

# **Das Strukturprotein SASH1 in der Tumorsuppression und der Pigmentierung – eine Näherung von der Maus zum Menschen**

Andreas Rudolf Sperlich

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Jürgen Ruland

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen
2. Prof. Dr. Dieter Saur
3. Priv.-Doz. Raquel Mejias-Luque, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 04.07.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 13.03.2024 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Summary</b> .....	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1 SASH1 und dessen vielseitige Rolle in pathophysiologischen Vorgängen.....	8
1.2 Gezielte Genmodifikation in Mäusen und der <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> <i>Gene Trap</i> von Sv129-Mäusen als Mausmodell zur Tumorentstehung .....	11
1.3 Der <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> <i>Gene Trap</i> von C57Bl/6N-Mäusen als vorklinisches Modell zur Hypopigmentierung .....	13
1.4 Prognostische und prädiktive Biomarker in kolorektalen Karzinomen: Kombination genetischer Biomarker wie <i>SASH1</i> und tumorinfiltrierender T-Lymphozyten .....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden .....	24
2.1.1 Isolation genomischer DNA.....	24
2.1.2 RNA-Isolierung, reverse Transkription und qRT-PCR .....	24
2.1.3 Genotypisierung von <i>Sash1</i> <sup>RF<math>\Delta</math>Hy</sup> -Mäusen.....	25
2.1.4 Zellfraktionierung .....	26
2.1.5 Photometrische Bestimmung des Melaningehalts von MelJuSo-Zellen.....	27
2.1.6 Sequenzierung des mit dem CRISPR/Cas9-System veränderten <i>SASH1</i> -Lokus .....	27
2.1.7 Massenspektrometrisches Screening von Sash1 in <i>Sash1</i> <sup>RF<math>\Delta</math>Hy</sup> -Mäusen.....	27
2.2 Zellbiologische Methoden .....	28
2.2.1 Zellkultur .....	28
2.2.2 Lipid-vermittelte Transfektion .....	28
2.2.3 Generierung von <i>SASH1</i> -Knockout MelJuSo-Zellen .....	28
2.2.4 Zellproliferationsassay .....	29
2.2.5 Transwell Migrationsassay und Invasionsassay .....	29
2.2.6 Wundheilungs-Assay .....	30
2.3 Immunologische Methoden und Mikroskopie .....	30
2.3.1 Zelllyse und Immunoblot .....	30
2.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	31
2.3.3 Live Cell Imaging .....	31
2.3.4 Erhebung tumorinfiltrierender T-Lymphozyten in Gewebeschnitten.....	32
2.3.5 Zählung intrazellulärer Melanosomen der Melanomzelllinie MelJuSo .....	32
2.3.6 Co-Immunpräzipitation .....	32
2.4 Tiermodell .....	33
2.5 Analyse humaner Gewebeproben .....	33
2.6 Statistische Methoden .....	34
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1 Abschnitt I: Das <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> -Mausmodell im Kontext der Tumorbiologie.....	35

3.1.1 Knockout durch ein <i>Gene Trap</i> Verfahren: Analyse der veränderten <i>Sash1</i> -Expression in verschiedenen Geweben .....	35
3.1.2 Lebensfähige <i>Sash1</i> -defiziente Mäuse mit Nachkommen nach den Mendelschen Regeln .....	40
3.1.3 Systematische Erfassung des Tumorphänotyps von <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> -Mäusen im genetischen Hintergrund Sv129 .....	42
3.1.4 Überrepräsentation weiblicher Mäuse in der Tumoprävalenz und translationaler Vergleich der Situation beim Menschen .....	47
3.2 Abschnitt II: Das <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> -Mausmodell im Kontext der Pigmentbiologie .....	50
3.2.1 Qualitative Beschreibung des Phänotyps .....	50
3.2.2 Entwurf eines <i>in vitro</i> Modells: CRISPR/Cas9-vermittelter <i>SASH1</i> -Knockout in der Melanomzelllinie MelJuSo .....	52
3.2.3 <i>SASH1</i> -Knockout in MelJuSo ohne Einfluss auf die Migration oder Proliferation.....	54
3.2.4 <i>MITF</i> -Expression in MelJuSo Wildtyp- und <i>SASH1</i> -Knockout-Zellen und Expression wichtiger Schlüsselenzyme der Melanogenese in murinen Hautproben .....	57
3.2.5 <i>SASH1</i> -unabhängige Melaninproduktion in MelJuSo-Zellen und Erhöhung der Anzahl intrazellulärer Melanosomen .....	59
3.2.6 Ineffizienter intrazellulärer Transport der Melanosomen und reduzierte Polarität innerhalb der MelJuSo- <i>SASH1</i> -Knockouts.....	64
3.2.7 Reduzierung des intrazellulären Melaningehalts nach Restituierung der <i>SASH1</i> -Expression in <i>SASH1</i> -defizienten MelJuSo-Zellen.....	66
3.2.8 Potenzieller Einfluss einer <i>SASH1</i> -Defizienz auf die Exozytose und EXOC8 als mutmaßlicher neuer Interaktionspartner von <i>SASH1</i> .....	68
3.2.9 <i>EXOC8</i> -Knockdown in Wildtyp-MelJuSo-Zellen und dessen Auswirkung auf die Exozytose .....	71
3.3 Abschnitt III: <i>SASH1</i> als genetischer Biomarker sowie Erweiterung um tumorinfiltrierende T-Lymphozyten zur Vorhersage rekurrenter Metastasen im Stadium III humaner Kolonkarzinome.....	74
3.3.1 PatientInnenkollektiv .....	74
3.3.2 Tumorinfiltrierende CD3- und CD8-positive T-Lymphozyten als prognostische und prädiktive Biomarker in humanen Kolonkarzinomen des UICC-Stadiums III .....	76
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>81</b>
4.1 Das <i>Sash1</i> -defiziente Mausmodell und sein Tumorphänotyp als Chance für translationale Analysen .....	81
4.2 Einfluss von <i>SASH1</i> auf die Pigmentierung durch Beeinträchtigung des interzellulären Melanintransfers.....	86
4.3 Prognostische und prädiktive Biomarker in Kolonkarzinomen des UICC-Stadiums III: Expression von <i>SASH1</i> und tumorinfiltrierende T-Lymphozyten.....	95
<b>5. Literatur .....</b>	<b>98</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>114</b>
6.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen .....	114
6.2 Materialien.....	119
6.3 Abbildungsverzeichnis .....	125
6.4 Tabellenverzeichnis.....	126

7. Publikationen ..... 128

8. Danksagung ..... 129

## Abkürzungen und Gennamen

5-FU	5-Fluorouracil
6-4-DPP	6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
Akt	Protein Kinase B
APC	Adenomatous polyposis coli
ASIP	Agouti Signal Protein
bp	Basenpaare
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cas9	CRISPR-associated 9
c-KIT	KIT Proto-Onkogen Rezeptor Tyrosin Kinase
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
CRKL	V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog (Like) protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCT	Dopachrom-Tautomerase
DSH	Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria
DUH	Dyschromatosis Universalis Hereditaria
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAP2K2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2
MART1	Melanoma Antigen Recognized by T-cells
MC1R	Melanocyte Stimulating Hormone Receptor 1
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2
MITF	Microphthalmia-Transkriptionsfaktor
MLH1	MutL Homolog 1, Colon Cancer, Nonpolyposis Type 2
MMTV	mammary-specific Promotors
NLS	Nucleur localization signal

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PKA	Proteinkinase A
PMEL17	Typ 1 Transmembranprotein des Silver-Locus
POMC	Proopiomelanocortin
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAB27a	Ras-Related Protein Rab-27A
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
ROSAFARY	Reverse Orientation Splice Acceptor for Array
ROSA $\beta$ -gal	Reverse-Orientation-Splice-Acceptor $\beta$ gal
SAM	sterile $\alpha$ -motif
SASH1	SAM- and SH3-domain containing 1
SCC	Squamous cell carcinoma
SH3	Src-homology 3
SLy	SH3 domain containing protein expressed in Lymphocytes (SASH3 gene)
SNAREs	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins receptors
THBS1	Thrombospondin 1
TIL	Tumorinfiltrierende (T-)Lymphozyten
TYR	Tyrosinase
TYRP1	Tyrosinase-Related Protein 1
vHRAS	Viral Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast-double hybrid system (Hefebasiertes-Zweikomponenten-System)
$\alpha$ -MSH	Alpha-Melanozyten-Stimulierendes Hormon
$\beta$ gal	Beta-Galactosidase

## Summary

*SASH1* is considered to be a tumor suppressor in various solid tumor entities and potentially influences various (patho-)physiological processes such as epithelial-mesenchymal transition, apoptosis or gene regulation. In this context, there is increasing evidence that germline mutations in *SASH1* are associated with human pigmentary disorders, although the exact mechanism has not yet been elucidated. In this work, we first describe the *Sash1*<sup>RFΔHy</sup> mouse model, which presents different phenotypes depending on the genetic background. Insertion of a gene trap vector into the *Sash1* locus resulted in significantly reduced expression of *Sash1* at the transcript level in different tissues in both hetero- and homozygous animals. In proteomic analysis of brain tissues, the level of Sash1 was highly significantly reduced, but peptides of the protein continued to be detectable at low abundance. Underscoring its role as a tissue-spanning tumor suppressor, *Sash1*-deficient mice in the Sv129 background showed a highly significant increase in the number of tumors in various organ systems (including lung, intestine, skin) than their littermates. This allowed translation of the observation of higher tumor incidence and earlier age of onset of disease in female mice to humans: in alignment with published TCGA data, significantly more females are affected by tumors with a *SASH1* deletion than males. After backcrossing to the C57Bl/6N background, *Sash1*<sup>RFΔH</sup> mice with a dilute phenotype possessed a homogeneous gray coat color. To investigate the role of *Sash1* in pigmentation, *SASH1*-deficient human melanoma cells were generated using the CRISPR/Cas9 system. Here, *SASH1* deficiency did not affect migration, proliferation, or melanogenesis, but did affect their ability to exocytosis. The absence of *SASH1* caused an accumulation of intracellular melanin, whereas exogenous *SASH1* expression could remedy this effect. Mechanistically, a previously unknown interaction of *SASH1* with EXOC8 involved in exocytosis was demonstrated and suggested as a mechanism for the observed dilute phenotype in homozygous *Sash1*<sup>RFΔH</sup> mice. Furthermore, the prognostic and predictive power of *SASH1* expression for predicting recurrent metastases in stage III human colon carcinomas was investigated. Although *SASH1* expression was significantly reduced at the mRNA level compared with normal tissue, metastasis-free survival analyses revealed a group of patients with high *SASH1* expression who had a significantly higher risk of distant metastases. In summary, the present work used cell-based and murine models, as well as studies of human tumor samples, to demonstrate a functional contribution of *SASH1* in tumorigenesis and pigmentation.

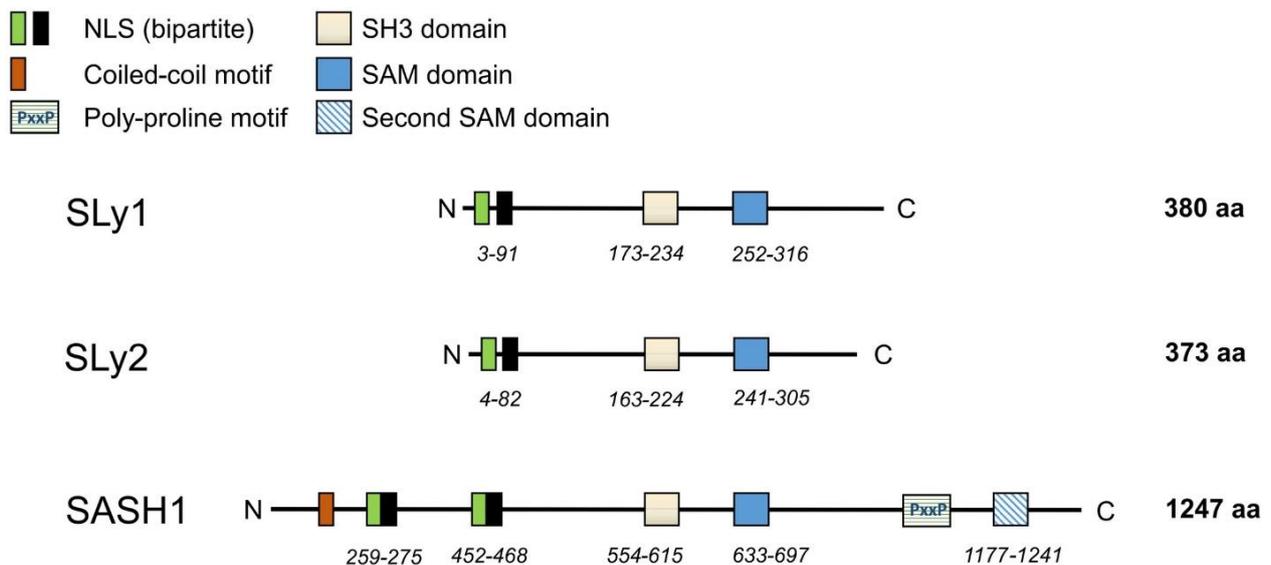
## Zusammenfassung

*SASH1* gilt als Tumorsuppressor in verschiedenen soliden Tumorentitäten und besitzt potenziell Einfluss auf verschiedene (patho-)physiologische Vorgänge wie etwa der Epithelial-mesenchymalen Transition, der Apoptose oder der Genregulierung. Dabei mehren sich die Hinweise, dass Keimbahnmutationen in *SASH1* mit humanen Pigmentstörungen assoziiert sind, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht geklärt ist. In dieser Arbeit wird das *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mausmodell erstbeschrieben, welches je nach genetischem Hintergrund unterschiedliche Phänotypen präsentiert. Die Insertion eines *Gene Trap* Vektors in den *Sash1*-Lokus führte sowohl in heterozygoten als auch homozygoten Tieren zu signifikant reduzierter Ausprägung von *Sash1* auf Transkriptebene in verschiedenen Geweben. In der Proteomanalyse von Gehirngewebe war der Gehalt an *Sash1* zwar hochsignifikant reduziert, Peptide des Proteins in niedriger Abundanz jedoch weiter nachweisbar. Die Rolle als gewebeübergreifender Tumorsuppressor unterstreichend entwickelten *Sash1*-defiziente Mäuse vor dem Sv129-Hintergrund hochsignifikant mehr Tumore in verschiedenen Organsystemen (u.a. Lunge, Darm, Haut) als ihre Wurfgeschwister. Dabei war eine Translation der Beobachtung einer höheren Tumorinzidenz und einem früheren Erkrankungsalter weiblicher Mäuse auf den Menschen möglich: Nach Abgleich mit den publizierten TCGA-Daten sind signifikant mehr Frauen von Tumoren mit einer *SASH1-Deletion* betroffen als Männer. Nach Rückkreuzung auf den C57Bl/6N-Hintergrund besaßen *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäuse mit einem *dilute*-Phänotyp eine homogen grauen Fellfarbe. Um die Rolle von *Sash1* in der Pigmentierung zu untersuchen, wurden mittels des CRISPR/Cas9-Systems *SASH1*-defiziente humane Melanomzellen erstellt. Die *SASH1*-Defizienz hatte dabei keinen Einfluss auf die Migration, Proliferation oder Melanogenese, jedoch auf deren Fähigkeit zur Exozytose. Das Fehlen von *SASH1* verursachte eine Akkumulation von intrazellulärem Melanin, wobei durch exogene *SASH1*-Expression dieser Effekt behoben werden konnte. Mechanistisch konnte eine bisher unbekannte Interaktion von *SASH1* mit dem an der Exozytose beteiligten EXOC8 gezeigt und als Mechanismus für den beobachteten *dilute*-Phänotyp in homozygoten *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen vorgeschlagen werden. Weiterhin wurde die prognostische und prädiktive Vorhersagekraft der *SASH1*-Expression in Bezug auf rezurrenente Metastasen im Stadium III humaner Kolonkarzinome untersucht. Obwohl die *SASH1*-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zum Normalgewebe signifikant reduziert war, zeigte sich bei den Metastasen-freien Überlebenszeitanalysen eine Gruppe an PatientInnen mit hoher *SASH1*-Expression, die ein signifikant höheres Risiko für Fernmetastasen aufwies. Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe zellbasierter und muriner Modelle sowie durch Untersuchungen humaner Tumorproben ein funktioneller Beitrag von *SASH1* bei der Tumorentstehung und Pigmentierung nachgewiesen werden.

# 1. Einleitung

## 1.1 SASH1 und dessen vielseitige Rolle in pathophysiologischen Vorgängen

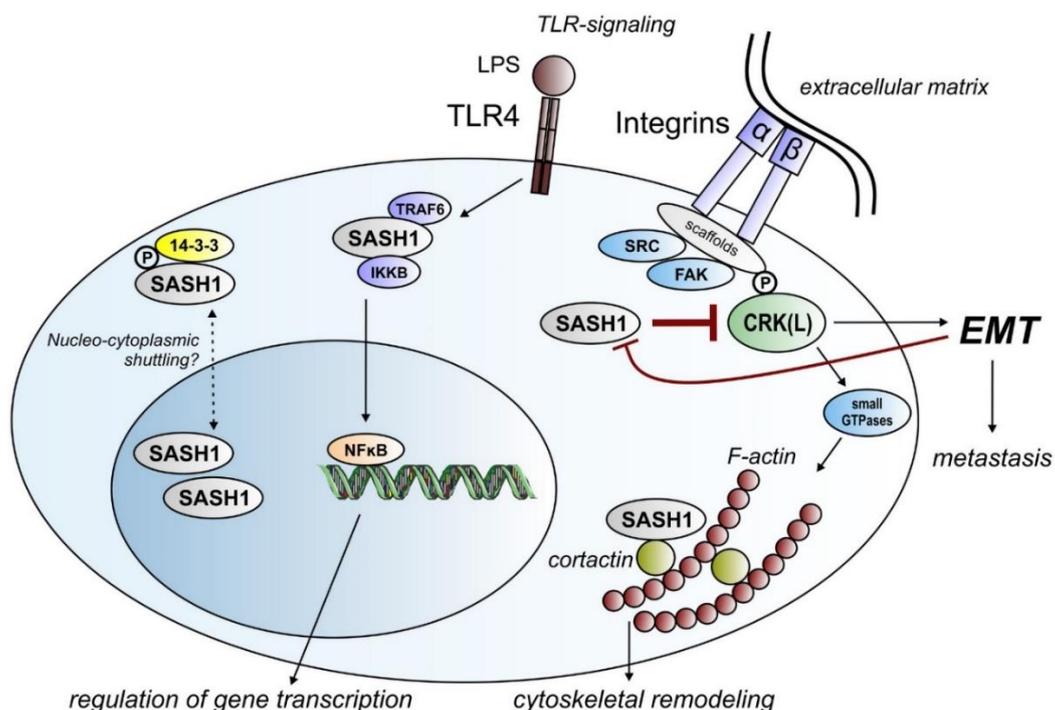
Das humane Gen *SAM- and SH3-domain containing 1* (*SASH1*) befindet sich auf Chromosom 6q24.3, umfasst 20 Exons und hat eine Größe von 201 kbp. Durch alternatives Spleißen existieren zwei Varianten an *SASH1*-Transkripten, die sich in der untranslatierten Region am 3'-Ende unterscheiden [1]. Aufgrund der Ähnlichkeit bezüglich der beinhalteten Domänen zählt *SASH1* zur Familie der SLy-Proteine und ist mit 1247 Aminosäuren der größte Vertreter dieser Gruppe. *SASH1* ist ein Gerüst-, Signal- und Adapterprotein, das zwei sterile  $\alpha$ -motif Domänen (SAM), eine Src-Homologie-Domäne 3 (SH3), eine N-terminale coiled-coil Domäne sowie eine C-terminale prolinreiche Region umfasst [2]. Die Primärstruktur von *SASH1* wurde hier unter Zuhilfenahme der RCSB Protein Data Bank (UniProt-Eintrag: O94885) beschrieben. *SASH1* ist dabei eines der wenigen Proteine mit zwei SAM-Domänen, die etwa 400 Basenpaare getrennt voneinander vorliegen [3]. Weiterhin beinhaltet *SASH1* zwei nukleäre Lokalisierungssignale (NLS), die für den Zellkernimport verantwortlich sind. Eine C-terminale Deletion des Proteins führte in Versuchen mit *SASH1*-Fragmenten zu einer Akkumulation von *SASH1* im Zellkern, bei einer zielgerichteten Invalidation der NLS durch Punktmutationen war der Import in den Zellkern hingegen blockiert [4].



**Abbildung 1: Schematische Proteinstruktur von SASH1, SLy1 und SLy2.** Die Proteine der SLy/SASH1-Familie sind Adapterproteine und ähneln sich in drei hochgradig homologen Domänen: der zweiseitigen Kernlokalisierungssequenz (NLS) sowie einer zentralen SH3- und einer SAM-Domäne, welche die Adapterfunktion ermöglichen (Abb. übernommen aus [5]).

*SASH1* wurde erstmals 2003 als potenzieller Tumorsuppressor in Brustkrebs beschrieben und zeigt eine breite Expression in verschiedenen Geweben, ausgenommen der T-Lymphozyten ([6, 7]). Neben den vielfältigen Expressionsmustern sind für *SASH1* auch mehrere Interaktionspartner

beschrieben. Diese Kombination lässt die verschiedenartigen (patho-)physiologischen Funktionen als Gerüst-, Signal- und Adapterprotein erahnen. Zum einen konnte eine Assoziation von SASH1 mit dem F-Aktin Zytoskelett gezeigt werden, wonach das Onkoprotein Cortactin mit SASH1 interagiert. Eine erhöhte *SASH1*-Expression stimuliert demnach die Polymerisierung von Aktinfilamenten, Zell-Matrix Adhäsion und hemmt die Zellmigration [2]. Ebenso weisen mehrere Studien darauf hin, dass eine erhöhte *SASH1*-Expression pro-apoptotische Eigenschaften besitzt. Nach Überexpression von *SASH1* in humanen Gliom-Zellen, Lungenkrebszellen und Zellen eines Osteosarkoms zeigten sich erhöhte Raten von apoptotischen Zellen [8-10]. Auch bei der durch äußere Stimuli verursachten Apoptose – wie die Behandlung von Zellen mit Chloropyramin und 4-Hydroxytamoxifen – konnte eine erhöhte Expression von *SASH1* nachgewiesen werden [11, 12]. In einer Studie mit PatientInnen, die an einer akuten ischämischen Nierenschädigung erkrankten, konnte mittels Single-cell RNA-Sequenzierung eine erhöhte *SASH1*-Expression in den (pro-) apoptotischen Zellen der proximalen Tubuli der Betroffenen nachgewiesen werden [13]. Eine reduzierte *SASH1*-Expression hingegen führte zu einer erhöhten Migration und Proliferation in verschiedenen *in vitro* Versuchen zu unterschiedlichen Tumorentitäten, wie etwa im Lungenkarzinom, Sarkom, Melanom, Schilddrüsenkarzinom, oder Zervixkarzinom [9-11, 14-16].



**Abbildung 2: Funktionen von SASH1.** SASH1 pendelt – ähnlich wie SLY1 und SLY2 – zwischen Nucleus und Zytoplasma. Obwohl der subzelluläre Transport noch nicht genau bekannt ist, wird 14-3-3 Proteinen eine wichtige Rolle dabei zugeschrieben, phosphoryliertes SASH1 im Zytoplasma zu halten. Nach Aktivierung des TLR4-Signalwegs durch Lipopolysaccharide (LPS) fungiert SASH1 mutmaßlich als Adapterprotein und bindet das proinflammatorische *TNF receptor-associated factor* (TRAF) 6 sowie den auf NFκB inhibitorisch wirkenden IKKB-Komplex. SASH1 interagiert außerdem mit Cortactin, dem wichtigsten Regulator der Aktin-Dynamik, und ist so an der Zellmorphologie und am Aktinumbau beteiligt. Durch eine Interaktion mit *V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog (Like) Protein* (CRKL) stört SASH1 die CRKL-vermittelte SRC/FAK-induzierte epithelial-mesenchymale Transition (EMT). (Abb. übernommen aus [5])

Weitergehende Befunde zu diesem Thema wurden in unserer Arbeitsgruppe erhoben, die einen Zusammenhang zwischen einem genomischen *SASH1*-Verlust und der daraus resultierenden Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) tumoröser Zellen (und damit einen Treiber der Entwicklung von Metastasen) erkannten. Diesen Effekt vermittelt eine erstmals mittels Co-Immuno- präzipitation, *Yeast-double hybrid system* (Y2H) und Massenspektrometrie nachgewiesene Interaktion von *SASH1* mit dem V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog (Like) protein (CRKL) durch eine Bindung am prolinreichen C-terminalen Ende von *SASH1* mit der N-terminalen SH3-Domäne von CRK(L) [4, 17]. Diese Erkenntnisse liefern einen wichtigen mechanistischen Ansatz für die bisher schon oft beobachtete schlechtere Prognose in Zusammenhang mit einer *SASH1*-Defizienz verschiedenster Krebsentitäten wie etwa von Kolorektalen Karzinomen, Gliomen, hepatozellulären Karzinomen, Magenkarzinomen sowie von spinozellulären Karzinomen [7, 8, 18-21]. Im Speziellen konnte unsere Arbeitsgruppe – und nicht zuletzt die vorliegende Arbeit – die klinische Bedeutung des Verlusts von *SASH1* bei kolorektalen Karzinomen aufzeigen und das damit einhergehende reduzierte Überleben aufgrund der Bildung metachroner Fernmetastasen [7, 18, 22]. Eine breite Gewebsexpression von *SASH1* in Kombination mit der Affinität zu Proteinen verschiedenster Signalwege und Zellstrukturen deuten bereits eine Vielzahl von möglichen Beteiligungen an pathophysiologischen Vorgängen an. So wurde in den atherosklerotischen Plaques der Karotiden von RaucherInnen eine erhöhte *SASH1*-mRNA-Expression mit einer negativ regulierten Migration, Proliferation und Angiogenese humaner Aortenendothelzellen in Verbindung gebracht. Ausgehend davon wurde auf einen protektiven Effekt der *SASH1*-Überexpression zur Hemmung dieser Mechanismen und damit der Atherosklerose in RaucherInnen geschlossen [23]. Zudem konnte in RaucherInnen eine positive Assoziation zwischen der mRNA-Expression von *SASH1* von im Blut zirkulierenden Monozyten und dem Ausbilden atherosklerotischer Plaques gezeigt werden [24]. Der kausale Zusammenhang scheint hier eine hypermethylierte Genregion zu sein, die in RaucherInnen zu einer erhöhten Expression der *SASH1*-mRNA führt [25]. Zur Vollständigkeit sei hier erwähnt, dass die *SASH1*-mRNA-Expressionsmuster ehemaliger RaucherInnen denen von nicht rauchenden ProbandInnen ähnelten und der oben genannte Effekt sowie die Methylierung reversible Prozesse sein können [23, 26]. Neben den hier aufgeführten Vorgängen sind Funktionen von *SASH1* auch in weiteren Zusammenhängen, wie etwa der Pigmentierung oder der Lungenreifung, beschrieben. Diese werden in den folgenden Absätzen bei der Einführung des *Sash1*-Mausmodells erläutert.

## 1.2 Gezielte Genmodifikation in Mäusen und der *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup> Gene Trap von Sv129-Mäusen als Mausmodell zur Tumorentstehung

Neoplastische Erkrankungen entstehen aus der Disparität mehrerer pathophysiologischer Prozesse, wie etwa dem Umgehen von Wachstumssuppressoren und dem Widerstand gegen den Zelltod, einer gesteigerten Angiogenese und erhöhtem invasiven und migratorischen Verhalten von Zellen, vermehrter Aktivität pro-proliferativer Signalwege oder einer ungehemmten Replikation bei der Zellteilung [27, 28]. Vereinfacht gesagt können Gene, die diese Prozesse vorantreiben, als Onkogene und Gene, welche diese Prozesse hemmen, als Tumorsuppressorgene bezeichnet werden. Wie oben bereits angedeutet scheint *SASH1* gleich in mehrere dieser Prozesse involviert zu sein und hemmt beispielsweise die Proliferation und Migration (maligner) Zellen sowie die Bildung von Metastasen [2, 4]. Die Entstehung maligner Tumore ist also ein mehrschrittiger und vielschichtiger Prozess, wodurch die Schwierigkeit einzelne Einflüsse trennscharf zu bestimmen deutlich erhöht wird. Um die Bedeutung einzelner Suppressoren oder Onkogene zu klären, bedarf es einfacherer Ansätze, beispielsweise *in vitro* Studien oder auch *in vivo* Modelle. Ein Vorgehen, welches diese beiden Methoden vereinfacht zusammenfasst, wäre die sogenannte Inokulation oder Xenotransplantation von malignen humanen Krebszelllinien in immundefiziente Mäuse, wie dies etwa in präklinischen Therapiestudien praktiziert wird, um die Effizienz neuer Krebsmedikamente zu testen [29]. Dabei werden allerdings nicht die Morphologie, die Vaskularisierung und genetische Heterogenität menschlicher Krebserkrankungen widergespiegelt, sodass diese Modelle das Ansprechen auf die Therapie meist überschätzen [30, 31]. Im Gegensatz zum genannten Inokulationsmodell haben transgene Mausmodelle – zum Beispiel Knock-in oder Knockout Strategien – den entscheidenden Vorteil, den Einfluss von Keimbahnmutationen auf die Tumorentstehung nachvollziehen zu können. Als Beispiel sei hier das 1987 veröffentlichte erste Knock-in Mausmodell des Onkogens vHRas angeführt, welches durch transgene Expression und unter Kontrolle des mammary-specific Promotors (MMTV) eine Anfälligkeit der Mäuse für die Entwicklung von Mammatumoren zur Folge hatte [32]. Im Gegensatz hierzu stellt das *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell ein Tumorsuppressorgen Knock-out Modell dar, welches mit Hilfe einer *Gene Trap* (Genfallen) Methode kreiert wurde. Diese Methode wurde in etwa zur selben Zeit beforscht wie die oben erwähnte Knock-in Methode und trug vor allem in der Entwicklungsbiologie zur Entdeckung neuer Gene beziehungsweise deren Funktionen bei [33]. Auch für die Tumorbilogie liefert dieses Verfahren interessante Ansätze, da durch das Unterbrechen der Genfunktion der Verlust oder die Herunterregulierung von Allelen mit tumorsuppressiver Wirkung in Tiermodellen nachempfunden werden kann [34]. In dieser Arbeit wurde eine Variante des gene-trapping verwendet, die neben einer Promoter-Falle noch eine PolyA-Falle (PolyA-trap) aufweist. Am 5'-Ende befindet sich somit ein Spleißakzeptor und das Reportergen  $\beta$ -Galactosidase in Abwesenheit eines Promoters, welches die Expression des Zielgens beziehungsweise dessen Promotoraktivität widerspiegelt. Als zweite transkriptionelle Einheit (PolyA-trap) trägt der Vektor

einen internen Promotor, der die Expression eines Resistenzmarkers ohne eigenes polyA-Signal antreibt, gefolgt von einem Spleißdonor. [35]  $\beta$ -Galactosidase ist ein Enzym, das durch hydrolytische Spaltung den Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) in das blaue 5-Brom-4-Chlorindigo überführt [36]. Die beschriebene *Gene Trap* Kasette wurde in umgekehrter Orientierung in einen retroviralen Vektor kloniert, sodass das gesamte Konstrukt ursprünglich als Reverse-Orientation-Splice-Acceptor- $\beta$ gal (ROSA $\beta$ -gal) bezeichnet wurde [37]. Dieser Ansatz wurde später weiter verfeinert, um für eine weiterführende Studie die Klonierungseffizienz zu steigern und für cDNA-Microarrays längere cDNA-Abschnitte zu erhalten, was in den aktualisierten retroviralen ROSAFARY (Reverse Orientation Splice Acceptor for Array) *Gene Trap* Vektor mündete [38]. Diese Modelle imitieren Keimbahnmutationen, die zwar einen erheblichen Anteil an (hereditären) malignen Neoplasien ausmachen, jedoch werden in diesem experimentellen Rahmen somatische Mutationen außer Acht gelassen, die in einem ansonsten gesunden Organ akkumulieren und in der Mehrzahl aller Fälle zur Tumorentstehung beitragen [31]. Wie oben bereits ausgeführt sind Prozesse der Tumorentstehung in der Regel komplex und erfordern vereinfachte Modelle und Ansätze. Aufgrund der hohen Nukleotid- und Aminosäurekonservierung zwischen humanem und murinem *SASH1* von 85% sollte ein Mausmodell daher ein wertvolles Werkzeug für die Untersuchung verschiedener (maligner) Phänotypen wie der Tumorgenese sein [5]. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit der ROSAFARY *Gene Trap* verwendet, um den Verlust von *Sash1* in einem *in vivo* Modell nachzuahmen. Durch die retrovirale Insertion einer Poly(A) *Gene Trap* Kasette in der 5'-Region des Gens wird die Transkription nach den ersten beiden Exons von *Sash1* und dem inserierten Reportergen an der Polyadenylierungssequenz terminiert, was zur Expression eines funktionslosen trunkierten Fusionsproteins führt [38].

Die Auswirkungen des Knockouts auf die Lebensfähigkeit und Entwicklung der Mäuse sowie die Tumorentstehung soll unter anderem in dieser Arbeit diskutiert werden. Ein solches *Gene Trap* Modell kann abhängig vom jeweiligen Kontext wie etwa der verwendeten Methode oder des Mausstamms mehrere Forschungsfragen gleichzeitig beantworten, aber auch neue Desiderate eröffnen, was im Folgenden deutlich werden soll.

### 1.3 Der *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup> Gene Trap von C57Bl/6N-Mäusen als vorklinisches Modell zur Hypopigmentierung

Die ersten Hinweise, dass *SASH1* an pathologischen Prozessen der Pigmentierung beteiligt sein könnte, lieferten Studien zu Erkrankungen, wie etwa Dyschromatosis Universalis Hereditaria (DUH) und Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria (DSH). Diese Pathologien weisen eine abnormale Verteilung von Hautmelanozyten auf, bei denen die PatientInnen hyper- und hypopigmentierte Makulä (in der Gesamtheit auch als Lentiginos bezeichnet) aufweisen, die Gesicht, Rumpf und Extremitäten bedecken. Zhou et al. bringt den Pigmentierungsphänotyp von drei nicht-konsanguinen Familien mit drei heterozygoten Mutationen in Verbindung, die im *SASH1*-Lokus der Betroffenen Aminosäuresubstitutionen verursachten. Hautschnitte bei einem der Patienten zeigten eine höhere Anzahl von Melanozyten in basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis im Vergleich zu normaler Haut, was die Autoren auf ein erhöhtes Migrationsverhalten von Melanozyten in die Epidermis schließen lässt [39]. In ähnlichen Studien wurden weitere Punktmutationen der Keimbahn im *SASH1*-Genlokus gefunden, die mit ähnlichen Phänotypen wie Genodermatosen oder Pigmentierungsstörungen wie DSH und DUH assoziiert sind [40-45]. Interessanterweise befinden sich die Mehrzahl der in Fallstudien beschriebenen Mutationen in der konservierten zentralen Region, die allen Mitgliedern der *SLy*-Familie gemeinsam ist [5, 46]. Allerdings veröffentlichten Courcet et al. einen Fallbericht von TrägerInnen einer *SASH1*-Punktmutation, die nicht in der zentralen *SLy*-Region lokalisiert ist und Pigmentierungsstörungen mit zusätzlicher Alopezie, palmoplantare Keratodermie, brüchige Zähne und multiple rezidivierende spinözelluläre Karzinome (SCC) der Haut verursacht [47]. Mit Verweis auf vorhergehende Ausführungen sei erwähnt, dass diese Krebsentität der Plattenepithelien unter dem Einfluss von *SASH1* und seiner bekannten tumorsuppressiven Funktion zu stehen scheint. Chen et al. führen hier den inhibitorischen Einfluss von *SASH1* auf die Akt-Signaltransduktion zur Tumorsuppression an und zeigen eine negative Korrelation von *SASH1*-Überexpression und Akt-Suppression [48].

Die ursächlichen zell- und entwicklungsbiologischen Mechanismen, die diese Pigmentierungsfehler verursachen, bleiben weiterhin unklar. Verschiedene Ansätze und Befunde werden diskutiert, darunter eine höhere Anzahl und Migration von Melanozyten und eine erhöhte epidermale Zellproliferation. Als Modell für diese komplexen Vorgänge in der Pigmentierung und Melanozytenbiologie wurden Melanomzelllinien wie A375-Zellen verwendet. Die erhöhte Migration von A375-Zellen könnte auf Veränderungen im Gas-SASH1-IQGAP1-E-Cadherin-Signalweg zurückzuführen sein, die zum Verlust von E-Cadherin führen [39, 40]. Weiterhin wurden eine p53-POMC-Gas-SASH1-autoregulatorische Rückkopplung beschrieben, bei der punktmutiertes *SASH1* zu erhöhten Levels von Proopiomelanocortin (POMC) und somit zu Pigmentierungsstörungen führen könnte [49], ebenso wie eine gegenseitige Beeinflussung von *SASH1* und MAP2K2, welche die ERK1/2/CREB-Kaskade über p53 reguliert [50]. Ein weiterer

beschriebener Mechanismus propagiert die Inaktivierung von TGF- $\beta$ 1 über die Herunterregulierung von *THBS1* aufgrund von mutiertem *SASH1*, was zu veränderter Melanozytenmigration und Melaninsynthese in PIG1-Zellen führen soll [51]. Dass *SASH1* in der Pigmentierung ein aktuell sehr volatiles Feld darstellt und stets neue Erkenntnisse zu ursächlichen Mutationen hinzukommen, wird auch an einer jüngeren Studie von Araki et al. deutlich, die von sechs japanischen PatientInnen mit Lentiginen fünf neue heterozygote Mutationen im *SASH1*-Lokus mittels Next-Generation-Sequencing identifizierten [52]. Punktmutationen in *SASH1* verursachen also autosomal-rezessive oder -dominante Genodermatosen und Pigmentierungsstörungen und unterstreichen damit die Funktion von *SASH1* in grundlegenden zellulären und molekularen Prozessen. In einem *in vivo* Experiment wurde versucht, die Funktion von *SASH1* in der Melanogenese zu untersuchen, indem eine bekannte menschliche *SASH1*-Punktmutation (Y551D) in BALB/cJ-Mäusen ausgeprägt wurde. Diese Mutation ist dafür bekannt, beim Menschen DUH zu verursachen und wurde mit Hilfe eines murinen *SASH1*-Vektors unter der Kontrolle seines Promotors in befruchtete murine Eizellen eingeführt. Die Autoren schlussfolgern, dass *SASH1* die Akkumulation des Transkriptionsfaktors MITF im Zellkern induziert und so den Signalweg der Melanogenese *in vivo* und *in vitro* reguliert [53].

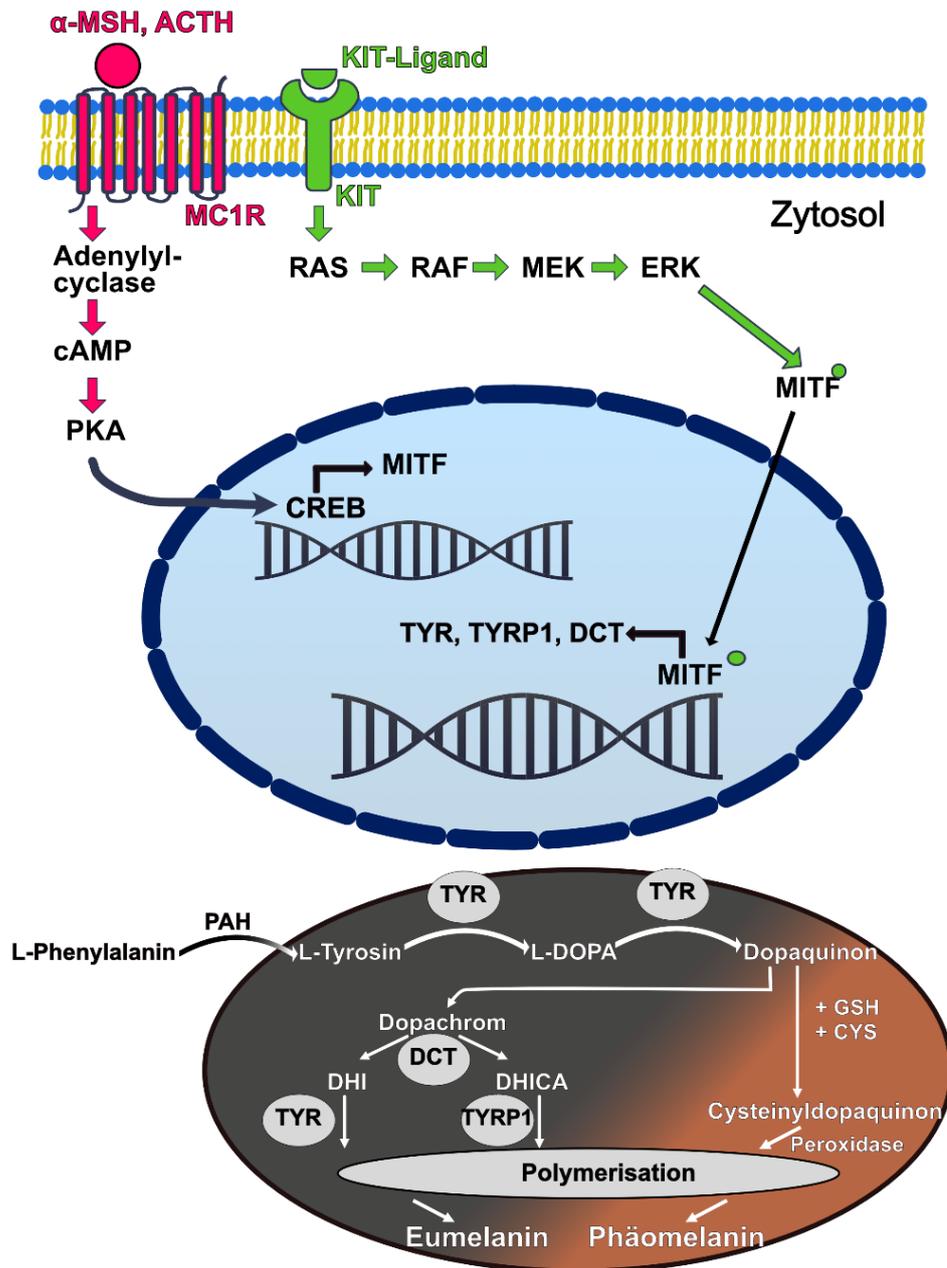
Ein Mausmodell zur Erforschung eines Pigmentierungsphänotyps zu Rate zu ziehen stellt allgemein einen interessanten Ansatz dar, da in der Vergangenheit bereits viele an der Pigmentierung beteiligte Genloci mit verschiedenen (Farb-)Phänotypen von Mausmodellen in Übereinstimmung gebracht werden konnten. Da der Locus den physischen Ort eines Gens auf dem jeweiligen Chromosom beschreibt und die experimentelle Genetik vor der Ära der Sequenzierung vor allem loss-of-function Modelle für die Forschung nutzte, wurden die deletierten Genloci mit dem neu entstandenen Phänotyp gleichgesetzt, auch wenn dieser Grad der Trennschärfe noch keine Kausalität zwischen einem Gen als Informationsabschnitt eines Proteins und dem phänotypischen Effekt unterscheidet. So werden – eher historisch – Phänotypen als *Ashen*, *Leaden*, *Brown*, *Agouti*, *Albino*, *Dilute*, *Pink-eye dilution* oder *Piebald* bezeichnet, wenn sie die entsprechende Fellfarbe oder den entsprechenden Pigmentdefekt aufweisen. Die aus den verschiedenen Loci abgeleiteten Gene beziehungsweise deren funktionelle Proteine wurden erst nachträglich mit den Phänotypen in Verbindung gebracht. [54] Die Anzahl der entdeckten Gene, die im Fall von Mutationen einen Einfluss auf die Fellfarbe haben, ist seitdem stetig gestiegen, sodass etwa 130 ursächliche Gene mit circa 1000 Allelen bei Mäusen bekannt sind [55]. Die verschiedenen biologischen Mechanismen, die hinter einer solchen Farbänderung stehen können, werden in einige wenige funktionelle Gruppen klassifiziert. Bennett und Lamoreux übernahmen und ergänzten eine Einteilung von W.K. Silvers Werk ‚The Coat Colors of Mice‘ 1979, die sich an die physiologischen Prozesse der Pigmentzellen sowie der Pigmentsynthese orientiert [56]. Demnach sind Fellfarbänderungen im Wesentlichen auf folgende Prozesse zurückzuführen:

- a) die embryonale Entwicklung der Neuralleiste mitsamt der Entstehung, Migration, Proliferation und Differenzierung der Melanoblasten;
- b) Enzyme und Komponenten der Melanosomen sowie
- c) die Regulation dieser und der Synthese von Melanin;
- d) das Einbinden und der Transport der melanosomalen Komponenten zu den Melanosomen selbst und
- e) der Transport der funktionalen Melanosomen zu den dendritischen Ausläufern der Melanozyten, wo diese
- f) zu umliegenden Keratinozyten weitergegeben und dort prozessiert werden [56].

Tomita et al. vereinfachen diese Auflistung der möglichen Einflussfaktoren beziehungsweise sehen diese eher unter dem Aspekt von pathologischen Syndromen, sodass obige Einteilung auch klinische Relevanz erhält. Demnach führen Störungen der Migration von Melanoblasten zum Waardenburg Syndrom, eine gestörte Bildung von Melanosomen in den Melanozyten zum Hermansky-Pudlak Syndrom, Störungen der Melaninsynthese in den Melanosomen zum Okulokutanen Albinismus und ein beeinträchtigter Transport der reifen Melanosomen zu den dendritischen Enden der Melanozyten zum Griscelli Syndrom [57].

Melanozyten entwickeln sich aus Vorläuferzellen (Melanoblasten) der Neuralleiste, besitzen ein hohes migratorisches Potential und befinden sich dementsprechend in den Geweben und Zellverbänden, die sich von der Neuralleiste ableiten [58]. So befinden sich Melanozyten entweder als Stammzellen an Haarfollikeln oder als deren differenzierte Nachfolger in der Basalschicht der Epidermis, in Augen, Fell, Federn oder Schuppen von Wirbeltieren [59]. Außerdem wurden Melanozyten beziehungsweise das daraus resultierende Melanin ebenfalls in den Meningen von Menschen und Mäusen beschrieben [60, 61]. Weiterhin wandern Melanoblasten während der Embryogenese in weitere Organe aus, wie etwa in die Cochlea, die Leptomeningen und ins Herz [62-64]. Die differenzierten Melanozyten der Epidermis proliferieren nur selten, während sich jene mit Stammzellcharakter an den Haarfollikeln beständig vermehren [65]. Neben der Thermoregulation ist der Schutz vor UV-Strahlung durch das produzierte Melanin die wichtigste Funktion der Melanozyten [66]. Die DNA der Haut und Hautanhangsgebilde absorbiert UV-B- (295-315 nm) und UV-A- (315-400 nm) Strahlung, die wiederum zu zellulären Schäden und strukturellen Veränderungen der DNA führt [67]. Dabei entstehen durch photochemische Reaktionen zwischen benachbarten Pyrimidinbasen zu 75% zyklische Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) Verbindungen und zu fast 25% nicht-zyklische 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4-PP) [68]. Diese Veränderungen führen über Basensubstitutionen von Cytosin und Thymin zu Mutationen und – ebenfalls beschrieben – zur lokalen Immunsuppression, wodurch kanzeröse Läsionen die Folge sein können [67]. Melanin, das Produkt der Melanozyten zum Schutz der Haut vor den genannten schädlichen Prozessen, wird von zelltypspezifischen, Lysosomen-ähnlichen Zellorganellen produziert: den Melanosomen. Dabei entstehen Einheiten von circa 36 Keratinozyten, die von einem Melanozyten mit Pigment

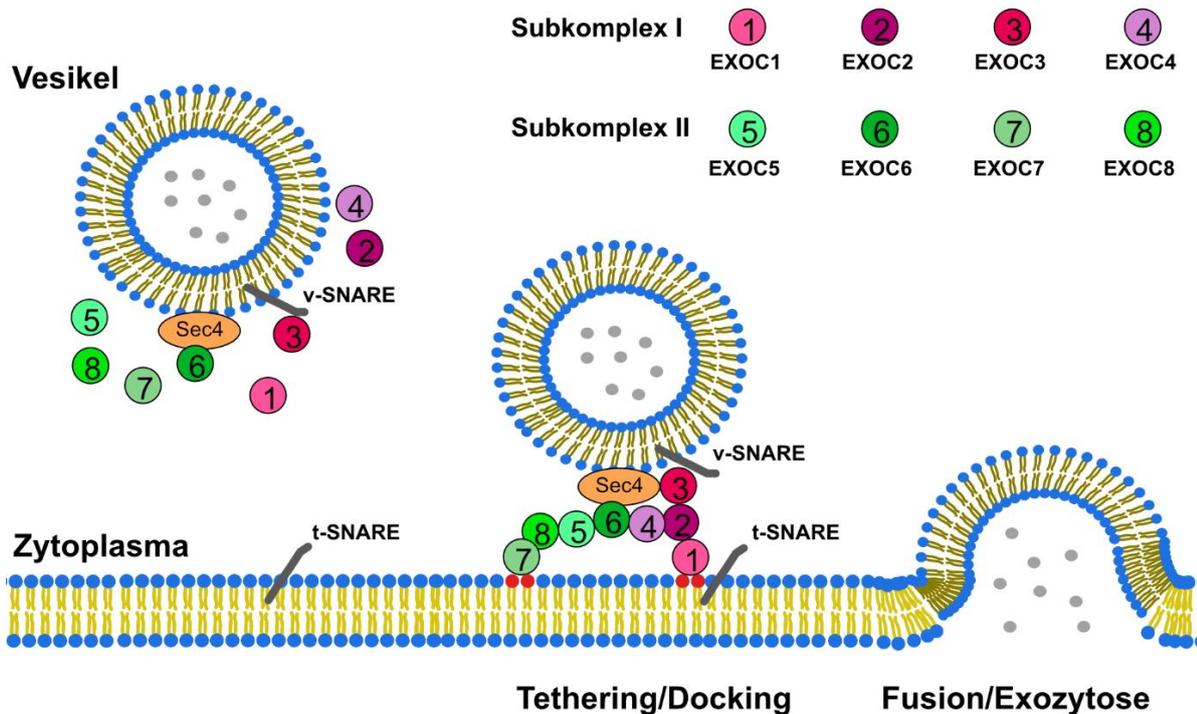
versorgt werden [69]. Im Wesentlichen unterscheidet man das rot/gelbe Phäomelanin und das braun/schwarze Eumelanin, die beide in den Melanosomen produziert und gespeichert werden [66, 70]. Für die Melanogenese innerhalb der Melanosomen werden zum einen die kritischen Substrate L-Tyrosin und L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) benötigt [71], zum anderen sind dafür bestimmte Enzyme notwendig. Das sind unter anderem Tyrosinase (TYR) zur Katalyse der entscheidenden geschwindigkeitsbeschränkenden Aktivität der Reaktion sowie das Tyrosinase-Related Protein 1 (TYRP1) und die Dopachrom-Tautomerase (DCT), deren Funktion die Quantität sowie die Qualität des Melanins beeinflussen. PMEL17 und MART1 hingegen sind wichtige Proteine, die für die Reifung der Melanosomen über vier Stadien hinweg benötigt werden [72]. Die genannten Proteine dienen zugleich als Gewebemarker für Melanozyten, wobei hier auch c-KIT, SOX10 und MITF zu nennen sind [73]. Zwei zentrale Signalwege bestimmen über die Expression des kritischen MITF die Melanogenese: die der Rezeptor-Tyrosinkinase c-KIT und jene des G-Protein gekoppelten Melanokortinrezeptors MC1R, welcher mit den vier weiteren Melanokortinrezeptoren (MC2R-MC5R) eine eigene Subgruppe bildet und an denen die Melanokortine alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) und das Adrenokortikotrope Hormon (ACTH) – Spaltprodukte des POMC – binden [74]. Letzterer Signalweg sei hier zuerst und ausführlicher erklärt, da sich Teile der vorliegenden Arbeit auf diese Kaskade beziehen.  $\alpha$ -MSH und ACTH entfalten eine agonistische Wirkung an den MC1R-Rezeptoren und führen sequentiell durch die Aktivierung des Gs-Proteins und der Adenylatzyklase zur Erhöhung von cAMP, der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und schließlich zur Phosphorylierung des cAMP responsive-element binding protein (CREB). CREB erhöht seinerseits die Transkription des entscheidenden Transkriptionsfaktors MITF. [75] Darüber hinaus verstärkt die durch die RAS-RAF-MEK-ERK Kaskade vermittelte Phosphorylierung des Ser73 von MITF dessen Transaktivierung [76]. Als Antagonist am MC1R-Rezeptor gilt das Agouti signaling protein (ASIP beim Menschen; ASP bei Mäusen), indem ASIP mit  $\alpha$ -MSH um die Bindung an MC1R konkurriert und deren Wechselwirkung um den bifunktionellen MC1R-Rezeptor für den individuellen Farbton von Säugetieren verantwortlich ist [77, 78].



**Abbildung 3: Signalkaskade der Melanogenese und deren Enzymreaktionen.** Abbildung verändert nach D'Mello et al. 2016, ergänzt um zusätzliche Informationen aus weiteren Publikationen [79-82]. Durch Bindung der Agonisten  $\alpha$ -Melanozyten-Stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) und Adrenokortikotropes Hormon (ACTH) am *Melanocyte Stimulating Hormone Receptor 1* (MC1R), bzw. des KIT-Liganden am Stammzellfaktor-Rezeptor (KIT) werden die Signalkaskaden abwärts der Rezeptoren aktiviert. Ersterer führt durch die Aktivierung einer Adenylylzyklase zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB) und damit zur vermehrten Expression des wichtigen Transkriptionsfaktors *Microphthalmia-Transkriptionsfaktor* (MITF). Die Translokation von MITF in den Nucleus wird wiederum durch Phosphorylierung über den MAPK-Signalweg RAS-RAF-MEK-ERK verstärkt. MITF steuert die Expression der Schlüssenzyme Tyrosinase (TYR), *Tyrosinase-related protein 1* (Tyrp1) und Dopachrom-Tautomerase (Dct). TYR katalysiert in den Melanosomen die initial wichtige Oxidation von L-Tyrosin zu L-DOPA und zu Dopaquinon, welches zu Dopachrom weiter oxidiert. Über die Moleküle 5,6-Dihydroxyindol-Carboxyl-Säure (DHICA) oder 5,6-Dihydroxyindol (DHI) folgen weitere Oxidationsschritte unter Einfluss von TYR oder Tyrp1 (in der Maus) und die Polymerisierung zu schwarzem Eumelanin. Ausgehend von Dopaquinon kann über Cysteinyl-dopaquinon das rötliche Phäomelanin entstehen.

Wie oben bereits angedeutet wird Melanin mit den dafür benötigten Substraten und Enzymen in Melanosomen hergestellt. Dabei entsteht, vermittelt durch die membrangebundene Tyrosinase, zuerst L-DOPA und sequentiell Dopaquinon [79]. Durch einen Redox-Austausch wird Dopaquinon zu Dopachrom oxidiert [83]. Dopachrom wird spontan decarboxyliert, wobei zum Großteil 5,6-Dihydroxyindol (DHI) und in einer Ratio von 70:1 5,6-Dihydroxyindol-Carboxyl-Säure (DHICA) entsteht und durch den Einfluss von DCT auch vermehrt DHICA gebildet wird [84]. Die weitere Oxidation von DHICA wird im Menschen durch die Tyrosinase und in der Maus von Tyrp1 katalysiert [85]. DHI wird durch die Tyrosinase weiter zu Indol-5,6-quinon und DHICA zu Indol-5,6-Quinon Carboxylsäure oxidiert (wobei beide Schritte auch durch eine Peroxidase katalysiert werden können) und schließlich entsteht durch weitere Polymerisation Eumelanin [80]. Ausgehend von Dopaquinon kann entweder, unter Konjugation von Glutathion, GlutathionylDOPA entstehen oder, unter Konjugation von Cystein, CysteinylDOPA. Beide werden jeweils unter Katalyse einer Peroxidase zu CysteinylDopaquinon reduziert und polymerisieren schließlich zu Phäomelanin [80, 86].

Die synthetisierten Melanosomen reifen innerhalb von vier Stadien von pigmentlosen Endo-/Lysosomen (Stadium I) über unreife Melanosomen (Stadien II und III) zu reifen Melanosomen (Stadium IV) [87]. Reife Melanosomen werden dann über die zelleigenen Transportorganellen zu den Zelldendriten befördert, wo diese dann an umliegende Zellen und Gewebe verteilt werden. Der genaue Ablauf dieser Translokation ist dabei nicht bis ins Detail geklärt, sodass einige Theorien von einem schnellen, bi-direktionalen, durch Mikrotubuli und Motorproteine wie Dyneine, Kinesine und Myosine vermittelten Transport der Melanosomen ausgehen [88-90]. Andere Arbeiten verweisen stattdessen auf ein Transportsystem, bei dem die Verteilung der Organellen durch das Gleichgewicht zwischen Mikrotubuli abhängigem, zentripetalem und Myosin-Va/Aktin abhängigem, zentrifugalem Transport bestimmt wird, wobei längere Strecken über Mikrotubuli, kürzere unidirektionale Wege über Aktin vermittelt werden [91]. Wie genau die Melanosomen schließlich die Zelle verlassen, ist bei weitem nicht so eindeutig geklärt, wie es die vermeintliche Simplizität der Frage vermitteln würde. Dabei werden mehrere Mechanismen diskutiert, die sich zudem jeweils zwischen Mensch und Maus zu unterscheiden scheinen: Die beiden wichtigsten Mechanismen sind dabei die des Ablösens/Abschnürens („Shedding“) von Vesikeln der Melanozyten und die Aufnahme durch Phagozytose in Keratinozyten sowie der Exozytose (Melanozyten) und Endozytose (Keratinozyten) [92]. Bei einer Variante des ersten Prozesses folgern die Autoren, dass Melanosomen über die Filopodien in Pigmentkügelchen konzentriert werden und sich diese dann mitsamt einer Zellmembranhülle von den Dendriten der Melanozyten abschnüren, von Keratinozyten phagozytiert und im perinukleären Raum verteilt werden [93]. Die Autoren räumen jedoch die Möglichkeit von weiteren ko-existierenden Transfermechanismen ein und können somit nicht ausschließen, dass nur ein Prozess an der Verteilung der Melanosomen beteiligt ist.



**Abbildung 4: Der Exocyst-Komplex und seine Funktion im Tethering.** Abbildung verändert nach Wu&Guo 2015 [94] und Mei&Guo 2018 [95], ergänzt um zusätzliche Informationen [96]. Zur Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran assoziieren sich diese zuvor durch sogenanntes *Tethering* und *Docking* an der Zellmembran. Diese Assoziierung übernimmt maßgeblich der Exocyst-Komplex, dessen Untereinheiten für diesen Prozess untereinander interagieren. Wichtige Funktionen übernehmen dabei folgende Proteine: EXOC6 interagiert mit dem Rab-Protein Sec4, welches seinerseits an Vesikeln bindet; EXOC3 bindet an v-SNARE Proteine, die ebenfalls mit den Vesikeln assoziiert sind. EXOC1 und EXOC7 verankern Vesikel über eine Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) (rote Punkte) der Zellmembran an eben jene. Anschließend erfolgt die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran und die Exozytose der Vesikel bzw. deren Inhalt.

Ein weiterer durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gestützter Mechanismus ist die Exozytose auf Seiten der Melanozyten durch Fusion der melanosomalen Membran mit der Zellmembran, ein Eintritt freier Melanosomen in den Extrazellulärraum und der Endozytose durch Keratinozyten [95, 97]. An der Exozytose ist unter anderem der Exocyst-Komplex beteiligt, welcher die zu sekretierenden Vesikel an die Plasmamembran bindet, bis die Fusion mit eben jener über *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins receptors* (SNAREs) initiiert wird [95]. Dies wird auch als *Tethering* oder *Docking* bezeichnet. Der Exocyst-Komplex besteht aus insgesamt acht Untereinheiten, die im engeren Sinne als EXOC1-8 benannt sind, jedoch werden auch andere Proteinamen anhand deren „Sec-“ oder „Exo-“ Namen verwendet: EXOC1 (= Sec3), EXOC2 (= Sec5), EXOC3 (= Sec6), EXOC4 (= Sec8), EXOC5 (= Sec10), EXOC6 (= Sec15), EXOC7 (= Exo70) und EXOC8 (= Exo84) [98]. Diese acht Proteine bilden schließlich zwei Subkomplexe, von denen sich EXOC1-4 zum ersten und EXOC5-8 zum zweiten Subkomplex ansammeln – ein Mechanismus, der von der Hefe bis zum Säuger hoch konserviert ist [96]. Beispielsweise zeigen Hefezellen mit Exocyst-Mutationen eine intrazelluläre Anhäufung von sekretorischen Vesikeln und Defekte in der Exozytose [95]. In Translation zu Säugetieren konnten beispielsweise Moreiras et al. nachweisen, dass das Unterdrücken der Exocysten-

Untereinheiten *Exoc4* oder *Exoc7* die Melanosomenexozytose aus Melanozyten hemmt, ohne die Melaninsynthese zu beeinträchtigen [99]. Bei einem solch hohen Grad an Konservierung wird die umfassende Funktion des Exocyst-Komplexes in gleich mehreren basalen Vorgängen in Neuronen sowie in anderen Zellen deutlich, wie etwa während der Entwicklung, der Polarität von Epithelzellen, der Ausprägung von Cilien, der Zell-Zell-Kommunikation und letztlich auch in malignen (patho-)physiologischen Vorgängen wie etwa Krebs, der Immunität und Infektionen [98]. Inwiefern der Exocyst-Komplex auch diese Arbeit bestimmt hat, wird in den Kapiteln des Ergebnisteils deutlich.

#### 1.4 Prognostische und prädiktive Biomarker in kolorektalen Karzinomen: Kombination genetischer Biomarker wie *SASH1* und tumorinfiltrierender T-Lymphozyten

Kolorektale Karzinome sind nach den geschlechtsspezifischen Tumoren der Brustdrüse und der Prostata sowie des Lungen- und Bronchialsystems die Tumorentität mit der höchsten Inzidenz und Mortalität beider Geschlechter [100, 101]. Die Pathogenese dieser soliden Karzinome ist sehr divers, da verschiedene molekulare Mechanismen zur Tumorgenese beitragen können. Zum Großteil entstehen sporadische kolorektale Tumore langsam über etwa zehn Jahre und bilden dabei prä-maligne Vorläuferläsionen aus, die sogenannten Adenome, welche auch diagnostischen Wert in der Früherkennung besitzen. Die meisten Adenome entstehen durch eine Mutation im *APC* (Adenomatous polyposis coli)-Gen, dessen Proteinprodukt als Teil eines Komplexes physiologisch  $\beta$ -Catenin ubiquitinyliert, welches dann proteolytisch degradiert wird. Durch eine *APC*-Mutation bleibt jedoch der Abbau des  $\beta$ -Catenins aus, welches in Übermaß in den Zellkern geschleust wird und dort als Transkriptionsfaktor den proliferativen Effekt des Wnt-Signalwegs vermittelt. [102] Etwa 70% der tubulären, villösen oder tubulovillösen Adenome besitzen eine Mutation im *APC*-Gen und können in maligne Karzinome übergehen, indem in dysplastischen Epithelzellen sequenziell weitere Mutationen auftreten, wie etwa im Onkogen *KRAS* und dem Tumorsuppressorgen *TP53* [103]. Unter dem morphologisch deskriptiven Begriff der serratierten Adenome lässt sich eine weitere heterogene Gruppe an hyperplastischen Vorläuferläsionen zusammenfassen, welche durch ein sternförmig-sägezahnartiges Epithel gekennzeichnet ist. Diese Gruppe ist durch eine aktivierende Mutation im Onkogen *BRAF* und eine Hypermethylierung von CpG-Inseln gekennzeichnet, wodurch epigenetisches Silencing des Mismatch-Reparaturgens *MLH1* begünstigt wird [104]. Infolgedessen gehen essenzielle Reparaturmechanismen während der Zellproliferation verloren, was vermehrt zu Mutationen in den Mikrosatellitensequenzen und damit zu einem höheren Maß an Mikrosatelliteninstabilität führt [105]. Kolorektale Tumore mit diesem Profil sind mit einer besseren Prognose und einer höheren Infiltration des Tumors mit Lymphozyten assoziiert als solche mit einer Mikrosatellitenstabilität [106]. Aus Gründen der Vollständigkeit seien hier noch vererbte genetische Syndrome genannt, die in 2-5% der Fälle durch

Keimbahnmutationen in Tumorsuppressor- oder Reparaturgenen und eine zusätzliche somatische Mutation verursacht werden und ähnliche molekulare Mechanismen aufweisen: die beiden häufigsten sind das Lynch-Syndrom mit Defekten in DNA Mismatch-Reparaturgenen und folglich hoher Mikrosatelliteninstabilität sowie die familiäre adenomatöse Polyposis mit einer Mutation im *APC*-Gen [107].

Anhand dieser Ausführungen wird ersichtlich, dass kolorektale Karzinome weniger ein monokausales Krankheitsgeschehen darstellen, sondern vielmehr als gemeinsamer Ausdruck einer Krankheit mit unterschiedlichsten molekularbiologischen Pathologien zu verstehen sind. Für PatientInnen und BehandlerInnen ist es dabei gleichermaßen notwendig, das Risiko einer Wiedererkrankung, sei es durch ein Rezidiv des Primärtumors selbst oder durch das Wachstum einer metastatischen Ablagerung, ebenso abschätzen zu können wie die Notwendigkeit für eine antitumorale Therapie und deren zu erwartende Wirksamkeit. Zwar werden PatientInnen vor der operativen Therapie durch die klinische Untersuchung, Bildgebungsverfahren und der histopathologischen Aufarbeitung von Biopsien dem sogenannten Staging zugeführt, um der Erkrankung das jeweilige Stadium zuzuweisen und um daraus therapeutische Konsequenzen zu ziehen [103]. Jedoch ist in den letzten Jahren trotz des Fortschritts in der Behandlung von kolorektalen Karzinomen und steigenden Therapieoptionen die Verfeinerung des Stagings im Wesentlichen ausgeblieben [108]. Prognostische Biomarker haben zu einer vereinfachten Einteilung von vier molekularbiologischen Grundtypen kolorektaler Karzinome – den vier „Consensus molecular subtypes“ (CMS) – geführt, jedoch erkennt man die Unschärfe dieser Einteilung bereits daran, dass 13% der hierfür verwendeten Tumorproben eine fünfte Gruppe mit Mischformen und schwer zuordenbaren Subtypen bilden [109]. Diese Biomarker sowie das konventionelle Staging mögen einen prognostischen Wert besitzen und zu Therapieentscheidungen beitragen, doch lassen sie weder einen Schluss auf die Notwendigkeit einer adjuvanten Chemotherapie, noch auf das individuelle Ansprechen der PatientInnen auf eben jene zu [103]. Gerade für PatientInnen mit kolorektalen Karzinomen der Stadien III und II mit zusätzlichen Risikofaktoren stellt sich also häufig die Frage, wer von einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie profitiert und wer ein hohes Risiko besitzt, nach der operativen Tumorentfernung und ohne adjuvante Chemotherapie eine Rezidiv der Krankheit zu entwickeln. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind in etwa bei 30% der PatientInnen bereits lokale Lymphknoten befallen, ohne dabei Fernmetastasen ausgebildet zu haben, was den Stadien IIIA-IIIC entspricht. PatientInnen in diesen Stadien besitzen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 86% (IIIA), 72% (IIIB) respektive 36% (IIIC) und zeigen ein Risiko für eine Rezidiv der Krankheit von 33% nach adjuvanter Chemotherapie verglichen mit einem Risiko von 45% nach alleiniger operativer Therapie [110, 111]. Wohlgedacht werden dabei alle PatientInnen potenziell schädlichen Nebenwirkungen ausgesetzt. Geeignete prädiktive Biomarker könnten das individuelle Ansprechen auf eine Therapie und das Risiko eines Rezidivs ohne weitere Therapie abschätzen. Solche molekularen Marker sind messbare, medizinische Zeichen für

den Gesundheitszustand der PatientInnen, die genau und reproduzierbar erhoben werden können und die als Indikator für pathologische oder physiologische Prozesse oder Krankheiten fungieren [112]. Bisher konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *KRAS*, *BRAF* V600E oder *PIK3CA* sowie eine *PTEN*-Defizienz prädiktive Marker für das Ansprechen auf eine spezifische Therapie mit EGFR-Inhibitoren darstellen, jedoch fehlen für die klinische Praxis weiterhin spezifische Marker für kolorektale Karzinome unterschiedlicher molekularpathologischer Ätiologie [113]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass mehrere zu einem Testpanel zusammengefasste genetische Marker das Risiko für ein Wiederauftreten der Tumorerkrankung in Form einer metastatischen Ablagerung stratifizieren können und dass dieses Instrument ebenso einen prognostischen Wert besitzt [18, 114-117].

Neben genetisch definierten Markern stellt auch das Immunsystem eine wichtige Einflussgröße auf das Tumorwachstum dar. Schon in den 1950er Jahren wurde eine tumorsuppressive Funktion des Immunsystems vermutet, wobei diese These erst Jahrzehnte später durch tieferegehende Studien belegt werden konnte, welche zeigten, dass verschiedene Tumore tatsächlich Antigene präsentieren, die wiederum von tumorinfiltrierenden (T-)Lymphozyten (TIL) erkannt und lysiert werden können [118, 119]. Diese Beobachtungen prägten den Begriff der Immunosurveillance, also einer Immunüberwachung von Neoplasien durch das Immunsystem. Diese Überwachung stellt allerdings gleichermaßen einen Selektionsdruck für Tumorzellen dar, sodass Tumor-Escape-Varianten ohne dominante Antigene oder fehlende Komponenten entstehen, die für die Empfindlichkeit gegenüber einer immunvermittelten Abtötung erforderlich sind: das sogenannte Immunoediting [118]. Der tumorsuppressive Einfluss von tumorinfiltrierenden Lymphozyten konnte für verschiedene Krebsentitäten einschließlich kolorektaler Karzinome gezeigt werden [120-122]. Vor allem stellte die Gesamtheit CD3-positiver T-Lymphozyten, deren CD8-positiven zytotoxischen Effektorzellen sowie CD45RO-positiven Gedächtnis-T-Zellen einen prognostischen Wert in humanen kolorektalen Karzinomen dar, welcher jenen der UICC-TNM-Klassifikation überlegen war [123, 124]. Mehr noch: etwa 25% der PatientInnen mit einem lokalen Tumorbefall (UICC I/II), die nach dem Standard nur mit einer lokalen operativen Therapie versorgt werden, erleiden eine Rezidiv ihrer Erkrankung. In einer retrospektiven Studie mit zwei unabhängigen Kohorten und insgesamt 602 Teilnehmenden konnte gezeigt werden, dass nur 4,8% der PatientInnen mit einem hohen Anteil tumorinfiltrierender Lymphozyten nach fünf Jahren eine Rezidiv ihrer Krankheit entwickelten, wohingegen 72% der PatientInnen mit einem geringen Score an TILs ein erneutes Tumorwachstum präsentierten und nur 27% nach fünf Jahren noch am Leben waren. [125] Es ist also von großem Interesse vorhersagen zu können, welche PatientInnen von einer (neo-)adjuvanten Therapie (auch in scheinbar günstigen Tumorstadien) profitieren würden und welche PatientInnen hierfür weniger in Betracht kommen. Dies erfordert also eine prädiktive Aussage über einen möglichen Therapieerfolg. In einem Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Panel an genetischen Markern, erweitert um die Dichte tumorinfiltrierender T-Zellen, das individuelle Risiko für metachrone Metastasen sowie das Ansprechen auf eine 5-Fluorouracil 5-FU

basierte, adjuvante Therapie für kolorektale Karzinome des Stadiums III prognostiziert werden kann. Hierfür wurden retrospektiv das Überleben beziehungsweise das Ansprechen auf eine 5-FU gestützte Therapie von 84 PatientInnen mit der Expression verschiedener genetischer und immunologischer Marker korreliert und die Rolle von *SASH1* als prognostischer und prädiktiver Biomarker überprüft. Zwar ist durch vorherige Arbeiten bereits eine prognostische Relevanz von *SASH1* in PatientInnen mit kolorektalen Karzinomen der UICC-Stadien II bis IV beschrieben, jedoch wurde der prädiktive Charakter dieser Marker bisher nicht systematisch überprüft [7, 18].

## 2. Material und Methoden

In Tabelle 10 sind die wichtigsten Puffer zu finden. In Tabelle 13 sind die wichtigsten Chemikalien, in Tabelle 14 die wichtigsten Verbrauchsmaterialien und in Tabelle 15 die wichtigsten kommerziellen Kits zu finden. Die verwendeten Bakterien, Zelllinien und Mäuse sind in Tabelle 16 und die technischen Hilfsmittel in Tabelle 17 gelistet.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolation genomischer DNA

Gewebe, bzw. Zellen, wurden in 100 µl Lysepuffer (0,1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,5% SDS, 5 mM EDTA) angesetzt. Für Gewebeproben wurde zudem ein Verdau mit 1 mg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich) bei 56 °C über Nacht durchgeführt. Nach der Lyse wurde zu den Proben 200 µl Isopropanolol hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 18.400 g für 10 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch mit einem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher) bestimmt.

#### 2.1.2 RNA-Isolierung, reverse Transkription und qRT-PCR

Die Isolierung von RNA erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) und dessen Protokoll. Für die reverse Transkription wurde pro Ansatz 1 µg RNA eingesetzt und mittels dem RevertAid H Minus Reverse Transcriptase System (Thermo Fisher), Random Hexamer Primer und Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer in cDNA überführt. Dafür wurde folgendes Mengenverhältnis verwendet und die Probe anschließend bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert und auf Eis gestellt.

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
RNA	1 µg
Random Hexamer Primer	0,2 µg
Oligo(dT) <sub>18</sub>	0,5 µg
ddH <sub>2</sub> O	Bis zu Volumen von 12,5 µl

Die Transkription wurde dann mit folgenden Reagenzien durchgeführt:

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
Volumen aus vorherigem Schritt	12,5 µl
Reaktions Puffer (5x)	4 µl
RNase Inhibitor	20 U

dNTP Mix	1mM pro Nukleosid
RevertAid H Minus RT	200 U
ddH <sub>2</sub> O	Bis zu Volumen von 20 µl

Die Reaktion wurde zuerst für 10 Minuten bei Raumtemperatur, dann für 60 Minuten bei 42 °C und schließlich für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Mit einem LightCycler 480 II PCR-Gerät (Roche) wurde durch qRT-PCR schließlich die Genexpression bestimmt, indem neben den passenden Primerpaaren (Tabelle 11) die qRT-PCR mittels des SYBR-Systems durchgeführt, oder – bei sondenbasierter qRT-PCR – zusätzlich die geeigneten Universal Probe Library (UPL) Proben eingesetzt wurden. In 96-Well Platten wurden folgende Reagenzien vorgelegt (Angaben in Klammern beziehen sich auf Mengen einer SYBR qRT-PCR):

Reagenz	Volumen pro Well
Genexpressions Mastermix Abi (Mastermix SYBR)	10 µl (15 µl)
Primer fwd [20 µM]	0,2 µl (1 µl, 25 µM)
Primer rev [20 µM]	0,2 µl (1 µl, 25 µM)
UPL	0,2 µl (--)
Verdünnte cDNA	5 µl (10 µl)
ddH <sub>2</sub> O	Bis zu 20 µl

Die Daten wurden mit der Software LightCycler 480 v1.5 analysiert. Die Expressions-Ergebnisse des Zieltranskripts wurden in Relation zur Expression des jeweiligen Referenzgens angegeben.

### 2.1.3 Genotypisierung von *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen

Durch PCR-Reaktionen von Ohrstanzen junger Mäuse wurde der Genotyp bestimmt. Die Isolierung der DNA erfolgte wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben. Um das Wildtyp oder das *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Allel nachzuweisen bewährte sich folgender Reaktionsansatz und das anschließende PCR-Protokoll:

Reagenz	Volumen
Primer fwd [25 µM]	1 µl
Primer rev [25 µM]	1 µl
Genomische DNA	1 µl
dNTPs (5 mM)	1 µl
DreamTaq Puffer + 20 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
DreamTaq DNA-Polymerase 5 U/µl	0,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	Bis zu 20 µl

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
1	95	120	1
2	95	30	35
3	60	30	
4	72	60	
5	72	600	1
6	4	-	

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel zur Elektrophorese geladen und gemäß dem spezifischen Bandenmuster der Produktgrößen interpretiert.

#### 2.1.4 Zellfraktionierung

Um die Zellen der humanen Melanomzelllinie MelJuSo [126] in die Komponenten Zytoplasma und Nucleus zu trennen, wurden zwei Versionen einer Zellfraktionierung durchgeführt. Zellen einer 10 cm Platte wurden mit PBS (Thermo Fisher) gewaschen, mit eiskaltem PBS auf Eis abgeschabt und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 960 µl 0,3% NP-40 (Thermo Fisher) in PBS durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Für das Gesamtzelllysats wurden von dieser Suspension 320 µl und 80 µl 5x Laemmli mit 100 mM DTT (Fermentas) in ein weiteres Mikroreagiergefäß gegeben. Die restliche Suspension wurde bei 4 °C und 15.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Für die zytosolische Fraktion wurden erneut 320 µl des Überstands abgenommen und mit 80 µl 5x Laemmli (100 mM DTT (Fermentas)) vermischt und anschließend für eine Minute bei 95 °C erhitzt. Das im vorherigen Schritt verbliebene Zellpellet wurde fünfmal mit 1 ml 0,3% NP-40 (Thermo Fisher) in PBS gewaschen, indem die Suspension jeweils für eine Minute bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde dann in 180 µl 1x Laemmli mit 100 mM DTT (Fermentas) resuspendiert, um die Nuclei zu erhalten. Nach der Ultraschallbehandlung der Zellkernfraktion mit einem Nadel-Dismembrator bei 4 °C für etwa 5-10 Sekunden wurden diese und die Mikroreagiergefäße des Gesamtzelllysats für 10 Minuten bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Für die Fraktionierung der Abbildung 15 A wurde initial für 15 Sekunden mit 3.000 rpm zentrifugiert und das verbleibende Pellet in 960 µl 0,1% NP-40 resuspendiert. Für die Fraktionierung wurde diese Suspension dann für 15 Sekunden und 3.000 rpm zentrifugiert. Anstelle von fünfmaligem Waschen wurde im alternativen Protokoll nur einmal mit 0,1% NP-40 gewaschen. Nach der Ultraschallbehandlung wurde erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Alle Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.1.5 Photometrische Bestimmung des Melaningehalts von MelJuSo-Zellen

Um das intrazelluläre Melanin der Melanomzellen MelJuSo zu bestimmen, wurden diese in den 10 cm Kulturschalen mit PBS (Thermo Fisher) gewaschen und anschließend für das Zählen mit einer Neubauer Zählkammer mittels Trypsins (Sigma Aldrich) abgelöst.  $2 \times 10^6$  Zellen der jeweiligen Genotypen wurden in ein 1,5 ml Mikroreagiergefäß gegeben, um die Zellen dann bei 1.200 g für 10 Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in 250  $\mu$ l 1 M NaOH mit 10% DMSO (Merck) resuspendiert und für zwei Stunden bei 80 °C verdaut. Die folgende Bestimmung der Melaninkonzentration erfolgte mit Hilfe von synthetischem Melanin (Sigma-Aldrich), welches in den Konzentrationen 0  $\mu$ g/ml, 0,625  $\mu$ g/ml, 1,25  $\mu$ g/ml, 2,5  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 15  $\mu$ g/ml und 20  $\mu$ g/ml in 1 M NaOH mit 10% DMSO (Merck) als Standard frisch angelegt wurde. In einer 96-Well-Platte wurden zur Doppelbestimmung der Extinktion mittels des MRX Microplate Reader (Dynex-Technologies) pro Probe je 125  $\mu$ l des Melaninstandards und des Überstands der MelJuSo-Lysate transferiert, die Extinktion gemessen und die Konzentration der Proben anhand der Standardgeraden abgeleitet.

### 2.1.6 Sequenzierung des mit dem CRISPR/Cas9-System veränderten *SASH1*-Lokus

Zur Sequenzierung des *SASH1*-Lokus, welcher durch das CRISPR/Cas9-System und die Guide-RNA S1 und S2 verändert wurde, wurden spezifische Primer zur Amplifikation des Lokus genutzt (Tabelle 11). Isolierte genomische DNA wurde als Vorlage für die PCR unter Verwendung der Phusion Hot Start II DNA-Polymerase (Thermo Fisher) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Das PCR-Produkt wurde dann mittels NGS CRISPR-Amplikon-Sequenzierung (CCIB DNA Core, Massachusetts General Hospital, Boston, USA) sequenziert.

### 2.1.7 Massenspektrometrisches Screening von *Sash1* in *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen

Für die Untersuchung des Proteoms wurden von je drei Wildtyp-Kontrollmäusen und *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen das Cerebellum entnommen, und in je 200  $\mu$ l Lysepuffer bestehend aus 100 mM Tris pH 8,5 mit, 1% Natriumdesoxycholat (Sigma), 10 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (Sigma-Aldrich) und 40 mM Chloracetamid (Sigma-Aldrich) für drei Minuten unter Verwendung des TissueLyser (Qiagen) lysiert. Anschließend wurden die Lysate für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt. Die weitere Vorbereitung, Vorfraktionierung und Analyse der Proben erfolgte durch die Kooperationspartner am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, nach deren Protokoll [127-129].

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die humanen Zelllinien MelJuSo und HEK293 wurden bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in Inkubatoren gelagert und in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher) kultiviert, welches zusätzlich 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom), 100 U pro ml Penicillin (Biochrom), 100 µg pro ml Streptomycin (Biochrom) und 2 mM L-Glutamin (Thermo Fisher) enthielt. Zum Ablösen der Zellen wurden ebenjene mit PBS (Thermo Fisher) gewaschen und mit Trypsin (Sigma-Aldrich) für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Zellen längere Zeit in flüssigem Stickstoff lagern zu können wurden diese mit einem Gemisch von 10% DMSO (Merck) und 90% FCS eingefroren.

### 2.2.2 Lipid-vermittelte Transfektion

Zellen der Zelllinien MelJuSo und HEK293 wurden mit verschiedenen Vektoren transfiziert, nachdem sie eine 60–70-prozentige Konfluenz in einer 6-Well-Platte erreicht haben. Dafür wurde mit FuGENE HD (Promega) oder Attractene (Qiagen) eine Lipid-vermittelte Transfektion der Zellen mit dem gewünschten Vektor durchgeführt. 100 µl Opti-MEM (Thermo Fisher) und 8 µl FuGENE HD (bzw. 7,5 µl Attractene) wurden mit 2 µg der Vektor-DNA vermischt und nach Vortexen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte durch langsames Zugeben des Gemisches zu den Zellen die Transfektion. Für die Transfektion von MelJuSo- und HEK293-Zellen für einen transienten Knockdown mittels siRNA wurde ähnlich verfahren. Wildtyp-Zellen von HEK293 und von MelJuSo wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Pro Well wurden zunächst 150 µl Opti-MEM (Thermo Fisher) mit 9 µl des Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) und 150 µl Opti-MEM mit 3 µl (30 pmol) der jeweiligen siRNA vermischt, bis die beiden Ansätze dann zusammengeführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das Gemisch wurde dann tröpfchenweise auf die entsprechenden Zellen gegeben. Bei allen Verfahren wurden nach 24 h die Transfektionsreagenzien durch Waschen und Wechsel des Mediums entfernt.

### 2.2.3 Generierung von *SASH1*-Knockout MelJuSo-Zellen

Um in MelJuSo-Zellen einen stabilen *SASH1*-Knockout herzustellen, wurden diese mit dem Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 und den dafür entwickelten Guide-RNAs S1 oder S2 transfiziert. Der Vektor selbst war ein Geschenk von Feng Zhang (Addgene Plasmid #62988; <http://n2t.net/addgene:62988>; RRID:Addgene\_62988), wobei die Guide-RNAs in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe von Dr. Fabian Christoph Franke (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) entworfen und in den Vektor ligiert wurden [130]. Zwei Tage nach der Trans-

fektion wurden die Zellen mit 1 µg/ml Puromycin für 72 h behandelt und anschließend zum Entfernen des Antibiotikums vorsichtig mit PBS gewaschen. Weitere 48 h später wurden die verbliebenen Zellen abgelöst und in niedriger Konzentration auf 10 cm Platten ausgebracht. Sobald Kolonien eines Zellklons sichtbar wurden, wurden diese in 48-Well-Platten passagiert, um dort weiterzuwachsen. Waren diese Kolonien groß genug, wurden sie teils passagiert und teils zur Überprüfung auf *SASH1*-Defizienz via Immunoblot lysiert.

#### 2.2.4 Zellproliferationsassay

Die Zellproliferation wurde mit dem kolorimetrischen XXT Cell Proliferation Kit II (Roche) und dem dazugehörigen Protokoll überprüft. Dabei wurden in einer 96-Well-Platte 2.000 Zellen pro Well in DMEM mit 2% FCS ausgebracht und die XTT-Tetrazoliumsalze Reagenzien zu den Zellen gegeben. Als Ausgangswert wurde eine 0 h Messung durchgeführt. Bei weiteren Messungen nach 4 h, 6 h und 24 h wurde von der höheren Absorption des Reagenzes jene vom Ausgangswert subtrahiert und für die Auswertung ein Faktor gebildet, welcher angibt, um wie viel die Absorption im Vergleich zum Ausgangswert angestiegen ist.

#### 2.2.5 Transwell Migrationsassay und Invasionsassay

Diese beiden Assays dienen zur Evaluation der Migration durch einen chemotaktischen Stimulus (Transwell-Migrations-Assay) und zusätzlich der Migration in extrazelluläre Matrix (Invasions-Assay). Dafür wurden jeweils spezielle Inserts verwendet: 8,0 µm Transwell Permeable Supports (Corning) und 8,0 µm Matrigel Invasion Chamber (Corning). Diese wurden zur Vorbereitung mit 10% FCS in DMEM für 2 h bei 37 °C beschichtet, mit PBS gewaschen und in die jeweiligen Wells wurde DMEM mit 10% FCS vorgelegt, wobei für die Migration 600 µl und für die Invasion 750 µl benötigt wurden. Die Inserts wurden dann mit  $2 \times 10^5$  Zellen in 100 µl DMEM ohne FCS für die Migration beziehungsweise  $3 \times 10^5$  Zellen in 500 µl DMEM ohne FCS für die Invasion befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h (Migrations-Assay) respektive 48 h (Invasions-Assay) bei 37 °C wurden die Inserts vorsichtig mit PBS gewaschen und die Zellen für 20 Minuten mit 3% PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert und wiederholt mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen an der Oberseite der Membran vorsichtig mit einem Baumwollstäbchen entfernt. Die Zellen an der Unterseite wurden mit 0,5% Triton X-100 (Carl Roth) in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Das Insert wurde dann nach einem weiteren Waschschrift auf einen 100 µl Tropfen DAPI 1:5.000 (Thermo Fisher) für 10 Minuten gestellt und so die durchwanderten Zellen markiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden von den durchwanderten Zellen je 10 Aufnahmen pro Ansatz in 20-facher Vergrößerung mit einem inversen AxioObserver Z1 Mikroskop (Carl Zeiss) gemacht und die Zellen ausgezählt.

## 2.2.6 Wundheilungs-Assay

Für diese Art des 2D-Migrationsassays wurden Culture-Insert 2 Well (Ibidi) verwendet, welche einen präformierten Spalt von 500 µm bilden, und mit 10 µg/ml Fibronectin (Roche) für 1 h bei 37 °C beschichtet. In jede Kammer des Inserts wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 100 µl DMEM mit 10% FCS ausgesät, welche zuvor für 2,5 h mit 0,625 µg/ml Mitomycin behandelt wurden, um die Proliferation zu unterbinden. Zur Adhäsion der Zellen wurde der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Insert entfernt und Ausgangsaufnahmen, sowie Aufnahmen nach 48 h Inkubationszeit mit einem AxioObserver Z1 (Zeiss) Mikroskop erstellt. Die kollektive Migration der Zellen in den Spalt wurde ermittelt, indem die zellfreie Fläche mit der Software ImageJ v1.51 (National Institutes of Health, USA) gemessen und der Wert nach 48 Stunden durch die Fläche des unbewachsenen Spaltes (entspricht dem Ausgangswert nach Null Stunden) dividiert wurde. Der Quotient entspricht dem Anteil der zellfreien Fläche nach 48 Stunden. Dieser Wert wurde dann von 100 Prozent subtrahiert, um den Schluss des Spalts in Prozent angeben zu können.

## 2.3 Immunologische Methoden und Mikroskopie

### 2.3.1 Zellyse und Immunoblot

Um Lysate von Zellen bzw. von Geweben zu erstellen, wurde das Material mit PBS gewaschen und in eiskaltem RIPA-Puffer lysiert, welcher folgende Inhibitoren enthielt: 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF, 1 mM Pefabloc, 2x Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 1 mM Benzamidine, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin. Gewebe wurde mit RIPA-Puffer unter Verwendung eines TissueLyser Gerätes (Qiagen) und einer autoklavierten Metallkugel homogenisiert. Die Lysate von Zellen und Geweben wurden dann mit Ultraschall behandelt und für 15 Minuten bei 4 °C zur weiteren Inkubation rotiert. Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 18.620 g für 15 Minuten wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration das Pierce BCA Protein Quantification Kit (Thermo Fisher) genutzt und dem Überstand 5x Laemmli hinzugefügt, sodass der Puffer letztlich eine einfache Konzentration aufwies. Nach der Durchführung des BCA Assays wurden alle Proben bezüglich ihrer Proteinkonzentrationen mit 1x Laemmli vereinheitlicht. Für die SDS-Acrylamid Gelelektrophorese der Proben mit dem PerfectBlue PAGE System (Peqlab) erfolgte ein Aufkochen der Proben für 5 Minuten bei 95 °C. Mithilfe des Transblotting Systems (Biorad) wurden die Proteine des SDS-Gels auf eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran (GE Healthcare Life Sciences) übertragen und die Membran schließlich mit 5% Milchpulver (Carl Roth) in PBST für 1 h blockiert und schließlich je dreimal für 10 Minuten mit PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 12) in entweder 5% Milchpulver oder 5% BSA (Sigma-Aldrich) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für 10 Minuten wurde die Membran mit

dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Jackson Immunoresearch, Tabelle 12) in 5% Milchpulver in PBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal mit PBST gewaschen, anschließend die Proteine durch Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen abgelichtet und entwickelt oder mithilfe eines Imagers (Analytik Jena) dargestellt.

### 2.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie diente der Analyse von Zellen und humanem Gewebe, welches dafür in TissueTek (Sakura) eingebettet und bei -80 °C solange gelagert wurde, bis es mithilfe eines Kryostats (Leica) in 6-8 µm Schnitte präpariert werden konnte. Zellen wurden auf Deckgläser ausgebracht, die zuvor für 1 h bei 37 °C mit 5 µg/ml Fibronectin (Roche) in PBS beschichtet wurden. Alle folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt: Vor der Fixierung mit 3% PFA (Sigma-Aldrich) in PBS für 20 Min, wurden Zellen sowie Gewebeproben mit PBS gewaschen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS für weitere 20 Minuten und anschließend wieder ein Waschschrift mit PBS bevor die Proben mit 0,1% Triton X-100 (Carl Roth) in PBS für 3 Minuten permeabilisiert wurden. Darauf folgte erneutes Waschen mit PBS sowie das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 2% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS für 1 h, woraufhin die Zellen bzw. Gewebe mit dem jeweiligen Antikörper (Tabelle 12) in 2% BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Tags darauf wurden die Proben erneut dreimal gewaschen und je nach Primärantikörper Alexa Fluor 488- oder Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Für Färbungen des Zellkerns wurde DAPI (Thermo Scientific), für F-Aktin TRITC-Phalloidin (Sigma-Aldrich) verwendet. Alle sekundären Färbungen wurden in 2% BSA für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt, worauf erneutes Waschen mit PBS folgte. Zuletzt wurde auf den Proben mithilfe von Gelatine ein Deckgläschen versehen und Aufnahmen mit einem AxioObserver Z1 (Zeiss) Mikroskop angefertigt.

### 2.3.3 Live Cell Imaging

Die Evaluierung des intrazellulären Melanosomentransports in MelJuSo Wildtyp- und Knockout-Zellen erfolgte durch *Live Cell Imaging* mithilfe des Zeiss Observer Mikroskops unter Verwendung einer CO<sub>2</sub>-Inkubationskammer (Zeiss) und der AxioCam (Zeiss). Damit zum Zeitpunkt der Mikroskopie die Zellen vereinzelt jedoch adhärent am 35 mm µ-Dish (Ibidi) vorlagen, wurden initial  $1,0 \times 10^3$  MelJuSo-Zellen in einem Volumen von 2 ml ausgebracht und über Nacht inkubiert. Die Aufnahmen erfolgten im Hellfeld mit 100-facher Vergrößerung durch das Plan-Neofluar 100x/1.30 Öl-Objektiv.

#### 2.3.4 Erhebung tumorinfiltrierender T-Lymphozyten in Gewebeschnitten

Um eine möglichst große Fläche der Gewebeschnitte humaner Kolonkarzinome beurteilen zu können, wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M (Zeiss) – und dessen Möglichkeit einer automatischen Tischführung – sowie des Tools MosaiX der Software AxioVision (Zeiss) ein aus 36 Einzelaufnahmen bestehendes Mosaik erstellt. Dies ermöglichte die individuelle Einstellung der Fokusebene im Kanal Cy3 jeder Aufnahme und eine anschließende qualitativ hochwertige Quantifizierung der T-Zellen. Außerdem konnte ein Ausbleichen der sekundären fluoreszierenden Antikörper der Schnitte verhindert werden, indem die Aufnahmen des DAPI-Kanals getrennt von jenen des Hellfelds-, Alexa488- und Cy3-Kanals erfolgten. Um möglichst gut beurteilbare Bilder zu erhalten, wurde ein Öl-Immersions-Objektiv mit 40-facher Vergrößerung (Zeiss) verwendet. Für eine Vereinheitlichung der gezählten Zellen pro mm<sup>2</sup> wurde das 7981x5980 Pixel große Gesamtbild um den Skalierungsfaktor 0,16 µm/Pixel bereinigt, sodass schlussendlich eine Fläche von 1.221.795 µm<sup>2</sup>, also 1,22 mm<sup>2</sup> je Mosaik untersucht wurde. Jede Gewebeprobe wurde jeweils mit bis zu drei Mosaikaufnahmen untersucht. Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung unter Zuhilfenahme der Zählfunktion der Software AxioVision (Zeiss). Sollten sich in einem Mosaik nicht beurteilbare oder leere Einzelbilder befunden haben, so wurden diese ausgeschlossen und der Umrechnungsfaktor für eine Zellzahl pro Quadratmillimeter von 1,22 entsprechen korrigiert.

#### 2.3.5 Zählung intrazellulärer Melanosomen der Melanomzelllinie MelJuSo

Für die Zählung der produzierten Melanosomen wurden sowohl MelJuSo Wildtyp- als auch Knockout-Zellen in Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen und einem einliegenden, beschichteten Deckgläschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Beschichtung, Fixierung und Färbung erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Da die Zellen bis zur Fixierung durch mehrere Zellteilungen nicht mehr vereinzelt vorlagen, wurden Gruppen von zwei, drei, vier, fünf, sechs oder acht Zellgruppen fotografiert und die Gesamtzahl der anschließend ausgezählten Melanosomen durch die jeweilige Anzahl der Zellen geteilt. Die Zählung selbst erfolgte für den jeweiligen Untersucher verblindet und halbautomatisch mithilfe der Software ImageJ v1.51 (National Institutes of Health, USA), anhand der Funktion „Analyze Particles“.

#### 2.3.6 Co-Immunpräzipitation

Diese Methode wurde verwendet, um eventuelle Interaktionspartner von SASH1 zu ermitteln. Dafür wurden HEK293 oder MelJuSo-Zellen in RIPA-Puffer lysiert, welcher 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 mM Pefabloc, 2x Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF und 1µg/ml Pepstatin enthielt, aber – anders als in 2.3.1 dargestellt – kein SDS. Zudem wurde auf die Ultraschallbehandlung der Zellen verzichtet. Wie in Abschnitt

2.3.1 beschrieben wurden die Proteinkonzentrationen und Volumina vereinheitlicht und mit 3 µg der Antikörper gegen V5 beziehungsweise GFP (Tabelle 12) für 2 h bei 4 °C rotiert. Des Weiteren wurden 40 µl Protein G Sepharose Beads (Sigma-Aldrich), je nachdem ob es sich um Antikörper aus Kaninchen (A) oder Maus handelte (G), zweimal mit PBS und einmal mit RIPA-Puffer, welcher Phosphatase- und Protease Inhibitoren enthielt, gewaschen. Die gewaschenen Beads wurden mit den Lysat-Antikörper-Gemischen für eine weitere Stunde bei 4 °C rotiert. Anschließend wurden die Ansätze viermal mit RIPA-Puffer (inklusive Phosphatase- und Protease-Inhibitoren) gewaschen und jeweils wieder für 1,5 Minuten bei 6.000 rpm abzentrifugiert. Die gebundenen Proteine wurden unter Zugabe von 100 µl 1x Laemmli eluiert und zur weiteren Analyse durch Immunoblots verwendet.

## 2.4 Tiermodell

Die retrovirale Transfektion muriner Stammzellen erfolgte durch das Labor von Philippe M. Soriano der *Icahn School of Medicine at Mount Sinai* gemäß deren Protokoll [35]. Der verifizierte embryonale Stammzellklon Gt(S2-5C1)<sup>Sor</sup>, der eine Integration des *Gene Trap* in den *Sash1*-Lokus enthielt, wurde revitalisiert und fünf chimäre Mäuse auf einem Sv129-Hintergrund erzeugt, von denen zwei Mäuse eine Keimbahnübertragung zeigten. Das Mausmodell selbst wurde über das MMRRC-Repository mit dem Resource Identifier RRID:MMRRC\_036479-UCD bereitgestellt. Die anfänglich chimären Mäuse wurden mit jenen des Sv129-Stamms verpaart und auf diesem Hintergrund für einige Generationen aufrechterhalten. Schließlich wurden diese Mäuse dann sukzessive mit Mäusen des C57BL/6N-Stamms verpaart und so die *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup> Allele auf diese Mäuse übertragen. Durch spätere Kreuzungen mit FLP-Deleter-Mäusen wurde der *Gene Trap* verkürzt und so das *Sash1*<sup>RF<sup>Δ</sup>Hy</sup>-Modell erzeugt. Im Falle von Organentnahmen wurden die untersuchten Mäuse tierrechtlich und ethisch sachgemäß mittels einer manuellen zervikalen Dislokation getötet.

## 2.5 Analyse humaner Gewebeproben

84 PatientInnen des UICC-Stadiums III mit vollständiger Resektion (R0) eines Karzinoms des Kolons aus zwei unabhängigen klinischen Zentren wurden untersucht. Die PatientInnen gaben vor der Operation der Chirurgischen Klinik der Technischen Universität München eine informierte Einwilligung zur Analyse der Daten und entnommenen Gewebe. Unmittelbar nach der Resektion wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. PatientInnen mit rektalen Karzinomen wurden ausgeschlossen, da diese als eigene Entität betrachtet werden müssen und in der Therapie direkt abhängig von der Qualität des operativen Eingriffs sind, sodass eine Verzerrung der Ergebnisse hier vermieden werden sollte. Wie angegeben und zuvor beschrieben erfolgten die

Analysen der Genexpression vor allem durch Dr. Dr. Ulrich Nitsche, Alexander Balmert und Sabine Bauer [22].

## 2.6 Statistische Methoden

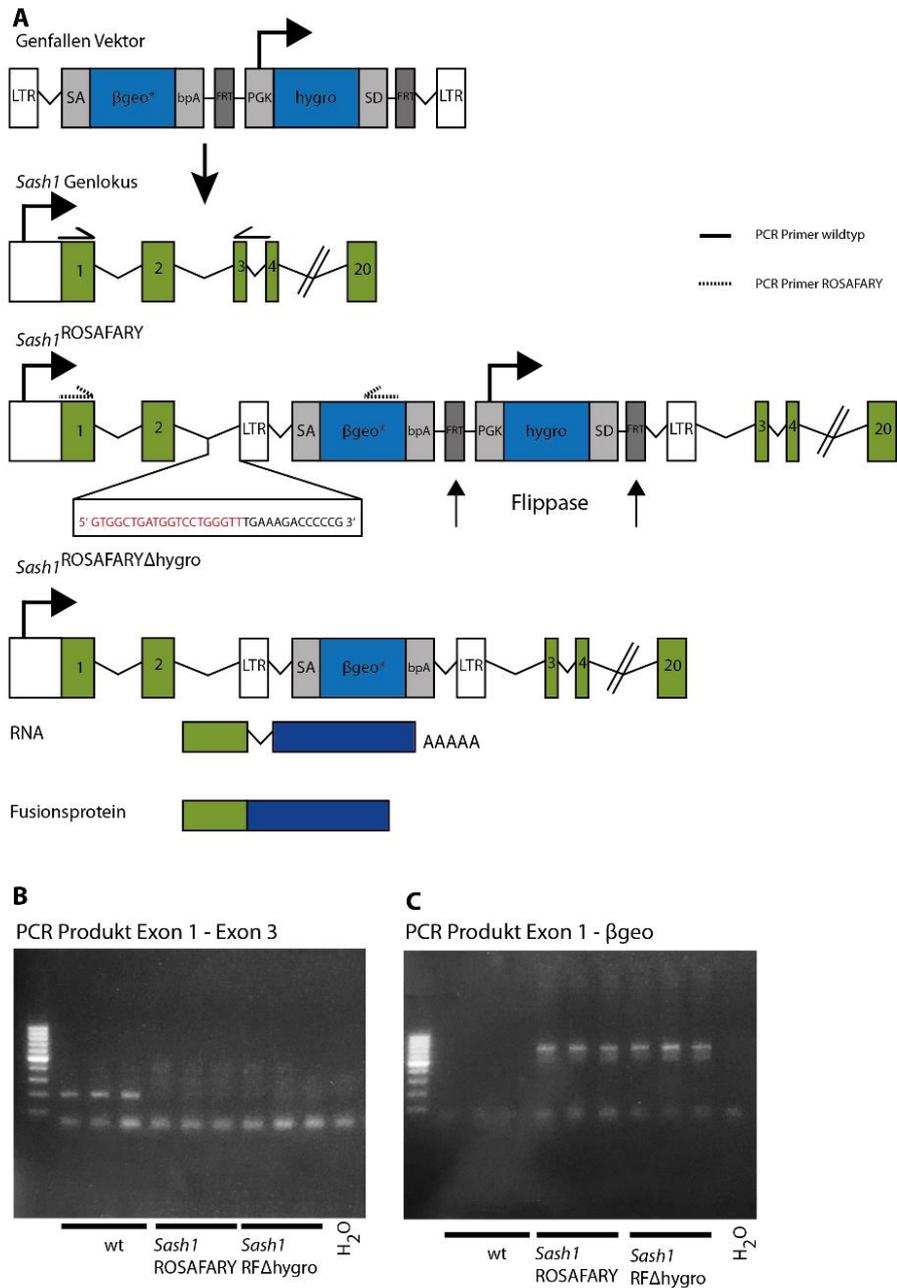
Für die Erstellung der Diagramme und die statistischen Analysen wurde (falls nicht anders angegeben) GraphPad Prism 8 verwendet. Alle Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Statistische Tests, Stichprobengrößen, und p-Werte sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben (nicht signifikant (ns):  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ ). Die Normalverteilung wurde mit dem Normalitätstest von D'Agostino & Pearson geprüft. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Die Signifikanz nominal oder ordinal skalierten Variablen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test überprüft. Überlebenswahrscheinlichkeiten von PatientInnen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet, wobei für den Vergleich der verschiedenen Gruppen der Log-Rank-Test verwendet wurde. Das Metastasen-freie Überleben der PatientInnen (d. h. das post-operative Überleben ohne Fernmetastasen) wurde als primärer Endpunkt betrachtet. Die Grenzwerte für die Zahl an TIL, beziehungsweise für die Expression oder Mutation eines genetischen Markers, die potenziell mit dem Überleben der PatientInnen korrelierten, wurden dankenswerterweise durch Dr. Dr. Ulrich Nitsche (aus der eigenen Arbeitsgruppe, Technische Universität München) übernommen. Hierfür und für die anschließende statistische Auswertung der Kaplan-Meier-Kurven wurde die IBM SPSS Statistics Software Version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) unter Verwendung der Software R Version 2.13.0 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) genutzt, deren Algorithmus an anderer Stelle näher erörtert wird [131].

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Abschnitt I: Das *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell im Kontext der Tumorbilogie

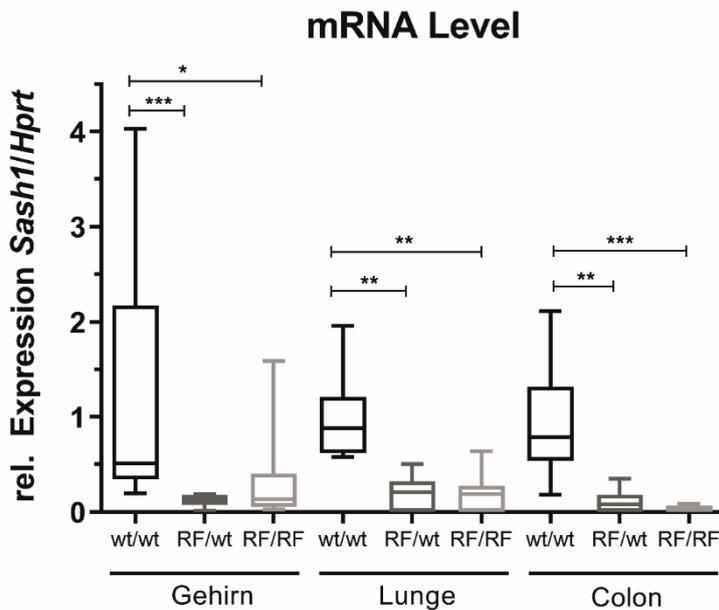
#### 3.1.1 Knockout durch ein *Gene Trap* Verfahren: Analyse der veränderten *Sash1*-Expression in verschiedenen Geweben

Wie eingangs erwähnt konnte der potenziell tumorhemmende Einfluss von *SASH1* in verschiedenen humanen Tumorentitäten in einigen Arbeiten bereits nachgewiesen werden [7, 8, 18-21]. Um den beobachteten Verlust der Heterozygotie von *SASH1* beziehungsweise dessen verminderte Expression im Menschen und die Auswirkungen davon modellhaft nachvollziehen zu können, wurde in vorherigen Arbeiten ein *Sash1*-defizientes Mausmodell geschaffen, welches hier näher erläutert werden soll. In diesem Mausmodell wird die Expression von murinem *Sash1* auf Chromosom 10 durch das Einfügen eines sogenannten *Gene Trap* Vektors (Genfalle) mit einer Poly-A-Trap verhindert. Dieser *Gene Trap* Vektor, ROSAFARY für „Reverse Orientation Splice Acceptor For Array“ genannt, wurde – wie von Friedel und Soriano beschrieben – durch retrovirale Transfektion muriner embryonaler Stammzellen in den *Sash1*-Lokus stabil inseriert [35]. In der Einleitung wurden die Entwicklung des Vektors sowie dessen funktionelle Einheiten bereits erörtert, sodass hier detaillierter auf die einzelnen Komponenten eingegangen werden kann. Der ROSAFARY *Gene Trap* Vektor (Abbildung 5 A) selbst besteht aus einer Poly-A-Fallenkomponente (SA- $\beta$ geo\*-bpA) und einer Promotorkomponente, welche auch für eine Resistenz gegenüber Hygromycin kodiert (PGK-hygro-SD) und von zwei langen, endständigen inaktivierten Sequenz-wiederholungen (LTR) retroviralen Ursprungs flankiert wird. Die Poly-A-Fallenkomponente ist von zwei Flippase-Erkennungssequenzen (FRT) umgeben, an die eine Flippase (FLP) binden und an der dortigen Gensequenz schneiden kann. Die  $\beta$ geo-Komponente kodiert für ein  $\beta$ -Galaktosidase-Neomycin-Phosphotransferase-Fusionsprotein und kombiniert durch die enzymatische Reaktion der  $\beta$ -Galaktosidase die Funktionen eines Reportergens mit der Funktion der Selektion anhand einer Neomycin-Resistenz (Abbildung 5 A). Bei erfolgreicher Integration der Genkassette in den murinen *Sash1*-Lokus führt dies zu einem mutierten Allel unter transkriptioneller Kontrolle des endogenen *Sash1*-Promotors mit der Allel-Bezeichnung *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>. Um die Position des *Gene Trap* Vektors zu bestimmen, wurde der *Sash1*-Lokus durch direkte Sanger-Sequenzierung genomischer DNA anhand von PCR-Produkten analysiert. Hierbei wurde in unserer Arbeitsgruppe der 5'- und 3'-Übergang zwischen der genomischen Sequenz und dem Vektor in der intronischen Region ca. 18.500 Basenpaare (bp) strangabwärts von Exon 2 und damit im intronischen Bereich zwischen Exon 2 und Exon 3 experimentell kartiert (die rot dargestellte Sequenz entspricht der genomischen DNA des *Sash1*-Lokus, die schwarze der *Gene Trap* Kasette; Abbildung 5 A).



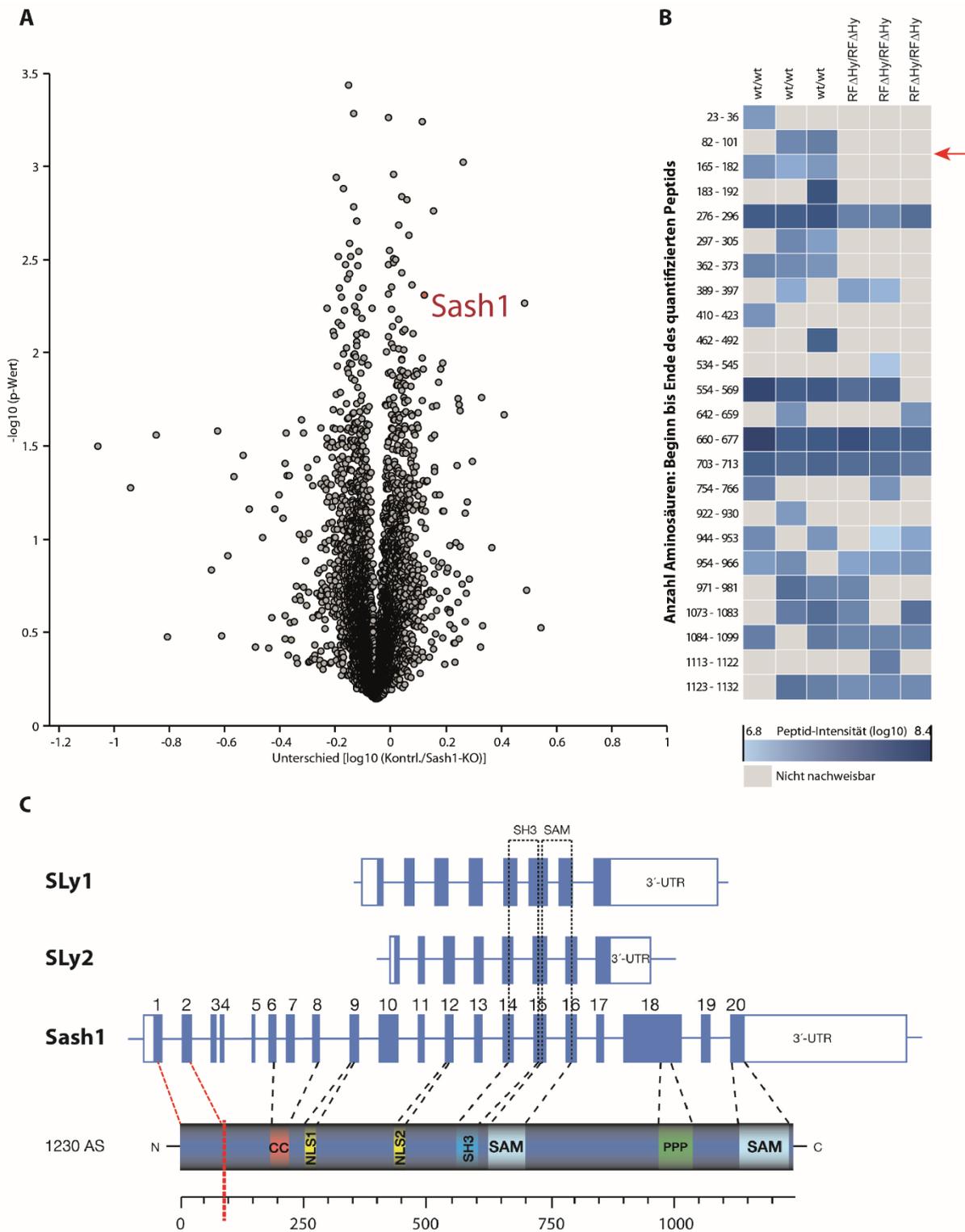
**Abbildung 5: Der ROSAFARY Gene Trap Vektor im murinen Sash1-Lokus. (A)** Schematische Darstellung des ROSAFARY Gene Trap Vektors, welcher durch retrovirale Transfektion muriner embryonaler Stammzellen in den Sash1-Lokus inseriert wurde [35] und dessen funktionelle Domänen: SA = Splice Acceptor, βgeo = β-Galaktosidase-Neomycin-Phosphotransferase, bpA = Polyadenylierungssequenz, FRT = Flippase-Erkennungssequenz, PGK = Phosphoglycerat Kinase Promotorsequenz, SD = Splice Donor; Sash1<sup>ROSAFARYΔHygro</sup> = durch Kreuzung mit FLP-Deleter-Mäusen gekürzte Gene Trap Kasette ohne den exogenen Promotor PGK und das resultierende Fusionsprodukt. Pfeile entsprechen der Lokalisation der entsprechenden Primer für B und C. **(B)** PCR-Produkte, erhalten durch an in Exon 1 und 3 bindende Primer an DNA aus Wildtyp Mäusen, jedoch nicht in homozygoten Sash1<sup>ROSAFARY</sup>- und Sash1<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen (n = 3). **(C)** PCR-Produkte durch an in Exon 1 und der βgeo-Domäne bindende Primer in homozygoten Sash1<sup>ROSAFARY</sup>- und Sash1<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen, jedoch nicht nachweisbar in Wildtyp-Kontrollmäusen (n = 3).

Um die Expression eines potenziellen Fusionsproteins aus SASH1 und dem Hygromycin-Resistenzelement unter Kontrolle einer exogenen und relativ starken, konstitutiven Promotoreinheit (PGK) zu vermeiden, wurde das Hygromycin-Resistenzmodul durch Kreuzung mit FLP-Deleter-Mäusen in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe aus der Keimbahn entfernt. Das neue, vereinfachte Allel trägt den Namen *Sash1*<sup>RFΔHygromycin</sup> (fortan kurz: *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>) (Abbildung 5 A). Nach der Translation sollte ein verkürztes Protein, bestehend aus den ersten beiden Exons und dem *Gene Trap* Vektor, exprimiert werden (Abbildung 5 A). Diese Mäuse wurden anfänglich auf dem Sv129-Hintergrund gezüchtet, um eine stabile Keimbahnübertragung zu erreichen. Die korrekte Lage des *Gene Trap* Vektors wurde auch in späteren Generationen mittels spezifischer Primer und RT-PCR überprüft. Hierzu wurden jeweils drei homozygote *Sash1*-Wildtyp-Kontrollen, homozygote *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup> sowie *Sash1*<sup>RFΔHy</sup> Wurfgeschwister geopfert, Gesamt-RNA aus Gehirnlisaten extrahiert und in cDNA transkribiert. Da aus vorherigen Experimenten bereits eine hohe *Sash1*-Expression im Gehirn bekannt war, wurden diese Organe hier verwendet. Die Primer binden selektiv entweder im Exon 1 oder Exon 3 von *Sash1*, sodass ein PCR-Produkt in der Größe von 331 bp für das Wildtyp-Allel entsteht, oder die Primer umfassen ein PCR-Produkt von 218 bp, da sie in Exon 1 oder in der βgeo-Domäne des mutierten Allels binden (die Positionen der Primer sind schematisch in Abbildung 5 A dargestellt). Die Produkte wurden zur Elektrophorese auf ein 1,5% Agarosegel geladen (Abbildung 5 B und C). Wie erwartet sind die PCR-Produkte von Exon 1 bis Exon 3 nur in Wildtyp-Mäusen vorhanden. Im Gegensatz dazu sind die Produkte von Exon 1 bis zur βgeo-Domäne nur in homozygoten *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup> beziehungsweise *Sash1*<sup>RFΔHy</sup> nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass der *Gene Trap* Vektor auch in späteren Generationen weiterhin stabil zwischen Exon 2 und Exon 3 integriert ist, funktionell exprimiert wird und kein offensichtliches alternatives Spleißen in den untersuchten Geweben stattfindet.



**Abbildung 6: Sash1-mRNA-Level verschiedener solider Organe.** Die *Sash1*-Expression auf Transkriptionsebene wurde durch qRT-PCR untersucht (Mann-Whitney Test; n = 7, wt/wt Lunge n = 6 und wt/wt Gehirn n = 8; \*  $\leq 0,0225$ ; \*\*  $\leq 0,0047$ ; \*\*\*  $\leq 0,0006$ ).

Zur Erfolgskontrolle des *Gene Trap* Verfahrens wurde mithilfe einer sondenbasierten qRT-PCR (die in Exon 9 und 10 des murinen *Sash1*-Gens lokalisiert ist) die relative *Sash1*-Expression verschiedener muriner Organe überprüft. Gehirn, Lunge und Colon waren hierfür von besonderer Relevanz, da diese bereits im Kontext von humanen Neoplasien beschrieben und somit auch in dieser Arbeit überprüft wurden [7, 9, 132]. Organe von Mäusen – heterozygot wie auch homozygot für das *Sash1*-ROSAFARY-Allel – sowie von homozygoten *Sash1*-Wildtyp-Mäusen wurden entnommen, RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Ct-Werte (Zyklusschwellenwerte) von *Sash1* wurden für jedes Gewebe und jeden Genotyp mit dem ausgewählten konstitutiv exprimierten Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt*) in Beziehung gesetzt. Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der *Sash1*-mRNA in allen untersuchten Organen (Abbildung 6). Interessanterweise sind die mRNA-Level der heterozygoten Gewebe vergleichbar mit denen der homozygoten Proben.



**Abbildung 7: Proteom-Analyse muriner *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>- und Wildtyp-Gehirne.** (A) Die *Sash1*-Expression im Gehirn ist in Wildtyp C57Bl/6N-Mäusen gegenüber den *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>- 1,51-fach erhöht. (ungepaarter t-test; n = 3; p = 0,0056). (B) Heat Map bezüglich der Intensität der detektierten *Sash1*-Peptide (roter Pfeil = Position der Genetrapp-Kassette, bis hier Peptide des Fusionsproteins der *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäuse aus Exon1/2). Im C-terminalen Teil des Proteins finden sich weiterhin Peptide mit einer niedrigen Abundanz. (C) Vergleich der murinen Genloci und Proteine SLy1, SLy2 und *Sash1*; Die Insertion des *Gene Trap* Vektors erfolgte im Intron 2 von *Sash1*. Sequenzierungsergebnisse lassen die Translation der ersten 88-91 Aminosäuren in *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen erwarten: rot gestrichelte Linien zeigen die zugehörigen Exons und die Länge des Restproteins an [133].

Eine Bestimmung der murinen *Sash1*-Expression auf Proteinebene durch eine Antikörper-vermittelte Nachweismethode gestaltete sich schwierig, da konventionell hergestellte Antikörper verschiedenster Hersteller keine methodisch zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten. Um einen Eindruck einer möglichen *Sash1*-Restexpression im Genetrap-Modell zu gewinnen, wurden in Kooperation mit Dr. Johannes Müller-Reif (Max-Planck-Institut für Biochemie, München) eine massenspektrometrische Untersuchung des Proteoms von Gehirnllysaten aus jeweils  $n = 3$  *Sash1*-Wildtyp und *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen vorgenommen. Für eine tiefergehende Analyse der *Sash1*-Expression wurde eine Vorfraktionierung durchgeführt. Diese Fraktionierung und die Präparation der Proben erfolgten gemäß dem Protokoll der Kooperationspartner [127, 128]. In den *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen ist der Gehalt an Sash1 um das 1,5068-fache im Vergleich zu den drei Kontrollproben reduziert, der Unterschied ist hochsignifikant (Abbildung 7 A,  $p = 0,0056$ ). Das im Vergleich zum Gesamtproteom niedrig abundante Sash1 war in den Lysaten der *Sash1*-defizienten Mäusen somit weiter erniedrigt, allerdings nicht völlig defizient. Durch diese sehr sensitive Messmethode konnten weiterhin Peptide vor allem im Bereich des C-Terminus detektiert werden, wohingegen N-terminal weniger bis keine Peptide messbar waren oder diese unter der Nachweisgrenze lagen (Abbildung 7 B). Die Kartierung des Mausgenoms hinsichtlich der Lage des *Gene Trap* Vektors zeigte eine Insertion zwischen Exon 2 und Exon 3 mit einer restlichen Translation von etwa 90 Aminosäuren. Zur besseren Einordnung der Ergebnisse der in Abbildung 7 B dargestellten Heat Map finden sich die zu erwarteten translatierten Aminosäuren in Abbildung 7 C. Eine Liste an Proteinen, die sich in den Kontrollmäusen mit dem Signifikanzniveau von Sash1 oder geringer unterscheiden, findet sich im Anhang (Tabelle S 3).

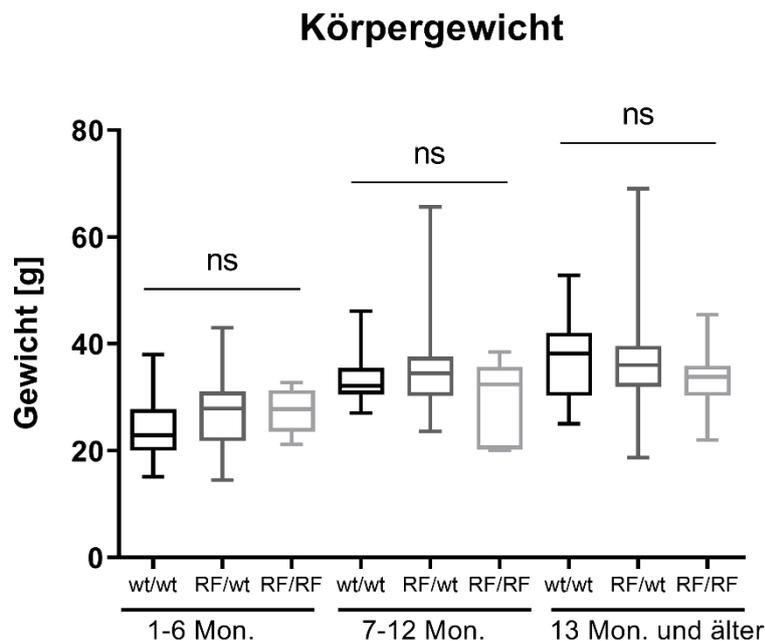
### 3.1.2 Lebensfähige *Sash1*-defiziente Mäuse mit Nachkommen nach den Mendelschen Regeln

	Anzahl Mäuse	beobachtet	erwartet
<b>RF/RF</b>	37	29,6%	25,0%
<b>RF/wt</b>	55	44,0%	50,0%
<b>wt/wt</b>	33	26,4%	25,0%
	$n = 125$		
<b>Durchschn. Wurfgröße</b>	8,2		
<b>Median Wurfgröße</b>	8		

**Tabelle 1: Vererbung der *Gene Trap* Kasette in *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen.** Nachkommen der *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse sind lebensfähig und besitzen gemäß der Verteilung der Mendelschen Regeln heterozygote und homozygote Allele ( $n = 125$ ).

Nach der erfolgreichen und stabilen Integration des *Gene Trap* Vektors in den *Sash1*-Lokus stellte sich auch die Frage, ob mutierte Allele gemäß den Mendelschen Regeln vererbt werden. Eine deutliche Abweichung davon würde einen Hinweis auf eine mögliche embryonale Letalität liefern. Die Genotypisierung der *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse zeigt hingegen, dass auch für das mutierte Allel homozygote wie auch heterozygote Mäuse lebensfähig sind und das mutierte Allel in der

Keimbahn weitergeben. Eine zufällige Auswahl an Verpaarungen von heterozygoten *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup> Mäusen ergab die Verteilung wie sie in Tabelle 1 zu sehen ist. Dabei entsprechen die beobachteten Raten der Genotypen innerhalb der Stichprobe in etwa den erwarteten Verhältnissen gemäß der Mendelschen Regeln (Tabelle 1). Auch die Reproduktionsfähigkeit der *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse scheint im Vergleich zu publizierten Wurfgrößen von C57BL/6N-Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein, wonach die Wurfgröße dieses Mausstamms zwischen 5-11 Jungtieren betragen kann [134]. In der vorliegenden Arbeit werden keine verringerten Wurfgrößen beobachtet: im Durchschnitt werden 8,2 Tiere pro Wurf geboren, im Median sind dies 8 (Tabelle 1).



**Abbildung 8: Körpergewicht zum Zeitpunkt der Opferung von *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen und deren Kontrollen.** Die einmalige Messung des Körpergewichts der Mäuse erfolgte nach der Opferung. Das Gewicht wurde nach Genotyp und Alter der Mäuse zusammengefasst und das Signifikanzniveau jeweils gegen Wildtyp-Mäuse bestimmt (ungepaarter t-Test; n = 260; p = ns). Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde hier auf Angaben zu Gruppengrößen und Signifikanzniveaus verzichtet. Eine ausführliche Tabelle findet sich im Anhang (Tabelle S 1).

Die Frage, ob die Veränderung des *Sash1*-Lokus durch die Insertion des ROSAFARY-Vektors sich auf grundlegende physiologische Funktionen wie etwa die Embryonalentwicklung, den Stoffwechsel oder das Wachstum auswirkt, kann anhand des Körpergewichts der Mäuse verschiedener Genotypen abgeschätzt werden. Hierzu wurde bei der Opferung der Mäuse das Gewicht bestimmt und dem Alter und Genotyp entsprechend gruppiert. Im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern ist bei heterozygoten oder homozygoten *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup> Mäusen keine signifikante Gewichtsabweichung nachweisbar (Abbildung 8). Gerade in den ersten Monaten nach Geburt unterscheiden sich die Mäuse verschiedener Genotypen im Mittel nur wenig voneinander. Auch wenn zu späteren Zeitpunkten einzelne heterozygote Mäuse extremere Abweichungen als die

Wildtyp Mäuse aufweisen, ist das mittlere Gewicht dieser Tiere nicht signifikant verändert. Abweichungen in Richtung eines verringerten Gewichts in Mäusen mit mutiertem *Sash1*-Genlocus könnten ein Hinweis auf die Entstehung maligner Neoplasien sein, wurden jedoch hier nicht beobachtet. Während der Arbeit mit den Tieren und deren Beobachtung über einen Zeitraum von mehreren Generationen wurden keine offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten festgestellt.

### 3.1.3 Systematische Erfassung des Tumorphänotyps von *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen im genetischen Hintergrund Sv129

Die erhaltenen chimären Sv129-*Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse wurden auf den C57Bl/6N-Stamm zurückgekreuzt. Dies ist eine gängige Praxis, da sich Stämme des Sv129-Hintergrunds – anders als C57Bl/6N – weniger gut vermehren lassen und im Vergleich zum weltweiten Standardstamm Bl/6 Anomalien im Verhalten und der Anatomie aufweisen [135]. Interessanterweise war der Tumorphänotyp der Mäuse nur bei Verpaarungen mit dem genetischen Hintergrund von Sv129-Mäusen zu beobachten, sodass der Stamm augenscheinlich eine höhere Tumorsuszeptibilität aufweist als jener von C57Bl/6N-Mäusen. Diese Beobachtung wurde bereits früher publiziert und stellt eine gewisse Einschränkung für den ansonsten praktikablen Mausstamm C57Bl/6N dar [135]. Dass der Hintergrund der Sv129-Mäuse initial verwendet wurde, liegt vor allem an den biologischen Besonderheiten deren embryonaler Stammzellen (ES-Zellen), da sich diese speziell für die Einführung gentechnischer Veränderungen eignen [136]. Da der Tumor-Phänotyp also nur auf dem Hintergrund des Sv129-Stamms zu beobachten war, konzentrieren sich Teile dieser Arbeit auf den Phänotyp der ersten Generationen nach Verpaarung der chimären Mäuse (F1), Mäuse der F1-Generation gepaart mit Wildtyp C57Bl/6N-Mäusen (F1 x wt) und F1 gepaart mit F1 (F1 x F1). Dies umfasste 15 Verpaarungen mit insgesamt 136 Mäusen, von denen 46 homozygot für das Wildtyp-Allel waren (*Sash1 wt/wt*) und 90 einen heterozygoten Genotyp aufwiesen (*Sash1* RF het). Das Kollektiv von 136 Mäusen umfasste 73 männliche und 63 weibliche Mäuse (Tabelle 2).

		Gesamt n = 136	Prozent (100%)	Tiere mit Tumor	Inzidenz	p-Wert
<b>Genotyp</b>	RF het	90	66,2%	20	14,7%	<b>0,0022</b>
	wt/wt	46	33,8%	1	0,7%	
<b>Geschlecht</b>	weiblich	63	46,3%	13	9,6%	<b>0,1194</b>
	männlich	73	53,7%	8	5,9%	
<b>Genotyp und Geschlecht</b>	RF het weiblich	43	31,6%	12	8,8%	<b>0,2147</b>
	RF het männlich	47	34,6%	8	5,9%	
	wt/wt weiblich	20	14,7%	1	0,7%	
	wt/wt männlich	26	19,1%	0	0,0%	
<b>Genotyp und Alter</b>	RF het < 12 Monate	64	47,1%	2	1,5%	<b>0,2711</b>
	wt/wt < 12 Monate	38	27,9%	0	0,0%	
	RF het >12 Monate	26	19,1%	18	13,2%	<b>0,0047</b>
	wt/wt > 12 Monate	8	5,9%	1	0,7%	
	RF het < 12 Monate	64	47,1%	2	1,5%	
	RF het >12 Monate	26	19,1%	18	13,2%	

**Tabelle 2: Tumorphänotyp in einer Kohorte von *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen mit Sv129-Hintergrund.** 136 Mäuse der F1-Generation, bzw. der Verpaarungen von F1xF1 und F1xwt wurden hinsichtlich einer möglichen Tumorbelastung untersucht und gemäß dem Genotyp, Geschlecht, oder Alter stratifiziert (Chi-Quadrat-Test).

Wie oben bereits erläutert führte die Verwendung eines *Gene Trap* Vektors zu einem Verlust der Heterozygotie und damit zu einer auf mRNA-Level beobachtbaren Haploinsuffizienz von *Sash1* in diesem Mausmodell. Ob eine Maus von einem Tumor betroffen war, wurde durch eine Sektion nach der sachgemäßen Tötung aufgrund einer äußerlich erkennbaren Beeinträchtigung des Allgemeinzustands (Erfüllung der Abbruchkriterien) oder, in selteneren Fällen, nach spontan eingetretenem Tod festgestellt. Innerhalb der gesamten Kohorte zeigten 21 Mäuse eine spontane Tumorbildung (15,4%) mit einem mittleren Alter von 20 Monaten (Bereich: 11,5-26 Monate). Die häufigsten beobachteten Tumorentitäten sind Lungenläsionen (n = 12), histopathologisch als Adenokarzinome eingestuft, gefolgt von Lymphomen (n = 6, B-Zell Lymphom) und Läsionen in anderen Organen wie Leber, Haut (jeweils n = 2, Nicht-Melanom Hauttumore) und Darm (n = 1) (Tabelle 3). Ausgewählte Tumore wurden durch einen Veterinärpathologen beurteilt (s. unten). Interessanterweise waren 20 dieser Mäuse heterozygot bezüglich des *Sash1*-ROSAFARY-Allels, während nur eine einzige Wildtyp-Maus eine Tumorbildung aufwies, sodass ein hochgradig signifikanter Zusammenhang zwischen *Sash1*-Mutation und Tumorgenese hergestellt werden kann (Tabelle 2). Werden die Mäuse der untersuchten Kohorte gemäß deren Alter und Genotyps stratifiziert, zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Einflussgrößen und der Entwicklung maligner Neoplasien. Im Gegensatz dazu liefert eine kombinierte Stratifizierung

von Geschlecht und Genotyp keinen Hinweis für einen Einfluss auf die Tumorentwicklung (Tabelle 2).

<i>Sash1</i> RF/wt			
Mausnummer	Läsion/Entität	Geschlecht	Alter (Monate)
2905	Lunge	weiblich	22
2906	Leber	weiblich	26
2935	Lymphom*	weiblich	20
2939	Lymphom	weiblich	21
3067	Lunge	weiblich	12
3006	Haut Läsion	weiblich	11,5
3283	Lymphom	weiblich	17
3287	Lunge	weiblich	26
3303	Lunge	weiblich	15
3299	Lunge + Lymphom	weiblich	10
3068	Lymphom	weiblich	12
3174	Ileum Läsion	weiblich	25
2837	Lunge*	männlich	23
2839	Lunge*	männlich	23
3110	Lunge	männlich	24
3112	Lunge	männlich	24
3268	Lunge	männlich	24
3279	Lunge + Leber	männlich	24
3280	Haut Läsion	männlich	17
3297	Lunge + Lymphom	männlich	24
<i>Sash1</i> wt/wt			
3306	V.a. Lymphom (Colon Uterus)	weiblich	17

**Tabelle 3: Genotyp, Tumorentität, Geschlecht und Alter von *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen mit einem Tumorphänotyp.** Läsionen in heterozygoten Mäusen: Lunge n = 12; Lymphom n = 6; Leber n = 2; Haut n = 2; Darm n = 1; 12 von 20 (60%) entdeckte tumoröse Neoplasien gehen auf weibliche Mäuse zurück. \* Repräsentative Läsionen wurden histopathologisch durch einen Veterinärpathologen beurteilt.

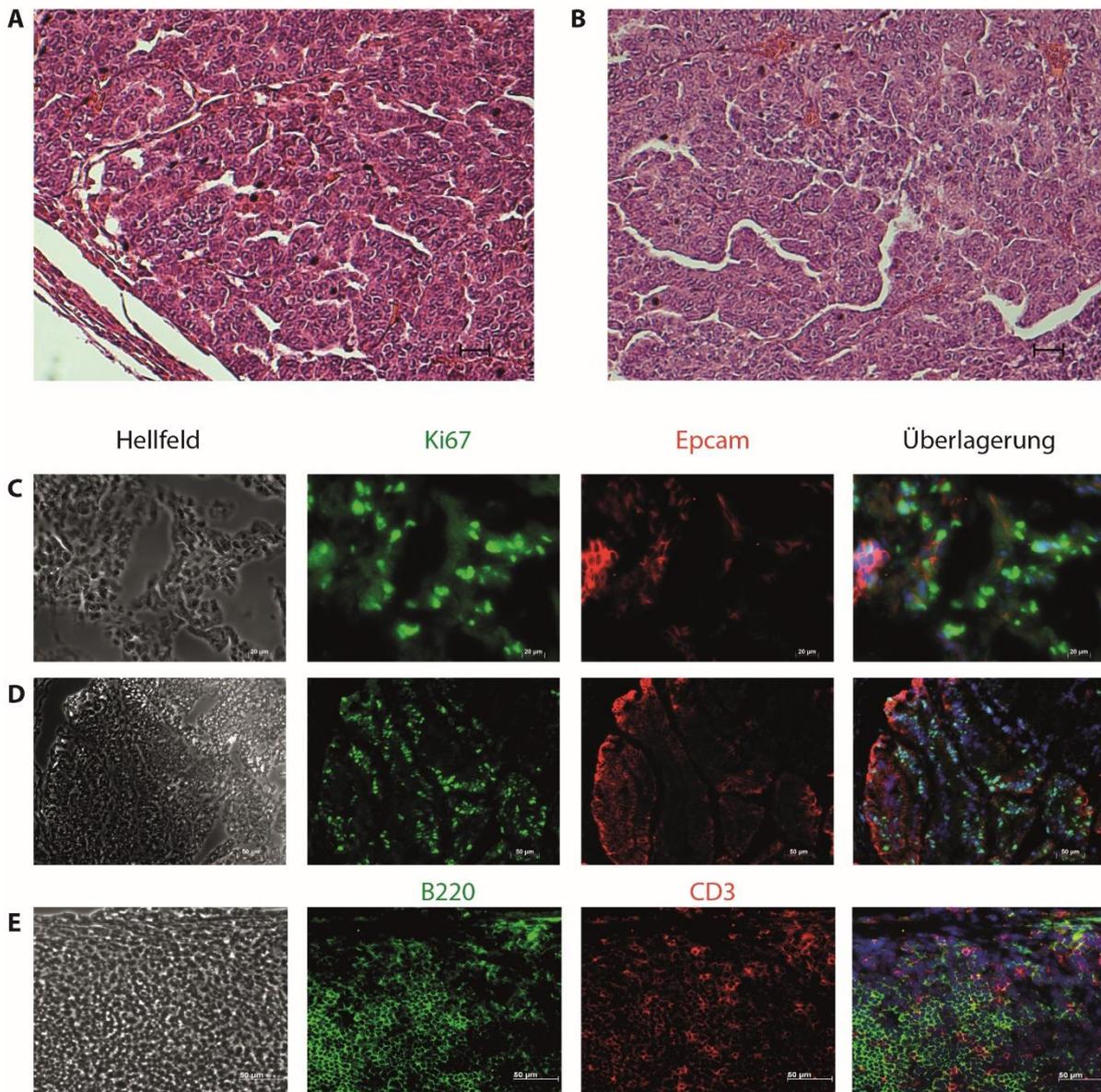
Auch wenn in dieser untersuchten Stichprobe keine signifikante Assoziation von Geschlecht und Tumorleiden hergestellt werden kann, so sind doch folgende Beobachtungen von besonderem Interesse. Zum einen wurde die Tumorlast weiblicher Mäuse im Durchschnitt vier Monate früher als bei männlichen Wurfgeschwistern offensichtlich (Tabelle 4). Zum anderen sind zwar nur 46,3% der untersuchten Mäuse weiblich, jedoch verzeichnen diese mit 60% der beobachteten Tumore eine überdurchschnittlich hohe Tumorlast (Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4). Beide Beobachtungen könnten auf einen Einfluss des Geschlechts auf die Tumorgenese hindeuten, was im folgenden Kapitel noch weiter erörtert werden soll.

Genotyp	Geschlecht	Alter bei Tumordetektion (Median)	Alter bei Tumordetektion (Mittelwert)	SD
<b>Sash1</b> RF/wt	Weiblich	18,5	18,1	6,0
	Männlich	24	22,9	2,4
	Gesamt	22,5	20,0	5,3

**Tabelle 4: Stratifizierung heterozygoter *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse nach Alter und Geschlecht.** Weibliche Mäuse zeigen im Durchschnitt ein früheres Auftreten tumoröser Neoplasien.

Die tumorsuppressive Rolle von *Sash1* in multiplen Organen wird auch durch den Befund unterstrichen, dass bei drei von 20 heterozygoten Mäusen mit Tumorstadium multiple Neoplasien gefunden wurden. Bei zwei von vier Mäusen, die ein Adenokarzinom der Lunge entwickelten, offenbarte die Sektion zudem ein zeitgleich aufgetretenes mutmaßliches Lymphom (Mäuse Nr. 3299 und 3297). Eine weitere Maus hatte neben dem Befall der Lunge zudem eine Läsion der Leber (Mausnummer 3279). Die einzige Wildtyp-Maus, die eine Tumorentwicklung aufwies, mutmaßlich ein multifokales B-Zell Lymphom, litt gleichermaßen an einer Lungen- und einer Gebärmutterläsion (Tabelle 3).

Die folgenden Seiten dieses Kapitels stellen histologische und immunhistochemische Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe dar (Masterarbeiten Birgitta Heckl, Eva Lichtenegger), die zwar nicht im Rahmen dieser Arbeit produziert, jedoch systematisch erfasst und tabellarisch sowie graphisch aufbereitet wurden. Daher sollen diese Befunde hier kurz erörtert werden.



**Abbildung 9: Histopathologisch, mikroskopische Aufarbeitung muriner Tumore des *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodells. (A)** H&E-Färbung eines Lungenkarzinoms der Maus 2839 (Maßstab = 25 µm). **(B)** H&E-Färbung eines Lungenkarzinoms der Maus 2839: Tumorzentrum (Maßstab = 25 µm). **(C)** Gewebeschnitte eines Lungenkarzinoms der Maus 5012, Antikörperfärbung gegen Ki67 (grün), Epcam (rot) und DNA-Färbung mit DAPI (blau) für Immunfluoreszenzmikroskopie (Maßstab = 20 µm). **(D)** Schnitte einer Darmläsion der Maus 5183; Färbungen und Maßstab entsprechen (C). **(E)** Färbung eines Lymphoms der Maus 5183 mit spezifischen Antikörpern gegen-B220 (grün), CD3 (rot) und DAPI (blau) für Immunfluoreszenzmikroskopie (Maßstab = 20 µm).

Die Sektion der Maus 2839 ergab eine rundliche Lungenläsion mit einem Durchmesser von etwa 5 mm sowie eine 1 cm lange, verdickte Darmwand mit einer weiteren Läsion von 2 mm. Der zur histologischen Untersuchung durch das Tierpathologische Institut der LMU München mit Hämatoxylin und Eosin angefärbte Gewebeschnitt wies auf einen primären Lungentumor hin, der überwiegend solide war und eine multifokale zentrale Nekrose aufwies, die höchstwahrscheinlich einem primären Lungenadenokarzinom entsprach (Abbildung 9 A, B). Die Restlunge wies zahlrei-

che Alveolarmakrophagen und mäßige perivaskuläre, lymphozytäre Infiltrationen auf. Die Histopathologie eines anderen seziierten Lungentumors (Maus 2837) zeigte multiple Herde eines vorwiegend tubulo-papillär wachsenden Adenokarzinoms ohne Hinweis auf dessen Histogenese. Ein weiteres Lungenadenokarzinom und eine Dickdarmläsion wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem Proliferationsmarker Ki67 und Epcam (*epithelial cell adhesion molecule*, ein Transmembranglykoprotein, das in epithelialen Tumorentitäten häufig überexprimiert wird) angefärbt. Sowohl die Lungen- als auch die Dickdarmläsion sind positiv für diese Marker, was auf ein Karzinom hinweist (Abbildung 9 C, D). Bei der Sektion der Maus 2935, die im Alter von 21 Monaten verstarb, wurde eine solide Läsion mit einer Größe von 2x2x1 cm an der Gebärmutter festgestellt. Die histologische Untersuchung ergab eine hochgradige diffuse pleomorphe Rundzellinfiltration lymphatischen Ursprungs mit überwiegend runden Kernen, ungleichmäßig kondensiertem Chromatin, isolierten Mitosen und fokaler zentraler Nekrose, die höchstwahrscheinlich mit einem Lymphom übereinstimmt. Darüber hinaus wurden die Lymphom-ähnlichen Tumore für Maus-pan-B-Zell Marker B220 (CD45 Isoform) und das T-Lymphozyten-Antigen CD3 angefärbt. Die starke membranständige Expression der CD45 Isoform in den Schnitten deutet auf ein B-Zell-Lymphom hin (Abbildung 9 E).

### 3.1.4 Überrepräsentation weiblicher Mäuse in der Tumorprävalenz und translationaler Vergleich der Situation beim Menschen

Wie oben bereits erörtert wurde, tragen weibliche *Sash1*<sup>ROSA<sup>F</sup>F<sup>Y</sup></sup>-Mäuse mehrheitlich zur entdeckten Tumorlast in der untersuchten Population bei. Interessanterweise sind die befallenen weiblichen Mäuse im Durchschnitt 4,8 Monate jünger als deren männliche Wurfgeschwister (Tabelle 4), sodass die Entwicklung einer Neoplasie in weiblichen Mäusen mit einer *Sash1*-Haploinsuffizienz eine verkürzte Latenz und eine erhöhte Frequenz aufweist. Auch wenn nur das Alter und der Genotyp, nicht aber das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf Neoplasien erkennen lassen (Tabelle 2), bietet diese mögliche Assoziation von Geschlecht und Tumorgenese eine Gelegenheit für eine Translation der Beobachtungen zum Menschen.

Es ist bereits bekannt, dass *SASH1*-Deletionen im Menschen auch mit geschlechtsspezifischen Tumorentitäten assoziiert sind, wie etwa bei Karzinomen der Mamma, der Ovarien oder des Gebärmutterhalses, aber auch der Prostata [6, 137-139]. Die Frage, inwiefern chromosomale Verluste von *SASH1* auch in menschlichen Proben über alle Krebsentitäten hinweg beobachtbar sind, sollte mithilfe der cBioPortal-Plattform [140] für Krebsgenomik beantwortet werden.

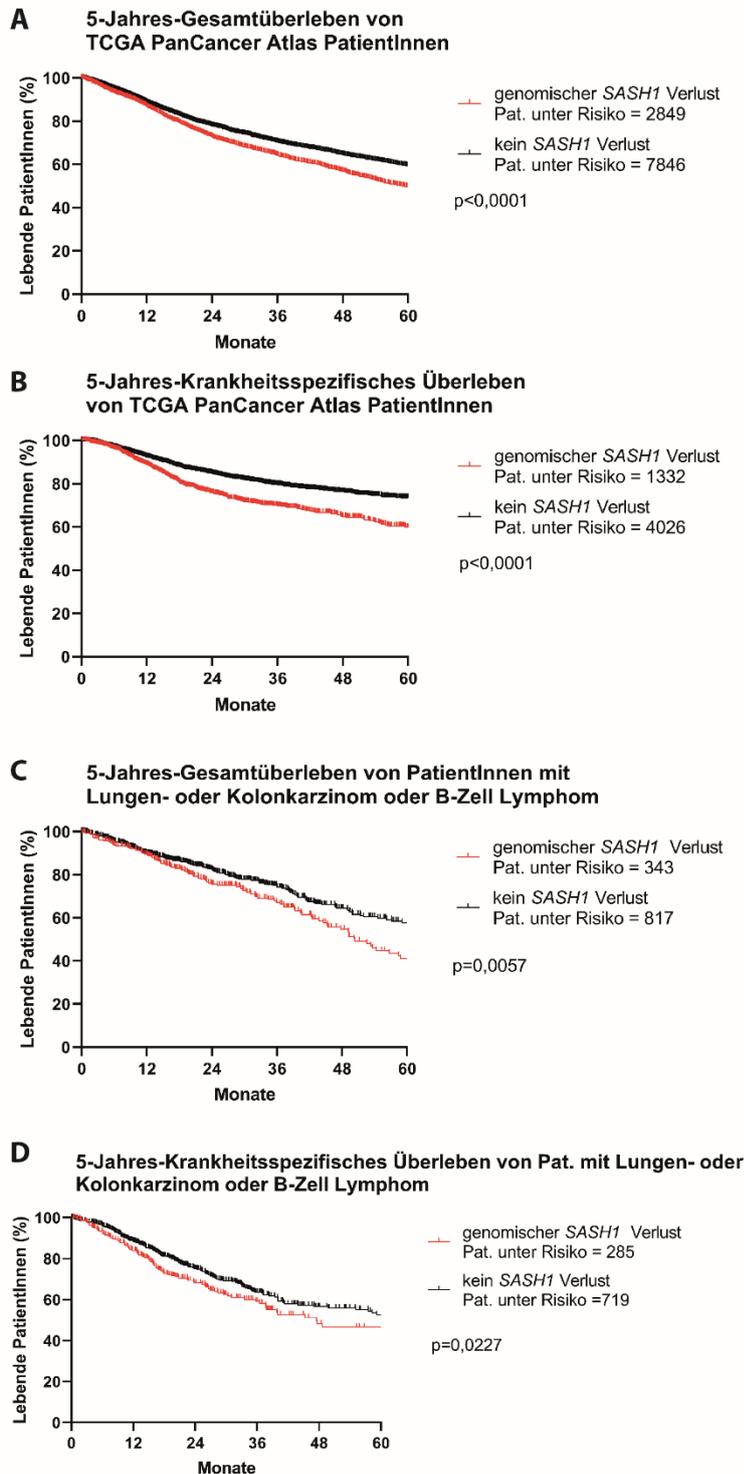
Geschlecht	Frauen		Männer		Gesamt	$\chi^2$
genomischer SASH1-Verlust	1475	54,1%	1253	45,9%	2728	
kein genomischer SASH1-Verlust	3841	51,5%	3614	48,5%	7455	
<b>Gesamt</b>	<b>5316</b>		<b>4867</b>		<b>10183</b>	<b>p &lt; 0,0227</b>

**Tabelle 5: Genomischer SASH1-Verlust in Krebspatientinnen signifikant häufiger als in männlichen Betroffenen.** (Chi-Quadrat-Test; n = 5316 von 10183; p<0,0227)

Diese Datenbank stellt molekulare Profile und klinische Merkmale von groß angelegten Projekten zur Krebsgenomik zur Verfügung, wie etwa dem TCGA Projekt [141]. Eine Abfrage der Datenbank hinsichtlich genomischer Verluste des SASH1-Lokus zeigte, dass insgesamt 9% aller PatientInnen mit einer Krebserkrankung jeglicher Art von einer SASH1-Deletion betroffen sind [140, 142]. In dieser Subgruppe an erkrankten Personen finden sich wiederum signifikant mehr Proben von Patientinnen mit einer SASH1-Deletion (Tabelle 5).

Die Daten der verwendeten TCGA GDAC Firehose Studie (Broad Institute) ließen leider keine Abfrage von Kaplan-Meier-Kurven zu, in denen das Überleben von Frauen mit genomischem SASH1-Verlust mit dem von Männern mit ähnlichen Genotypen hätte verglichen werden können. Allerdings konnte das 5-Jahres-Gesamtüberleben sowie das 5-Jahres-Krankheitsspezifische Überleben von PatientInnen mit SASH1-Verlust mit jenen ohne genomische Veränderungen verglichen werden. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen zeigen Patientinnen und Patienten mit einem SASH1-Verlust sowohl ein geringeres Gesamtüberleben als auch ein reduziertes krankheitsfreies Überleben über die verschiedenen Entitäten des verwendeten Registers (Abbildung 10 A, B). Die am häufigsten beobachteten Tumorentitäten im *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell sind das Adenokarzinom der Lunge und des Dickdarms sowie das B-Zell-Lymphom. Daher wurden die entsprechenden Entitäten kombiniert und die TCGA Firehose Legacy-Studien bezüglich des Überlebens von PatientInnen mit genomischen SASH1-Verlusten hin abgefragt. Auch hier wurden die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate und die 5-Jahres-Krankheitsspezifische-Überlebensrate analysiert, und es zeigt sich, dass die Überlebensrate nach dem Verlust von SASH1 bei diesen drei Entitäten signifikant niedriger ist (Abbildung 10 C, D). [140, 142]

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich ähnliche Effekte im *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell auch in humanen Kollektiven wiederfinden und somit die Translation von Beobachtungen im Mausmodell auf den Menschen durchaus legitim sein kann.



**Abbildung 10: Prognostische Relevanz des genomischen *SASH1*-Verlusts für das Überleben von KrebspatientInnen des TCGA GDAC Firehose Kollektivs [140]. (A) Kaplan-Meier Analyse bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens von PatientInnen mit genomischem *SASH1*-Verlust aller in der TCGA Firehose Studie erfassten Krebsentitäten (Log-rank Test; 2.849 von 10.695;  $p < 0,0001$ ). (B) Kaplan-Meier Analyse bezüglich des 5-Jahres-Krankheitsspezifischen Überlebens von PatientInnen mit genomischem *SASH1*-Verlust aller in der TCGA Firehose erfassten Krebsentitäten (Log-rank Test; 1.332 von 5.358;  $p < 0,0001$ ). (C) Kaplan-Meier Analyse hinsichtlich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens von PatientInnen mit im *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell aufgetretenen Tumorentitäten der Lunge, des Kolons und des Lymphoms (Log-rank Test; 343 von 1.160;  $p = 0,0057$ ). (D) Kaplan-Meier Analyse hinsichtlich 5-Jahres-Krankheitsspezifischen Überlebens von PatientInnen mit im *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell aufgetretenen Tumorentitäten der Lunge, des Kolons und des Lymphoms (Log-rank Test; 285 von 1.004;  $p = 0,0227$ ).**

## 3.2 Abschnitt II: Das *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell im Kontext der Pigmentbiologie

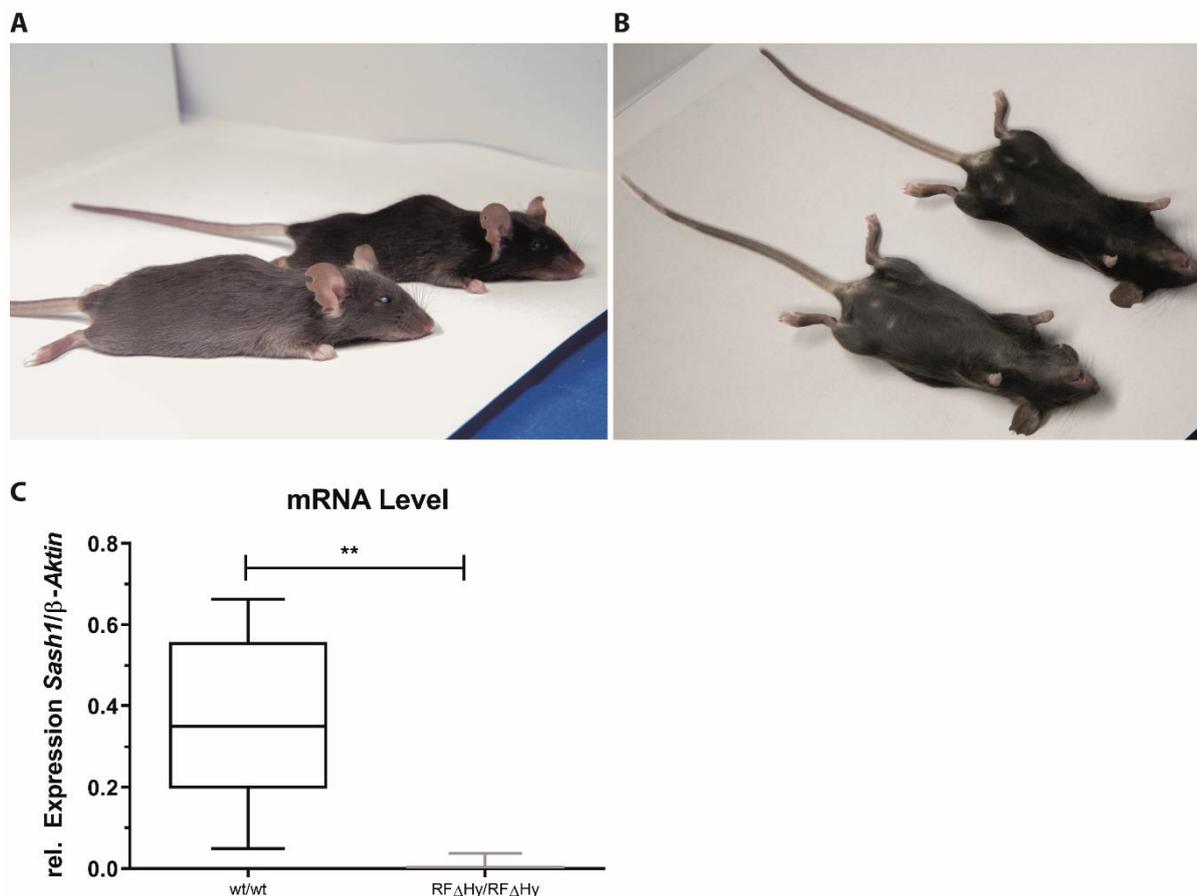
### 3.2.1 Qualitative Beschreibung des Phänotyps

Im vorherigen Abschnitt wurde erläutert, wie die Verwendung eines *Gene Trap* Vektors im *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell einen pro-onkogenen Phänotyp vor dem genetischen Hintergrund von Sv129-Mäusen verursacht. Durch die Rückkreuzung des genetischen Modells auf den Hintergrund der C57Bl/6N-Mäuse ging dieser Phänotyp über mehrere Generationen hinweg jedoch verloren (AG Janssen, Manuskript in Vorbereitung). Weiterhin wurden die *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>- mit FLP-Deleter-Mäusen verpaart, wodurch das Hygromycin-Resistenzelement des ROSAFARY-*Gene Trap* unter Kontrolle des PGK-Promotors in der Keimbahnlinie entfernt wurde. Daraus resultiert nunmehr das *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mausmodell (Abbildung 5 A). Im Verlauf der Verpaarungen von C57Bl/6N-Mäusen mit *Sash1*-defizienten Mäusen und den ersten homozygoten *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Nachkommen stellte sich eine weitere Besonderheit ein: die ansonsten schwarze Fellfarbe der Mäuse war bei einigen Wurfgeschwistern homogen grau gefärbt (Abbildung 11). Eine solche abgeschwächte Intensität der Fellfarbe wird auch als „dilute“ oder „verdünnt“ bezeichnet [54]. Dieser Pigmentierungs-Phänotyp stellt sich bereits beim Wachstum des ersten Fells der Jungtiere ein. Interessanterweise sind fast ausschließlich Mäuse von dieser homogenen grauen Fellfarbe betroffen, die homozygot für das veränderte *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Allel sind, während keines der Tiere mit homozygoten Wildtyp-Allelen diese Veränderungen zeigt (Tabelle 6).

Genotyp	Fellfarbe Schwarz	Fellfarbe Grau	Anzahl Gesamt	$\chi^2$
RF/RF	1	79	80	$p < 0,0001$
RF/wt	63	2	65	$p = 0,477$
wt/wt	16	0	16	
Gesamt	80	81	161	

**Tabelle 6: Hypopigmentierungsphänotyp in *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen.** 1 von 80 homozygoten *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen besitzen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern eine schwarze Fellfarbe (Chi-Quadrat-Test;  $p < 0,0001$ ). In heterozygoten Mäusen besitzen 63 von 65 eine schwarze Fellfarbe (Chi-Quadrat-Vierfelder Test;  $p = 0,477$ ).

Von insgesamt 65 untersuchten heterozygoten Mäusen konnten nur zwei mit einer auffälligen Fellfarbe identifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass die Penetranz des Phänotyps bei heterozygotem Genotyp deutlich geringer ausfällt. Abgesehen von der veränderten Fellfarbe zeigen sich, wie oben bereits ausgeführt, weder offensichtliche Entwicklungs- oder Verhaltensauffälligkeiten noch hat der Genotyp Einfluss auf die Lebensfähigkeit, Fruchtbarkeit, und die Vererbbarkeit der Merkmale nach den Mendelschen Regeln.



**Abbildung 11: Hypopigmentierungsphänotyp und signifikant reduzierte *Sash1*-Expression der Haut von homozygoten *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen. (A, B)** Homozygote *Sash1*-defiziente Mäuse besitzen eine homogen graue Fellfarbe. **(C)** Die *Sash1*-Expression der Haut auf Transkriptionsebene wurde durch qRT-PCR untersucht (Mann-Whitney Test; wt/wt n = 5; RFΔHy/RFΔHy n = 7; p = 0,0013).

Da insbesondere die homozygoten *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäuse eine Hypopigmentierung präsentieren, wurde in der Haut (als Zielorgan der Pigmentierung) die *Sash1*-Ausprägung auf mRNA-Level untersucht. Dafür wurden von jeweils sieben homozygot mutierten und Wildtyp-Mäusen eine vom Großteil des Fells befreite Hautprobe des Rückens von etwa 2 cm<sup>2</sup> entnommen, RNA extrahiert und in cDNA transkribiert, um das Niveau der *Sash1*-mRNA in den untersuchten Geweben abschätzen zu können. Dabei zeigt sich eine hoch signifikante Suppression der *Sash1*-mRNA in den untersuchten mutierten Hautproben; ein Zusammenhang zwischen einer *Sash1*-Defizienz und dem Pigmentierungsphänotyp erscheint somit naheliegend (Abbildung 11 C). Etwa zeitgleich veröffentlichte Studien verdeutlichten erstmals die Rolle von *SASH1* im Kontext humaner Pathologien von hyperpigmentierten Lentiginen oder spinozellulären Karzinomen [40, 47]. Wie in der Einleitung erörtert haben vor allem zelluläre Mechanismen einen entscheidenden Einfluss auf Hypopigmentierungsphänotypen, sodass in dieser Arbeit ein komplementäres *in vitro* Modell entworfen wurde, welches mögliche Anhaltspunkte für die Beobachtungen der Hypopigmentierung im *in vivo* Modell der Maus und letztlich auch beim Menschen generieren soll.

### 3.2.2 Entwurf eines *in vitro* Modells: CRISPR/Cas9-vermittelter *SASH1*-Knockout in der Melanomzelllinie MelJuSo

Um sich den zellbiologischen Mechanismen der beobachteten Hypopigmentierung im *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mausmodell zu nähern, wurde ein geeignetes *in vitro* Modell mittels der CRISPR/Cas9-Methode etabliert, in dem *SASH1*-defiziente Zellen der humanen Melanomzelllinie MelJuSo generiert wurden. In einer vorhergehenden Arbeit wurden bereits zwei unabhängige Guide-RNA (gRNA) Sequenzen entworfen, um innerhalb der jeweils für Exon 1 (gRNA S1, kurz S1) beziehungsweise Exon 2 (gRNA S2, kurz S2) kodierenden genomischen Sequenz zu schneiden (Abbildung 12 A) [4]. Die potenziell *SASH1*-defizienten Zellen wurden in einer 96 Well-Mikrotiterplatte vereinzelt, sodass sich jeweils nur ein potenzieller Zellklon in einer Kavität befand. Die Benennung der Klone erfolgte anhand der verwendeten Zielsequenz und gemäß der Nummer der jeweiligen Kavität, in welcher sich die Klone zum Zeitpunkt der Vereinzlung befanden. Daraus resultierten dann die Klone S1-1, S1-9, S2-16 und S2-64. Obwohl in dieser Arbeit Zellen mit beiden Zielsequenzen editiert und diese Zellen auch für weiterführende Experimente verwendet wurden, wurde der Erfolg der Genomedition nur beispielhaft für die Klone S1-1 und S1-9 durch *Next-Generation-Sequencing* der entsprechenden Exons untersucht. Dort ist im Vergleich zu den Allelen der Wildtyp-Zellen eine Insertion eines Basenpaares auf einem Allel des Klons S1-1 zu finden, wohingegen auf dem zweiten Allel die Deletion eines Basenpaares zu beobachten ist (Abbildung 12 A). Wie für das Allel 1 des Klons S1-1 ergab die Sequenzierung des Klons S1-9 eine bi-allelische Insertion eines Basenpaares (Abbildung 12 A). Die eingefügten beziehungsweise deletierten Basenpaare verursachen eine Verschiebung des Leserasters mit konsekutiver Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons, sodass die potenziell noch transkribierten Proteinsequenzen, die sich aus der Translation jenes Genlokus ableiten, auf 60 Aminosäuren respektive 47 Aminosäuren bei Allel 2 von S1-1 verkürzt werden (Abbildung 12 B). Durch diese erhebliche Verkürzung der Proteinprodukte enthalten diese keine funktionellen Domänen des regulär 1247 Aminosäuren langen *SASH1* mehr (Abbildung 12 B). Auf der Nachweisebene des Immunoblots war bei den Zellklonen beider Zielsequenzen S1 und S2 keine Expression von *SASH1* (weder komplettes Protein noch trunkierte Produkte) festzustellen, sodass mit der CRISPR/Cas9-Methode erfolgreich ein *SASH1*-Knockout Modell hergestellt wurde (Abbildung 12 C). Dabei befindet sich das Epitop des verwendeten Antikörpers (Bethyl, A302-265A) laut Hersteller im Bereich der Aminosäuren 100-150.



**Abbildung 12: CRISPR/Cas9-vermittelter *SASH1*-Knockout in MelJuSo-Zellen unter Verwendung der Guide-RNA S1 und S2. (A)** Zum Vergleich der Exone 1 und 2 der *SASH1*-defizienten Klone, die mit der Guide-RNA S1 des CRISPR/Cas9-Systems behandelt wurden, wurden die genomischen DNA-Sequenzen mit Hilfe von ApE v2.0.55 mit der Wildtyp (WT) Sequenz verglichen. Die beiden Insertionen wie auch die Deletion sind rot markiert. **(B)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen *SASH1* und der CRISPR/Cas9-Angriffsorte der Guide-RNAs S1 und S2. Durch frühzeitige Stopcodons entstehen trunkeierte Proteinreste mit je 60 Aminosäuren (AS) eines Allels des Klons S1-1 und beide Allele des Klons S1-9, sowie 47 AS des zweiten Allels des Klons S1-1. (NLS = Kernlokalisierungssequenz; SLY = konservierter Bereich der *SASH1*, SLY1 und SLY2 gemeinsam ist; SH3 = Src-Homologie-Domäne 3; SAM = sterile  $\alpha$ -Motif Domänen; Pro-rich = prolinreiche Region). **(C)** Knockout und Wildtyp MelJuSo-Zellen wurden mithilfe von Immunoblots auf die *SASH1*-Translation hin untersucht. Die vollständigen Immunoblots des Zielproteins wie auch der Kontrolle sind in Abbildung S 1 zu finden.

Mit den *SASH1*-defizienten Zellen S1-1, S1-9, S2-16 und S2-64 steht nun ein experimentell leicht zugängliches und molekular gut definiertes Werkzeug bereit, um Hypothesen bezüglich der Ursachen des Pigmentierungsphänotyps des *Sash1*<sup>1<sup>RF</sup>AHy</sup>-Mausmodells zu überprüfen. Diese konnten im Rahmen dieser Arbeit – und in Analogie zu den in der Einleitung erwähnten – vor allem auf vier funktionelle Bereiche reduziert werden:

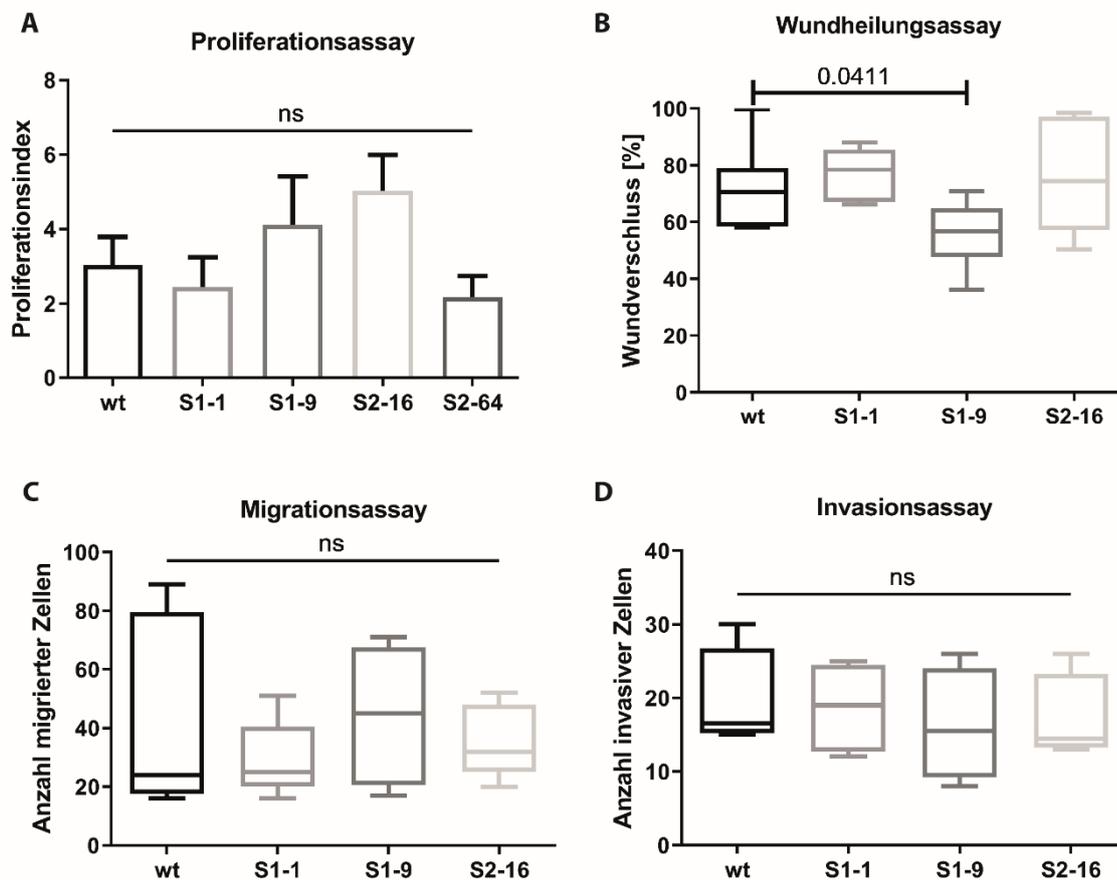
1. Die Proliferation und gerichtete sowie ungerichtete Migration der Melanomzellen
2. Die Melaninsynthese, deren Haupt-Transkriptionsfaktor und Schlüsselenzyme
3. Der Transport von Melanosomen innerhalb der Zelle
4. Die Exozytose der Melanosomen

In den folgenden Kapiteln werden die Auswirkungen einer *SASH1*-Defizienz auf diese Prozesse und deren möglicher Einfluss auf die pathologische Fellfarbeveränderung der *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäuse in der oben aufgestellten Reihenfolge untersucht.

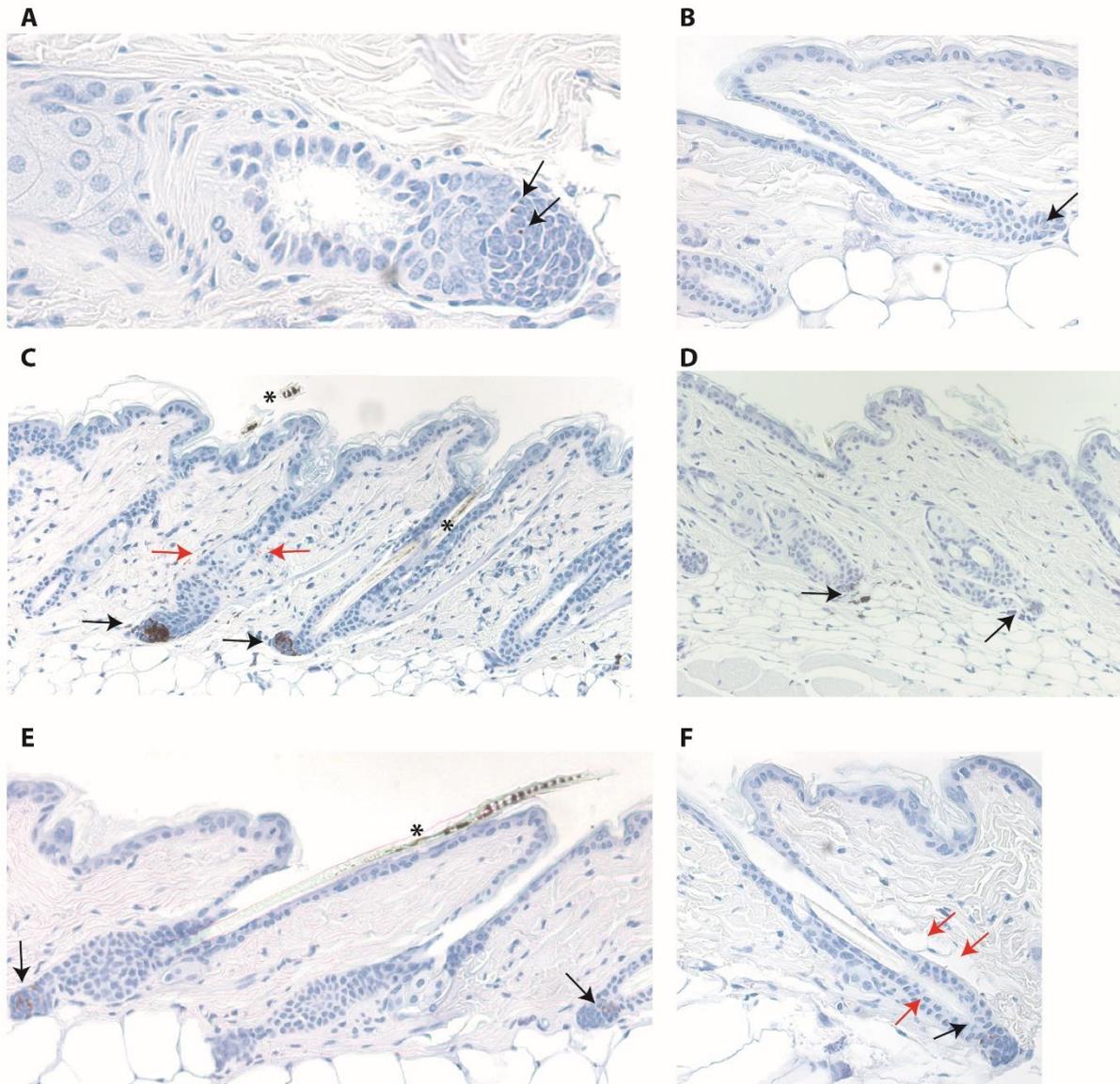
### 3.2.3 *SASH1*-Knockout in MelJuSo ohne Einfluss auf die Migration oder Proliferation

Ein reduziertes proliferatives Potenzial der melanozytären (Stamm-)Zellen der Epidermis und Hautanhangsgebilde könnte ursächlich für eine Hypopigmentierung des *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mausmodells sein. Alternativ könnten durch eine gestörte Migration *SASH1*-defizienter Melanozyten während der Embryonalentwicklung zu wenige Zellen ihren Wirkort erreichen. In beiden Fällen wären nicht ausreichend Melanozyten für die Synthese des benötigten Melanins vorhanden. In mehreren experimentellen Ansätzen wurden beide Hypothesen durch einen kolorimetrischen Proliferationsassay, einen 2D-Wundheilungsassay („Scratch Assay“) zur Messung der gerichteten Zellmigration, einen Transwell-Migrationsassay und einen Invasionsassay, jeweils mit einem Gradienten an chemotaktisch wirkendem FCS für die Migration in extrazelluläre Matrix, überprüft. Zwischen den Wildtyp-Zellen und den *SASH1*-defizienten Melanomzellen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten. Nur zwei der vier untersuchten Klone sind im Wachstumsverhalten gehemmt, wohingegen zwei weitere Klone eine etwas erhöhte Proliferation im Zellproliferations-Assay zeigen, obgleich keine der Beobachtungen mit der nötigen Signifikanz gegenüber den Wildtyp-Zellen einhergeht (Abbildung 13 A). Eine ähnliche Verteilung der Effekte zeigt sich im Wundheilungsassay, in welchem bei zwei von drei Klonen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp-Melanomzellen und den *SASH1*-Knockouts in deren gerichteten Migrationsverhalten beobachtet werden können. Einzig der Unterschied zwischen den Wildtyp und den S1-9 Knockout Zellen liegt knapp unter dem Signifikanzniveau, was auf klonale Artefakte schließen lässt (Abbildung 13 B). Die Überprüfung der chemotaktisch stimulierten Migration durch eine Transwell-Membran (Abbildung 13 C) zeigt ebenso wenig signifikante Unterschiede wie die gerichtete Invasion der Zellen in die extrazelluläre Matrix (Abbildung 13 D). Somit konnte *in vitro* kein Effekt einer *SASH1*-Defizienz auf die Proliferation, Migration und Invasion von Melanomzellen gefunden werden.

In Kooperation mit Dr. Theresa Pachecho und Dr. Yiqun Shellman (beide School of Medicine, Universität Colorado, USA, Abteilung Dermatologie) wurde die Haut von *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen histologisch untersucht.



**Abbildung 13: Proliferations- und Migrationsverhalten von MeJuSo-Wildtyp und SASH1-Knockout Zellen.** (A) Proliferation der Zellen wurde mittels XTT-Assay in 2% FCS getestet (Mann-Whitney Test;  $n = 3$ ;  $p > 0,1$ ). (B) Zellmigration wurde durch 2D-Wundheilungsassays überprüft, indem die zellfreie Fläche mit der Software ImageJ v1.51 48h nach Entfernung des Zellinsets gemessen wurde (Mann-Whitney Test;  $n = 3$ ;  $p = 0,0411$ ). (C) Die Migration wurde durch einen Transwell-Migrationsassay untersucht und die migrierten Zellen nach 24h gezählt (Mann-Whitney;  $n = 5$ ;  $p > 0,8413$ ). (D) Um die Invasion der MeJuSo-Zellen in extrazelluläre Matrix zu überprüfen, wurden Transwell-Invasionsassays durchgeführt und die invasiven Zellen nach 48h gezählt (Mann-Whitney;  $n = 4$ ;  $p > 0,2286$ ). Eine ausführliche Tabelle zu allen Signifikanzniveaus findet sich im Anhang (Tabelle S 2).



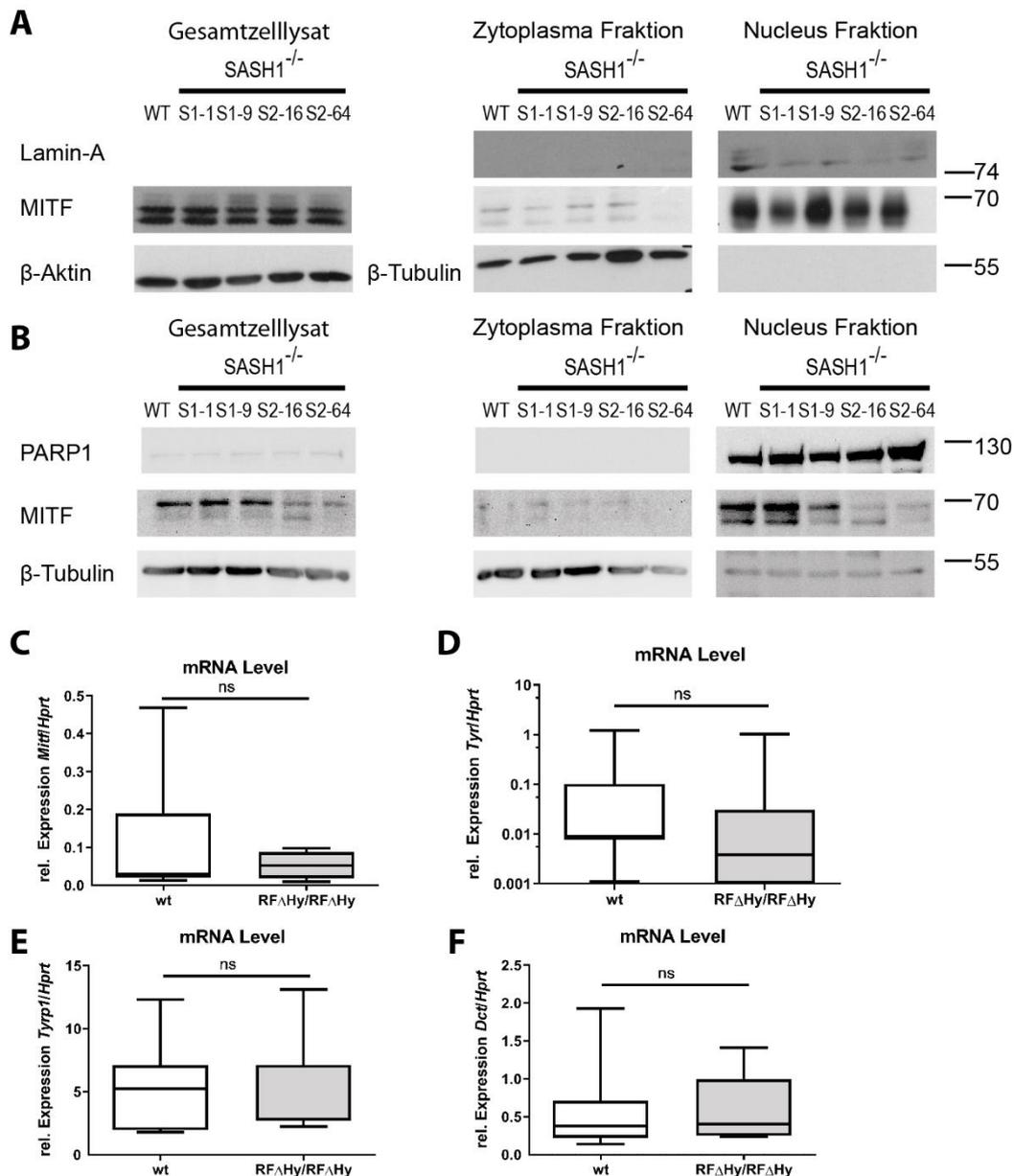
**Abbildung 14: Hautschnitte von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen.** Hämatoxylin-Eosin Färbung, und Aufnahmen durch Dr. Theresa Pachecho und Dr. Yiqun Shellman (beide School of Medicine, Universität Colorado, USA, Abteilung Dermatologie) zur Verfügung gestellt. **(A&B)** Gewebedünnschnitte der Haut von Wildtyp Mäusen aus *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Verpaarungen. **(C&D)** Gewebedünnschnitte der Haut von homozygoten *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen. **(E&F)** Gewebedünnschnitte der Haut von heterozygoten *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen.

Dafür wurden von folgenden Genotypen der *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäuse Schnitte der Haut angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt: Wildtyp (n = 2, Alter 14 Monate), homozygot (n = 2, Alter 16 Monate) und heterozygot (n = 2, Alter 16 Monate). Die histologische Beurteilung wurde durch die Kooperationspartnerinnen mit langjähriger Erfahrung in Dermatopathologie durchgeführt. Bei der Untersuchung der Hautschnitte sticht eine ungleiche Verteilung ektopen Melanins zwischen den verschiedenen Mäusen hervor. Demnach befindet sich in den Hautschnitten der Wildtyp-Mäuse mit schwarzen Haaren nur wenig Melanin in den Haarwurzeln (Abbildung 14 A, B). Im Gegensatz

dazu ist in homozygoten *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen mit grauem Fell auffällig viel Melanin in den Haarwurzeln sowie ektopes Melanin außerhalb der Haarwurzel entlang der eingestülpten Epidermis des Haarfollikels zu finden (Abbildung 14 C, D). Der Gehalt an sichtbarem Melanin in diesen Schnitten übertrifft laut den Untersucherinnen jenen von Wildtyp- als auch von heterozygoten *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen. Letztere zeigen einen intermediären Phänotyp unter dem Mikroskop, da in einigen Schnitten der Melaningehalt jenem von Wildtyp-Mäusen ähnelt, in anderen wiederum der Gehalt an Melanin (teilweise auch ektopisch entlang der Epidermis eines Haarfollikels) jenem von homozygoten Mäusen entspricht (Abbildung 14 E, F).

#### 3.2.4 *MITF*-Expression in MelJuSo Wildtyp- und *SASH1*-Knockout-Zellen und Expression wichtiger Schlüsselenzyme der Melanogenese in murinen Hautproben

Der veränderte Pigmentierungsphänotyp des *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mausmodells könnte auch in einer gestörten Melaninsynthese begründet sein. Aus diesem Grund wurde die Expression des in der Einleitung bereits näher beschriebenen wichtigsten spezifischen Transkriptionsfaktors der Melanogenese *MITF* in der humanen Melanomzelllinie MelJuSo untersucht. Von *SASH1* wie auch *SLy1* ist ein Kernimport und -export dieser Proteine bekannt [5]. Da eine *Sash1*-Defizienz möglicherweise eine Beeinträchtigung des Kernimports des Transkriptionsfaktors zur Folge haben könnte, wurde darüber hinaus mittels Zellfraktionierung auch die Expression von *MITF* in den verschiedenen Kompartimenten des Nucleus und des Zytosols von MelJuSo-Zellen betrachtet.



**Abbildung 15: MITF-Expression in verschiedenen Zellkompartimenten von Wildtyp und SASH1-Knockout MelJuSo-Zellen sowie Expression wichtiger Regulatoren und Enzyme der Melanogenese in *Sash1*<sup>RFAHy</sup>-Mäusen.** (A) Die MITF-Expression auf Proteinebene in Gesamtzelllysaten und Lysaten aus Zytoplasma und Zellkern von Wildtyp (WT) und *SASH1*-defizienten (S1-1, S1-9, S2-16, S2-64) MelJuSo-Zellen wurde durch Immunoblots analysiert. Lamin-A und β-Tubulin entsprechen jeweils der Positivkontrolle der Nucleus Fraktion bzw. der Zytoplasma Fraktion, β-Aktin zur Beladungskontrolle. (B) Weitere Immunoblot Analyse der MITF-Proteinlevel in den Zellkompartimenten mit den Positivkontrollen PARP1 und β-Tubulin für die Kompartimente des Nucleus bzw. des Zytoplasmas. Die Expression des Transkriptionsfaktors *Mitf* und der Enzyme *Tyrosinase* (*Tyr*), *Tyrosinase-related protein 1* (*Tyrp1*) und *Dopachrom-Tautomerase* (*Dct*) der Melanogenese in der Haut von *Sash1*<sup>RFAHy</sup>-Mäusen wurden auf der Ebene der Transkription untersucht. (C) *Mitf*-Expression auf mRNA-Ebene (Mann-Whitney; n = 7-8; p = 0,8665). (D) *Tyr*-Expression auf mRNA-Ebene (Mann-Whitney; n = 7-8; p = 0,3204). (E) *Tyrp1*-Expression auf mRNA-Ebene (Mann-Whitney; n = 7-8; p = 0,9551). (F) *Dct*-Expression auf mRNA-Ebene (Mann-Whitney; n = 7-8; p > 0,9999).

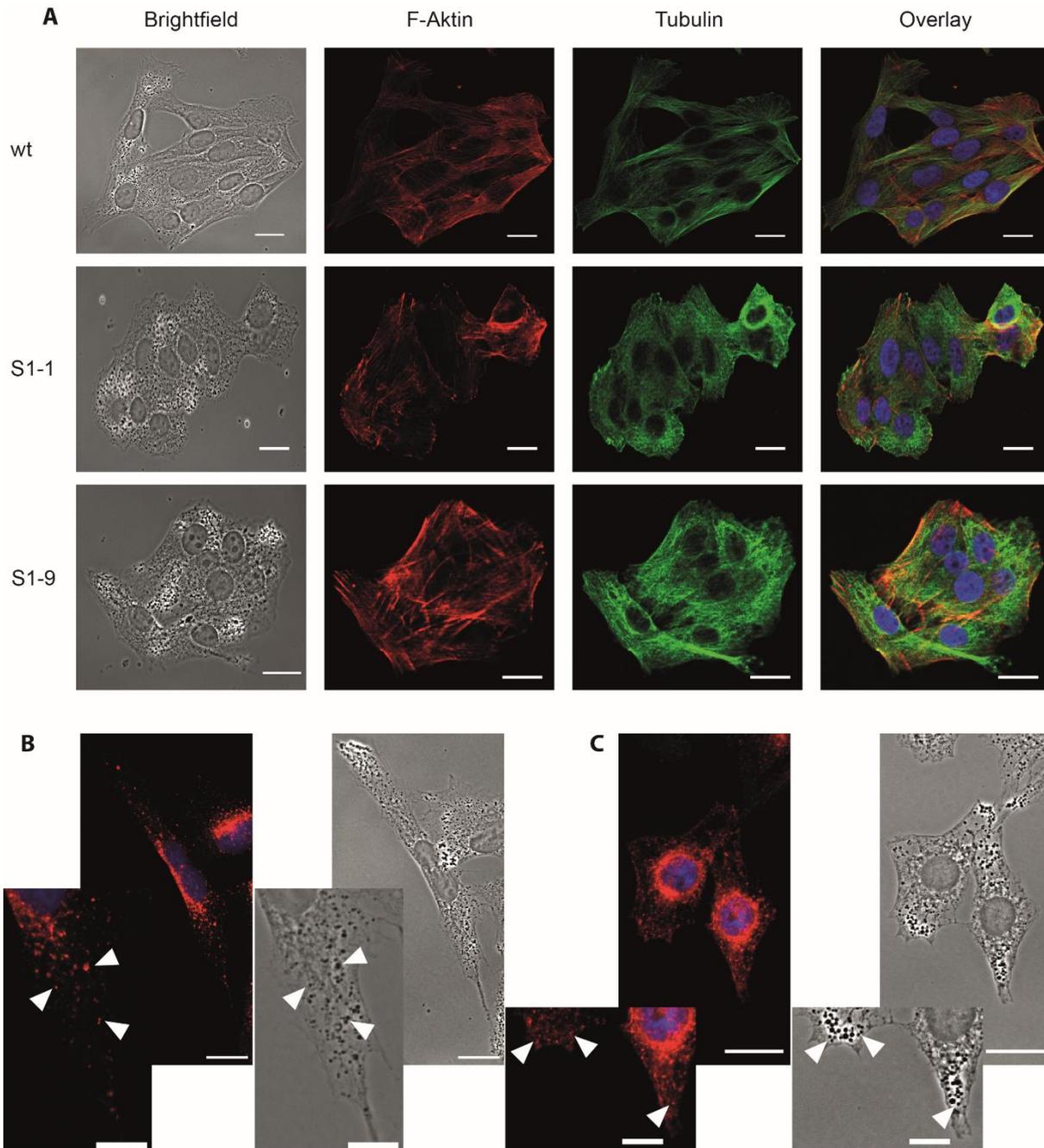
Dabei wurden zwei voneinander leicht abgewandelte Versuchsanordnungen zur Zellfraktionierung verwendet, in denen mittels Immunoblot neben MITF auch Lamin-A beziehungsweise das DNA-Reparaturenzym PARP1 als Positivkontrolle des Zellkerns und  $\beta$ -Tubulin als Positivkontrolle des Zytoplasmas ermittelt wurden (Abbildung 15 A, B). Die jeweiligen Kontrollen gelten dabei auch als Negativkontrollen, die Verunreinigungen des jeweils anderen Kompartiments detektieren. Bei Betrachtung der Gesamtzelllysate ist kein wesentlicher Unterschied in der Gesamtexpression von *MITF* zwischen den MelJuSo Wildtyp- und Knockout-Zellen festzustellen, sodass die fehlende Expression von *SASH1* offenbar keinen Einfluss auf die *MITF*-Gesamtexpression besitzt (Abbildung 15 C, D). Dies bestätigt sich zudem im Vergleich der *Mitf*-Expression *in vivo*, in Hautproben von *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup> Wildtyp- und homozygot mutierten Mäusen. In den beiden Genotypen zeigt sich kein signifikanter Unterschied des *Mitf*-mRNA-Niveaus (Abbildung 15 E). Die Frage, ob trotz gleichbleibender Gesamtmengen an MITF der Kernimport des Transkriptionsfaktors durch eine *SASH1*-Defizienz beeinträchtigt sein könnte, sollte mit Experimenten zur Zellfraktionierung beantwortet werden. MITF konnte zwar eindeutig im Zellkern angereichert nachgewiesen werden, ein klarer Unterschied zwischen *SASH1*-Knockout und Kontrollen ließ sich allerdings nicht belegen. Diese Versuche sind trotz mehrmaliger Wiederholungen und unter Verwendung verschiedener Kontrollmarker und methodischer Variationen in ihrer Aussagekraft nicht eindeutig, da etwa die Positivkontrolle der Nucleusfraktion Lamin-A in den Knockout-Proben nur schwach detektiert wird, (Abbildung 15 A), oder in anderen Ansätzen die Negativkontrolle  $\beta$ -Tubulin auch in den Nucleusfraktionen detektiert wird, was auf eine Kontamination der Kernfraktion hindeutet (Abbildung 15 B).

Neben der Expression des wichtigsten Transkriptionsfaktors *MITF* ist zudem die Expression von Schlüsselenzymen der Melanogenese von Interesse. Dabei liegt der Fokus auf den Enzymen Tyrosinase (Tyr) (Abbildung 15 F), Tyrosinase-related-protein 1 (Tyrp1) (Abbildung 15 G) und der Dopachrom-Tautomerase (Dct) (Abbildung 15 H), von denen die mRNA-Spiegel durch qPCR bestimmt wurden. Verglichen wurden jeweils Hautproben von Wildtyp- und homozygoten *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäusen. Keines der genannten Enzyme zeigt dabei eine signifikante Änderung in der Expression zwischen den entsprechenden Genotypen (Abbildung 15 F-H). Insgesamt fällt jedoch auf, dass sowohl in Wildtyp- als auch in *Sash1*-defizienten Geweben die Expression der Enzyme sowie des Transkriptionsfaktor sehr gering ist.

### 3.2.5 *SASH1*-unabhängige Melaninproduktion in MelJuSo-Zellen und Erhöhung der Anzahl intrazellulärer Melanosomen

Melanozyten besitzen mit der Melanogenese eine zentrale, zelltypspezifische Funktion. Der dafür wichtigste Transkriptionsfaktor MITF und die Schlüsselenzyme dieses Synthesevorgangs wurden bereits im vorherigen Kapitel im *in vitro* Zelllinienmodell, als auch im *in vivo* Maus-Modell näher betrachtet. Die Frage, ob in den vorliegenden Melanomzellen auch das finale Produkt der

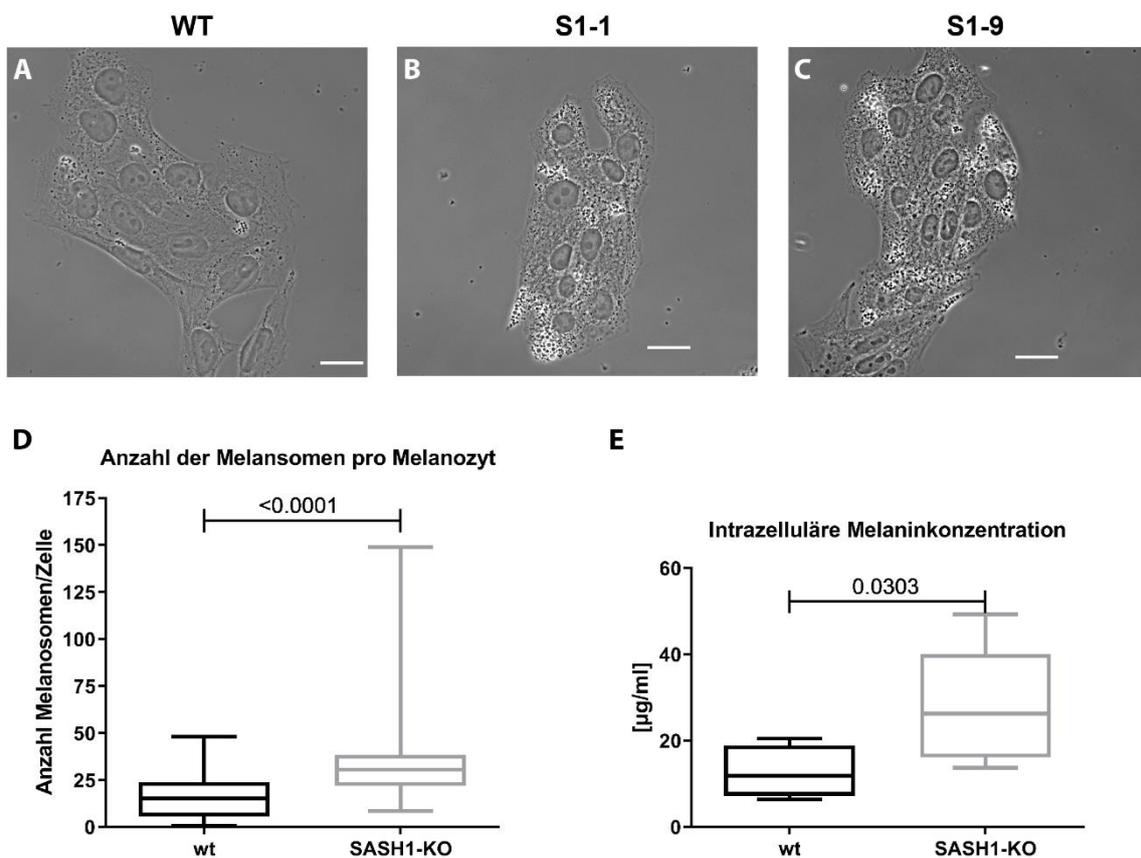
Melanogenese, nämlich das in Melanosomen verpackte Melanin zu finden ist und ob die Melanogenese möglicherweise durch einen *SASH1*-Verlust der Zellen zum Erliegen kommt, wurde bisher nicht beantwortet. Durch die Fixierung und Färbung der Wildtyp- sowie der Knockout-Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie sollte ein besserer Eindruck für diese Fragen gewonnen werden. Bei genauer Betrachtung sind in den Hellfeldaufnahmen der Zellen phasendichte Vesikel auszumachen, welche den Zellkern nicht überlagern, sondern um diesen herum und radiär in Richtung der Zellperipherie verteilt sind (Abbildung 16 A). Dies gilt gleichermaßen für Wildtyp- wie auch für *SASH1*-defiziente Zellen, obgleich letztere bei erhaltener Polarität eine etwas rundlichere Form aufweisen. Eine vorausgegangene Arbeit untersuchte bereits die Veränderung der Zellmorphologie in Folge einer Überexpression von *SASH1* in HeLa-, LLC-PK1- und HEK293-Zellen [2]. *SASH1* begünstigt demnach die Polymerisation filamentösen Aktins (F-Aktin), was zur Bildung von Zellausläufern und einer verlängerten Zellform führt. Aufgrund dieser Vorbefunde und der hier beobachteten, wenngleich nur leicht veränderten Zellform, wurde F-Aktin sowohl von Wildtyp- als auch von *SASH1*-defizienten MelJuSo-Zellen mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei fanden sich keine offensichtlichen Veränderungen in der Anordnung des F-Aktins der Zellen oder der Anreicherung von F-Aktin-Strängen entlang der Membranen der Längsachse der Zellen (Abbildung 16 A). Zum Beweis, dass es sich bei den beobachteten phasendichten Strukturen der Melanozyten auch tatsächlich um Melanosomen handelt, wurden die fixierten Zellen mit geeigneten Antikörpern gegen das Tyrosinase-related-protein 1 (TYRP1) – ein Marker für reife Melanosomen – gefärbt und mittels chromophoren sekundären Antikörpern in der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Der Vergleich der Hellfeldaufnahmen, in denen die phasendichten Vesikel zu sehen sind, mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Aufnahmen des Oberflächenproteins TYRP1 belegt eine Kollokalisierung beider Strukturen, sodass die beobachteten Vesikel fortan als *bona fide* Melanosomen bezeichnet werden können (Abbildung 16 B, C). Diese Ergebnisse zeigen, dass MelJuSo-Zellen Melanin bilden und dass dies auch im Falle einer *SASH1*-Defizienz weiterhin möglich ist. Mehr noch: Neben der stärker abgerundeten Zellform scheinen die Knockout-Zellen mit deutlich mehr Melanosomen gefüllt zu sein. Dieser Phänotyp ist über mehrere Passagen hinweg stabil zu beobachten (Abbildung 17 A-C), sodass die Anzahl der Melanosomen in den Wildtyp- sowie in den *SASH1*-defizienten Zellen systematisch erfasst wurde.



**Abbildung 16: Morphologie von Wildtyp- (wt) und *SASH1*-defizienten (S1-1, S1-9) MelJuSo-Melanomzellen und Nachweis von Melanosomen. (A)** In Wildtyp- (wt) und *SASH1*-defiziente (S1-1, S1-9) MelJuSo-Zellen wurden F-Aktin (rot), Tubulin (grün) und die DNA (DAPI; blau) angefärbt (Maßstab = 20 µm). **(B)** Melanosomen (weiße Pfeile) wurden durch den Marker Tyrp1 (rot) in MelJuSo-Wildtyp-Zellen, Zellkerne durch DAPI (blau) angefärbt (Maßstab = 20 µm). **(C)** In *SASH1*-defizienten S1-1 Zellen wurden Melanosomen (weiße Pfeile) durch Tyrp1 (rot) und Zellkerne durch DAPI (blau) gefärbt (Maßstab = 20 µm).

Hierfür wurden die Melanosomen verblindet, halbautomatisch mittels ImageJ v1.51 (National Institutes of Health, USA) ausgezählt und ihre Anzahl durch die Anzahl der Zellen im Blickfeld geteilt, wodurch sich die Anzahl an Melanosomen pro Melanozyt für die verschiedenen Genotypen ergibt. Dabei fällt auf, dass die Anzahl der Melanosomen in *SASH1*-defizienten Zellen hochsignifikant erhöht ist (Abbildung 17 D). Im Anschluss stellte sich die Frage, ob dieser

Unterschied auch mit einer weiteren, unabhängigen Messmethode validiert werden kann. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  MelJuSo-Zellen auf einer 10 cm Platte geerntet, in 1M NaOH lysiert, und Zelltrümmer mittels Zentrifugation entfernt. Der melaninhaltige Überstand wurde dann mit Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 405 nm untersucht und somit die intrazelluläre Melaninkonzentration anhand einer Standardkurve synthetischen Melanins ermittelt (Abbildung 17 E). Betrachtet man die Knockout-Klone einzeln, ist bei Klon S1-1 eine signifikante Erhöhung des Farbstoffes messbar und obgleich der Klon S1-9 im vorherigen Experiment einen ausgeprägteren Phänotyp mit mehr Melanosomen pro Zelle zeigt, scheidet die Erhöhung des intrazellulären Melaningehalts dieses Klons im photometrischen Verfahren am Signifikanzniveau (Abbildung S 3 A, B).

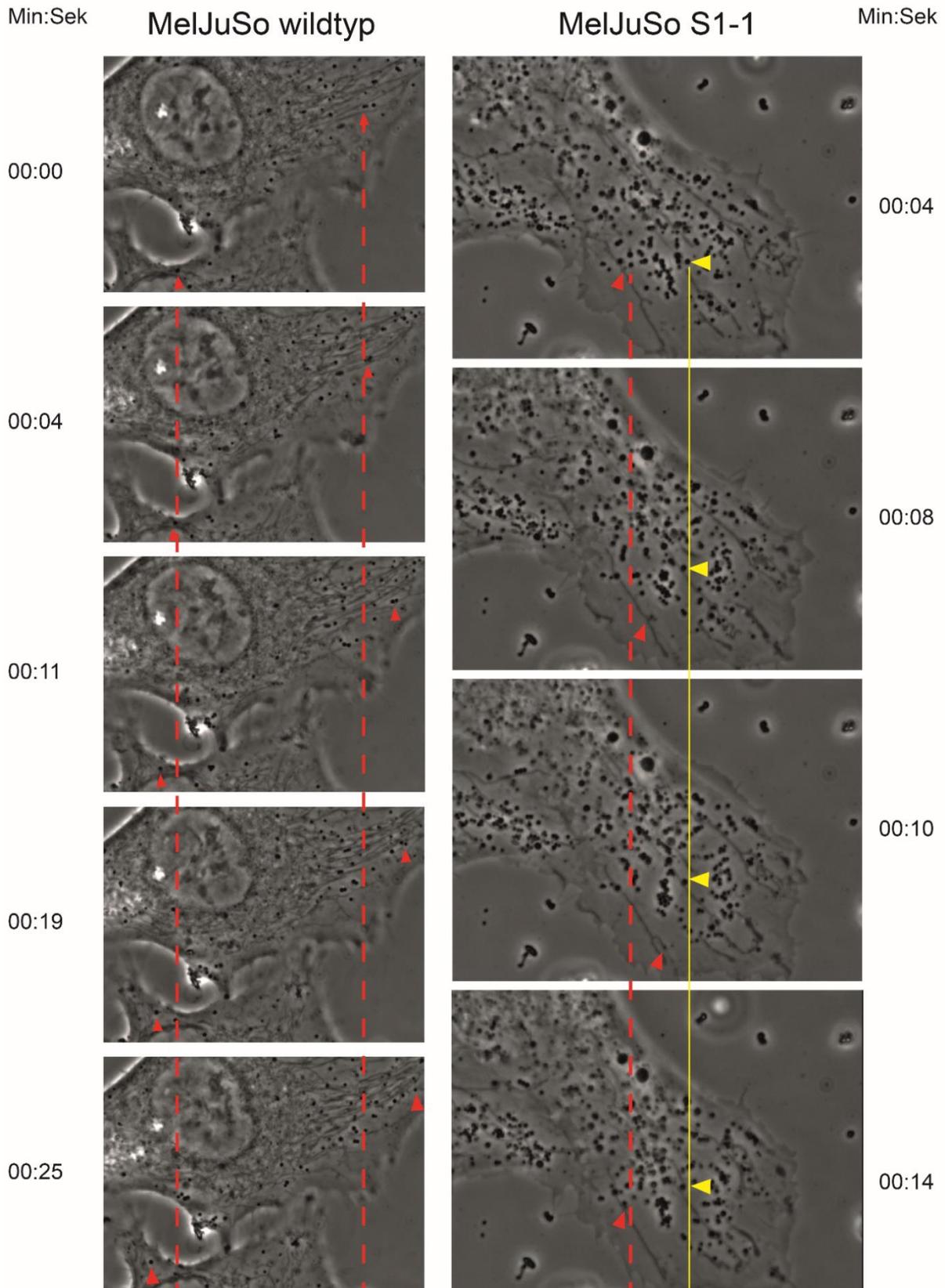


**Abbildung 17: Erhöhte Anzahl intrazellulärer Melanosomen in *SASH1*-defizienten MelJuSo-Zellen.** (A) Wildtyp MelJuSo-Zellen zeigen eine unauffällige Morphologie und Melaningehalt in Form von phasendichten Melanosomen. (B, C) Die *SASH1*-defizienten Klone S1-1 und S1-9 zeigen eine etwas breitere Morphologie und lassen eine erhöhte Anzahl intrazellulärer Melanosomen erkennen. (D) Die Auszählung der Melanosomen erfolgte anhand von Hellfeldaufnahmen der jeweiligen Zellklone. Entsprechende Aufnahmen stellen die Abbildungen A-C dar. Die halbautomatische Zählung der Melanosomen erfolgte mittels ImageJ v1.51 (Mann-Whitney Test; wt n = 34; SASH1-KO n = 66;  $p < 0,0001$ ). (E) Die photometrische Bestimmung des intrazellulären Melaningehalts erfolgte durch alkalische Lyse der MelJuSo-Zellen und anschließender Absorptionsmessung und Konzentrationsbestimmung anhand einer Verdünnungsreihe synthetischen Melanins (Mann-Whitney Test; wt n = 4; SASH1-KO n = 8;  $p = 0,0303$ ).

Die beobachteten Phänotypen lassen auf eine Ansammlung von Melanosomen in den *SASH1*-defizienten Zellen schließen, sodass am ehesten zwei Prozesse innerhalb der Melanozyten durch einen *SASH1*-Verlust beeinträchtigt sein könnten: der Transport der Melanosomen entlang der Mikrotubuli (und in geringerem Maße auch des F-Aktins) oder die Exozytose der Melanosomen. Um die Morphologie der Mikrotubuli zu untersuchen, wurden diese in einem weiteren Schritt mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie angefärbt (Abbildung 16 A). Wie in den Abbildungen zu erkennen ist, entsteht der Eindruck einer weniger klar definierten Struktur der Mikrotubuli der *SASH1*-defizienten Zellen im Vergleich zu denen der Wildtyp-Zellen. Anstelle der typischen strängigen, abgegrenzten Filamente, die der Polarität der Zellen folgen, sind diese vielmehr heterogen angeordnet. Auch die Zellpolarität selbst scheint vermindert zu sein, da die Knockout-Zellen weniger eine längliche Morphologie, sondern eher ein flächiges Erscheinungsbild mit weniger Zellausläufern aufweisen (Abbildung 16 A, Abbildung 17 A-C).

Auch wenn dieser Phänotyp in weit weniger Zellen und weniger konsistent zu beobachten war als jener von mit Melanosomen angefüllten *SASH1*-Knockout-Zellen, stellt sich dennoch die Frage, ob die eventuell unterschiedliche Modifikation des Tubulins auch einen funktionellen Einfluss auf den Transport der Melanosomen hin zur Zellmembran bedeutet. Der Melanosomentransport wird im nachfolgenden Kapitel genauer untersucht.

3.2.6 Ineffizienter intrazellulärer Transport der Melanosomen und reduzierte Polarität innerhalb der MelJuSo-SASH1-Knockouts



**Abbildung 18: Melanosomentransport in MelJuSo Wildtyp- und SASH1-defizienten Zellen.** Durch Live Cell Imaging sollte ein qualitativer Eindruck des intrazellulären Melanosomentransports in MelJuSo-Wildtyp-Zellen (linke Spalte) und dem *SASH1*-defizienten Zellklon S1-1 (rechte Spalte) gewonnen werden. Für Melanosomen, die sich entlang filamentöser Strukturen bewegen, wie auch für jene, die keine Mobilität zeigen, wurden jeweils stellvertretend Vesikel über 25 Sekunden (wt) bzw. 14 Sekunden (S1-1) nachverfolgt. Die rot gestrichelte Linie entspricht dabei dem Ausgangspunkt, von dem sich die nachverfolgten Melanosomen (rote Pfeile) zu Beginn des Beobachtungszeitraumes befanden. Die gelbe durchgezogene Linie deutet ebenfalls die Anfangsposition an, von denen sich die immobilen Melanosomen (gelbe Pfeile) kaum entfernen.

Im Hinblick auf die Frage, ob die in mehreren *SASH1*-defizienten Zellen identifizierten Veränderungen des Tubulins einen Einfluss auf die Dynamik des Transports und die Funktion von Melanosomen ausüben, wurden lebende MelJuSo-Zellen mittels Zeitraffer-Mikroskopie untersucht. Für den Vergleich des S1-1 Knockouts mit den Wildtyp-MelJuSo-Zellen wurden jeweils repräsentative Ausschnitte der Aufnahmen und der Wanderung von Partikeln ausgewählt. Ungeachtet der Tatsache, dass diese Beobachtungen eher einen qualitativen Eindruck vermitteln, liefern sie dennoch einen Einblick in die Dynamik des Zelltransports. Die Wildtyp-MelJuSo-Zellen zeigen – wie oben schon erwähnt – eine deutlich geringere Anzahl an intrazellulären Melanosomen, was die Nachverfolgung einzelner Partikel erleichtert und die Bewegung von Vesikeln eindeutiger und nachvollziehbarer macht. In den Wildtyp-Zellen ist eine deutliche Polarität des Transports vom Zentrum der Zelle hin zur Peripherie zu erkennen: die Melanosomen schlängeln sich von einem Startpunkt zu Beginn der Beobachtung entlang filamentöser Strukturen gleichmäßig in Richtung der Zellausläufer. Zwar sind kurze und schnelle Rückwärtsbewegungen der Melanosomen zu erkennen, die am ehesten der inhärenten Molekularbewegung sowie der Eigenmotilität der Zellen selbst geschuldet zu sein scheinen, allerdings überwiegt der gerichtete Transport der Melaninpartikel (linke Spalte, rote Linie). Bei den *SASH1*-defizienten MelJuSo-Knockout-Zellen ist der Eindruck heterogen, aber auch hier bewegen sich Melanosomen entlang filamentöser Strukturen, sodass von einem Tubulin-abhängigen Transport ausgegangen werden kann. Die erhöhte Anzahl an Melanosomen innerhalb der Zellen erschwert die genaue Nachverfolgung einzelner Melanosomen über den zeitlichen und räumlichen Verlauf. Die hier abgebildeten Dynamiken sind dennoch repräsentativ für die Beobachtungen in den Knockout-Zellen. Im Allgemeinen fluktuieren Melanosomen in den *SASH1*-defizienten Zellen stärker in der Bewegung zwischen Zellperipherie und -zentrum. Dabei ist bei vielen Partikeln eine gerichtete Bewegung erst in Richtung Peripherie zu beobachten, auf die sogleich eine mindestens ebenso starke Gegenbewegung in Richtung der Zellmitte folgt (Abbildung 18, rechte Spalte, rote Pfeile). Anders als bei Wildtyp-Zellen – bei denen diese Gegenbewegungen in einem viel geringeren Maß auftreten und insgesamt ein gerichteter Transport zur Peripherie zu erkennen ist – überwiegt bei dieser Dynamik eher ein gleichmäßiges Pendeln zwischen den Ausgangspunkten. Eine andere Gruppe an Melanosomen weist hingegen keine Lokalisationsänderung auf und bleibt im Wesentlichen über die Zeit hinweg an den gleichen Ausgangsorten (Abbildung 18, rechte Spalte, gelbe Pfeile). Diese bewegungsarmen Partikel sind

vor allem in Zellbereichen mit einer ohnehin hohen Dichte an Melanosomen zu finden. Der pendelnde Transport von Melanosomen ist hingegen eher in Regionen mit einer geringeren Dichte an Melaninvesikeln zu beobachten. Trotz der auffälligen Bewegungen der Melanosomen innerhalb von *SASH1*-defizienten Zellen kann ein Vesikeltransport entlang von tubulären Strukturen nachempfunden werden, auch wenn diese Abläufe ineffizient erscheinen. Die möglichen Gründe für diese Beobachtungen sollen in der Zusammenschau mit weiteren Ergebnissen am Ende dieser Arbeit tiefergehend diskutiert werden. Für einen vollständigen Einblick soll zuvor jedoch ein weiterer möglicher Mechanismus erörtert werden, welcher ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl an Melanosomen innerhalb der *SASH1*-defizienten Zellen beitragen könnte.

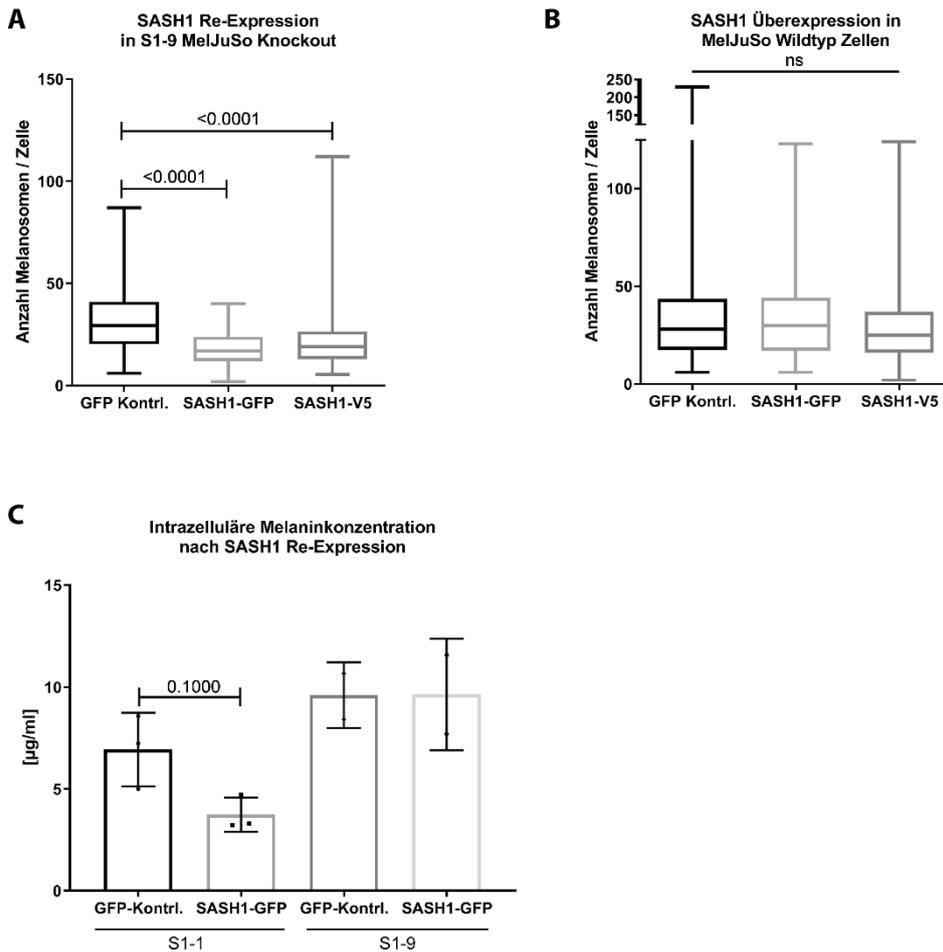
### 3.2.7 Reduzierung des intrazellulären Melaningehalts nach Restituierung der *SASH1*-Expression in *SASH1*-defizienten MelJuSo-Zellen

Wie beschrieben sind in *SASH1*-defizienten MelJuSo-Zellen signifikant mehr Melanosomen zu detektieren als in parentalen Zellen. Daher stellt sich die Frage, ob der beobachtete Phänotyp durch eine Re-Expression von *SASH1* umkehrbar wäre.

In einem sogenannten „Rescue“-Experiment wurde der Knockout-Klon S1-9 mit verschiedenen Vektoren transfiziert. Dabei wurden entweder Plasmide verwendet, welche die Sequenz für *SASH1-GFP* (mit einer N-terminalen *GFP*-Markierung unter der Kontrolle des humanen CMV-IE-Promotors), *SASH1-V5* (mit einer C-terminalen *V5*-Markierung, unter der Kontrolle des humanen EF-1 $\alpha$ -Promotors) oder als Kontrolle *GFP* allein (ebenfalls unter der Kontrolle des humanen CMV-IE-Promotors) enthielten. Außerdem wurden Wildtyp-Zellen mit den gleichen Vektoren transfiziert, um etwaige Effekte der Transfektion selbst oder jene einer Überexpression von *SASH1* durch die exogenen Promotoren abschätzen zu können. Anschließend wurden die Zellen fixiert, für die Mikroskopie präpariert, die Melanosomen erneut verblindet und wie oben beschrieben ausgezählt. Interessanterweise zeigen sich nach Re-Expression von *SASH1-GFP* oder *SASH1-V5* in den *SASH1*-Knockout-Zellen signifikant weniger Melanosomen als in jenen Zellen, die nur mit einem *GFP*-Kontrollvektor transfiziert wurden (Abbildung 19 A). Nach einer Überexpression von *SASH1* in Wildtyp-Zellen ist hingegen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl intrazellulärer Melanosomen im Vergleich zur *GFP*-Kontrolltransfektion festzustellen (Abbildung 19 B). Aufgrund dieser Beobachtungen scheint es naheliegend, dass eine Re-Expression von *SASH1* die Knockout-Zellen erneut dazu befähigt, die angesammelten intrazellulären Melanosomen abzugeben, auch wenn dieser Effekt nach einer Überexpression in Wildtyp-Zellen nicht weiter skalierbar ist.

Neben dem mikroskopischen Nachweis sollten diese Beobachtungen auch mittels oben erwähnter photometrischer Methode verifiziert werden. Für den Klon S1-1 ist mit dieser Methode ein erniedrigter Melaningehalt nach *SASH1*-Re-Expression messbar, welcher jedoch durch Streuung der Werte in den Kontrolltransfektionen nicht das Signifikanzniveau erreicht (Abbildung 19 C).

Für den Klon S1-9, welcher in der Mikroskopie hoch signifikant weniger Melanosomen nach einer *SASH1*-Re-Expression beinhaltet, ist dieser Effekt in der photometrischen Messmethode nicht mehr nachweisbar (Abbildung 19 C).



**Abbildung 19: Intrazellulärer Melaningehalt nach *SASH1*-(Re)-Expression in MelJuSo-Wildtyp und *SASH1*-Knockout Zellen. (A)** *SASH1*-defiziente MelJuSo-Zellen wurden jeweils mit einem *GFP*-, *SASH1-GFP*- oder *SASH1-V5*-Vektor transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen fixiert, die Anzahl intrazellulärer Melanosomen durch halbautomatische Zählung mittels ImageJ v1.51 ausgewertet (Mann-Whitney Test; n = 65-84; p<0,0001). **(B)** MelJuSo-Wildtyp-Zellen wurden jeweils mit einem *GFP*-, *SASH1-GFP*- oder *SASH1-V5*-Vektor transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen fixiert, die Anzahl intrazellulärer Melanosomen durch halbautomatische Zählung mittels ImageJ v1.51 ausgewertet (Mann-Whitney Test; n = 61-69; p>0,3242). **(C)** Die *SASH1*-defizienten Klone S1-1 und S1-9 wurden mit *GFP*-, bzw. *SASH1-GFP*-Vektoren transfiziert. Die Photometrische Bestimmung des intrazellulären Melaningehalts erfolgte 48h nach Transfektion (Mann-Whitney Test; n = 3, p = 0,1000 für S1-1; n = 2, p>0,9999 für S1-9).

Eine gemeinsame Darstellung der *SASH1*-defizienten Klone als Pool nach der Re-Expression gegenüber den Kontrolltransfektionen ist im Anhang aufgeführt (Abbildung S 4).

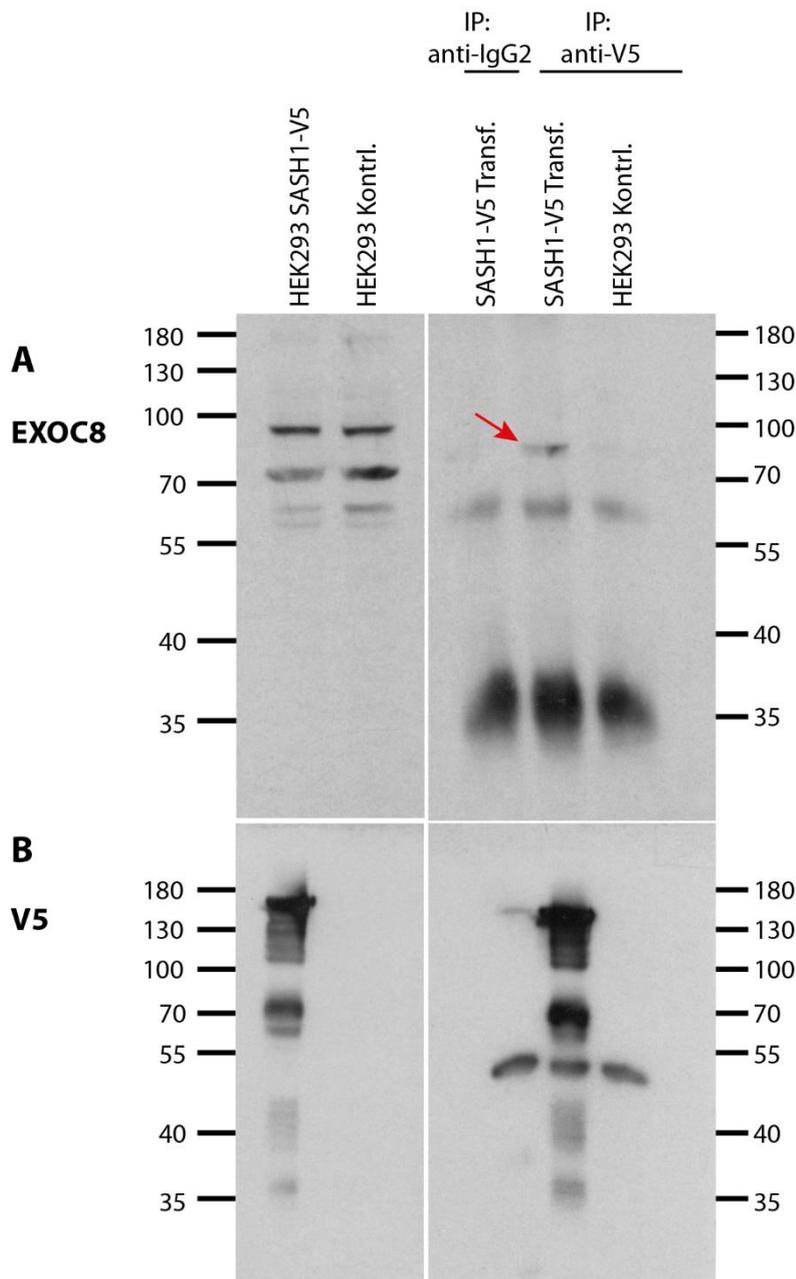
Trotz der nicht signifikanten Reduktion während der photometrischen Bestimmung des Melaningehalts scheint ein Zusammenhang zwischen der Expression von *SASH1* und der intrazellulären Menge und Konzentration von Melanin zu bestehen. Es bleibt jedoch die Frage zu beantworten, welcher zellbiologische Mechanismus diese Korrelation verursacht.

### 3.2.8 Potenzieller Einfluss einer *SASH1*-Defizienz auf die Exozytose und EXOC8 als mutmaßlicher neuer Interaktionspartner von *SASH1*

Die bisher untersuchten Prozesse zeigen im *SASH1*-defizienten *in vitro* Modell weniger ausgeprägte Effekte, die den *dilute*-Phänotyp im *Sash1*<sup>RF<sup>Δ</sup>Hy</sup>-Mausmodell erklären könnten, und können daher weitgehend ausgeschlossen werden. Der zuletzt beschriebene erhöhte Melaningehalt in *SASH1*-defizienten Zellen schien dagegen vielversprechender, sodass ein Einfluss von *SASH1* auf die Exozytose postuliert wurde. Mögliche Interaktionspartner von *SASH1* auf Proteinebene wurden in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern schon in früheren Arbeiten untersucht, indem etwa das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) in Kooperation mit Dr. Ewa Ninio und Dr. Henri Weidmann (beide Sorbonne Universität, Paris, Frankreich) oder auch die Co-Immunopräzipitation in Kombination mit einer folgenden Massenspektrometrie (in Kooperation mit Solenne Charbonnet, Sorbonne Universität, Paris, Frankreich) etwaige Interaktionen aufdecken sollten. In Tabelle 7 sind diese Ergebnisse systematisch zusammengefasst und mögliche Interaktionen anhand der Ergebnisse der Massenspektrometrie in verschiedene Konfidenzgrade kategorisiert worden, wobei die Konfidenzlevel D bis F keine Berücksichtigung fanden [130]. Von den in der Tabelle aufgeführten Genprodukten, die zugleich auch eine Interaktion in der Co-Immunopräzipitation und der anschließenden Massenspektrometrie zeigen, ist das Gen *EXOC8* von besonderem Interesse, da dieses einen Bestandteil des an der Exozytose beteiligten Exozyst-Komplexes darstellt [98]. Daher wurde der Fokus auf eine mögliche Interaktion der Proteine *SASH1* und *EXOC8* gelegt, mit der Hypothese, dass eine beeinträchtigte *SASH1*-Expression über eine mögliche Interaktion mit *EXOC8* zu einer gestörten Exozytose von Melanosomen in Melanozyten führt. Letztere würden umliegende Gewebe wie etwa (menschliche) Keratinozyten oder (murine) Haarfollikel nicht mehr suffizient versorgen können, sodass der Hypopigmentierungsphänotyp im *Sash1*-defizienten Mausmodell (Abbildung 11 A) oder Pigmentierungsphänotyp in Menschen durch heterogene Punktmutationen im *SASH1*-Lokus zumindest in Teilen erklärbar wäre [40, 44, 47].

Gen	Konfidenz	Interaktion in Co-IP/Massenspektrometrie
AFF1	A	
AKAP10	C	
ARRB1	A	
ASCC2	C	Ja
BAP1	C	
C1D	A	
CCNDBP1	A	
CNKSR1	B	
CRK	A	
CRKL	C	Ja
CTNNA1	A	
EPS8L2	A	
IKBKB	A	
JADE2	A	
JADE3	A	
KIF3B	B	
MCRS1	A	Ja
OAS2	B	Ja
PPP4R1	A	
RBM12B	B	
SECISBP2L	B	
SNX1	C	
SPG7	C	
SPTBN1	B	Ja
SYNE2	B	
TNKS2	A	
UTRN	C	
<b>EXOC8</b>	A	Ja

**Tabelle 7: Y2H- und massenspektrometrisches Screening von SASH1-Co-Immunpräzipitationen.** Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-Screens wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ewa Ninio und Dr. Henri Weidmann (beide Universität Sorbonne, Paris, Frankreich) untersucht. Co-Immunpräzipitationen und Massenspektrometrie von GFP und GFP-SASH1 in HEK293-Zellen wurden von Solenne Chardonnet (Universität Sorbonne, Paris, Frankreich) durchgeführt. Mutmaßliche Interaktionen der Konfidenzstufen A (sehr hoch), B (hoch) und C (gut) wurden berücksichtigt, während Interaktionskandidaten der Stufen D bis F ausgeschlossen wurden. Die Daten entsprechen jenen von Dr. Fabian Franke [130].



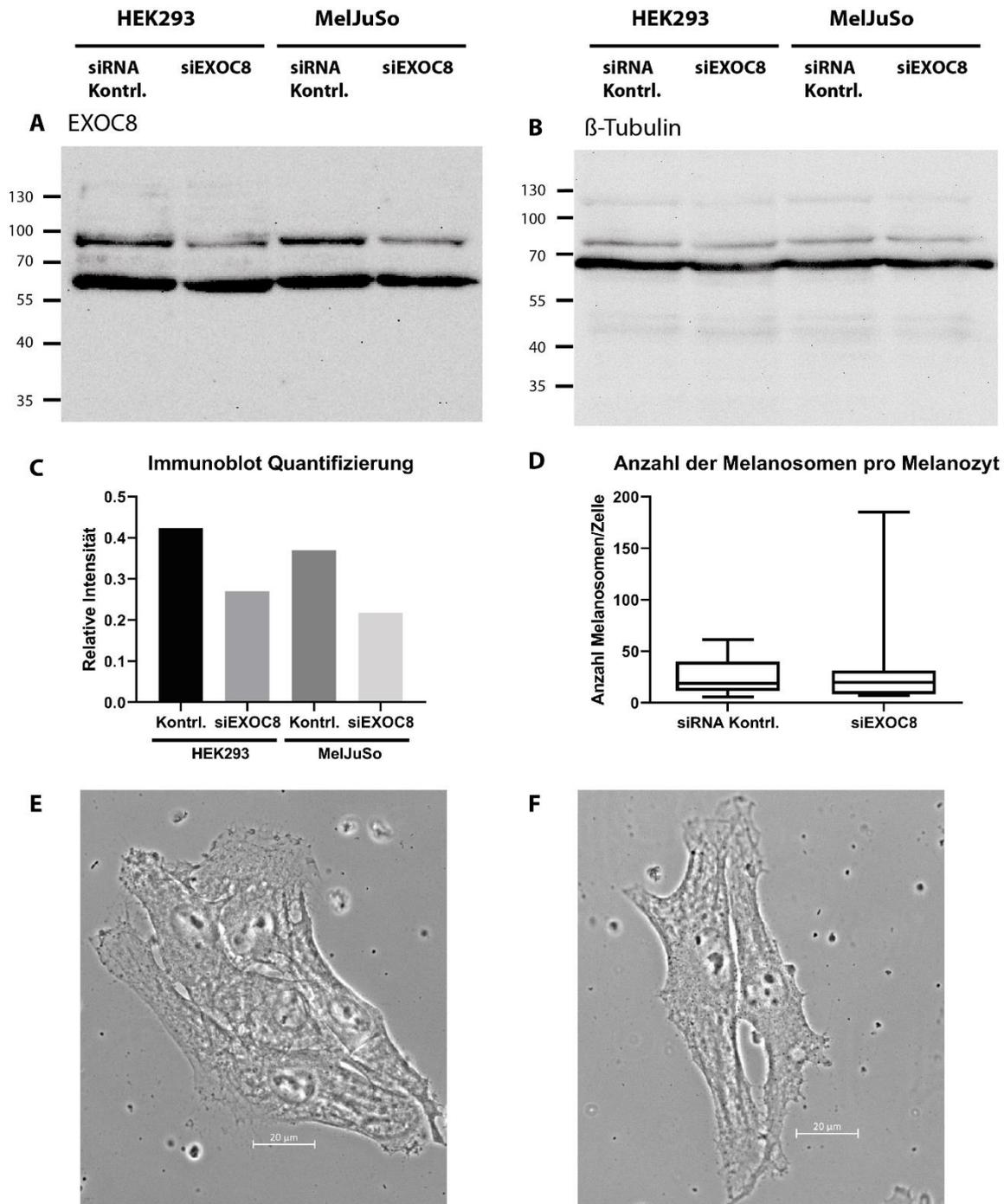
**Abbildung 20: Exogenes SASH1-V5 interagiert mit endogenem EXOC8 in HEK293-Zellen. (A)** Nach Expression eines exogenen *SASH1-V5* Konstrukts wurde endogenes EXOC8 in Versuchen zur Immunpräzipitation (IP) in HEK293-Zelllysaten von Anti-V5-Antikörpern, nicht aber von Isotyp-Kontroll-Antikörpern präzipitiert und von Anti-EXOC8-Antikörpern durch Immunoblot nachgewiesen (roter Pfeil). **(B)** Transfektions- und Präzipitationskontrolle der Präzipitate: Anti-V5-Antikörper erkennen V5-Tag auf Immunoblot nur im Input der *SASH1-V5*-Transfektionen und in der Immunpräzipitation (IP) mit eingesetzten Anti-V5-Antikörpern.

Zunächst folgte eine eigene Überprüfung der möglichen SASH1-EXOC8-Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation in HEK293-Zellen, welche transient mit oben beschriebenem *SASH1-V5* Vektorkonstrukt transfiziert wurden, um anschließend eine mögliche Interaktion im Pulldown-Assay mittels eines an Sepharose-G gekoppelten Anti-V5-Antikörpers zu bestätigen. Darüber hinaus wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt, indem zum einen Proteinlysate aus HEK293 Zellen nach *SASH1-V5* Transfektion mit unspezifischen Antikörpern gegen IgG2 sowie

untransfizierte HEK293-Zellen mit einem spezifischen V5-Antikörper inkubiert wurden. Als Positivkontrolle wurde als Input ein Proteinlysate der transfizierten HEK293-Zellen verwendet. Das Zielprotein EXOC8 sowie die Ladekontrolle wurden durch die entsprechenden Antikörper mittels Immunoblot sichtbar gemacht (Abbildung 20 A). Entsprechend der Herstellerangaben des EXOC8-Antikörpers sind Banden jenes Proteins auf dem Immunoblot etwa in einer Höhe von 94 kDa zu erwarten, sowie weitere vermutliche Abbau-Produkte, Isoformen oder Spleißvarianten des Proteins mit einer geringeren Größe. Tatsächlich wird EXOC8 in den Kontrolllysaten des Inputs bei einer relativen elektrophoretischen Mobilität von knapp unter 100 kDa erkannt; die Ladekontrolle sowie die Negativkontrolle gegen die V5-Markierung belegen eine korrekte Transfektion und Antikörperspezifität (Abbildung 20 B). Auch in anderen Publikationen wird EXOC8 auf dieser Höhe beschrieben, einschließlich weiterer Produkte mit einem geringeren Molekulargewicht [143, 144]. In den Immunpräzipitaten ist neben der leichten Kette des Immunglobulins auf einer Höhe von 35 kDa auch die schwere Kette der verwendeten Antikörper auf einer Höhe von etwa 60 kDa in den Co-Immunpräzipitationen zu erkennen. Im V5-„Pulldown“ der *SASH1*-V5 Transfektion ist eine Bande in einer Höhe von knapp unter 100 kDa zu erkennen (Abbildung 20 A, roter Pfeil), die – verglichen mit den entsprechenden EXOC8-Banden in den Inputs – auf einer ähnlichen Höhe zu erkennen ist. Diese Bande stellt somit einen Hinweis auf eine Interaktion von *SASH1* mit EXOC8 dar. Das gezeigte Experiment wurde auf einer Immunoblotmembran mit größeren Abständen leerer Spuren zwischen den Proben durchgeführt und hier zur besseren Veranschaulichung durch Ausschneiden dieser leeren Spuren dargestellt (gesamte Membran inklusive Beschriftung im Anhang (Abbildung S 6)). Der Größenstandard des rechten Blot-Abschnitts von Abbildung 20 läuft dabei etwas niedriger als die Leiter im linken Bildrand, weshalb beide Standards hier aufgeführt sind. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass sich die korrespondierende Bande für EXOC8 im rechten Abschnitt von Abbildung 20 A in einer etwas geringeren Höhe als in den Kontrolllysaten befindet. Unter Einbezug der leicht erniedrigten Laufhöhe des Standards von 100 kDa am rechten Bildrand relativiert sich der Unterschied in der beobachteten Laufhöhe von EXOC8 jedoch (Abbildung S 6).

### 3.2.9 EXOC8-Knockdown in Wildtyp-MelJuSo-Zellen und dessen Auswirkung auf die Exozytose

Wie in vorherigen Kapiteln gezeigt, geht ein Verlust von *SASH1* in der humanen Melanomzelllinie MelJuSo mit einer Erhöhung der intrazellulären Anzahl an Melanosomen einher. Zwar liefert eine mögliche Interaktion von *SASH1* mit EXOC8 erste Hinweise auf einen Mechanismus, jedoch wurde dieser bisher nur im Sinne eines *SASH1*-Knockouts untersucht.



**Abbildung 21: Intrazelluläre Melanosomen nach EXOC8-Knockdown in MelJuSo-Wildtyp-Zellen.** (A) Wildtyp HEK293 und MelJuSo-Zellen wurden nach 48h Transfektion mit Kontroll- und EXOC8-siRNA auf die Proteinlevel von EXOC8 untersucht. (B) Ladekontrolle der untersuchten Zelllysate von HEK293 und MelJuSo-Zellen nach Transfektion mit (Kontroll-)siRNA. (C) Knockdown Erfolgskontrolle: EXOC8-Level wurden in Relation zu Tubulin quantifiziert (n = 1). (D) Anzahl gezählter Melanosomen pro Zelle in Wildtyp und siEXOC8-MelJuSo-Zellen 48h nach Transfektion (Mann-Whitney Test; n = 9-10; p>0,9999). Die Zählung erfolgte manuell mittels des Programms Zen (Zeiss). (E) Morphologie von Kontrolltransfektionen mit nicht EXOC8-spezifischer siRNA. (F) Morphologie von siEXOC8 MelJuSo-Zellen.

Zum Abschluss dieser Arbeit soll der Grundstein für weitere Experimente gelegt werden, die den Einfluss von SASH1 und EXOC8 auf die Exozytose weiter ergründen könnten. Für einen ersten

Einblick wurde ein transienter siRNA-vermittelter Knockdown von *EXOC8* in der humanen Melanomzelllinie MelJuSo durchgeführt und dessen Auswirkung auf den intrazellulären Melanosomengehalt als Maß für die Exozytoseaktivität untersucht. Als Positivkontrolle der Transfektion wurde die Zelllinie HEK293 gewählt, da aus Vorergebnissen eine hohe Effizienz der Lipid-vermittelten Transfektion bekannt war. Um eventuelle off-target Effekte der siRNA-Transfektion zu berücksichtigen wurde als Negativkontrolle eine Mischung verschiedener nicht *EXOC8*-spezifischer siRNA verwendet, sogenannte scrambled siRNA. Im Vergleich zu dieser Kontrolltransfektion konnte in beiden Zelllinien eine verminderte *EXOC8*-Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden, wobei von zwei sichtbaren Banden nur jeweils die obere eines größeren Proteins reduziert ist. (Abbildung 21 A-C). Die Auswirkungen auf die zellbiologischen Vorgänge der Exozytose wurden parallel untersucht, indem die Zellen fixiert und für Aufnahmen mit dem Mikroskop präpariert wurden. Sowohl von den Kontrolltransfektionen als auch von den Zellen des *EXOC8*-Knockdowns wurden mikroskopische Aufnahmen von jeweils zehn Zellkolonien durchgeführt, bei denen zum einen die Anzahl der Zellen klar zu erkennen und zum anderen auch das Zytoplasma angemessen beurteilbar war. Anschließend wurde die Anzahl der Melanosomen manuell mit Hilfe des Programms ZEN (Zeiss) ausgezählt und jeweils durch die Anzahl der Zellen geteilt. Im direkten Vergleich ist dabei kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl intrazellulärer Melanosomen nach einem *EXOC8*-Knockdown gegenüber einer Transfektion mit unspezifischer siRNA zu erkennen (Abbildung 21 D). Auch wenn die durchschnittliche Anzahl an Melanosomen unter Knockdown-Bedingungen etwas höher liegt als unter den Kontrollbedingungen (35,10 vs. 24,97), so unterscheidet sich der Median der Stichproben nur wenig (19,79 vs. 18,80). Allerdings fällt auf, dass die Größe sowie die Anzahl der Melanosomen pro Zelle in beiden Behandlungen unter jenen liegen, die in vorherigen Experimenten beobachtet wurden, wodurch schlussendlich auch eine manuelle Auszählung notwendig war (Abbildung 17).

### 3.3 Abschnitt III: SASH1 als genetischer Biomarker sowie Erweiterung um tumorinfiltrierende T-Lymphozyten zur Vorhersage rekurrenter Metastasen im Stadium III humaner Kolonkarzinome

Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit den prognostischen und prädiktiven Vorhersagewerten genetischer und immunologischer Biomarker in einem Kollektiv von PatientInnen mit Kolonkarzinom. Der Fokus liegt dabei im Wesentlichen auf den Untersuchungen zu tumorinfiltrierenden CD3- und CD8-positiven T-Lymphozyten (TIL), sowie methodischen Aspekten und in Teilen auch der statistischen Auswertung der erhobenen Daten. Die folgenden Ausführungen konzentrieren sich demnach auf den immunologischen Aspekt, wobei zum besseren Verständnis und aus Gründen der Vollständigkeit auch Gesichtspunkte erläutert werden, die nicht originär im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind und sich beispielsweise auf genetische Biomarker beziehen. Diese Teile werden jedoch als solche gekennzeichnet.

#### 3.3.1 PatientInnenkollektiv

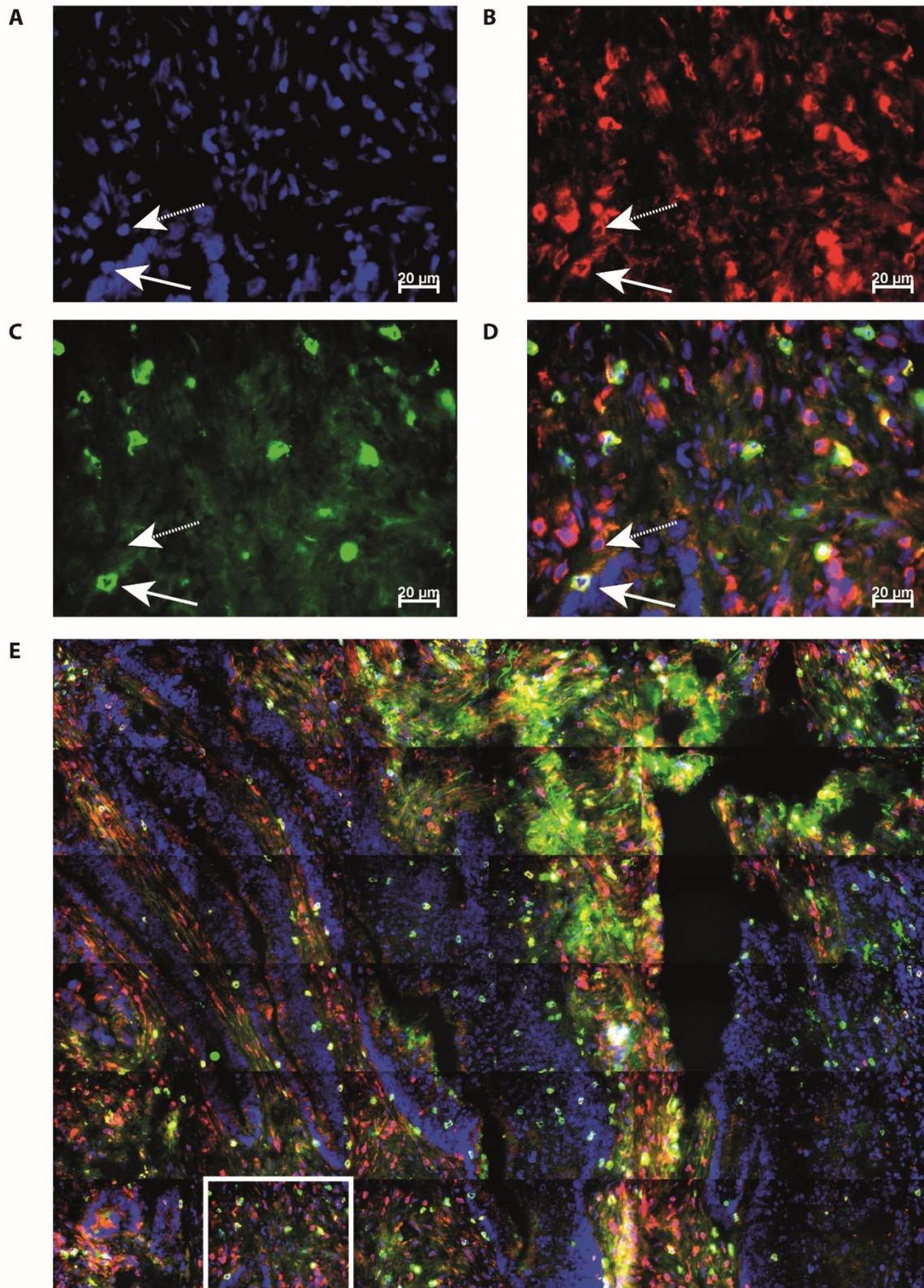
Insgesamt wurden 84 PatientInnen des UICC-Stadiums III mit vollständiger Resektion (R0) eines Karzinoms des Kolons aus zwei unabhängigen klinischen Zentren eingeschlossen (Klinikum rechts der Isar, Darmzentrum Marienhospital Vechta; Tabelle 3.3.1), wobei der Anteil an Frauen 36% betrug. Der Altersmedian lag bei 67 Jahren. Die Entität der rektalen Karzinome unterscheidet sich in der Prognose und der Art der Therapie von den Kolonkarzinomen, sodass erstere bewusst ausgeschlossen wurden, um mögliche Verzerrungen in der Prognose zu vermeiden. In der histologischen Untersuchung ist das Adenokarzinom mit 89% der am häufigsten diagnostizierte Subtyp. Die Nachbeobachtungszeit der PatientInnen nach der Tumorsektion betrug im Median 9,5 Jahre. In diesem Zeitraum entwickelten 37 PatientInnen (44%) im Median von 17 Monaten eine oder mehrere metachrone Fernmetastasen, also eine Metastase, welche zum Zeitpunkt der Diagnose oder operativen Therapie noch nicht manifest war. Tumorbedingt starben 33 PatientInnen (39%) nach einem Median von 112 Monaten. Das 5-Jahresüberleben ohne Auftreten einer Fernmetastase betrug  $52 \pm 6\%$ . Ein Indikator für das Risiko an einer Fernmetastase zu erkranken ist mit dem Status der befallenen Lymphknoten hoch signifikant assoziiert ( $p = 0,002$ ), wohingegen das Tumorstadium das Signifikanzniveau knapp verfehlt ( $p = 0,054$ ). Von den eingeschlossenen PatientInnen erhielten 27 (32%) eine 5-Fluorouracil (5-FU) basierte adjuvante Therapie.

		Alle PatientInnen		Auftreten einer Metastase		
		n = 84	(100%)	Metastase (n = 37)	Metastase (44%)	p-Wert Metastase
Geschlecht	Weiblich	30	36%	12	40%	<b>0,578</b>
	Männlich	54	64%	25	46%	
Alter (Jahre, Median)		67 (35-86)		37	44%	<b>0,428</b>
Histologie	Adenokarzinom	75	89%	34	46%	<b>0,076</b>
	Muzinöses Adenokarzinom	7	9%	1	14%	
	Siegelringzellkarzinom	2	2%	2	100%	
Grading	G1-2	48	57%	18	38%	<b>0,163</b>
	G3-4	36	43%	19	53%	
Tumorausdehnung (pT)	T1	0	0%	0	0%	<b>0,054</b>
	T2	6	7%	4	67%	
	T3	57	68%	20	35%	
	T4	21	25%	13	62%	
Nodalstatus (pN)	N1	58	69%	19	33%	<b>0,002</b>
	N2	26	31%	18	69%	
Lymphgefäßinvasion	L0	57	68%	25	44%	<b>0,960</b>
	L+	27	32%	12	44%	
Angioinvasion	V0	79	94%	34	43%	<b>0,459</b>
	V+	5	6%	3	60%	
Adjuvante Chemotherapie	Keine	41	49%	16	39%	<b>0,500</b>
	5-FU alleine	27	32%	12	44%	
	Andere	16	19%	9	56%	
Überlebensstatus	Überlebt	31	37%	2	6%	<b>&lt;0,001</b>
	Tumorbedingter Tod	33	39%	33	100%	
	Kein tumorbedingter Tod	20	24%	2	10%	
Auftreten metachroner Fernmetastasen	Keine Metastase	47	56%	0	0%	-
	Metachrone Fernmetastase	37	44%	37	100%	

**Tabelle 8: Eingeschlossene PatientInnen mit Kolonkarzinomen des UICC Stadiums III.** (t-Test; n = 84; p-Werte siehe Tabelle)

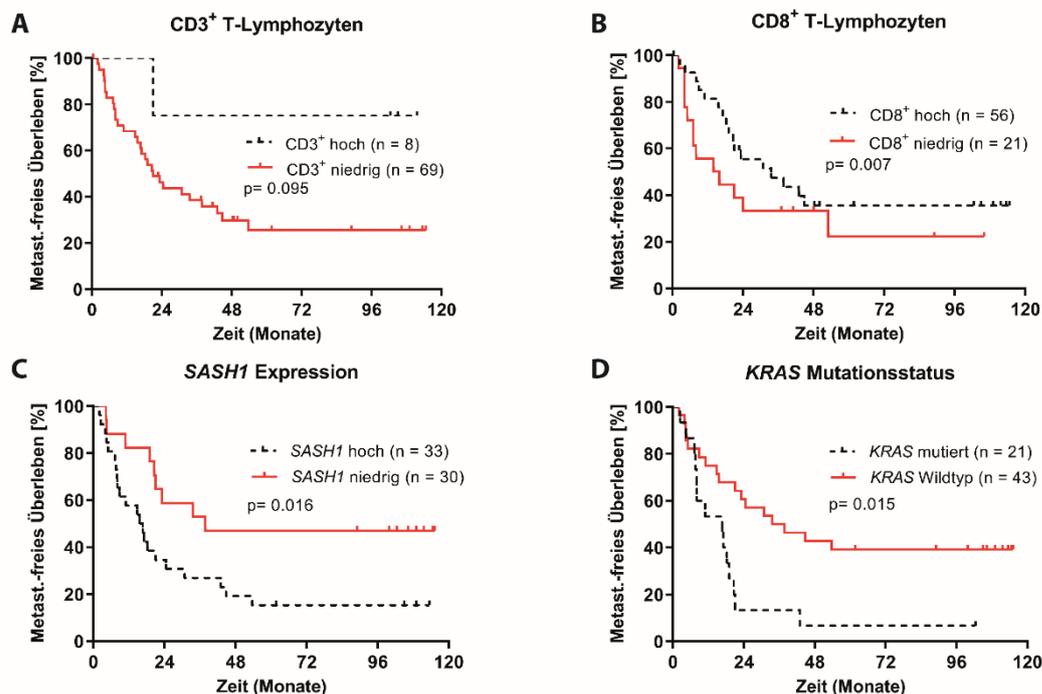
### 3.3.2 Tumorinfiltrierende CD3- und CD8-positive T-Lymphozyten als prognostische und prädik- tive Biomarker in humanen Kolonkarzinomen des UICC-Stadiums III

Zur Bestimmung der Anzahl der tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TIL) wurden Gewebeschnitte der Kolonkarzinome des oben beschriebenen Kollektivs mittels spezifischen Antikörpern, die entweder das Oberflächenmolekül CD3 (Abbildung 22 B) oder CD8 (Abbildung 22 C) erkennen, und deren korrespondierenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern gefärbt und für die Mikroskopie aufbereitet. Als Kontrolle und für eine optimale Beurteilung der TIL erfolgte zusätzlich eine DNA-Färbung mittels des fluoreszierenden Interkalanz DAPI (Abbildung 22 A). Es sollte ein möglichst großes und repräsentatives Feld der gefärbten Kolonkarzinome erfasst werden, sodass mithilfe der Software AxioVision (Zeiss) und eines Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M (Zeiss) ein Mosaik bestehend aus 36 benachbarten Einzelaufnahmen und einer Gesamtfläche von 1,22 mm<sup>2</sup> erstellt wurde. Mit dieser Methode konnten insgesamt 77 der 84 eingeschlossenen PatientInnen untersucht werden, wobei im Rahmen dieser Arbeit je drei Mosaik von 39 Gewebeschnitten mikroskopiert und CD3-positive Zellen (Abbildung 22, gestrichelter Pfeil) sowie CD8-positive Zellen (Abbildung 22, durchgezogener Pfeil) manuell unter Verwendung der Software AxioVision (Zeiss) ausgezählt wurden. Die erhobenen Daten wurden mit denen von Sabine Bauer zusammengeführt, die ihrerseits im Rahmen ihrer Masterarbeit 38 Gewebeproben auf die gleiche Weise untersuchte, sodass schlussendlich die Gewebeschnitte von 77 PatientInnen in die Beurteilung der TIL einfließen konnten. In der Zusammenschau der Daten konnten (korrigiert um den Flächenfaktor 1,22) jeweils im Median 208 (53-570) CD3-positive Zellen pro mm<sup>2</sup> und 86 (11–396) CD8-positive Zellen pro mm<sup>2</sup> beobachtet werden, die hier vereinfacht als T-Lymphozyten angesehen werden.



**Abbildung 22: Mosaik aus 36 Aufnahmen zur Quantifizierung tumorinfiltrierender T-Lymphozyten in Kolonkarzinomen.** Gewebeschnitte der Kolonkarzinome wurden hinsichtlich der T-Lymphozytenmarker CD3 und CD8 gefärbt. **(A)** Zellkernfärbung DAPI (blau) (Maßstab = 20 µm). **(B)** CD3 (rot) (Maßstab = 20 µm). **(C)** CD8 (grün) (Maßstab = 20 µm). **(D)** Überlagerung von A-C (Maßstab = 20 µm). **(E)** Resultierendes Mosaik. Weiße Umrandung entspricht A-D.

Die Anzahl der TIL wurde mit dem tumorfreien Überleben der PatientInnen assoziiert und so das Überleben ohne metachrone Fernmetastase bei den Überlebenszeitanalysen als primärer Endpunkt gesetzt. Die Anzahl CD3-positiver TIL ist in den Kaplan-Meier-Analysen nicht signifikant mit dem Auftreten einer metachronen Fernmetastase assoziiert (Abbildung 23 A). Ausgehend von den Analysen der Grenzwerte werden 22 von insgesamt 77 Proben zur Gruppe mit einer geringen Anzahl CD8-positiver TIL zugeordnet. Dabei korreliert das Risiko, eine metachrone Fernmetastase zu entwickeln, signifikant mit einer geringen Anzahl CD8-positiver TIL (Abbildung 23 B). Auch bei PatientInnen mit einer onkogenen Mutation im Exon 2 von *KRAS* ist ein signifikant erhöhtes Risiko einer Fernmetastase festzustellen (Abbildung 23 D). Während onkogene *KRAS*-Mutationen und die Anzahl von TIL bereits in anderen Arbeiten auf ihre prognostische Eignung untersucht wurden, lag hier ein besonderer Fokus auf *SASH1* als möglicher Biomarker. Interessanterweise zeigt sich bei den Metastasen-freien Überlebenszeitanalysen eine Gruppe an PatientInnen mit hoher *SASH1*-Expression, die ein signifikant höheres Risiko für Fernmetastasen im Verlauf des Beobachtungszeitraums aufweisen (Abbildung 23 C). Dabei ist in den untersuchten Gewebeproben des Kollektivs die *SASH1*-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zum Normalgewebe signifikant reduziert [22].



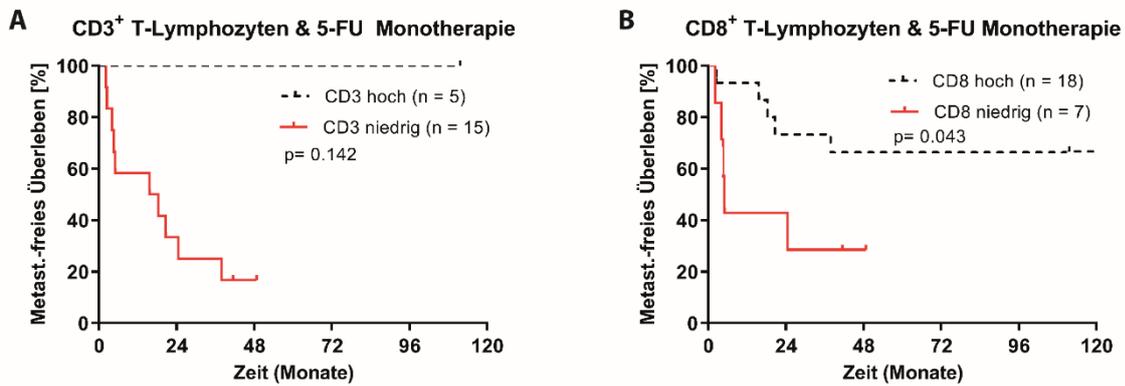
**Abbildung 23: Risiko einer Fernmetastase unter Berücksichtigung immunologischer und genetischer Marker.** Die Kaplan-Meier-Analysen wurden mithilfe von Dr. Dr. Ulrich Nitsche (Technische Universität München) erstellt. **(A-B)** Einfluss der Anzahl CD3- (A) oder CD8- (B) positiver T-Lymphozyten auf das Risiko, eine metachrone Fernmetastase zu entwickeln (Log-rank Test; n = 77; p = 0,0995 (A), p = 0,007 (B)). **(C-D)** Einfluss der Expression von *SASH1* (C) und Mutationsstatus des Onkogens *KRAS* (D) auf das Risiko, eine metachrone Fernmetastase zu entwickeln (Log-rank Test; n = 63-64; p = 0,016 (C), p = 0,015 (D)).

Die in den Kaplan-Meier-Kurven beobachteten Assoziationen zwischen genetischen und immunologischen Biomarkern und dem Auftreten von metachronen Fernmetastasen wurde in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse auf deren prognostischen Vorhersagewert hin untersucht (Tabelle 9). Auch hier stellt eine hohe Anzahl CD8-positiver TIL einen signifikant positiven prognostischen Effekt dar, ein mutierter onkogener *KRAS*-Status bedeutet hingegen einen signifikant negativen prognostischen Vorhersagewert für das Auftreten einer Fernmetastase. Die CD3-Zellzahl und die *SASH1*-Expression zeigen in der untersuchten Kohorte dagegen keinen prognostischen Zusammenhang bezüglich des Auftretens einer metachronen Fernmetastase.

	p-Wert	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
<b>CD3</b>	0,109	1,01	0,99	1,01
<b>CD8</b>	0,009	0,99	0,97	0,99
<b><i>SASH1</i></b>	0,103	3,01	0,80	11,31
<b><i>KRAS</i></b>	0,008	3,21	1,36	7,59

**Tabelle 9: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zur Bestimmung des prognostischen Vorhersagewerts der untersuchten Marker.**

Mit diesen Analysen kann die prognostische Relevanz der Biomarker *KRAS* sowie von CD8-positiven TIL im untersuchten Kollektiv für das Risiko metachroner Fernmetastasen unterstrichen werden. Es ist jedoch weiterhin von klinischem Interesse, ob diese Biomarker auch einen prädiktiven Charakter aufweisen, sodass der Erfolg einer antitumoralen Therapie abgeschätzt werden kann. Das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) wird seit Jahrzehnten beständig, häufig jedoch in Kombination mit verschiedenen weiteren Therapeutika, verwendet, sodass aus Gründen der Vergleichbarkeit der prädiktive Wert von TIL auf das Risiko für metachrone Fernmetastasen nach einer adjuvanten 5-FU Monotherapie untersucht wurde. In den Analysen genetischer Marker – durchgeführt von Mitgliedern der Arbeitsgruppe – zeigte allein die Expression von Osteopontin (*OPN*) als Surrogat für eine Aktivierung des WNT-Signalwegs einen prädiktiven Aussagewert für das Metastasen-freie Überleben (Abbildung S 5).



**Abbildung 24: Prädiktiver Wert der immunologischen Marker für das Entstehen einer Fernmetastase nach 5-FU Monotherapie.** Statistische Analysen wurden durchgeführt von Dr. Dr. Nitsche (Technische Universität München). **(A)** Einfluss CD3-positiver T-Lymphozyten auf das Entstehen einer metachronen Fernmetastase (Log-rank Test; n = 20; p = 0,142). **(B)** Einfluss CD8-positiver T-Lymphozyten auf das Entstehen einer metachronen Fernmetastase (Log-rank Test; n = 25; p = 0,043).

Der Fokus in der vorliegenden Arbeit lag vor allem auf den TIL und deren prädiktiven Wert. Unter den eingeschlossenen PatientInnen dieses Kollektivs erhielten 27 eine adjuvante Monotherapie mit 5-FU, eine Erhebung der TIL war aber lediglich für n = 20 untersuchte Proben für CD3, beziehungsweise n = 25 Proben für den Marker CD8 möglich. Erneut zeigt sich für die CD3-positiven TIL keine signifikante prädiktive Aussagekraft für das Entwickeln einer zeitversetzten Fernmetastase nach Therapieende (Abbildung 24 A). Allerdings ging eine niedrige Zahl CD8-positiver TIL mit einem signifikant höheren Risiko einher, in den Jahren nach einer adjuvanten 5-FU Monotherapie an einer metachronen Fernmetastase zu erkranken (Abbildung 24 B).

## 4. Diskussion

### 4.1 Das *Sash1*-defiziente Mausmodell und sein Tumorphänotyp als Chance für translationale Analysen

Der Verlust der Genregion des Chromosoms 6q24.3, in der sich auch das humane *SASH1* befindet, wurde schon früh mit der Entstehung verschiedener Krebsentitäten in Verbindung gebracht, wie etwa des kolorektalen Karzinoms, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms, Eierstockkrebs, Prostatakrebs, endokriner Tumore der Bauchspeicheldrüse oder des Zervixkarzinoms [137-139, 145-147]. Schließlich wurde 2003 der genomische Verlust oder eine geringere Expression von *SASH1* mit einer schlechteren Überlebensrate und einer erhöhten Tumorgöße von Brustkrebspatientinnen assoziiert, sodass *SASH1* fortan als potenzieller Tumorsuppressor angesehen wurde [6]. Seitdem wurde ein *SASH1*-Mangel in verschiedenen Tumorarten beobachtet, wie etwa in Dickdarm- und Magenkrebs, Gliomen und Osteosarkomen, Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses sowie nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [7, 10, 20, 21, 132, 148]. Das humane *SASH1* besteht aus 1247 Aminosäuren, ist damit das größte Mitglied der SLy-Proteinfamilie und zeigt mit 85% Homologie zwischen Maus und Mensch eine hohe Konservierung zwischen den Spezies [1]. Nicht zuletzt aufgrund dieser hohen Übereinstimmung erscheint ein *Sash1*-defizientes Mausmodell zur Klärung der physiologischen Funktion und der Rolle von *SASH1* in pathologischen Vorgängen im Menschen interessant. Auch andere Gruppen näherten sich mittels eines Mausmodells bereits der Rolle von *Sash1*. Beispielsweise erstellte eine chinesische Arbeitsgruppe im Kontext der Pigmentierung ein heterozygoten Knock-in-Mausmodell, welches die bekannte menschliche Punktmutation Y551D unter Kontrolle des murinen *Sash1*-Genlokus exprimiert und so ein chimäres *SASH1*-*Sash1*-Exon erzeugt [53]. Dieser Ansatz soll später in Zusammenschau mit anderen Ergebnissen erläutert werden.

In Abgrenzung dazu und in einer ähnlichen Vorgehensweise zum hier beschriebenen *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell wählte eine kanadische Arbeitsgruppe ebenfalls ein *Gene Trap* Verfahren. In den *Sash1*-Lokus wurde der Vektor pGT0LcfT2, bestehend aus den Sequenzen für den Homöobox Transkriptionsfaktor *Engrailed 2* (*En2*), einem Spleißakzeptor, einer  $\beta$ geo-Domäne und einer Polyadenylierungssequenz, unter Kontrolle des endogenen *Sash1*-Promotors eingefügt. Im Gegensatz zum *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell findet sich diese Insertion im Intron 14 von *Sash1*, sodass laut den Autoren ein *Sash1*-LacZ-Fusionsprotein mit der Sequenz der ersten 14 *Sash1*-Exons translatiert wird. Anhand dieses Mausmodells wurde die *Sash1*-Gewebsexpression untersucht und ausgehend von einer starken Expression in mikrovaskulären Endothelien die Rolle von *SASH1* im endothelialen TLR4-Signalweg analysiert. In dieser Studie wurden nur heterozygote *Sash1*-*Gene Trap* Mäuse präsentiert und es wurde erwähnt, dass homozygot mutierte Mäuse eine perinatale Letalität zeigen. [149]

Dieser Phänotyp wurde von derselben Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie näher beleuchtet, wonach homozygote *Sash1*-defiziente Mäuse eine verzögerte Reifung von Alveolarepithelzellen und damit eine verminderte Surfactant-assoziierte Proteinsynthese besitzen [150]. Über eine Beeinträchtigung eines mutmaßlich von *Sash1* induzierten Signalweges, der über  $\beta$ -Arrestin1, die Kinasen PI3K und Akt sowie den eNOS-Signalweg führt, verursacht ein Surfactant-Mangel dann in homozygot *Sash1*-mutierten Mäusen in allen Fällen postnatal Zyanose, Atemstörungen und schlussendlich den Tod der Jungtiere [150]. Weiterhin zeigen homozygot-mutierte Mäuse demzufolge perinatal ein signifikant geringeres Gewicht als Wurfgeschwister (Wildtyp und heterozygot), die *Sash1*-Allele werden in diesem Mausmodell gemäß den Mendelschen Regeln vererbt [150].

Zur Untermauerung der Ergebnisse erstellten die Autoren ein konditionales Mausmodell unter Nutzung des Cre/loxP-Systems, indem die *Sash1* Exons 3 und 4 mit loxP-Stellen versehen und die resultierenden *Sash1*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit einem endothelspezifischen Cre-Mausmodell (VEC-Cre) gekreuzt wurden. Ein ebenso eingefügtes Stopcodon in Exon 5 sollte nunmehr die residuale *Sash1*-Expression verhindern. In beiden Mausmodellen sind die mRNA-Level wichtiger Surfactant-assoziiierter Proteine in einem späten Stadium der fetalen Entwicklung signifikant reduziert. Die Autoren lassen jedoch unerwähnt, ob auch die Mäuse des Cre/floxP-Systems nach der Geburt aufgrund von Atemnot sterben. [150]

Offenbar setzten die Autoren eine funktionelle *Sash1*-Defizienz in den eingesetzten *Gene Trap* Modellen als gegeben voraus, da in keiner der Publikationen der Erfolg des *Gene Trap* Ansatzes auf mRNA- oder Proteinebene kontrolliert oder eine mögliche *Sash1*-Restexpression (weder des N-terminalen noch des C-terminalen Teils) gezeigt wird. Lediglich eine Expression des LacZ-Fusionsproteins wird mittels der  $\beta$ -Galactosidase-Färbung nachgewiesen, sodass sehr wahrscheinlich ein trunkiertes Fusionsprotein mit den ersten 14 *Sash1*-Exons ohne die funktionellen SH3- und SAM-Domänen exprimiert wird [149]. Allerdings bleibt die N-terminale Kernlokalisierungssequenz weiterhin erhalten und in Experimenten mit humanen C-terminalen SASH1-Deletionsprodukten konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass diese im Zellkern akkumulieren [4]. Daher wäre eine negativ-dominante Wirkung des trunkierten murinen *Sash1* möglich, welches die Funktion im Zytoplasma als Gerüstprotein nicht mehr physiologisch erfüllen kann, da es in Fusion mit der  $\beta$ -Galaktosidase ausgeprägt wird und somit grundlegende zelltypspezifische Mechanismen über ein künstliches Maß hinaus beeinträchtigt.

In dieser Arbeit wie auch in Vorarbeiten zum *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell wurde der Erfolg des *Gene Trap* genau überprüft. Grund dafür ist die Möglichkeit, dass durch Spleißvorgänge um die Insertion herum ein Wildtyp-Transkript des endogenen Gens erzeugt wird [151]. Nach Erhalt der ersten mutierten Mäuse wurde der *Sash1*-Lokus auch durch Sanger-Sequenzierung der genomischen DNA untersucht und die Lage des *Gene Traps* zwischen Exon 2 und 3 präzise bestätigt.

Auch wenn in den durchgeführten qPCR-Experimenten weiterer Generationen die *Sash1*-Expression auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Geweben der heterozygoten und homozygoten *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse signifikant reduziert ist, findet man in manchen Proben noch eine sehr geringe Restexpression, die zwar auf Kontamination zurückzuführen sein könnte, aber auch auf eine nicht vollständige Funktion der *Gene Trap* Kasette. Die höchste Expression von *Sash1* in Mäusen wurde im Gehirn nachgewiesen. Daher eignet sich die RT-PCR von Gehirnproben von Wildtyp-Tieren im Vergleich zu homozygoten *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen, um die Lage des *Gene Trap* Vektors in verschiedenen Generationen des Mausmodells zu kontrollieren und dabei ein alternatives Spleißen auszuschließen. In den Lysaten der homozygot mutierten Mäuse sind keine PCR-Produkte des Wildtyp-Allels nachweisbar, sodass die korrekte Lage der Genkasette weiterhin anzunehmen ist. Ein alternatives Spleißen und ein daraus resultierendes Wildtyp-Produkt kann dabei weitgehend ausgeschlossen werden oder dieses liegt zumindest deutlich unter der Nachweisgrenze, die die RT-PCR bietet. Der später durch eine Kreuzung mit Flippase-Deleter-Mäusen geschaffene Genotyp der *Sash1*<sup>RFΔHygromycin</sup>-Mäuse senkt die Wahrscheinlichkeit alternativer Fusionsprodukte weiter, da der exogene PGK-Promotor des Vektors dauerhaft entfernt wurde. Der Erfolg des *Sash1*-Knockouts sollte auch auf Proteinebene aufgezeigt werden, jedoch scheiterten Antikörper-vermittelte Nachweismethoden aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper gegen das murine *Sash1*. Aufgrund dessen wurde mit der Massenspektrometrie eine sehr sensitive und labelfreie Methode gewählt. Aus Voruntersuchungen war bereits eine vergleichsweise niedrige Abundanz von *Sash1* auf Proteinebene bekannt, sodass zur Bestimmung des Proteoms die einzelnen Peptide durch eine Vorfractionierung aufkonzentriert wurden, wobei sich aufgrund des technischen Aufwands die Zahl an biologischen Replikaten der beiden Genotypen auf  $n = 3$  reduzierte [128, 129]. Die Expression von *Sash1* auf Proteinebene wurde wie auch in den Experimenten mit cDNA (RT-PCR) beziehungsweise mRNA (qPCR) anhand von Gehirnlisaten durchgeführt, sodass die Ergebnisse untereinander gut vergleichbar sein sollten. Interessanterweise ist in den Kontrollen 1,51-fach mehr *Sash1* als in den Lysaten der *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse zu detektieren, woraus sich ein signifikanter Unterschied ergibt. Allerdings wurden demzufolge in *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Tieren *Sash1*-Peptide identifiziert, darunter auch Peptide im C-terminalen Teil des Proteins, die in 3'-Richtung der *Gene Trap* Kasette liegen und deren Ausprägung inhibiert sein sollte. Die niedrigen oder fehlenden *Sash1*-mRNA-Level in den qPCR-Experimenten scheinen somit nur bedingt im Einklang mit der Massenspektrometrie zu stehen. Die verwendeten Primer binden im 5'-Teil des *Sash1*-Transkripts, der für den N-terminalen Anteil von *Sash1* kodiert. Allerdings besteht keine lineare Korrelation von mRNA-Leveln und der Menge an translatiertem Protein, da sich beispielsweise transkriptionale und (post-)translationale Prozesse differentiell auswirken können [152]. Weiterhin kann die Anzahl an mRNA-Kopien in Mäusen bis zu 10.000-fach niedriger liegen als die korrespondierende Proteinexpression dies erwarten ließe [153]. Hier könnte die Methode der RNA-seq Abhilfe schaffen, da so Isoformen und unterschied-

liche Exon-Nutzung besser quantifiziert werden können, was zu besseren Modellen des tatsächlichen Transkripts führt, das einem bestimmten Protein zugrunde liegt [152]. Andererseits belegt die Analyse auf Protein-Niveau, dass in dem hier verwendeten *Gene Trap* Modell eine gewisse, obgleich signifikant reduzierte Sash1-Expression vorliegt, die dennoch ausreicht, um einen starken Phänotyp zu induzieren.

Interessant ist ohnehin, dass eine beeinträchtigte, wenn auch nicht völlig fehlende Sash1-Expression in zwei ähnlichen gentechnischen Verfahren jeweils verschiedene Phänotypen hervorbringt. Homozygote Mäuse der kanadischen Arbeitsgruppe sterben perinatal aufgrund eines Surfactant-Mangels [153], wohingegen sich in den *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen je nach Hintergrund des Mausstamms entweder ein Hypopigmentierungsphänotyp (C57Bl/N6) oder spontane Neoplasien in verschiedenen Organen (Sv129) zeigen. Ausgehend von diesen Beobachtungen und den nachgewiesenen Sash1-Peptiden in den Proben der *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse, könnte eine komplette Sash1-Defizienz tatsächlich nicht mit dem Leben vereinbar sein.

Auffällig ist zudem, dass der genetische Hintergrund von C57Bl/6N-Mäusen kein weiteres nennenswertes neoplastisches Geschehen mehr zulässt. Wie oben beschrieben ist die Rückkreuzung des genetischen Modells von Sv129- auf C57Bl/6N-Mäuse weit verbreitet und üblich – nicht zuletzt deswegen sollte die Rückkreuzung die Ergebnisse vergleichbarer machen. Die fehlende Ausprägung des Tumorphänotyps stellt dahingehend jedoch eine Limitation dar, auch wenn ähnliche Effekte schon für andere Pathologien vor anderen genetischen Hintergründen der Mausmodelle beobachtet wurden, wie etwa in Modellen zur Dystonie oder Neuralrohrdefekten, aber auch in Modellen von kolorektalen Karzinomen und Leukämie [154-157]. Noch offensichtlicher wurde dies bei Studien, die – ähnlich dieser Arbeit – eine höhere Tumorenpenetranz vor der Rückkreuzung eines Mausmodells von Sv129- auf den C57Bl/6N-Hintergrund feststellen mussten [158, 159]. Auch speziell hinsichtlich pulmonaler Neoplasien ist eine verringerte Tumoranfälligkeit von Mäusen mit dem C57Bl/6-Hintergrund vorbeschrieben, die auf gewisse Maus-Lungenkrebs-Suszeptibilitäts-Loci wie etwa den *Pulmonary adenoma susceptibility 1* (*Pas1*) zurückgeführt werden kann [160, 161]. In heterozygoten und homozygoten *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen ist die Sash1-Expression auf mRNA-Ebene gleichermaßen reduziert und in den ersten Generationen der heterozygoten Sv129-Mäuse zeigt sich der oben beschriebene pro-onkogene Phänotyp, sodass in Zusammenschau dieser Erkenntnisse von einer Haploinsuffizienz für das *Sash1*-Allel gesprochen werden kann [162]. Selbst wenn in heterozygoten Mäusen ein weiteres nicht mutiertes *Sash1*-Allel vorhanden wäre, kann dies augenscheinlich nicht die fehlende Expression des mutierten Allels kompensieren oder physiologische Level von *Sash1*-mRNA produzieren.

Im Gegensatz zum Modell der kanadischen Arbeitsgruppe zeigen heterozygote wie auch homozygote *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mäuse einen lebensfähigen Phänotyp und weisen Nachkommen gemäß den Mendelschen Regeln auf. Es wurden keine Anzeichen von Blindheit oder abnormalem Verhalten beobachtet. Auch die Gewichtsentwicklung der Mäuse über die Monate

hinweg zeigt keine signifikanten Veränderungen, die auf einen gestörten Stoffwechsel im Besonderen oder eine beeinträchtigte Entwicklung der Mäuse im Allgemeinen hindeuten würden. Allerdings kann ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer *Sash1*-Defizienz und der Entwicklung verschiedener Tumorentitäten anhand des *Gene Trap* Mausmodells hier erstmals nachgewiesen werden, da zwischen dem *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Genotyp und der Tumorentstehung ein signifikanter Zusammenhang besteht. Stratifiziert man die Mäuse gemäß deren Genotyp und Phänotyp bei Tumorentdeckung, zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang, der möglicherweise darauf schließen lässt, dass eine aberrante *Sash1*-Expression erst im Lauf der Zeit durch ein prokogenes Ungleichgewicht zu tumorösen Neoplasien führt. Eine ähnlich starke Penetranz dieser Keimbahnmutation wie etwa in *Apc*<sup>Min/+</sup>-Mäusen, die aufgrund von Neoplasien im Dünn- und Dickdarm nur ein Überleben von etwa vier bis fünf Monaten zeigen, ist für eine *Sash1*-Defizienz nicht beobachtbar [163].

Auch wenn die Stratifizierung von Geschlecht und Genotyp keine signifikanten Ergebnisse liefert, hatten weibliche Mäuse nach dem Verlust von *Sash1* ein tendenziell höheres Risiko, einen Tumor zu entwickeln, als deren männliche Wurfgeschwister. Betrachtet man das mittlere Alter der Tumorentdeckung zwischen den beiden Geschlechtern, so traten bei Weibchen im Durchschnitt vier Monate früher Tumore auf als bei Männchen. Ob diese Beobachtungen auch für humane Tumorentitäten zutreffen, sollte in einer translationalen Analyse mithilfe der cBioPortal Datenbank untersucht werden; demnach stammen die Mehrzahl der Tumorproben mit einer *SASH1*-Deletion von Frauen. Warum jedoch vor allem Frauen häufiger eine Deletion im *SASH1*-Lokus aufweisen, bleibt weiter unklar. Stabilisierende Effekte des fehlenden Y-Chromosoms kommen gleichermaßen in Betracht wie etwa die mögliche Reaktivierung von ansonsten stillgelegten X-Chromosomen [164, 165], obgleich M. Dorak und E. Karpuzoglu festhalten, dass die geschlechtsspezifische Assoziation einer genetischen Variante nicht zwangsläufig von deren genomischen Position (der Gonosomen) abhängt, da laut deren Meta-Analyse die Mehrheit der Gene mit geschlechtsspezifischer Expression Autosomen betrifft [166]. In Rückschau auf das *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell, welches pathophysiologisch einer *Sash1*-Deletion ähnelt, könnte das bedeuten, dass das vermehrte Auftreten tumoröser Neoplasien nicht allein auf die kleine Stichprobengröße zurückzuführen ist. Daraus könnte gefolgert werden, dass der weibliche Genotyp die Haploinsuffizienz des Tumorsuppressorgens *Sash1* in weiblichen Mäusen aggraviert. Inwiefern chromosomale oder hormonelle Unterschiede zwischen den Geschlechtern Einfluss auf diesen Effekt haben und ob dieser Schluss womöglich auch für den Menschen gültig ist, bedarf weiterer Forschung. Zusammengefasst belegt das hier beschriebene *Sash1*<sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodell die Rolle von *SASH1* als Tumorsuppressor *in vivo*, in unterschiedlichen Organtypen und Geweben (Manuskript zur Veröffentlichung in Vorbereitung).

## 4.2 Einfluss von *SASH1* auf die Pigmentierung durch Beeinträchtigung des interzellulären Melanintransfers

Der Hauptteil dieser experimentellen Arbeit hat sich auf den Zusammenhang von *SASH1* und der Pigmentierung des Menschen wie auch des *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mausmodells konzentriert. Zwar wird bei den Mäusen durch die Rückkreuzung auf den C57Bl/N6-Hintergrund der Tumorphänotyp unterdrückt, jedoch stellte sich eine hypopigmentierte, graue Fellfarbe der *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäuse ein, welche streng mit dem Genotyp der Mäuse korreliert. Hier ist anzumerken, dass der Phänotyp der grauen Fellfarbe auch schon vor der Kreuzung mit FLP-Deleter-Mäusen zu beobachten war; da für die Fragestellung der Hypopigmentierung jedoch vor allem mit Mäusen des *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Genotyps gearbeitet wurde, wird zur Vereinfachung für folgende Ausführungen *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Genotyp stellvertretend verwendet. Dieser Phänotyp gewann dabei zunehmend an Interesse, da zur selben Zeit weitere Arbeitsgruppen die Bedeutung von *SASH1* und dessen Rolle in der Pigmentierung erkannten. So wurden seitdem mehrere Fallberichte von PatientInnen veröffentlicht, die ein lentiginöses, also hyper- sowie hypopigmentiertes Hautbild präsentieren. Diese Erscheinung kann jeweils auch unter den Begriffen Dyschromatosis Universalis Hereditaria (DUH) sowie Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria (DSH) zusammengefasst werden, wobei das genetische Korrelat eine Mutation des *SASH1*-Lokus darstellt [40, 42, 43, 52, 167]. In einem Fall einer homozygoten Missense-Mutation von *SASH1* ist neben den Hautveränderungen auch ein spinozelluläres Karzinom beschrieben [47]. Zhou et al. griffen 2013 auf eine früher veröffentlichte Studie zurück, in der bereits zwei chinesische Familien mit DSH publiziert und der Genlocus 6q24.2-q25.2 – in dem sich auch *SASH1* befindet – als Ursache vermutet wurde [39, 168]. Auf die von dieser Arbeitsgruppe veröffentlichten Studien bezüglich einer mechanistischen Erklärung für die Phänotypen der DSH und DUH soll im weiteren Verlauf des Kapitels im Kontext der Ergebnisse dieser Arbeit näher eingegangen werden. Interessanterweise finden sich die verantwortlichen Punktmutationen in den veröffentlichten Individuen mit Pigmentierungsstörungen zum Großteil im hochkonservierten Bereich von *SASH1*, der den drei Proteinen der SLy-Familie gemeinsam ist; eine Beobachtung, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemacht und zudem unabhängig veröffentlicht wurde [5, 44, 46]. Clements et al. leiten daraus und aus eigenen spektroskopischen Experimenten den Entschluss ab, diesen Bereich, der in *SASH1* die Aminosäuren 400-554 umfassen soll, definitorisch enger einzugrenzen und als SPIDER (SLy Proteins Associated Disordered) Region zu benennen [46]. Im Gegensatz zu den humanen Punktmutationen fußt das *Sash1*<sup>ROSA<sup>F</sup>ARY</sup>-Mausmodell auf einem *Gene Trap* und somit auf einer funktionellen Deletion bzw. Reduktion von *Sash1*. Auch in der Haut von homozygoten Mäusen ist die *Sash1*-Expression hoch signifikant reduziert, sodass in diesem Mausmodell eine Kausalität zwischen *Sash1*-Expression und veränderter Fellfarbe angenommen werden kann. Um die Beobachtungen *in vivo* noch weiter vereinfachen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Modell entworfen, indem durch das CRISPR/Cas9-System

*SASH1*-defiziente Klone der humanen Melanomzelllinie MelJuSo erstellt wurden. Die Klone wurden auf vier wesentliche Mechanismen hin verglichen, die für einen veränderten Pigmentierungsphänotyp verantwortlich sein können: die Migration und Proliferation, die Melaninsynthese, der Transport der Melanosomen und schließlich deren Exozytose [56, 57]. Es gilt natürlich zu bedenken, dass hier physiologische Prozesse von Melanozyten mithilfe einer Melanomzelllinie untersucht werden. Der Vorteil dieser Vorgehensweise: Melanomzellen müssen, anders als Melanozyten, nicht mehr immortalisiert werden und eignen sich daher für einen stabilen „Knockout“ und vergleichbare Experimente über die Zeit hinweg. Dabei ist selbstverständlich keine uneingeschränkte Übertragung der Erkenntnisse auf die Primärzellen möglich. Für Primärkulturen wie auch für Zelllinien gilt jedoch gleichermaßen, dass sie unabhängig von deren natürlichem Milieu und zellulärem Umfeld – in diesem Fall maßgeblich Keratinozyten und extrazelluläre Matrix der Epidermis – betrachtet werden, mit welchem sie ansonsten interagieren würden. [169]

Aus Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe im Kontext der Tumorbilogie, die mittlerweile für viele verschiedene Zelltypen und Krebsentitäten bestätigt wurden, ist bereits ein erhöhtes proliferatives und migratorisches Potential *SASH1*-defizienter Zellen bekannt [2, 4, 9-11, 14-16]. Jedoch konnten mit der hier verwendeten Melanomzelllinie MelJuSo diese Ergebnisse interessanterweise nicht bestätigt werden, da sich weder bezüglich der Proliferation, der 2D-Zellmigration, noch der gerichteten Migration entlang eines Serumgradienten signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *SASH1*-Knockout Zellen zeigen. Eine Verminderung der Migration respektive der Proliferation in den *SASH1*-defizienten Melanomzellen hätte die Hypothese gestützt, Melanozyten beziehungsweise Melanoblasten seien in deren Migration zum Zielort – der Basis von Haarfollikeln und der Epidermis – oder in der dortigen Proliferation durch das Fehlen von *SASH1* gehemmt. Die Folge wäre eine Hypopigmentierung durch eine Unterversorgung der umliegenden Zellverbände. Natürlich ist hier der Einwand berechtigt, dass die Experimente mit immortalisierten Zellen einer Melanomzelllinie und nicht mit unipotenten Melanoblasten durchgeführt wurden. Auch eine genauere Betrachtung der Migration von Melanoblasten aus der Neuralleiste in der embryonalen Entwicklung würde sicherlich interessante Einblicke liefern. Allerdings wurden diese Prozesse mit dem durchgeführten genetischen Maus-Modell abgebildet und auch die Migration durch extrazelluläre Matrix überprüft. Aufgrund der oben genannten Vorbefunde einer *SASH1*-Defizienz und in Zusammenschau mit den histologischen Untersuchungen der Kooperationspartner erscheint ein reduziertes migratorisches und proliferatives Verhalten *in vivo* unwahrscheinlich, da sich auch in homozygoten *Sash1*-defizienten Mäusen Melanozyten entlang der Basalmembran finden. Zhou et al. kommen jedoch zu unterschiedlichen bis gegenteiligen Ergebnissen: sie untersuchten je eine PatientIn aus drei nicht blutsverwandten Familien, die von DSH betroffen sind und identifizierten je eine Punktmutation in *SASH1*. Die Mutationen E509K, L515P und Y551D befinden sich jeweils im evolutionär konservierten, zentralen Bereich von *SASH1*, welcher den Proteinen der SLy-Familie ähnelt, und haben nach immunhistochemischer Färbung der entsprechenden Hautschnitte mehr *SASH1*-positive Zellen in allen Schichten der Epidermis zur Folge. Da sich in den

Hautschnitten von nicht betroffenen Individuen SASH1-positive Zellen vor allem entlang der Basalmembran befinden, schließen die Autoren darauf, dass *SASH1* die Migration von Melanozyten in die Epidermis reguliert und Betroffene mit der untersuchten Punktmutation daher hyperpigmentierte Makulä besitzen. Allerdings fehlt für diese Konklusion der Nachweis: es wird kein Beleg erbracht, dass es sich bei den SASH1-positiven Zellen in der Immunhistochemie auch um Melanozyten handelt und ebenso keine Quantifizierung der gefärbten Zellen zwischen den Individuen oder zwischen hyperpigmentierter und normal pigmentierter Haut der Betroffenen angegeben. Darüber hinaus wurde in der Melanomzelllinie A375 durch eine retrovirale Transfektion eine stabile Expression der punktmutierten *SASH1*-Konstrukte erzeugt, woraus eine erhöhte *SASH1*-Expression und eine erhöhte Proteinstabilität abgeleitet werden. Die Überexpression in den stabilen Klonen hat eine erhöhte 2D-Migration, sowie eine erhöhte Migration durch die Poren eines Zellkultur-Inserts zur Folge. Schließlich zeigt sich in den mutierten A375-Zellen eine erniedrigte *E-Cadherin*-Expression, die durch eine Interaktion von SASH1 mit Gas und IQGAP1 vermittelt und so die erhöhte Migration der Melanozyten erklären soll. [39] Theoretisch wäre eine Reduzierung von E-Cadherin durch eine funktionelle Beeinträchtigung von SASH1 möglich, auch wenn ein anderer Mechanismus als wahrscheinlicher angesehen werden kann, wonach SASH1 durch eine direkte Bindung an das Onkogen CRKL dieses inhibiert, die durch CRKL vermittelte Epithelial-Mesenchymale-Transition hemmt und epitheliale Marker wie E-Cadherin verstärkt exprimiert werden [4, 130]. Es sei erwähnt, dass Zhou et al. ihre Beobachtungen allerdings auch aus unterschiedlichen Prämissen ableiten. So wird bei deren Versuchen zum einen eine Melanomzelllinie verwendet, in welcher *SASH1* überexprimiert ist. Zum anderen wurden Hautproben von Individuen mit *SASH1*-Punktmutationen histologisch aufgearbeitet. Damit stellen sich andere Voraussetzungen als in den hier verwendeten *SASH1*-Knockouts der humanen Melanomzelllinie MelJuSo und des stark reduzierten bis abwesenden Sash1 in *Sash1<sup>RFΔHy</sup>*-Mäusen dar.

Neben der Migration und Proliferation wurde auch die Melanogenese genauer betrachtet. Begonnen wurde mit dem wichtigsten Transkriptionsfaktor *MITF*, dessen Expression nach einem *SASH1*-Knockout in MelJuSo-Zellen keine offensichtlichen Veränderungen in der Analyse der Immunoblots zeigt. Hier muss natürlich berücksichtigt werden, dass die vorläufigen Experimente zur Bestimmung der *MITF*-Expression mit zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt wurden, weshalb sich hier auch die Bestimmung eines Signifikanzniveaus verbietet. In jeder der beiden Analysen wurden dennoch vier Knockout-Klone gegen je eine Wildtyp-Kondition verglichen, so dass sich daraus zumindest eine qualitative Beobachtung ableiten lässt. Allerdings unterscheidet sich die *Mitf*-Expression auf mRNA-Ebene in Hautproben von homozygoten *Sash1<sup>RFΔHy</sup>*-Mäusen nicht signifikant von deren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Daher kann in der Zusammenschau der Ergebnisse ein offensichtlicher Einfluss auf die Gesamtexpression des Transkriptionsfaktors *Mitf* eher ausgeschlossen werden. Diese Erkenntnis steht in Widerspruch zu einer weiteren Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von Zhou et al., die sich ebenfalls mit *SASH1* und dessen Auswirkung auf die Pigmentierung beschäftigt. Darin erstellte die Gruppe ein chimäres *SASH1*-

*Sash1*-Knock-in BALB/c-Mausmodell, welches die humane *SASH1*-Punktmutation Y551D sowie murines *Sash1* exprimiert. Wildtyp, heterozygote wie auch homozygote chimäre Mäuse exprimieren dabei das chimäre *SASH1-Sash1*-Produkt, ohne dabei einen beobachtbaren hyper-/ oder hypopigmentierten Phänotyp zu präsentieren. Interessanterweise zeigen homozygote chimäre Mäuse eine verminderte *SASH1-Sash1*-/ und *Mitf*-Expression, wohingegen sieben von elf heterozygoten Mäusen signifikant höhere Proteinlevel an *SASH1/Sash1* und *Mitf* besitzen als deren Wildtyp-Wurfgeschwister, sodass die Autoren zum einen zu dem Schluss kommen, dass *Mitf* von *Sash1* induziert wird und zum anderen *SASH1* als Gerüstprotein für die Ansammlung von *Mitf* im Zellkern fungiert und so die Melanogenese reguliert. [53] Diese Hypothesen konnten mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Allerdings wurde auch hier der Einfluss der *SASH1*-Expression auf den Transkriptionsfaktor *MITF* näher beleuchtet und in Experimenten mit Zellkernfraktionierung untersucht, ob der Zellkernimport von *MITF* nach einem *SASH1*-Knockout in MeJuSo-Zellen beeinträchtigt ist. Trotz mehrmaligen Wiederholungen mit verschiedenen Versuchsbedingungen und Protokollen sind Aussagen und Schlussfolgerungen zur Translokation von *MITF* aus dem Zytosol in den Nucleus aus technischen Gründen nicht uneingeschränkt möglich, da in der Zellkern-Fraktion die Positivkontrolle Lamin-A entweder nur schwach zu erkennen ist oder die Negativkontrolle  $\beta$ -Tubulin zu finden ist, was auf Verunreinigung mit Zytosol schließen lässt. Jedoch wurde die murine *Mitf*-Expression in Hautproben der *Sash1*<sup>RF $\Delta$ Hy</sup>-Mäuse sowie die Expression von *Tyr*, *Tyrp1* und *Dct* – wichtigen Enzymen der Melanogenese – auf mRNA-Ebene untersucht und dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen *Sash1*-defizienten oder Wildtyp Geweben festgestellt. Dieser Vergleich erfolgte auch zwischen den *SASH1*-defizienten Klonen und parental MelJuSo-Zellen, in denen der Transkriptionsfaktor und dessen Zielgene *TYR*, *TYRP1* und *DCT* so gering exprimiert waren, dass ein Nachweis durch qPCR nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Dabei gilt zu bedenken, dass *MITF* und die wichtigsten Enzyme der Melanogenese ohne eine hormonelle ( $\alpha$ MSH) oder physikalische (UVA-/UVB-Strahlung) Stimulation nur gering physiologisch exprimiert werden [82, 170]. Für weitere Experimente sollte also eine Bestrahlung der Mäuse und anschließende Gewebeproben oder eine  $\alpha$ MSH-Stimulation der humanen Melanomzelllinie MelJuSo erwogen werden.

Zhou et al. hingegen publizierten Ergebnisse, wonach eine erhöhte *SASH1*-Expression stabiler Klone, welche jeweils die oben genannten Punktmutationen des humanen *SASH1* exprimieren, zu einer erhöhten Expression von *TYR*, *TYRP1*, *RAB27*, und *PMEL17* in den Melanomzelllinien SKMel28 und NHEM führt. Hier muss in Betracht gezogen werden, dass mutierte Varianten von *SASH1* „Gain/Loss of function“ Effekte erzeugen könnten, die von den Auswirkungen einer Gendefizienz des endogenen *SASH1*, wie sie in der vorliegenden Arbeit generiert wurde, deutlich abweichen können. *PMEL17* ist nach der enzymatischen Herstellung des Melanins für die Reifung der Melanosomen verantwortlich, wobei *RAB27a* eine wichtige Rolle im Melanosomentrans-

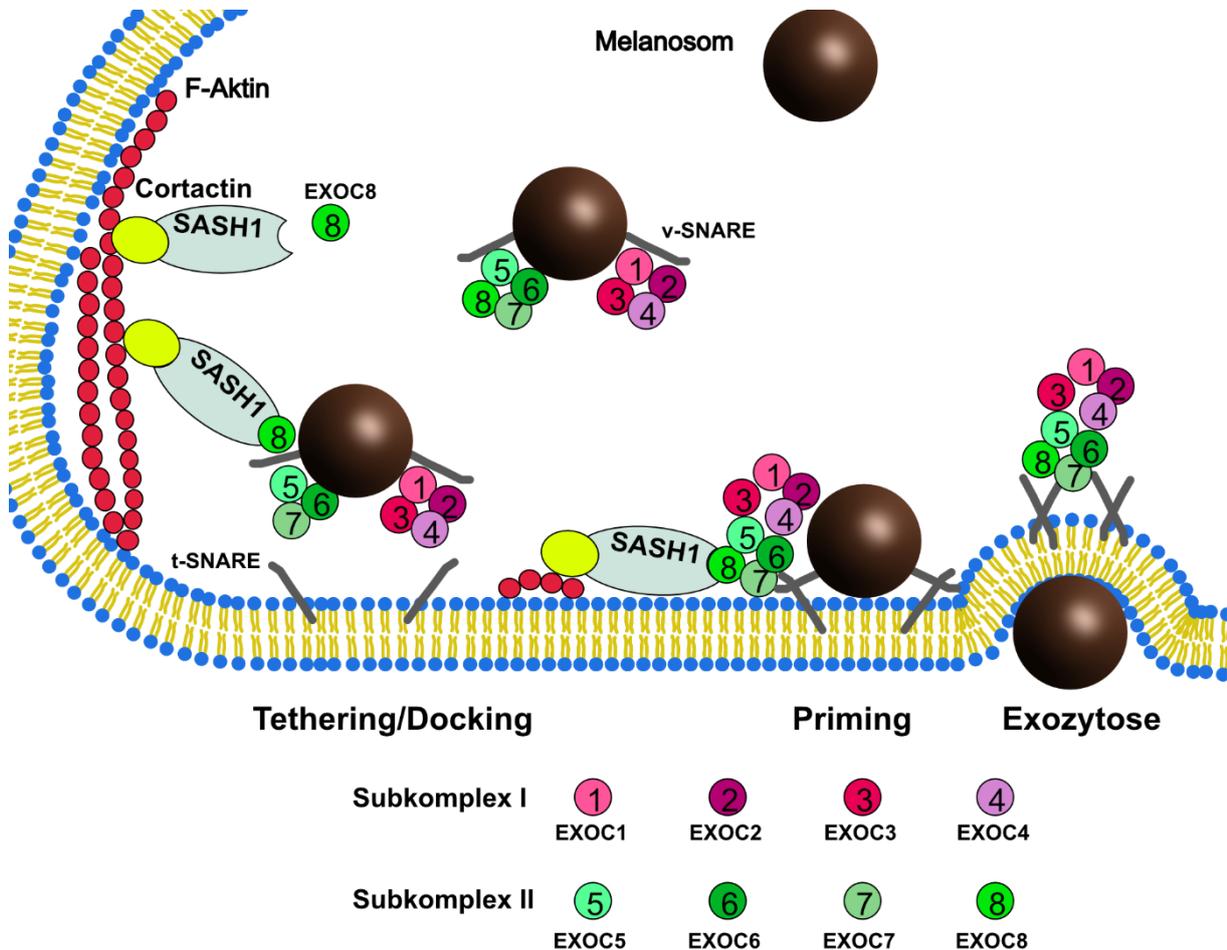
port in den dendritischen Fortsätzen der Melanozyten einnimmt und sich aus Störungen der beiden Proteine jeweils eigene Pigmentierungsphänotypen ableiten lassen [171, 172]. In den stabilen Klonen der *SASH1*-Überexpression soll *SASH1* durch eine Kaskade von p53-POMC-Gas-*SASH1* durch p53 induziert werden, wobei *SASH1* in einer Rückkopplungsschleife wiederum p53 positiv stimuliert [50]. In einer weiteren Arbeit der Autoren soll der *SASH1*-vermittelte Effekt auf die Melanogenese dargestellt werden: eine Assoziation von *SASH1* mit MAP2K2-Kinasen erhöht die Phosphorylierung der Kinasen ERK1 und ERK2 und schließlich des Transkriptionsfaktors CREB, sodass die Enzyme *TYR*, *TYRP1* und *PMEL17* stärker exprimiert werden [49]. Anders als die Induktion der Melanogenese durch TP53 [173] sind die beschriebenen Zusammenhänge dieser Arbeitsgruppe nicht unabhängig bestätigt und stimmen teilweise nicht mit den in der Literatur beschriebenen Signalwegen überein. So wird CREB beispielsweise durch PKA phosphoryliert, welches dann den Transkriptionsfaktor MITF induziert, während die Phosphorylierung von MITF durch RAS-RAF-MEK-ERK-Kinasen stattfindet [82, 174]. In Versuchen mit p53-CRISPR/Cas9-Knockout Klonen der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 konnte keine veränderte *SASH1*-Expression nachgewiesen werden. Ebenso ist die Induktion von p53 durch *SASH1* nicht durch eigene experimentelle Daten zu belegen, da in *SASH1*-defizienten HCT116-Zellen kein Zusammenhang mit TP53 und dessen Gensignaturen in der RNA-seq beobachtet wurden [17]. Trotz aller Einschränkungen ergibt sich in der vorliegenden Arbeit ein einheitliches Bild zwischen humanen und murinen Proben, sodass ein *SASH1*-Verlust keinen Einfluss auf die Melanogenese, deren wichtigsten Transkriptionsfaktor oder entscheidende Enzyme zu haben scheint. Vor allem im direkten Vergleich der Melanomzellen MelJuSo mit deren CRISPR/Cas9-Knockout Klonen wird dies deutlich, da die *SASH1*-defizienten Klone weiterhin in der Lage sind, sichtbares Melanin in Form von intrazellulären Melanosomen zu produzieren. Bei näherer Betrachtung findet sich sogar mehr intrazelluläres Melanin als in den Wildtyp-Melanomzellen. Die beiden orthogonalen Messmethoden, mit denen der Unterschied des Melaningehalts ermittelt wurde, haben zwar ihre jeweiligen methodischen Fehler, ergänzen sich im Umkehrschluss aber gut für Aussagen der Melanosomenkonzentration. Vorteilhaft an der digitalen Mikroskopie: die Auszählungen lassen sich zu späteren Zeitpunkten an gespeicherten, hochaufgelösten Bilddateien reproduzieren – wie hier im Rahmen eines „*SASH1*-Rescue“ Versuchs durchgeführt. Im Falle von Transfektionsexperimenten wie der GFP-markierten Re-Expression von *SASH1* in MelJuSo-Knockout Klonen lässt sich die Transfektionseffizienz sehr leicht bestimmen, sodass nur GFP-positive und damit transfizierte Zellen in die Auswertung einfließen. Dies führt zu einer genaueren Aussage über den Erfolg einer Re-Expression. Allerdings werden mit dieser Methode der halbautomatischen Auszählung möglicherweise andere Zellorganellen mitgezählt und die Anzahl der intrazellulären Melanosomen überschätzt, auch wenn dieser Fehler Kontrollklone gleichermaßen betrifft. Beim biochemisch-photometrischen Ansatz besteht eine größere Fehleranfälligkeit der Messungen. Trotz der teilweise hohen Melanin-Ansammlung in den *SASH1*-defizienten Klonen ist die Konzentration für diese Methode zu gering und befindet sich

im nicht-linearen Anfangsbereich der Standardgeraden, wodurch ein vorhandener Trend relativiert werden kann. Deutlich wird dies in den oben gezeigten Messungen, in denen der Klon S1-9 bei erhaltenem Trend zu einem höheren Melaningehalt keinen signifikanten Unterschied im photometrischen Verfahren zu den Lysaten der Wildtyp-Zellen erkennen lässt. Allerdings zeigt der Klon S1-9 in der Mikroskopie-basierten Auszählung der Melanosomen einen höchst signifikanten Unterschied.

Es bleibt allerdings die Frage, warum sich überhaupt eine Erhöhung des intrazellulären Melanins nach einem *SASH1*-Verlust einstellt. Im Allgemeinen können dafür zwei wesentliche Mechanismen verantwortlich sein: ein beeinträchtigter Transport der Melanosomen innerhalb der Zellen oder eine gestörte Exozytose [91, 99, 175]. Die beiden Mechanismen greifen auch ineinander und können teilweise nur schwer getrennt voneinander betrachtet werden. Eine mögliche Beeinträchtigung des Melanosomentransports wurde durch die Zeitraffer-Mikroskopie näher beleuchtet. Anders als in den Wildtyp-Zellen, in denen sich Melanosomen entlang filamentöser Strukturen (Mikrotubuli-System) vom Zentrum der Zelle zu dessen Peripherie bewegen, sind in den *SASH1*-Knockout Zellen neben mehrheitlich pendelnden Bewegungen zwischen Zellpol und -zentrum auch immobile Vesikel ohne größere Lageänderung zu erkennen. Hier finden sich seltener Melanosomen, die entlang von fibrillären Strukturen zu den Zellausläufern ziehen. In anderen *in vitro* Modellen, in denen wichtige Transportproteine der Melanozyten wie etwa Myosin-V oder Rab27a mutiert oder deletiert sind, zeigt sich zudem eine charakteristische Morphologie, bei der sich Melanosomen zirkulär um den Zellkern akkumulieren, da ein Abtransport von dort in Richtung Zellausläufer unterbunden ist [88, 172]. Evans et al. schlagen ein Verständnis für den intrazellulären Transport vor, wonach die Verteilung der Melanosomen durch das Gleichgewicht zweier Kräfte bestimmt wird: dem Mikrotubuli-abhängigen zentripetalen Transport und dem Myosin-Va/dynamischen, Aktin-abhängigen zentrifugalen Transport [91]. Da in den *SASH1*-Knockout Zellen weiterhin Melanosomen in zentripetaler wie zentrifugaler Richtung transportiert werden (wenn auch weniger effizient als in Wildtyp-Zellen), wurde die Hypothese verworfen, dass *SASH1* einen Einfluss auf die Integrität und Funktionalität der Mikrotubuli als wichtigste Transportstruktur der Zellen haben könnte, obgleich einige der *SASH1*-defizienten Zellen eine veränderte Struktur der Mikrotubuli präsentierten. Vielmehr wurde diese Morphologie als Wirkung des erhöhten Melanosomengehalts der Zellen betrachtet und nicht als deren Ursache. Die komplexen Mechanismen des Melanosomentransports entlang des Zellgerüsts aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten können mit diesen Experimenten nicht abgebildet werden und wichtige zellbiologische Abläufe wie etwa das Zusammenspiel molekularer Motoren wie Dyneine, Kinesine oder Myosine werden nicht im Detail erfasst [90, 176].

Als einzige noch nicht ausgeschlossene Erklärungsmöglichkeit wurde der Fokus vielmehr auf das Ausmaß der Exozytose von Melanosomen der *SASH1*-defizienten Melanomzellen gelegt, wobei der intrazelluläre Melaningehalt als Surrogat für die Exozytosefähigkeit dient. Wie bereits erwähnt sammeln sich nach einem *SASH1*-Knockout vermehrt Melanosomen in den MelJuSo-Zellen.

Dieser Phänotyp ist durch eine transiente Re-Expression von *SASH1* reproduzierbar reversibel, sodass ein Einfluss von *SASH1* auf die Exozytose vermutet wurde. Die Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybridsystems (Y2H) und der massenspektrometrischen Untersuchung von *SASH1*-Co-Immunopräzipitaten, die *EXOC8* als möglichen Interaktionspartner von *SASH1* in Betracht kommen lassen, erhärten die Hypothese, dass *SASH1* – vermittelt durch *EXOC8* – einen Einfluss auf die Exozytose von Melanosomen haben könnte. Für eine Bestätigung der Vorbefunde der Massenspektrometrie und des Y2H-Screenings sollte durch eine Co-Immunopräzipitation eine direkte Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden. Tatsächlich befinden sich Banden in den entsprechenden Höhen der Inputs wie auch der Präzipitate (Pulldowns), die auf *EXOC8* und damit auf eine mögliche Interaktion mit *SASH1* schließen lassen. Dabei verweisen bereits frühere Veröffentlichungen auf alternative Spleißvarianten von *EXOC8*, welche sich auch in den dazugehörigen Immunoblots wiederfinden [177]. Außerdem kann *EXOC8* durch *CDK1* Zellzyklus-abhängig phosphoryliert werden, was neben einer leicht erhöhten Laufhöhe im Immunoblot zugleich das Ansammeln des Exozyst-Komplexes inhibiert [143]. In einer anderen Studie zur Rolle des *EXOC8*-Subkomplexes in der Aktivierung des Hippo-Signalwegs zeigte sich wie in dieser Arbeit ein ähnliches Laufverhalten von *EXOC8* auf einer Immunblotmembran [144]. In einem letzten Experiment sollte untersucht werden, ob durch einen siRNA vermittelten Knockdown von *EXOC8* ein ähnlicher Phänotyp mit einem hohen intrazellulären Melanosomengehalt provoziert werden kann. Dabei war der Knockdown an sich zwar erfolgreich und die *EXOC8*-Expression per Immunoblot messbar reduziert, wenn auch nicht komplett herabreguliert, jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp-MelJuSo und den behandelten Zellen zu erkennen. Es ist bereits publiziert, dass Knockdown-Experimente der Exozyst-Untereinheiten *Exoc4* und *Exoc7* keinen Einfluss auf die Melanogenese haben [99]. Die Transfektion könnte dennoch einen zellulären Stress darstellen, der für eine ausreichende Melanogenese erst überwunden werden muss. Aus anderen Studien ist bekannt, dass Eingriffe in die Expression von Untereinheiten des Exozyst-Komplexes für Mäuse (*Exoc1*) wie auch für humane Zellen (*EXOC7*) tödlich sein können [178, 179]. Trotzdem wäre für eine Steigerung der Knockdown-Effizienz eine zweifache Behandlung mit siRNA denkbar, um die *EXOC8*-Expression weiter zu reduzieren und einen messbaren Effekt zu erzeugen. Weitere Experimente sind also nötig, um eine mögliche Kausalität des *EXOC8*-vermittelten Einflusses von *SASH1* auf die Exozytose in den untersuchten Melanomzellen tiefergehend zu untersuchen.



**Abbildung 25: Hypothese des Einflusses von SASH1 auf die Exozytose.**Abbildung verändert nach Nishida-Fukuda, ergänzt um zusätzliche Informationen aus weiteren Publikationen [2, 5, 95, 96]. Durch eine Interaktion mit EXOC8 könnte SASH1 für eine effizientere Gestaltung der Exozytose verantwortlich sein, indem durch die SASH1-EXOC8-Assoziation das Tethering und Priming von zu exozytierenden Vesikeln verbessert wird.

Die zentrale These dieser Arbeit lautet, dass SASH1 einen Einfluss auf die Pigmentierung besitzt, indem das Adaptorprotein SASH1 mit der Untereinheit des Exozyst-Komplexes EXOC8 direkt interagiert. Der gestörte Melanosomen-Transfer von Melanozyten zu Keratinozyten der Haarfollikel könnte den Hypopigmentierungsphänotyp der *Sash1*<sup>RF<sup>FAHy</sup></sup>-Mäuse erklären. Da auch in *Sash1*-defizienten Mäusen weiterhin Melanozyten entlang der Haarfollikel zu finden sind, liegt eine Beeinträchtigung der spezifischen Funktion der Melanozyten näher: nämlich der Produktion bzw. des Transportes von Melanin, oder der Abgabe der Melanosomen an umliegende Zellen. Im CRISPR/Cas9 *SASH1*-Knockout Modell ist in den Melanozyten mehr Melanin zu finden als in den Wildtyp-Zellen, sodass der Einfluss von *SASH1* auf die Melanogenese eher sekundär zu sein scheint. Aus Vorergebnissen dieser Arbeitsgruppe ist die Anreicherung von SASH1 in der Zellperipherie bekannt, ebenso wie die Assoziation von SASH1 mit Cortactin und F-Aktin, dessen Polymerisation dadurch stimuliert wird [2]. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte man durch die Interaktion von SASH1 mit EXOC8 eine räumliche Bahnung der Untereinheit des Exozyst-Komplexes zu der Zellperipherie vermuten. Durch einen *SASH1*-

Verlust geht der Effekt dieser Bahnung verloren und die Exozytose gestaltet sich weniger effizient, obgleich sie nicht vollständig erliegt. Übertragen auf die Beobachtungen des pendelnden Transports in *SASH1*-defizienten Zellen könnte dies eine Art funktionellen Polaritätsverlust bedeuten, da der sequenzielle Ablauf von Transport und Exozytose ohne den letzten Schritt stattfindet. Nishida-Fukuda vermutet ohnehin, dass die beiden Subkomplexe des oktameren Exozyst-Komplexes, die erst aus dem Zytosol rekrutiert werden müssen, durch verschiedene Regulatoren gesteuert werden [96]. Der vollständige Exozyst-Komplex wiederum ist für das Tethering, also das Festhalten von Vesikeln an der Zellmembran zuständig, bis die Membranen der Vesikel, vermittelt durch die SNARE-Proteine, mit denen der Zelle verschmelzen [99, 180]. Auch hier könnte die Interaktion von *SASH1* und *EXOC8* das Tethering und möglicherweise auch das Priming unterstützen und somit die Exozytose effizienter gestalten. Darüber hinaus scheint *EXOC8* über eine Bindung an *Sro7* und *Sro77* und einer Interaktion von *Sec9* die SNARE-Proteine und so die Vesikelbindung und -fusion zu regulieren [95]. Dies würde die Rolle von *EXOC8* in der Exozytose nur weiter unterstreichen. Durch die fehlende Interaktion von *SASH1* und *EXOC8* in den MelJuSo-Zellen wäre auch die veränderte Morphologie der *SASH1*-defizienten Zellen erklärbar, da der Exozyst-Komplex auch an der Zellpolarität beteiligt ist [94], wobei hier auch andere Faktoren wie der in HCT116 beobachtete Verlust epithelialer Marker nach einem *SASH1*-Knockout verantwortlich sein können [4].

Trotz allem gilt es weiterhin, die obigen Erkenntnisse auf den Prüfstand zu stellen und mit weiteren Experimenten die genannten Hypothesen abzusichern oder zu verwerfen. Um das Ausmaß der Beeinträchtigung der Exozytose durch einen *SASH1*-Verlust zu quantifizieren, könnte auch der Melaningehalt im Medium von Melanozyten photometrisch bestimmt werden. Außerdem wäre eine Co-Kultur von Melanozyten und Keratinozyten von großem Interesse, da so nicht nur Effekte der Exozytose, sondern auch der Endozytose von Melanin in Keratinozyten überprüft werden könnten. So könnte ausgeschlossen werden, dass der Transport oder die Melanogenese von *SASH1*-defizienten Melanozyten beeinträchtigt und die verminderte Aufnahme in Keratinozyten allein einer ineffizienten Exozytose der Melanosomen zuzuschreiben ist [99, 181]. Ergänzend dazu könnten Primärkulturen der Melanozyten von homozygoten und Wildtyp *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mäusen einen Vergleich zum *in vitro* Modell der humanen *SASH1*-defizienten MelJuSo-Zellen ermöglichen. Die Bestimmung der intra- oder auch extrazellulären Melaninkonzentration könnte Hinweise auf die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf das Mausmodell geben.

Wu und Hammer unterstreichen in einer Übersichtsarbeit die Notwendigkeit eines Mausmodells, welches durch einen spezifischen Defekt des Melanosomen-Transfers eine Hypopigmentierung des Fells aufweist und mutmaßen, dass bisher kein geeignetes Modell identifiziert wurde, da durch eine Beeinträchtigung des Transfer Prozesses die Tiere nicht überlebensfähig wären [92]. Vielleicht könnte hier das *Sash1*<sup>RFΔHy</sup>-Mausmodell eine translationale Lücke füllen.

### 4.3 Prognostische und prädiktive Biomarker in Kolonkarzinomen des UICC-Stadiums III: Expression von SASH1 und tumorinfiltrierende T-Lymphozyten

Kolorektale Karzinome stellen über die Geschlechter hinweg eine sehr häufige Erkrankungs- und Todesursache dar, deren initiale therapiebestimmende Diagnostik sich in den letzten Jahren weniger stark entwickelte als die Möglichkeiten der Therapie selbst [100, 108]. Bei PatientInnen, die durch das Staging gemäß den TNM-Kriterien in frühe Stadien mit vermeintlich guter Prognose der Krankheit eingeteilt werden, zeigt sich ein sehr heterogenes Bild bezüglich des Überlebens und der krankheitsfreien Zeit nach Therapieende [110, 125]. Die Erwartungen der Gesundheitsdienstleistender und der Betroffenen gegenüber der sogenannten personalisierten Medizin entspricht also keineswegs dem klinischen Alltag. Prognostische und prädiktive Biomarker wären ein wichtiges Werkzeug, um die Krankheitsschwere von PatientInnen und deren Ansprechen auf die jeweiligen Therapien besser abschätzen zu können, wobei hier sowohl genetische als auch immunologische Biomarker, wie etwa tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TIL) hilfreich sein können [18, 116, 117, 120-122].

In einem Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob molekulargenetische Faktoren, wie die SASH1-Expression oder KRAS-Mutationen, bzw. die Häufigkeit CD3- und CD8-positiver Zellen in einem Kollektiv mit Kolonkarzinomen des UICC-Stadiums III einen prognostischen Wert für ein Wiederauftreten der Krankheit in Form einer metachronen Fernmetastase besitzen. Der Einfachheit halber wurden CD3-positive Zellen, basierend auf Morphologie und Lokalisierung, generell als T-Lymphozyten und CD8-positive Zellen als Effektor-T-Zellen betrachtet. Eine Mehrfach-Färbung oder eine durchflusszytometrische Analyse von isolierten Zellen könnten hier natürlich präzisere Aussagen über die Identität der TIL erlauben. Untersucht werden sollte insbesondere, ob die TIL eine prädiktive Aussage auf das Ansprechen einer 5-FU basierten adjuvanten Therapie erlauben können. Diese Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an den von Galon et al. etablierten Immunoscore für kolorektale Karzinome, welcher das Immuninfiltrat als eine Kombination bestehend aus den Populationen CD3<sup>-</sup>, CD45RO<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup> positiver T-Lymphozyten inklusive des Granzym B bestimmte und das Überleben der PatientInnen mit dem Ausmaß des Immuninfiltrats korrelierte [123]. Diese Vorgehensweise wurde später vereinfacht, indem ausschließlich CD3- und CD8-positive Lymphozyten erhoben wurden, auch wenn diese weiterhin entsprechend ihres Auftretens im Zentrum des Tumors bzw. des invasiven Randbereichs unterschieden wurden [125]. In diesen Untersuchungen konzentrierten sich die Autoren vor allem auf die prognostische Aussagekraft von Immuninfiltraten auf kolorektale Karzinome der UICC-Stadien I-II. Sie stellten auch selbst die Frage, wie der Immunoscore in den pathologischen Alltag integriert werden kann und forderten die Machbarkeit und Reproduzierbarkeit des Immunoscores durch weitere Forschungsarbeit zu demonstrieren und den prognostischen Wert des Immunoscores auch für PatientInnen mit kolorektalen Karzinomen des UICC Stadiums III zu validieren [182, 183].

In dieser Arbeit wurde dabei, in Abgrenzung zur Vorgehensweise von Galon et al., auf eine strenge Einteilung der Lymphozyten nach deren Lokalisation im Zentrum oder Randbereich des Tumors verzichtet und die Lymphozyten unabhängig von deren Position als tumorinfiltrierend zusammengefasst [184]. Einen weiteren Unterschied stellt die Nachweismethode der TIL in den hier untersuchten Gewebeproben dar. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Galon et al. wurde die Nachweismethode der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Es war daher auch von Interesse, ob sich diese methodischen Änderungen auf die prognostische und prädiktive Aussagekraft der Erhebung auswirken würden. Wie oben dargelegt besitzen neben genomischen Mutationen im Onkogen *KRAS* vor allem die CD8-positiven TIL einen prognostischen Wert. Allerdings war eine Abschätzung des Metastasen-freien Überlebens in dieser Kohorte allein an der Anzahl der CD3-positiven Lymphozyten nicht möglich. Interessanterweise finden sich auch ähnliche Ergebnisse in einer der ursprünglichen Arbeiten von Galon et al.: in zwei von drei Kohorten der Studie war eine bloße Erhebung der CD3-positiven T-Lymphozyten im Tumorzentrum (was dem Vorgehen in dieser Arbeit am nächsten kommt) nicht ausreichend, um einen signifikanten Unterschied in der Prognose vorhersagen zu können [123]. Es liegt nicht fern, dass die CD8-positiven Effektorzellen einen genaueren Prognosemarker darstellen, da sie an allen CD3-positiven Zellen eine Subpopulation mit zytotoxischen Eigenschaften darstellen und somit ein deutliches Potential besitzen, tumoröses Gewebe zu bekämpfen. In einer Übersichtsarbeit wurde noch einmal deutlich, dass CD8-positive TIL für 18.700 PatientInnen und über 17 Krebsentitäten hinweg den stärksten prognostischen Faktor bezüglich des Überlebens darstellen [185]. Weitere Analysen auf die Anwesenheit von Markern der Effektorfunktion wie Granzym B könnten hier nähere Einsichten liefern.

In dieser Arbeit konnte für ein Kollektiv des UICC-Stadiums III gezeigt werden, dass mithilfe der Immunfluoreszenz und ohne Einbezug genauer Tumorgrenzen eine prognostische Aussage über das Überleben der Betroffenen gefällt werden kann. Es ist jedoch von weiterem Interesse – vorzugsweise in einer retrospektiven Studie –, ob auch die Methodik zur Erkennung der TIL vereinfacht und die vergleichsweise aufwendige Immunfluoreszenz durch die größtenteils automatisierbare Immunhistochemie ersetzt werden kann. Dies würde den Aspekt der Machbarkeit einer weiterführenden pathologischen Beurteilung der TIL erleichtern.

Neben den immunologischen Markern der TIL wurde auch untersucht, inwiefern genetische Marker allein und in Kombination mit den immunologischen Markern die Prognose des Metastasen-freien Überlebens abbilden können. Interessanterweise stach dabei eine Subpopulation hervor, die bei einer hohen Expression von *SASH1* und entgegen dem beschriebenen tumorsuppressiven Potential von *SASH1* ein reduziertes Metastasen-freies Überleben zeigt. Es muss hier berücksichtigt werden, dass die Ausprägung von *SASH1* im Vergleich zur normalen Kolonmukosa in Tumoren generell deutlich reduziert ist, jedoch innerhalb der Tumore eine Gruppe mit relativ

hoher SASH1-Expression existiert. Ein ähnlicher Effekt wurde in einem Kollektiv von Brustkrebspatientinnen beobachtet, sodass der tumorsuppressive Einfluss von SASH1 wohl auch im molekularen und tumorbiologischen Kontext des Tumorstadiums betrachtet werden muss [11].

In einer weiteren Analyse wurde geprüft, ob TIL oder andere genetische Biomarker einen prädiktiven Vorhersagewert in Bezug auf das Ansprechen auf eine 5-FU Monotherapie im untersuchten Kollektiv besitzen. Auch hier erreichen CD3-positive T-Lymphozyten allein nicht die nötige Signifikanz. Allerdings stellen eine hohe Anzahl an CD8-positiven TIL sowie eine hohe Expression von Osteopontin (*OPN*) prädiktive Marker für das Metastasen-freie Überleben nach einer 5-FU Monotherapie dar.

Die *OPN*-Expression entspricht laut eigenen Vorbefunden einem Maß für die Aktivität des kanonischen WNT-Signalwegs [186], dessen verstärkte Aktivierung zu einem fehlenden Abbau von  $\beta$ -Catenin führt und über eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors TCF weitere pro-onkogene Proteinprodukte wie etwa c-Myc oder das Zyklin D1 produziert wird [187]. *OPN* kann also als prognostischer Marker in kolorektalen Karzinomen und als Surrogatmarker für den WNT-Signalweg zu Rate gezogen werden [186, 188]. Interessanterweise verweisen Angell et al. darauf, dass eine Aktivierung des onkogenen WNT- $\beta$ -Catenin-Signalweges die Rekrutierung von CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten zur Bekämpfung eines (kolorektalen) Karzinoms reduziert, so wie dies im Kontext maligner Melanome bereits gezeigt wurde [184, 189].

Vor diesem Hintergrund erscheinen die beiden Marker mit einer prädiktiven Aussagekraft – CD8-positive TIL und *OPN*-Expression – umso bemerkenswerter, da eine hohe *OPN*-Expression einer Infiltration mit CD8-positiven T-Lymphozyten entgegenstehen würde, obgleich jeder Wert für sich eine relevante Aussage über das Ansprechen auf eine Chemotherapie liefern könnte. Weitere Untersuchungen mit dem Schwerpunkt dieser Kombination an prädiktiven Markern wäre also sehr sinnvoll, auch im Hinblick auf die Frage, in welchem Ausmaß sich diese beiden Marker gegenseitig beeinflussen oder ob sie sogar zwei molekulare, tumorbiologisch getrennte Mechanismen abbilden.

Bei all diesen Überlegungen stellt die geringe Anzahl an PatientInnen mit einer 5-FU Monotherapie, bei der zugleich eine Erhebung des TIL-Status möglich war, sicherlich eine methodische Einschränkung dar. In weiteren retrospektiven Studien mit einer größeren Anzahl an ProbandInnen und weiteren 5-FU basierte Kombinationstherapien könnte die Aussagekraft dieser Parameter für das Metastasen-freie Überleben weiter untersucht werden.

## 5. Literatur

- [1] K. Janssen, "SASH1 (SAM and SH3 domain containing 1)," *Atlas Genet Cytogenet Oncol and Heamatol*, 2014, doi: 18(4):236-238.
- [2] M. Martini, A. Gnann, D. Scheickl, B. Holzmann, and K. P. Janssen, "The candidate tumor suppressor SASH1 interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 43, no. 11, pp. 1630-40, Nov 2011, doi: 10.1016/j.biocel.2011.07.012.
- [3] C. M. Clements, M. A. Henen, B. Vögeli, and Y. G. Shellman, "The Structural Dynamics, Complexity of Interactions, and Functions in Cancer of Multi-SAM Containing Proteins," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 11, Jun 1 2023, doi: 10.3390/cancers15113019.
- [4] F. C. Franke *et al.*, "The Tumor Suppressor SASH1 Interacts With the Signal Adaptor CRKL to Inhibit Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer," *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, vol. 7, no. 1, pp. 33-53, 2019, doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.08.007.
- [5] J. Jaufmann *et al.*, "The emerging and diverse roles of the SLy/SASH1-protein family in health and disease-Overview of three multifunctional proteins," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 35, no. 4, p. e21470, Apr 2021, doi: 10.1096/fj.202002495R.
- [6] C. Zeller *et al.*, "SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer," *Oncogene*, vol. 22, no. 19, pp. 2972-83, May 15 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206474.
- [7] C. Rimkus *et al.*, "Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer," *Br J Cancer*, vol. 95, no. 10, pp. 1419-23, Nov 20 2006, doi: 10.1038/sj.bjc.6603452.
- [8] L. Yang, M. Liu, Z. Gu, J. Chen, Y. Yan, and J. Li, "Overexpression of SASH1 related to the decreased invasion ability of human glioma U251 cells," *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 33, no. 6, pp. 2255-63, Dec 2012, doi: 10.1007/s13277-012-0487-z.
- [9] E. G. Chen, Y. Chen, L. L. Dong, and J. S. Zhang, "Effects of SASH1 on lung cancer cell proliferation, apoptosis, and invasion in vitro," *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 33, no. 5, pp. 1393-401, Oct 2012, doi: 10.1007/s13277-012-0387-2.
- [10] Q. Meng *et al.*, "SASH1 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of osteosarcoma cell," *Mol Cell Biochem*, vol. 373, no. 1-2, pp. 201-10, Jan 2013, doi: 10.1007/s11010-012-1491-8.

- [11] J. T. Burgess *et al.*, "SASH1 mediates sensitivity of breast cancer cells to chloropyramine and is associated with prognosis in breast cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 45, pp. 72807-72818, Nov 8 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12020.
- [12] Q. Fang, S. Yao, G. Luo, and X. Zhang, "Identification of differentially expressed genes in human breast cancer cells induced by 4-hydroxytamoxifen and elucidation of their pathophysiological relevance and mechanisms," (in eng), *Oncotarget*, vol. 9, no. 2, pp. 2475-2501, Jan 5 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23504.
- [13] R. Tang *et al.*, "Single-cell RNA sequencing reveals the transcriptomic landscape of kidneys in patients with ischemic acute kidney injury," (in eng), *Chin Med J (Engl)*, Apr 20 2023, doi: 10.1097/cm9.0000000000002679.
- [14] S. Lin *et al.*, "Effects of SASH1 on melanoma cell proliferation and apoptosis in vitro," *Molecular medicine reports*, vol. 6, no. 6, pp. 1243-8, Dec 2012, doi: 10.3892/mmr.2012.1099.
- [15] D. Sun, R. Zhou, H. Liu, W. Sun, A. Dong, and H. Zhang, "SASH1 inhibits proliferation and invasion of thyroid cancer cells through PI3K/Akt signaling pathway," *International journal of clinical and experimental pathology*, vol. 8, no. 10, pp. 12276-83, 2015. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722413>.
- [16] H. Chen, D. Wang, and Y. Liu, "SASH1 inhibits cervical cancer cell proliferation and invasion by suppressing the FAK pathway," *Molecular medicine reports*, vol. 13, no. 4, pp. 3613-8, Apr 2016, doi: 10.3892/mmr.2016.4946.
- [17] F. C. Franke *et al.*, "Novel role for CRK adaptor proteins as essential components of SRC/FAK signaling for epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer aggressiveness," *Int J Cancer*, Mar 9 2020, doi: 10.1002/ijc.32955.
- [18] U. Nitsche *et al.*, "Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer," *Ann Surg*, vol. 256, no. 5, pp. 763-71; discussion 771, Nov 2012, doi: 10.1097/SLA.0b013e318272de87.
- [19] L. Peng, H. Wei, and L. Liren, "Promoter methylation assay of SASH1 gene in hepatocellular carcinoma," *J BUON*, vol. 19, no. 4, pp. 1041-7, Oct-Dec 2014. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536614>.
- [20] N. Zhou, C. Liu, X. Wang, Q. Mao, Q. Jin, and P. Li, "Downregulated SASH1 expression indicates poor clinical prognosis in gastric cancer," *Hum Pathol*, vol. 74, pp. 83-91, Apr 2018, doi: 10.1016/j.humpath.2018.01.008.
- [21] Y. Jin and X. Qin, "Paired like homeodomain 1 and SAM and SH3 domain-containing 1 in the progression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 127, p. 105846, Oct 2020, doi: 10.1016/j.biocel.2020.105846.
- [22] A. Sperlich *et al.*, "Genetic and immunological biomarkers predict metastatic disease recurrence in stage III colon cancer," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 998, Oct 19 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4940-2.

- [23] H. Weidmann *et al.*, "SASH1, a new potential link between smoking and atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 242, no. 2, pp. 571-9, Oct 2015, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.013.
- [24] R. A. Verdugo *et al.*, "Graphical modeling of gene expression in monocytes suggests molecular mechanisms explaining increased atherosclerosis in smokers," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e50888, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0050888.
- [25] M. Wan *et al.*, "Identification of Smoking-Associated Differentially Methylated Regions Using Reduced Representation Bisulfite Sequencing and Cell type-Specific Enhancer Activation and Gene Expression," *Environ Health Perspect*, vol. 126, no. 4, p. 047015, Apr 27 2018, doi: 10.1289/EHP2395.
- [26] L. G. Tsaprouni *et al.*, "Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation," *Epigenetics*, vol. 9, no. 10, pp. 1382-96, Oct 2014, doi: 10.4161/15592294.2014.969637.
- [27] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646-74, Mar 4 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [28] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," (in eng), *Cancer Discov*, vol. 12, no. 1, pp. 31-46, Jan 2022, doi: 10.1158/2159-8290.Cd-21-1059.
- [29] D. Hanahan, E. F. Wagner, and R. D. Palmiter, "The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer," *Genes Dev*, vol. 21, no. 18, pp. 2258-70, Sep 15 2007, doi: 10.1101/gad.1583307.
- [30] R. S. Kerbel, "Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved," *Cancer Biol Ther*, vol. 2, no. 4 Suppl 1, pp. S134-9, Jul-Aug 2003. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508091>.
- [31] K. Kersten, K. E. de Visser, M. H. van Miltenburg, and J. Jonkers, "Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine," *EMBO Mol Med*, vol. 9, no. 2, pp. 137-153, Feb 2017, doi: 10.15252/emmm.201606857.
- [32] E. Sinn, W. Muller, P. Pattengale, I. Tepler, R. Wallace, and P. Leder, "Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo," *Cell*, vol. 49, no. 4, pp. 465-75, May 22 1987, doi: 10.1016/0092-8674(87)90449-1.
- [33] M. Salminen, B. I. Meyer, and P. Gruss, "Efficient poly A trap approach allows the capture of genes specifically active in differentiated embryonic stem cells and in mouse embryos," *Dev Dyn*, vol. 212, no. 2, pp. 326-33, Jun 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199806)212:2<326::AID-AJA17>3.0.CO;2-1.
- [34] C. A. Finlay, "p53 loss of function: implications for the processes of immortalization and tumorigenesis," *Bioessays*, vol. 14, no. 8, pp. 557-60, Aug 1992, doi: 10.1002/bies.950140811.

- [35] R. H. Friedel and P. Soriano, "Gene trap mutagenesis in the mouse," *Methods Enzymol*, vol. 477, pp. 243-69, 2010, doi: 10.1016/S0076-6879(10)77013-0.
- [36] G. R. MacGregor, B. P. Zambrowicz, and P. Soriano, "Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells," *Development*, vol. 121, no. 5, pp. 1487-96, May 1995. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789278>.
- [37] G. Friedrich and P. Soriano, "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice," *Genes Dev*, vol. 5, no. 9, pp. 1513-23, Sep 1991. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653172>.
- [38] W. V. Chen, J. Delrow, P. D. Corrin, J. P. Frazier, and P. Soriano, "Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis," *Nature genetics*, vol. 36, no. 3, pp. 304-12, Mar 2004, doi: 10.1038/ng1306.
- [39] D. Zhou *et al.*, "SASH1 regulates melanocyte transepithelial migration through a novel Galphas-SASH1-IQGAP1-E-Cadherin dependent pathway," *Cell Signal*, vol. 25, no. 6, pp. 1526-38, Jun 2013, doi: 10.1016/j.cellsig.2012.12.025.
- [40] Y. G. Shellman *et al.*, "SASH1 Is Involved in an Autosomal Dominant Lentiginous Phenotype," *J Invest Dermatol*, vol. 135, no. 12, pp. 3192-3194, Dec 2015, doi: 10.1038/jid.2015.292.
- [41] W. L. Zhong, H. J. Wang, Z. M. Lin, and Y. Yang, "Novel mutations in SASH1 associated with dyschromatosis universalis hereditaria," *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, vol. 85, no. 4, p. 440, Jul-Aug 2019, doi: 10.4103/ijdv.IJDVL\_360\_17.
- [42] J. Wang *et al.*, "A Novel De novo Mutation of the SASH1 Gene in a Chinese Family with Multiple Lentigines," *Acta Derm Venereol*, vol. 97, no. 4, pp. 530-531, Apr 6 2017, doi: 10.2340/00015555-2575.
- [43] J. Zhang, R. Cheng, J. Liang, C. Ni, M. Li, and Z. Yao, "Lentiginous phenotypes caused by diverse pathogenic genes (SASH1 and PTPN11): clinical and molecular discrimination," *Clin Genet*, vol. 90, no. 4, pp. 372-7, Oct 2016, doi: 10.1111/cge.12728.
- [44] L. Cao *et al.*, "Novel missense mutation of SASH1 in a Chinese family with dyschromatosis universalis hereditaria," *BMC Med Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 168, Jun 26 2021, doi: 10.1186/s12920-021-01014-w.
- [45] K. Guo, J. W. Liu, R. Zhang, R. Wang, D. L. Ma, and X. Zhang, "Genetic and phenotypic heterogeneity of multiple lentigines and precise diagnosis in four Chinese families with multiple lentigines," (in eng), *Pigment Cell Melanoma Res*, Apr 13 2023, doi: 10.1111/pcmr.13086.
- [46] C. M. Clements, B. Vögeli, Y. G. Shellman, and M. A. Henen, "Solution NMR backbone assignment of the SASH1 SLy proteins associated disordered region (SPIDER)," (in eng), *Biomol NMR Assign*, May 8 2023, doi: 10.1007/s12104-023-10134-6.

- [47] J. B. Courcet *et al.*, "Autosomal-recessive SASH1 variants associated with a new genodermatosis with pigmentation defects, palmoplantar keratoderma and skin carcinoma," *Eur J Hum Genet*, vol. 23, no. 7, pp. 957-62, Jul 2015, doi: 10.1038/ejhg.2014.213.
- [48] S. Z. Chen, Y. Zhang, S. Y. Lei, and F. Q. Zhou, "SASH1 Suppresses the Proliferation and Invasion of Human Skin Squamous Cell Carcinoma Cells via Inhibiting Akt Cascade," *Onco Targets Ther*, vol. 13, pp. 4617-4625, 2020, doi: 10.2147/OTT.S234667.
- [49] D. Zhou *et al.*, "p53 regulates ERK1/2/CREB cascade via a novel SASH1/MAP2K2 crosstalk to induce hyperpigmentation," *J Cell Mol Med*, vol. 21, no. 10, pp. 2465-2480, Oct 2017, doi: 10.1111/jcmm.13168.
- [50] D. Zhou *et al.*, "A novel P53/POMC/Galphas/SASH1 autoregulatory feedback loop activates mutated SASH1 to cause pathologic hyperpigmentation," *J Cell Mol Med*, vol. 21, no. 4, pp. 802-815, Apr 2017, doi: 10.1111/jcmm.13022.
- [51] H. Cui, S. Guo, H. He, H. Guo, Y. Zhang, and B. Wang, "SASH1 promotes melanin synthesis and migration via suppression of TGF-beta1 secretion in melanocytes resulting in pathologic hyperpigmentation," *Int J Biol Sci*, vol. 16, no. 7, pp. 1264-1273, 2020, doi: 10.7150/ijbs.38415.
- [52] Y. Araki *et al.*, "Five novel mutations in SASH1 contribute to lentiginous phenotypes in Japanese families," *Pigment Cell Melanoma Res*, Sep 27 2020, doi: 10.1111/pcmr.12930.
- [53] Z. Xu *et al.*, "Mutated SASH1 promotes Mitf expression in a heterozygous mutated SASH1 knockin mouse model," *Int J Mol Med*, vol. 46, no. 3, pp. 1118-1134, Sep 2020, doi: 10.3892/ijmm.2020.4652.
- [54] G. S. Barsh, "The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits," *Trends Genet*, vol. 12, no. 8, pp. 299-305, Aug 1996, doi: 10.1016/0168-9525(96)10031-7.
- [55] E. Steingrimsson, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins, "Mouse coat color mutations: from fancy mice to functional genomics," *Dev Dyn*, vol. 235, no. 9, pp. 2401-11, Sep 2006, doi: 10.1002/dvdy.20840.
- [56] D. C. Bennett and M. L. Lamoreux, "The color loci of mice--a genetic century," *Pigment Cell Res*, vol. 16, no. 4, pp. 333-44, Aug 2003, doi: 10.1034/j.1600-0749.2003.00067.x.
- [57] Y. Tomita and T. Suzuki, "Genetics of pigmentary disorders," *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, vol. 131C, no. 1, pp. 75-81, Nov 15 2004, doi: 10.1002/ajmg.c.30036.
- [58] R. Mayor and E. Theveneau, "The neural crest," (in eng), *Development*, vol. 140, no. 11, pp. 2247-51, Jun 2013, doi: 10.1242/dev.091751.
- [59] R. L. Mort, I. J. Jackson, and E. E. Patton, "The melanocyte lineage in development and disease," (in eng), *Development*, vol. 142, no. 7, p. 1387, Apr 1 2015, doi: 10.1242/dev.123729.
- [60] H. Barden and S. Levine, "Histochemical observations on rodent brain melanin," (in eng), *Brain Res Bull*, vol. 10, no. 6, pp. 847-51, Jun 1983, doi: 10.1016/0361-9230(83)90218-6.

- [61] L. Zecca *et al.*, "The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals," (in eng), *J Neural Transm (Vienna)*, vol. 109, no. 5-6, pp. 663-72, May 2002, doi: 10.1007/s007020200055.
- [62] M. Tachibana, "Sound needs sound melanocytes to be heard," (in eng), *Pigment Cell Res*, vol. 12, no. 6, pp. 344-54, Dec 1999, doi: 10.1111/j.1600-0749.1999.tb00518.x.
- [63] M. H. Goldgeier, L. E. Klein, S. Klein-Angerer, G. Moellmann, and J. J. Nordlund, "The distribution of melanocytes in the leptomeninges of the human brain," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 82, no. 3, pp. 235-8, Mar 1984, doi: 10.1111/1523-1747.ep12260111.
- [64] F. C. Brito and L. Kos, "Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart," (in eng), *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 21, no. 4, pp. 464-70, Aug 2008, doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00459.x.
- [65] E. K. Nishimura, "Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation," (in eng), *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 24, no. 3, pp. 401-10, Jun 2011, doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00855.x.
- [66] J. Y. Lin and D. E. Fisher, "Melanocyte biology and skin pigmentation," (in eng), *Nature*, vol. 445, no. 7130, pp. 843-50, Feb 22 2007, doi: 10.1038/nature05660.
- [67] N. Agar and A. R. Young, "Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?," (in eng), *Mutat Res*, vol. 571, no. 1-2, pp. 121-32, Apr 1 2005, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.11.016.
- [68] L. O. Essen and T. Klar, "Light-driven DNA repair by photolyases," (in eng), *Cell Mol Life Sci*, vol. 63, no. 11, pp. 1266-77, Jun 2006, doi: 10.1007/s00018-005-5447-y.
- [69] M. W. Lambert, S. Maddukuri, K. M. Karanfilian, M. L. Elias, and W. C. Lambert, "The physiology of melanin deposition in health and disease," *Clin Dermatol*, vol. 37, no. 5, pp. 402-417, Sep - Oct 2019, doi: 10.1016/j.clindermatol.2019.07.013.
- [70] M. S. Marks and M. C. Seabra, "The melanosome: membrane dynamics in black and white," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 2, no. 10, pp. 738-48, Oct 2001, doi: 10.1038/35096009.
- [71] A. Slominski, G. Moellmann, E. Kuklinska, A. Bomirski, and J. Pawelek, "Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway, L-tyrosine and L-dopa," *Journal of cell science*, vol. 89 ( Pt 3), pp. 287-96, Mar 1988. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3143738>.
- [72] Y. Yamaguchi, M. Brenner, and V. J. Hearing, "The regulation of skin pigmentation," *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 38, pp. 27557-61, Sep 21 2007, doi: 10.1074/jbc.R700026200.
- [73] T. Passeron, S. G. Coelho, Y. Miyamura, K. Takahashi, and V. J. Hearing, "Immunohistochemistry and in situ hybridization in the study of human skin melanocytes," *Exp Dermatol*, vol. 16, no. 3, pp. 162-70, Mar 2007, doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00538.x.

- [74] G. W. Millington, "Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors," (in eng), *Clin Exp Dermatol*, vol. 31, no. 3, pp. 407-12, May 2006, doi: 10.1111/j.1365-2230.2006.02128.x.
- [75] J. C. García-Borrón, Z. Abdel-Malek, and C. Jiménez-Cervantes, "MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation," (in eng), *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 27, no. 5, pp. 699-720, Sep 2014, doi: 10.1111/pcmr.12257.
- [76] E. R. Price *et al.*, "Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia," *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 29, pp. 17983-6, Jul 17 1998, doi: 10.1074/jbc.273.29.17983.
- [77] I. Suzuki *et al.*, "Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin," *J Invest Dermatol*, vol. 108, no. 6, pp. 838-42, Jun 1997, doi: 10.1111/1523-1747.ep12292572.
- [78] R. D. Cone *et al.*, "The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation," (in eng), *Recent Prog Horm Res*, vol. 51, pp. 287-317; discussion 318, 1996.
- [79] J. D. Simon, D. Peles, K. Wakamatsu, and S. Ito, "Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function," *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 22, no. 5, pp. 563-79, Oct 2009, doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00610.x.
- [80] A. Slominski, M. A. Zmijewski, and J. Pawelek, "L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions," *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 25, no. 1, pp. 14-27, Jan 2012, doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00898.x.
- [81] I. F. Videira, D. F. Moura, and S. Magina, "Mechanisms regulating melanogenesis," *An Bras Dermatol*, vol. 88, no. 1, pp. 76-83, Jan-Feb 2013, doi: 10.1590/s0365-05962013000100009.
- [82] S. A. D'Mello, G. J. Finlay, B. C. Baguley, and M. E. Askarian-Amiri, "Signaling Pathways in Melanogenesis," *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 7, Jul 15 2016, doi: 10.3390/ijms17071144.
- [83] E. J. Land, S. Ito, K. Wakamatsu, and P. A. Riley, "Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis," (in eng), *Pigment Cell Res*, vol. 16, no. 5, pp. 487-93, Oct 2003, doi: 10.1034/j.1600-0749.2003.00082.x.
- [84] A. Palumbo *et al.*, "Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1115, no. 1, pp. 1-5, Nov 14 1991, doi: 10.1016/0304-4165(91)90003-y.
- [85] C. Olivares, C. Jiménez-Cervantes, J. A. Lozano, F. Solano, and J. C. García-Borrón, "The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human

- tyrosinase," (in eng), *The Biochemical journal*, vol. 354, no. Pt 1, pp. 131-9, Feb 15 2001, doi: 10.1042/0264-6021:3540131.
- [86] S. Ito, "The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis," (in eng), *Pigment Cell Res*, vol. 16, no. 3, pp. 230-6, Jun 2003, doi: 10.1034/j.1600-0749.2003.00037.x.
- [87] N. Ohbayashi and M. Fukuda, "SNARE dynamics during melanosome maturation," *Biochem Soc Trans*, vol. 46, no. 4, pp. 911-917, Aug 20 2018, doi: 10.1042/BST20180130.
- [88] X. Wu, B. Bowers, K. Rao, Q. Wei, and J. A. Hammer, 3rd, "Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo," *J Cell Biol*, vol. 143, no. 7, pp. 1899-918, Dec 28 1998, doi: 10.1083/jcb.143.7.1899.
- [89] S. Aspengren, D. Hedberg, H. N. Skold, and M. Wallin, "New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells," *Int Rev Cell Mol Biol*, vol. 272, pp. 245-302, 2009, doi: 10.1016/S1937-6448(08)01606-7.
- [90] X. Tian, Z. Cui, S. Liu, J. Zhou, and R. Cui, "Melanosome transport and regulation in development and disease," (in eng), *Pharmacol Ther*, vol. 219, p. 107707, Mar 2021, doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107707.
- [91] R. D. Evans *et al.*, "Myosin-Va and dynamic actin oppose microtubules to drive long-range organelle transport," *Curr Biol*, vol. 24, no. 15, pp. 1743-50, Aug 4 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.06.019.
- [92] X. Wu and J. A. Hammer, "Melanosome transfer: it is best to give and receive," *Current opinion in cell biology*, vol. 29, pp. 1-7, Aug 2014, doi: 10.1016/j.ceb.2014.02.003.
- [93] H. Ando *et al.*, "Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion," *J Invest Dermatol*, vol. 132, no. 4, pp. 1222-9, Apr 2012, doi: 10.1038/jid.2011.413.
- [94] B. Wu and W. Guo, "The Exocyst at a Glance," (in eng), *Journal of cell science*, vol. 128, no. 16, pp. 2957-64, Aug 15 2015, doi: 10.1242/jcs.156398.
- [95] K. Mei and W. Guo, "The exocyst complex," *Curr Biol*, vol. 28, no. 17, pp. R922-R925, Sep 10 2018, doi: 10.1016/j.cub.2018.06.042.
- [96] H. Nishida-Fukuda, "The Exocyst: Dynamic Machine or Static Tethering Complex?," (in eng), *Bioessays*, vol. 41, no. 8, p. e1900056, Aug 2019, doi: 10.1002/bies.201900056.
- [97] K. Van Den Bossche, J. M. Naeyaert, and J. Lambert, "The quest for the mechanism of melanin transfer," (in eng), *Traffic*, vol. 7, no. 7, pp. 769-78, Jul 2006, doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00425.x.
- [98] M. Martin-Urdiroz, M. J. Deeks, C. G. Horton, H. R. Dawe, and I. Jourdain, "The Exocyst Complex in Health and Disease," *Front Cell Dev Biol*, vol. 4, p. 24, 2016, doi: 10.3389/fcell.2016.00024.

- [99] H. Moreiras *et al.*, "The exocyst is required for melanin exocytosis from melanocytes and transfer to keratinocytes," *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 33, no. 2, pp. 366-371, Mar 2020, doi: 10.1111/pcmr.12840.
- [100] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2019," *CA Cancer J Clin*, vol. 69, no. 1, pp. 7-34, Jan 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [101] R. Koch-Institut and G. d. e. K. i. D. e.V., "Krebs in Deutschland 2015/2016," (in ger), 2019, doi: <http://dx.doi.org/10.25646/5977>.
- [102] R. Fodde, "The APC gene in colorectal cancer," *Eur J Cancer*, vol. 38, no. 7, pp. 867-71, May 2002, doi: 10.1016/s0959-8049(02)00040-0.
- [103] H. Brenner, M. Kloor, and C. P. Pox, "Colorectal cancer," *Lancet*, vol. 383, no. 9927, pp. 1490-1502, Apr 26 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- [104] C. Langner, "Serrated and non-serrated precursor lesions of colorectal cancer," *Dig Dis*, vol. 33, no. 1, pp. 28-37, 2015, doi: 10.1159/000366032.
- [105] J. G. Herman *et al.*, "Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 12, pp. 6870-5, Jun 9 1998, doi: 10.1073/pnas.95.12.6870.
- [106] C. R. Boland and A. Goel, "Microsatellite instability in colorectal cancer," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2073-2087 e3, Jun 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064.
- [107] K. W. Jasperson, T. M. Tuohy, D. W. Neklason, and R. W. Burt, "Hereditary and familial colon cancer," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2044-58, Jun 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.
- [108] I. D. Nagtegaal *et al.*, "Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging-A Systematic Review and Meta-Analysis," *J Clin Oncol*, vol. 35, no. 10, pp. 1119-1127, Apr 1 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.68.9091.
- [109] J. Guinney *et al.*, "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer," *Nat Med*, vol. 21, no. 11, pp. 1350-6, Nov 2015, doi: 10.1038/nm.3967.
- [110] U. Nitsche *et al.*, "Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective," *Ann Surg*, vol. 254, no. 5, pp. 793-800; discussion 800-1, Nov 2011, doi: 10.1097/SLA.0b013e3182369101.
- [111] S. Gill *et al.*, "Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?," *J Clin Oncol*, vol. 22, no. 10, pp. 1797-806, May 15 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.09.059.
- [112] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are biomarkers?," *Curr Opin HIV AIDS*, vol. 5, no. 6, pp. 463-6, Nov 2010, doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.

- [113] V. Das, J. Kalita, and M. Pal, "Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges," *Biomed Pharmacother*, vol. 87, pp. 8-19, Mar 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.064.
- [114] E. C. Zeestraten *et al.*, "Specific activity of cyclin-dependent kinase I is a new potential predictor of tumour recurrence in stage II colon cancer," *Br J Cancer*, vol. 106, no. 1, pp. 133-40, Jan 3 2012, doi: 10.1038/bjc.2011.504.
- [115] M. Maak *et al.*, "Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer," *Ann Surg*, vol. 257, no. 6, pp. 1053-8, Jun 2013, doi: 10.1097/SLA.0b013e31827c1180.
- [116] S. Kopetz *et al.*, "Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors," *Oncologist*, vol. 20, no. 2, pp. 127-33, Feb 2015, doi: 10.1634/theoncologist.2014-0325.
- [117] I. J. Goossens-Beumer *et al.*, "MicroRNA classifier and nomogram for metastasis prediction in colon cancer," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 24, no. 1, pp. 187-97, Jan 2015, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0544-T.
- [118] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape," *Nature immunology*, vol. 3, no. 11, pp. 991-8, Nov 2002, doi: 10.1038/ni1102-991.
- [119] T. Boon, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, and A. Van Pel, "Tumor antigens recognized by T lymphocytes," *Annual review of immunology*, vol. 12, pp. 337-65, 1994, doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002005.
- [120] Y. Naito *et al.*, "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer," *Cancer Res*, vol. 58, no. 16, pp. 3491-4, Aug 15 1998. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721846>.
- [121] P. K. Baier *et al.*, "Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas," *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 19, no. 3, pp. 205-12, 1998, doi: 10.1159/000030008.
- [122] A. C. Diederichsen, J. Hjelmberg, P. B. Christensen, J. Zeuthen, and C. Fenger, "Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 52, no. 7, pp. 423-8, Jul 2003, doi: 10.1007/s00262-003-0388-5.
- [123] J. Galon *et al.*, "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome," *Science*, vol. 313, no. 5795, pp. 1960-4, Sep 29 2006, doi: 10.1126/science.1129139.
- [124] B. Mlecnik *et al.*, "Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction," *J Clin Oncol*, vol. 29, no. 6, pp. 610-8, Feb 20 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.30.5425.

- [125] F. Pages *et al.*, "In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer," *J Clin Oncol*, vol. 27, no. 35, pp. 5944-51, Dec 10 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.19.6147.
- [126] J. P. Johnson, M. Demmer-Dieckmann, T. Meo, M. R. Hadam, and G. Riethmüller, "Surface antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies. I. Biochemical characterization of two antigens found on cell lines and fresh tumors of diverse tissue origin," (in eng), *European journal of immunology*, vol. 11, no. 10, pp. 825-31, Oct 1981, doi: 10.1002/eji.1830111015.
- [127] N. A. Kulak, G. Pichler, I. Paron, N. Nagaraj, and M. Mann, "Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells," (in eng), *Nat Methods*, vol. 11, no. 3, pp. 319-24, Mar 2014, doi: 10.1038/nmeth.2834.
- [128] N. A. Kulak, P. E. Geyer, and M. Mann, "Loss-less Nano-fractionator for High Sensitivity, High Coverage Proteomics," (in eng), *Mol Cell Proteomics*, vol. 16, no. 4, pp. 694-705, Apr 2017, doi: 10.1074/mcp.O116.065136.
- [129] J. B. Müller *et al.*, "The proteome landscape of the kingdoms of life," (in eng), *Nature*, vol. 582, no. 7813, pp. 592-596, Jun 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2402-x.
- [130] F. C. Franke, "Contribution of the novel tumor suppressor SASH1 and the CRK protein family to tumor progression and metastasis formation ", Fakultät für Medizin, Technische Universität München, <http://mediatum.ub.tum.de/?id=1507224> 2020. [Online]. Available: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20190430-1507224-1-6>
- [131] T. Hothorn and A. Zeileis, "Generalized maximally selected statistics," *Biometrics*, vol. 64, no. 4, pp. 1263-9, Dec 2008, doi: 10.1111/j.1541-0420.2008.00995.x.
- [132] L. Yang, H. Zhang, Q. Yao, Y. Yan, R. Wu, and M. Liu, "Clinical Significance of SASH1 Expression in Glioma," *Dis Markers*, vol. 2015, p. 383046, 2015, doi: 10.1155/2015/383046.
- [133] M. Martini, "Charakterisierung der physiologischen Funktion des neuartigen Tumorsuppressors SASH1 und seiner Rolle in der Tumorgenese ", Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, 2010. [Online]. Available: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20100712-982903-1-9>
- [134] J. B. Finlay, X. Liu, R. W. Ermel, and T. W. Adamson, "Maternal Weight Gain as a Predictor of Litter Size in Swiss Webster, C57BL/6J, and BALB/cJ mice," *J Am Assoc Lab Anim Sci*, vol. 54, no. 6, pp. 694-9, Nov 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26632778>.
- [135] J. Rivera and L. Tessarollo, "Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans," *Immunity*, vol. 28, no. 1, pp. 1-4, Jan 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2007.12.008.

- [136] A. Nagy and K. Vintersten, "Murine embryonic stem cells," *Methods Enzymol*, vol. 418, pp. 3-21, 2006, doi: 10.1016/S0076-6879(06)18001-5.
- [137] V. Shridhar *et al.*, "A novel region of deletion on chromosome 6q23.3 spanning less than 500 Kb in high grade invasive epithelial ovarian cancer," *Oncogene*, vol. 18, no. 26, pp. 3913-8, Jul 1 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1202756.
- [138] C. M. Acevedo, M. Henriquez, M. R. Emmert-Buck, and R. F. Chuaqui, "Loss of heterozygosity on chromosome arms 3p and 6q in microdissected adenocarcinomas of the uterine cervix and adenocarcinoma in situ," *Cancer*, vol. 94, no. 3, pp. 793-802, Feb 1 2002. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11857315>.
- [139] V. Srikantan *et al.*, "Allelic loss on chromosome 6Q in primary prostate cancer," *Int J Cancer*, vol. 84, no. 3, pp. 331-5, Jun 21 1999. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371356>.
- [140] E. Cerami *et al.*, "The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data," *Cancer Discov*, vol. 2, no. 5, pp. 401-4, May 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
- [141] "Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma," (in eng), *Cancer Cell*, vol. 32, no. 2, pp. 185-203.e13, Aug 14 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2017.07.007.
- [142] J. Gao *et al.*, "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal," *Sci Signal*, vol. 6, no. 269, p. p1, Apr 2 2013, doi: 10.1126/scisignal.2004088.
- [143] G. Luo, J. Zhang, F. C. Luca, and W. Guo, "Mitotic phosphorylation of Exo84 disrupts exocyst assembly and arrests cell growth," *J Cell Biol*, vol. 202, no. 1, pp. 97-111, Jul 8 2013, doi: 10.1083/jcb.201211093.
- [144] A. Zaman *et al.*, "Exocyst protein subnetworks integrate Hippo and mTOR signaling to promote virus detection and cancer," *Cell Rep*, vol. 36, no. 5, p. 109491, Aug 3 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109491.
- [145] H. E. Alcock, T. J. Stephenson, J. A. Royds, and D. W. Hammond, "Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridization," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 37, no. 4, pp. 369-80, Aug 2003, doi: 10.1002/gcc.10201.
- [146] Y. Zhang, K. Weber-Matthiesen, R. Siebert, P. Matthiesen, and B. Schlegelberger, "Frequent deletions of 6q23-24 in B-cell non-Hodgkin's lymphomas detected by fluorescence in situ hybridization," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 18, no. 4, pp. 310-3, Apr 1997, doi: 10.1002/(sici)1098-2264(199704)18:4<310::aid-gcc10>3.0.co;2-k.
- [147] A. Barghorn *et al.*, "Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors," *The American journal of pathology*, vol. 158, no. 6, pp. 1903-11, Jun 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64658-5.

- [148] J. T. Burgess *et al.*, "SASH1 is a prognostic indicator and potential therapeutic target in non-small cell lung cancer," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 18605, Oct 29 2020, doi: 10.1038/s41598-020-75625-1.
- [149] S. M. Dauphinee *et al.*, "SASH1 is a scaffold molecule in endothelial TLR4 signaling," *J Immunol*, vol. 191, no. 2, pp. 892-901, Jul 15 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1200583.
- [150] P. Coulombe *et al.*, "Endothelial Sash1 Is Required for Lung Maturation through Nitric Oxide Signaling," *Cell Rep*, vol. 27, no. 6, pp. 1769-1780 e4, May 7 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.039.
- [151] J. M. Brickman, A. Tsakiridis, C. To, and W. L. Stanford, "A wider context for gene trap mutagenesis," (in eng), *Methods Enzymol*, vol. 477, pp. 271-95, 2010, doi: 10.1016/s0076-6879(10)77014-2.
- [152] Y. Liu, A. Beyer, and R. Aebersold, "On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance," (in eng), *Cell*, vol. 165, no. 3, pp. 535-50, Apr 21 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014.
- [153] S. B. Azimifar, N. Nagaraj, J. Cox, and M. Mann, "Cell-type-resolved quantitative proteomics of murine liver," (in eng), *Cell Metab*, vol. 20, no. 6, pp. 1076-87, Dec 2 2014, doi: 10.1016/j.cmet.2014.11.002.
- [154] L. M. Tanabe, C. Martin, and W. T. Dauer, "Genetic background modulates the phenotype of a mouse model of DYT1 dystonia," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e32245, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0032245.
- [155] R. Y. Leduc, P. Singh, and H. E. McDermid, "Genetic backgrounds and modifier genes of NTD mouse models: An opportunity for greater understanding of the multifactorial etiology of neural tube defects," *Birth Defects Res*, vol. 109, no. 2, pp. 140-152, Jan 30 2017, doi: 10.1002/bdra.23554.
- [156] T. Doetschman, "Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes," *Methods Mol Biol*, vol. 530, pp. 423-33, 2009, doi: 10.1007/978-1-59745-471-1\_23.
- [157] K. Young, M. A. Loberg, E. Eudy, L. S. Schwartz, K. D. Mujica, and J. J. Trowbridge, "Heritable genetic background alters survival and phenotype of Mll-AF9-induced leukemias," *Exp Hematol*, vol. 89, pp. 61-67 e3, Sep 2020, doi: 10.1016/j.exphem.2020.07.012.
- [158] L. A. Donehower *et al.*, "Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice," *Mol Carcinog*, vol. 14, no. 1, pp. 16-22, Sep 1995, doi: 10.1002/mc.2940140105.
- [159] L. K. Petiniot *et al.*, "RAG-mediated V(D)J recombination is not essential for tumorigenesis in Atm-deficient mice," *Molecular and cellular biology*, vol. 22, no. 9, pp. 3174-7, May 2002, doi: 10.1128/MCB.22.9.3174-3177.2002.
- [160] K. M. Gressani, S. Leone-Kabler, M. G. O'Sullivan, L. D. Case, A. M. Malkinson, and M. S. Miller, "Strain-dependent lung tumor formation in mice transplacentally exposed to 3-

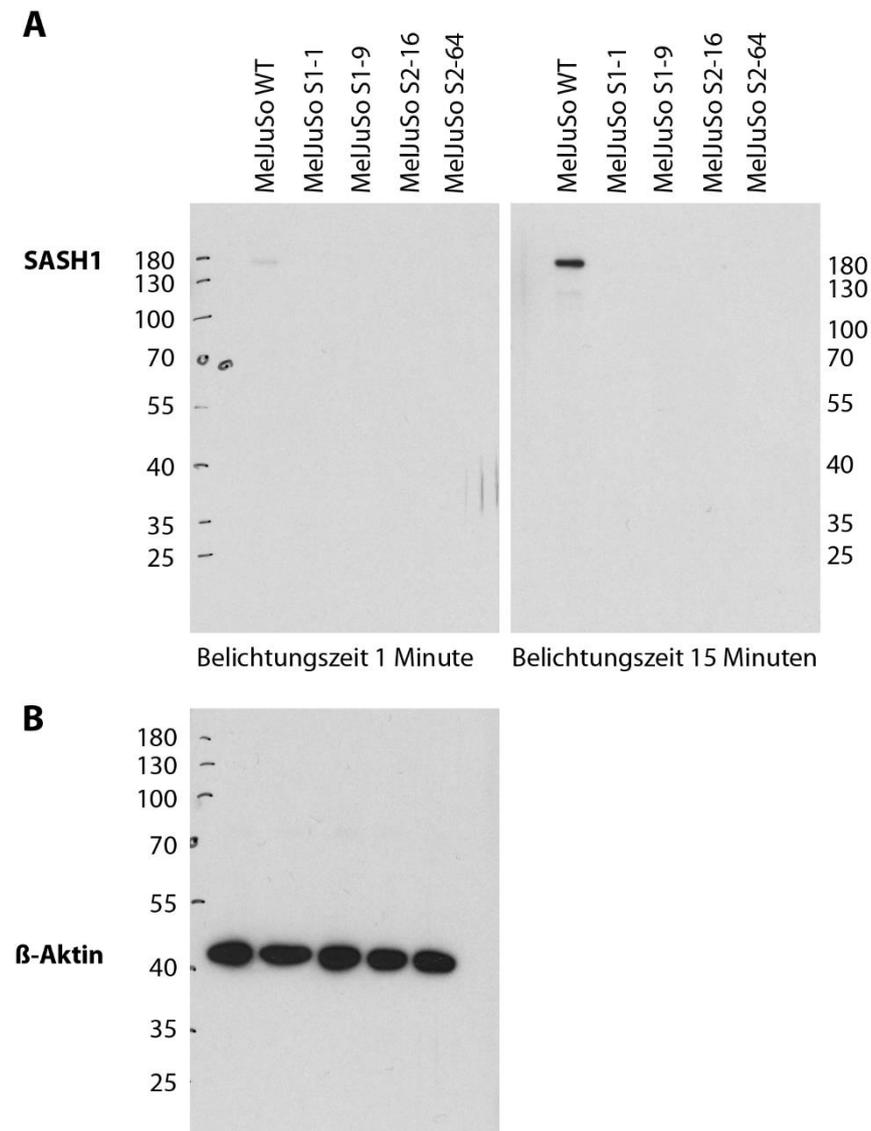
- methylcholanthrene and post-natally exposed to butylated hydroxytoluene," (in eng), *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 11, pp. 2159-65, Nov 1999, doi: 10.1093/carcin/20.11.2159.
- [161] M. D. To, J. Perez-Losada, J. H. Mao, J. Hsu, T. Jacks, and A. Balmain, "A functional switch from lung cancer resistance to susceptibility at the Pas1 locus in Kras2LA2 mice," (in eng), *Nature genetics*, vol. 38, no. 8, pp. 926-30, Aug 2006, doi: 10.1038/ng1836.
- [162] A. F. Johnson, H. T. Nguyen, and R. A. Veitia, "Causes and effects of haploinsufficiency," (in eng), *Biol Rev Camb Philos Soc*, vol. 94, no. 5, pp. 1774-1785, Oct 2019, doi: 10.1111/brv.12527.
- [163] J. Ren, H. Sui, F. Fang, Q. Li, and B. Li, "The application of Apc(Min/+) mouse model in colorectal tumor researches," (in eng), *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 145, no. 5, pp. 1111-1122, May 2019, doi: 10.1007/s00432-019-02883-6.
- [164] D. W. Bellott *et al.*, "Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators," *Nature*, vol. 508, no. 7497, pp. 494-9, Apr 24 2014, doi: 10.1038/nature13206.
- [165] C. M. Lopes-Ramos, J. Quackenbush, and D. L. DeMeo, "Genome-Wide Sex and Gender Differences in Cancer," *Front Oncol*, vol. 10, p. 597788, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.597788.
- [166] M. T. Dorak and E. Karpuzoglu, "Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue," *Front Genet*, vol. 3, p. 268, 2012, doi: 10.3389/fgene.2012.00268.
- [167] J. W. Liu, X. Habulieti, R. R. Wang, D. L. Ma, and X. Zhang, "Two novel SASH1 mutations in Chinese families with dyschromatosis universalis hereditaria," (in eng), *J Clin Lab Anal*, vol. 35, no. 6, p. e23803, Jun 2021, doi: 10.1002/jcla.23803.
- [168] Q. H. Xing *et al.*, "A gene locus responsible for dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH) maps to chromosome 6q24.2-q25.2," (in eng), *American journal of human genetics*, vol. 73, no. 2, pp. 377-82, Aug 2003, doi: 10.1086/377007.
- [169] G. Kaur and J. M. Dufour, "Cell lines: Valuable tools or useless artifacts," (in eng), *Spermatogenesis*, vol. 2, no. 1, pp. 1-5, Jan 1 2012, doi: 10.4161/spmg.19885.
- [170] L. Fagerberg *et al.*, "Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics," (in eng), *Mol Cell Proteomics*, vol. 13, no. 2, pp. 397-406, Feb 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.035600.
- [171] T. Hoashi *et al.*, "The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 30, pp. 21198-21208, Jul 28 2006, doi: 10.1074/jbc.M601643200.
- [172] P. Bahadoran *et al.*, "Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 152, no. 4, pp. 843-50, Feb 19 2001, doi: 10.1083/jcb.152.4.843.

- [173] R. Cui *et al.*, "Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation," (in eng), *Cell*, vol. 128, no. 5, pp. 853-64, Mar 9 2007, doi: 10.1016/j.cell.2006.12.045.
- [174] W. J. Pavan and R. A. Sturm, "The Genetics of Human Skin and Hair Pigmentation," (in eng), *Annu Rev Genomics Hum Genet*, vol. 20, pp. 41-72, Aug 31 2019, doi: 10.1146/annurev-genom-083118-015230.
- [175] M. Fukuda, "Rab GTPases: Key players in melanosome biogenesis, transport, and transfer," (in eng), *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 34, no. 2, pp. 222-235, Mar 2021, doi: 10.1111/pcmr.12931.
- [176] M. C. De Rossi, M. E. De Rossi, M. Sued, D. Rodríguez, L. Bruno, and V. Levi, "Asymmetries in kinesin-2 and cytoplasmic dynein contributions to melanosome transport," (in eng), *FEBS letters*, vol. 589, no. 19 Pt B, pp. 2763-8, Sep 14 2015, doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.038.
- [177] S. Awasthi, R. Palmer, M. Castro, C. D. Mobarak, and S. W. Ruby, "New roles for the Snp1 and Exo84 proteins in yeast pre-mRNA splicing," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 33, pp. 31004-15, Aug 17 2001, doi: 10.1074/jbc.M100022200.
- [178] S. Mizuno *et al.*, "Peri-implantation lethality in mice carrying megabase-scale deletion on 5q3.3 is caused by Exoc1 null mutation," (in eng), *Sci Rep*, vol. 5, p. 13632, Sep 8 2015, doi: 10.1038/srep13632.
- [179] S. M. Ahmed and I. G. Macara, "The Par3 polarity protein is an exocyst receptor essential for mammary cell survival," (in eng), *Nat Commun*, vol. 8, p. 14867, Mar 30 2017, doi: 10.1038/ncomms14867.
- [180] M. R. Heider and M. Munson, "Exorcising the exocyst complex," (in eng), *Traffic*, vol. 13, no. 7, pp. 898-907, Jul 2012, doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01353.x.
- [181] A. K. Tarafder *et al.*, "Rab11b mediates melanin transfer between donor melanocytes and acceptor keratinocytes via coupled exo/endocytosis," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 134, no. 4, pp. 1056-1066, Apr 2014, doi: 10.1038/jid.2013.432.
- [182] J. Galon, W. H. Fridman, and F. Pagès, "The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective," (in eng), *Cancer Res*, vol. 67, no. 5, pp. 1883-6, Mar 1 2007, doi: 10.1158/0008-5472.Can-06-4806.
- [183] J. Galon *et al.*, "Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours," *J Pathol*, vol. 232, no. 2, pp. 199-209, Jan 2014, doi: 10.1002/path.4287.
- [184] H. K. Angell, D. Bruni, J. C. Barrett, R. Herbst, and J. Galon, "The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond," (in eng), *Clin Cancer Res*, vol. 26, no. 2, pp. 332-339, Jan 15 2020, doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-18-1851.

- [185] D. Bruni, H. K. Angell, and J. Galon, "The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy," (in eng), *Nature reviews. Cancer*, vol. 20, no. 11, pp. 662-680, Nov 2020, doi: 10.1038/s41568-020-0285-7.
- [186] F. Rohde *et al.*, "Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer," (in eng), *Int J Cancer*, vol. 121, no. 8, pp. 1717-23, Oct 15 2007, doi: 10.1002/ijc.22868.
- [187] J. Behrens, "The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis," (in eng), *Biochem Soc Trans*, vol. 33, no. Pt 4, pp. 672-5, Aug 2005, doi: 10.1042/bst0330672.
- [188] K. Amilca-Seba, M. Sabbah, A. K. Larsen, and J. A. Denis, "Osteopontin as a Regulator of Colorectal Cancer Progression and Its Clinical Applications," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 15, Jul 28 2021, doi: 10.3390/cancers13153793.
- [189] S. Spranger, R. Bao, and T. F. Gajewski, "Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity," (in eng), *Nature*, vol. 523, no. 7559, pp. 231-5, Jul 9 2015, doi: 10.1038/nature14404.

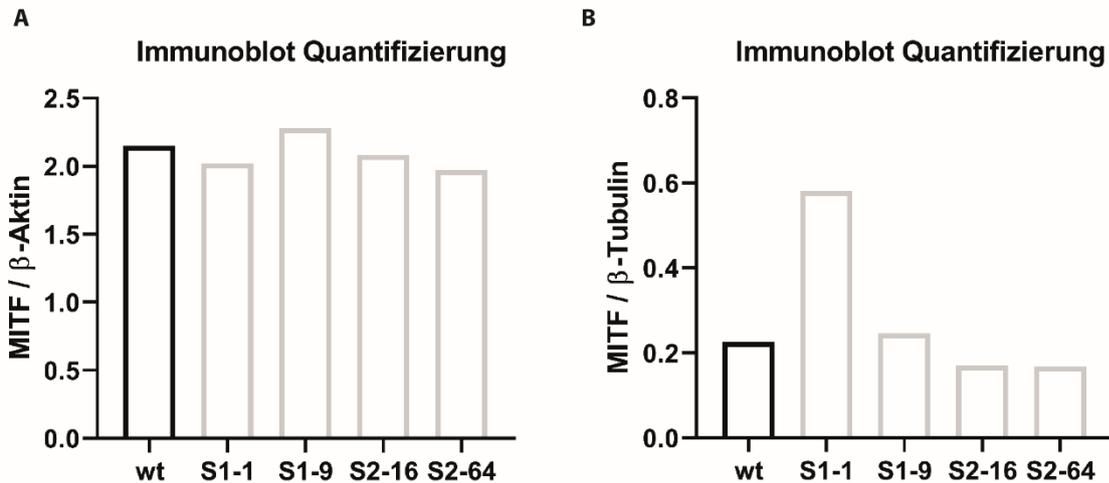
## 6. Anhang

### 6.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

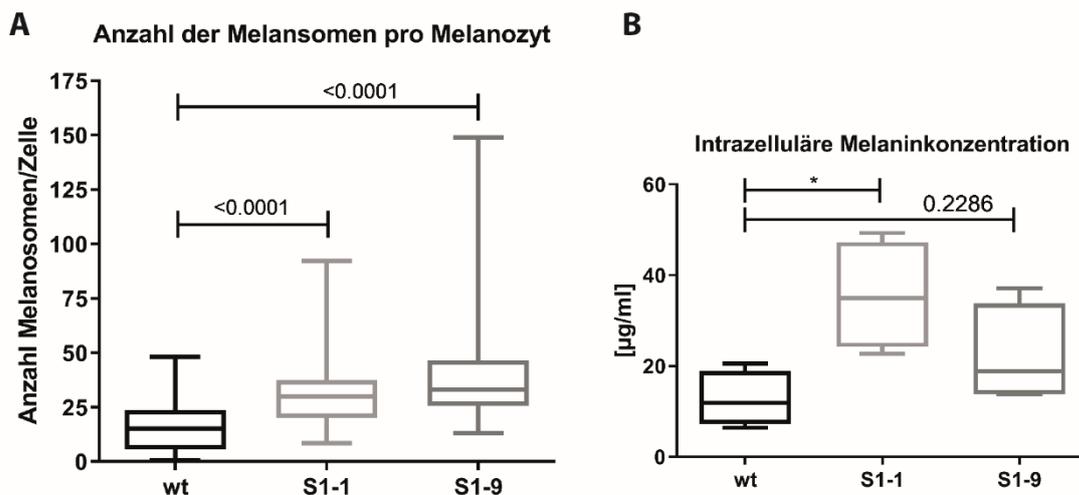


**Abbildung S 1: CRISPR/Cas9-vermittelter SASH1-Knockout in MelJuSo-Zellen unter Verwendung der Guide-RNA S1 und S2.** Knockout und Wildtyp MelJuSo-Zellen wurden mithilfe von Immunoblots auf die SASH1-Translation hin untersucht. Hier Darstellung der vollständigen Immunoblots. **(A)** Kein SASH1-Nachweis in MelJuSo-Knockout-Zellen. Linker Immunoblot: Belichtungszeit 1 Minute; rechter Immunoblot: Belichtungszeit 15 Minuten. **(B)** Beladungskontrolle mittels  $\beta$ -Aktin.

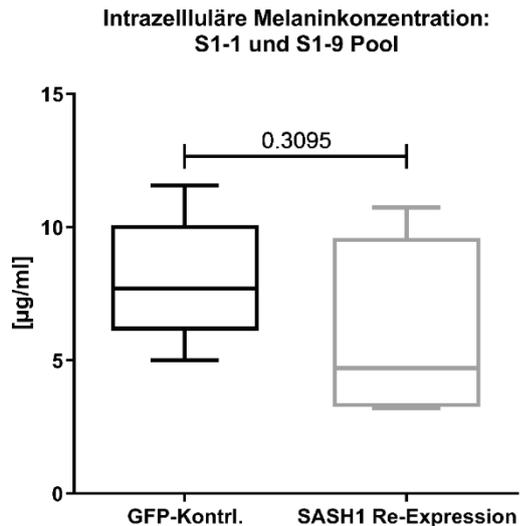
### MITF-Proteinlevel in Gesamtzelllysaten



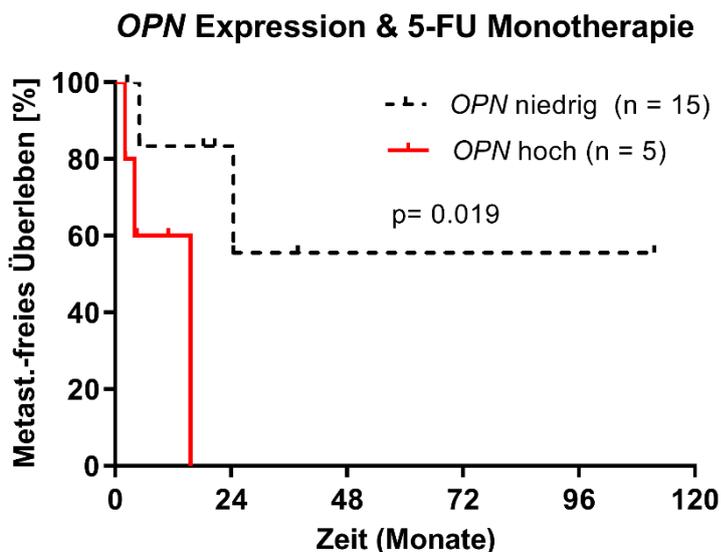
**Abbildung S 2: MITF-Proteinlevel in Gesamtzelllysaten von Wildtyp und SASH1-defizienten MelJuSo-Zellen.** MITF-Proteinlevel in Gesamtzelllysaten von Wildtyp und SASH1-defizienten (S1-1, S1-9, S2-16, S2-64) MelJuSo-Zellen wurden in Relation zu  $\beta$ -Aktin quantifiziert (n = 1). **(B)** MITF-Proteinlevel in Gesamtzelllysaten von Wildtyp und SASH1-defizienten MelJuSo-Zellen (S1-1, S1-9, S2-16, S2-64) wurden in Relation zu  $\beta$ -Tubulin quantifiziert (n = 1).



**Abbildung S 3: Erhöhte Anzahl intrazellulärer Melanosomen und intrazelluläre Melaninkonzentration in SASH1-defizienten MelJuSo-Zellen.** **(A)** Die Auszählung der Melanosomen erfolgte anhand von Hellfeldaufnahmen der jeweiligen Zellklone. Die halbautomatische Zählung der Melanosomen erfolgte mittels ImageJ v1.51 (Mann-Whitney Test; n = 33-34;  $p < 0,0001$ ). **(B)** Die biochemisch-photometrische Bestimmung des intrazellulären Melaningehalts erfolgte durch Lyse der MelJuSo-Zellen und anschließender Absorptionsmessung und Konzentrationsbestimmung anhand einer Standardgeraden synthetischen Melanins (Mann-Whitney Test; n = 4;  $p = 0,0286$ ).



**Abbildung S 4: Intrazelluläre Melaninkonzentration nach SASH1-Re-Expression in SASH1-Knock-out Zellen. (A)** Die SASH1-defizienten Klone S1-1 und S1-9 wurden mit GFP-only, bzw. SASH1-GFP-Vektoren transfiziert. Die photometrische Bestimmung des intrazellulären Melaningehalts erfolgte 48h nach Transfektion. Ergebnisse der einzelnen Klone gepoolt (Mann-Whitney Test; n = 5; p = 0,3095).



**Abbildung S 5: Einfluss von Osteopontin (OPN) auf das Metastasen-freie Überleben.** OPN besitzt als Surrogatmarker für den WNT-Signalweg einen prädiktiven Aussagewert für das Metastasen-freie Überleben nach 5-FU Monotherapie für PatientInnen des Kollektivs mit Kolonkarzinomen des UICC-Stadiums III (Log-rank Test; n = 20; p = 0,019). Statistische Analysen wurden durchgeführt von Dr. Dr. Nitsche (Technische Universität München).

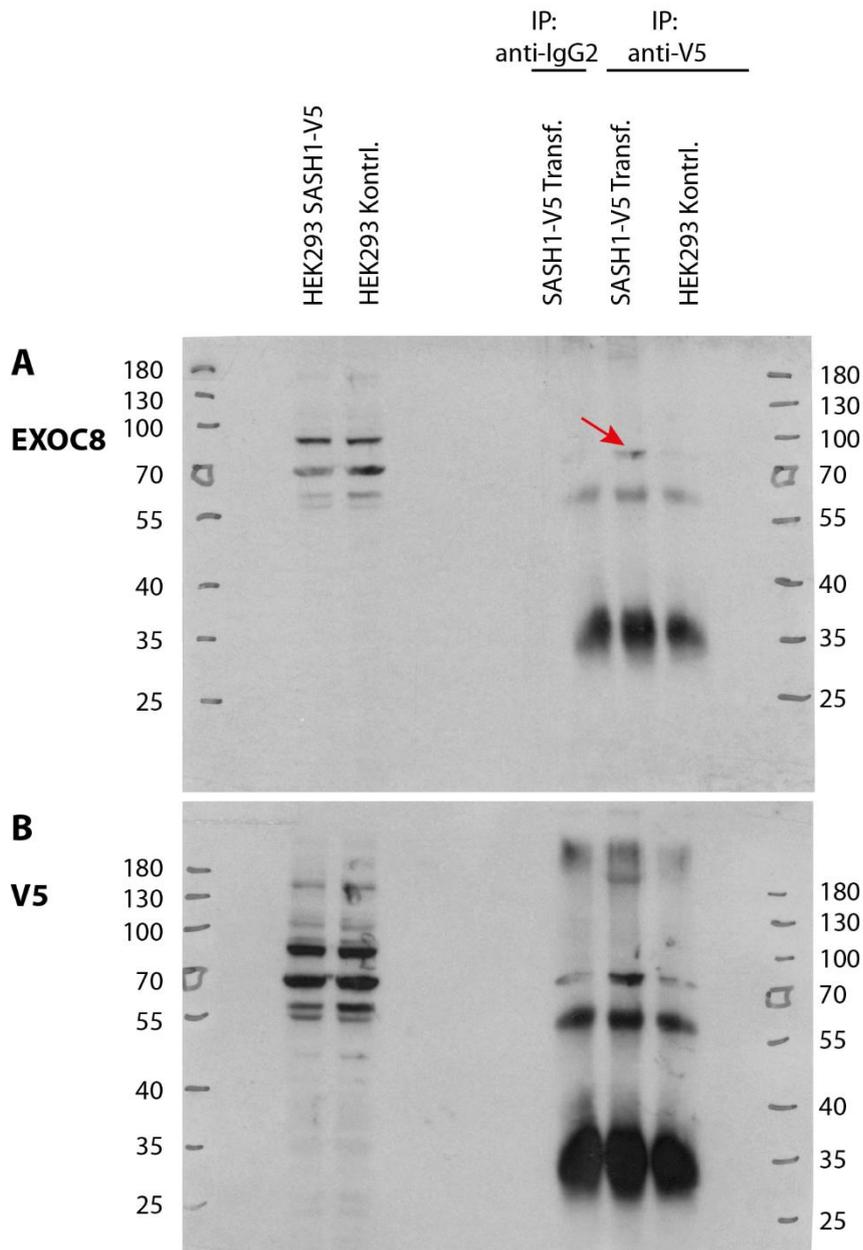


Abbildung S 6: Vollständiger Immunoblot der Abbildung 20.

	1-6 Mo- nate	t-Test	7-12 Mo- nate	t-Test	≥13 Mo- nate	t-Test
wt/wt	n = 16		n = 17		n = 19	
RF/wt	n = 57	p = 0,1084	n = 25	p = 0,2798	n = 85	p = 0,9259
RF/RF	n = 6	p = 0,2784	n = 6	p = 0,1650	n = 30	p = 0,0549

Tabelle S 1: Gruppengröße und Signifikanzniveaus aus Abbildung 8.

	<b>Proliferations-assay</b>	<b>Wundheilungs-assay</b>	<b>Migrationsassay</b>	<b>Invasionsassay</b>
<b>wt</b>				
<b>S1-1</b>	p>0,9999	p = 0,3939	p = 0,9683	p = 0,7429
<b>S1-9</b>	p = 0,2000	p = 0,0411	p = 0,8810	p = 0,6857
<b>S2-16</b>	p = 0,1000	p = 0,9372	p = 0,8413	p = 0,2286
<b>S2-64</b>	p = 0,4000			

**Tabelle S 2: Signifikanzniveaus der Abbildung 13.**

<b>Gen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>q-Wert</b>	<b>Änderungs-faktor</b>	<b>Gen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>q-Wert</b>	<b>Änderungs-faktor</b>
<b>In Kontrollmäusen reduziert</b>				<b>In Kontrollmäusen erhöht</b>			
<b>Isca2</b>	0,0012	0,6583	0,7044	<b>Eif3a</b>	0,0056	0,6871	1,1053
<b>Cab39l</b>	0,0034	0,7086	0,7154	<b>Hdac5</b>	0,0006	0,7493	1,1060
<b>Psen1</b>	0,0051	0,6728	0,7276	<b>Ppp5c</b>	0,0038	0,6513	1,1087
<b>Cox6b1</b>	0,0014	0,6810	0,7517	<b>Por</b>	0,0032	0,7607	1,1211
<b>Mtpap</b>	0,0038	0,6302	0,7667	<b>Cask</b>	0,0050	0,6834	1,1364
<b>Tfrc</b>	0,0045	0,6615	0,7753	<b>Mrps24</b>	0,0035	0,7076	1,1573
<b>Nudt5</b>	0,0004	1,0000	0,7834	<b>Nudt9</b>	0,0012	0,7500	1,1591
<b>Ubl7</b>	0,0043	0,6221	0,7927	<b>Vps36</b>	0,0037	0,6696	1,1607
<b>Eif5a</b>	0,0029	0,7443	0,7930	<b>Akr1b3;Akr1b1</b>	0,0036	0,6845	1,1771
<b>Zmpste24</b>	0,0034	0,7402	0,7975	<b>FAM120A</b>	0,0023	0,6791	1,2118
<b>Hspd1</b>	0,0018	0,6782	0,8203	<b>Psm2</b>	0,0016	0,6773	1,2419
<b>Tbc1d9b</b>	0,0006	0,9620	0,8209	<b>Grb2</b>	0,0042	0,6452	1,2446
<b>Clta</b>	0,0022	0,6778	0,8443	<b>Rbm6</b>	0,0016	0,6548	1,2991
<b>Rtn4ip1</b>	0,0039	0,6238	0,8498	<b>Mrpl27</b>	0,0026	0,7323	1,3158
<b>Prdx3</b>	0,0032	0,7313	0,8564	<b>Cox6a1</b>	0,0049	0,6860	1,3520
<b>Pank4</b>	0,0051	0,6524	0,8883	<b>Exosc4</b>	0,0006	0,5620	1,4773
				<b>Sash1</b>	0,0056	0,6705	1,5068
				<b>Ttc9c</b>	0,0019	0,6410	1,6407

**Tabelle S 3: Erhöhte und erniedrigte Proteinlevel in den Proteomanalysen der Gehirne von Sash1<sup>RFAHy</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen.** Hier sind Proteine aufgeführt, die sich mit dem Signifikanzniveau von Sash1 (p = 0,0056) oder geringer von den Kontrollmäusen unterscheiden. Diese wurden nach dem Änderungsfaktor, nach dem sich die Menge an detektierten Peptiden im Vergleich zu den Kontrollen unterscheidet, sortiert (entsprechend dem Volcano Plot Abbildung 7 A) (t-Test p-Wert; t-Test q-Wert).

## 6.2 Materialien

**Tabelle 10: Wichtige Puffer**

Laemmli Puffer (5X)	1.5 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 77 mg ml <sup>-1</sup> DTT, 0,01% (w/v) Bromphenol blau
PBST	PBS, 0,1% (v/v) Tween-20
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,25% (v/v) Natriumdesoxycholat, 1 mM EDTA (pH 8,0), optional: 0,1% (v/v) SDS
Melanozyten Lyse Puffer	1 M NaOH, 10% (v/v) DMSO

**Tabelle 11: Oligonukeloide**

Primer	Sequenz	Verwendung
mSash1 fwd	5'-TGTGTCTGTCATGCGTGTGTAC-3'	Maus <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> Genotypisierung
ROSAFARY-βgeo rev	5'-GCCGAGTTAACGCCATCAAAAATA-3'	
mSash1 fwd	5'-TGTGTCTGTCATGCGTGTGTAC-3'	Maus <i>Sash1</i> -Wildtyp Genotypisierung
mSash1 rev	5'-GCTTATTCATCCCGCTTTCTCAC-3'	
mSash1 fwd	5'-GTCTCCGAGTCAATCTCCCG-3'	Maus qPCR Exon 1 - Exon 3 (ROSAFARY-βgeo s.o.)
mSash1 rev	5'-GCTGGCGTCGGGTTTCTC-3'	
mSash1 qRT-PCR fwd	5'-TTCATCTTGGACTGGGGAAT-3'	Maus <i>Sash1</i> qRT-PCR (UPL #55)
mSash1 qRT-PCR rev	5'-ACGACCCGAAAAAGTAAAGA-3'	
mβ-Aktin qRT-PCR fwd	5'-AAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3'	Maus β-Aktin qRT-PCR (UPL #56)
mβ-Aktin qRT-PCR rev	5'-GTGGTACGACCAGAGGCATAC-3'	
mHprt qRT-PCR fwd	5'-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-3'	Maus <i>Hprt</i> qRT-PCR (UPL #95)
mHprt qRT-PCR rev	5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'	
mMitf qRT-PCR fwd	5'-GCCATAAACGTCAGTGTGCC-3'	Maus <i>Mitf</i> qRT-PCR (SYBR)
mMitf qRT-PCR rev	5'-CCAAGTCCTGAGCTTGCCAT-3'	
mTyr qRT-PCR fwd	5'-ACGGCGTAATCCTGGAAACC-3'	Maus <i>Tyr</i> qRT-PCR (SYBR)
mTyr qRT-PCR rev	5'-GCACAATGCCTTGACATCT-3'	
mTyrp1 qRT-PCR fwd	5'-TGCAGGAAATGTTGCAAGAGC-3'	Maus <i>Tyrp1</i> qRT-PCR (SYBR)

Primer	Sequenz	Verwendung
m <i>Tyrp1</i> qRT-PCR rev	5'-CGAGTGGTCTGTGACTCCTT-3'	
m <i>Dct</i> qRT-PCR fwd	5'-GATCACCACACAACACTGGC-3'	Maus <i>Dct</i> qRT-PCR (SYBR)
m <i>Dct</i> qRT-PCR rev	5'-CCAGCGACTCATTGGCAATG-3'	
S1 CRISPR/Cas9 fwd	5'-CACATCCGAGGCGTTCTC-3'	Amplifizierung des mit CRISPR/Cas9 Guide-RNA S1 veränderten <i>SASH1</i> -Lokus
S1 CRISPR/Cas9 rev	5'-TGTGTGTATTTAGCCCCCTAAG-3'	
S1 Guide-RNA	5'-CACCGCGACTCTGGACCGACGTGAT-3'	CRISPR/Cas9 Guide-RNA S1
S1 Guide-RNA	5'-AAACATCACGTCCGGTCCAGAGTCGC-3'	
S2 Guide-RNA	5'-CACCGTTTCTCCGACGTGTGCGAG-3'	CRISPR/Cas9 Guide-RNA S2
S2 Guide-RNA	5'-AAACCTCGCACACGTCCGAGAAAC-3'	

**Tabelle 12: Primäre und Sekundäre Antikörper**

#### Primäre Antikörper

CD3	NeoMarkers, RM-9107-S
CD8	BD Pharmingen, RPA-T8
EXOC8	Atlas Antibodies, HPA027438
Lamin A	Cell Signaling, #2032
MITF	Santa Cruz, MA5-14146
PARP-1	Abcam ab137653
SASH1	Bethyl, A302-265A
TYRP1	Millipore, MABC592
V5 Epitop	Thermo Scientific, MA5-15253
β-Aktin	Cell Signaling, #3700
β-Tubulin	Oncogene, CP07

#### Sekundäre Antikörper

Cy3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)	Jackson 115-165-003
FITC AffiniPure Rat Anti-Mouse IgG(H+L)	Jackson 415-095-100
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Thermo Scientific A32723

## Sekundäre Antikörper

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Thermo Scientific A11008
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson 115-035-003
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson 111-035-144
Peroxidase-AffiniPure Mouse Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson 212-036-102

### Tabelle 13: Wichtige Chemikalien

Acrylamid Lösung	BioRad, München, Deutschland
Adenosintriphosphat	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ammoniumpersulfate	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Attractene	Qiagen, Hilden, Deutschland
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Blotting grade milk powder	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Bromphenol blau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett Lösung	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
DAB chromogen	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DAPI	Thermo Fisher, Waltham, USA
Desoxynukleotide	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DreamTaq Puffer + 20 mM MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher, Waltham, USA
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Fisher, Waltham, USA
D-Luciferin	PerkinElmer, Waltham, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher, Waltham, USA
ECL Substrat	Pierce, Bonn, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eukitt	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
FastDigest restriction enzymes	Thermo Fisher, Waltham, USA

Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fibronectin (human)	Roche, Mannheim, Deutschland
FuGENE HD	Promega, Madison, USA
Gel Loading Dye, blau 6x	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 100 bp DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
LB medium	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, München, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Matrigel	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
N-hydroxysulfosuccinimid	Thermo Fisher, Waltham, USA
Nonidet P40	Thermo Fisher, Waltham, USA
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Opti-MEM	Thermo Fisher, Waltham, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pefabloc	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pepstatin A	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	Thermo Fisher, Waltham, USA
PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
ProLong Gold Antifade	Thermo Fisher, Waltham, USA
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Roche, Mannheim, Deutschland
Protein A/G Sepharose	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Random Hexamer Primer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	Thermo Fisher, Waltham, USA

RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher, Waltham, USA
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SOC medium	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, München, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Sodium orthovanadate	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
β-Glycerophosphate	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Bio-Rad, München, Deutschland
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
TRITC-phalloidin	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 14: Wichtige Verbrauchsmaterialien**

Amersham Hyperfilm	GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland
Cell culture plates	Corning, Corning, USA
Culture-Insert 2 Well in μ-Dish 35 mm	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Enspire-LFB, 384-well High Sensitivity, User- Activated Biochemical Plates, Corning Epic System	Corning, Corning, USA
Whatman Blotting Paper	GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland
8.0 μm Transwell Permeable Supports #3422	Corning, Corning, USA
8.0 μm Matrigel Invasion Chamber #354480	Corning, Corning, USA
Amersham Protran nitrocellulose membrane (0,45 μm)	GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland

**Tabelle 15: Wichtige kommerziell erhältliche molekulargenetische Kits**

Cell Proliferation Kit II (XTT)	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland
LightCycler 480 Probes Master	Roche, Mannheim, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher, Waltham, USA
QIAGEN Plasmid Mini/Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Universal ProbeLibrary Set	Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland

**Tabelle 16: Bakterien, Zelllinien, Mausmodell**

<i>E. coli</i> TOP10	Thermo Fisher, Waltham, USA
MelJuSo	DSMZ (ACC 74)
HEK293	ATCC (CRL-1573)
C57BL/6N	Charles River Laboratories, Calco, Italien

**Tabelle 17: Technische Hilfsmittel**

4230 refrigerated incubator shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Axiolab	Zeiss, Jena, Deutschland
AxioObserver Z1 (inklusive ApoTome)	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 100	Zeiss, Jena, Deutschland
BBD 6220 cell culture incubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Biometra Power Pack P25T	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Bioruptor Sonicator	Diagenode, Seraing, Belgium
Chemoluminescence imager	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Cryostat CM3050S	Leica, Nussloch, Deutschland
Enspire Multimode Plate Reader	PerkinElmer, Waltham, MA
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, USA
Fluoroskan Ascent FL	Thermo Fisher, Waltham, USA
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech GMBH, Ortenberg, Deutschland

GelDoc XR Imaging System	Biorad, München, Deutschland
Genesys 5 Spectrophotometer	Spectronic, Helsingborg, Sweden
HERA Safe Cleanbench	Thermo Scientific, Waltham, USA Inova
IVIS Spectrum <i>In vivo</i> Imaging System	PerkinElmer, Waltham, MA
LightCycler 480 II system	Roche, Penzberg, Deutschland
Mithras LB 940 Microplate reader	Berthold Technologies, Wildbad, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher, Waltham, USA
PerfectBlue PAGE System	Peqlab (via VWR) Darmstadt, Deutschland
Purelab Ultra MK II	ELGA LabWater, Lane End, United Kingdom
Sonopuls Sonicator system	Bandelin, Berlin, Deutschland
T3 Thermocycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Trans-Blot SD semi-dry transfer cell	Biorad, München, Deutschland
X-Ray Film Processor Optimax	Protec, Oberstenfeld, Deutschland

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Schematische Proteinstruktur von SASH1, SLy1 und SLy2.</b> .....	8
<b>Abbildung 2: Funktionen von SASH1.</b> .....	9
<b>Abbildung 3: Signalkaskade der Melanogenese und deren Enzymreaktionen.</b> .....	17
<b>Abbildung 4: Der Exocyst-Komplex und seine Funktion im Tethering.</b> .....	19
<b>Abbildung 5: Der ROSAFARY Gene Trap Vektor im murinen Sash1-Lokus.</b> .....	36
<b>Abbildung 6: Sash1-mRNA-Level verschiedener solider Organe.</b> .....	38
<b>Abbildung 7: Proteom-Analyse muriner <i>Sash1</i><sup>RFΔHy</sup>- und Wildtyp-Gehirne.</b> .....	39
<b>Abbildung 8: Körpergewicht zum Zeitpunkt der Opferung von <i>Sash1</i><sup>ROSAFARY</sup>-Mäusen und deren Kontrollen.</b> .....	41
<b>Abbildung 9: Histopathologisch, mikroskopische Aufarbeitung muriner Tumore des <i>Sash1</i><sup>ROSAFARY</sup>-Mausmodells.</b> .....	46
<b>Abbildung 10: Prognostische Relevanz des genomischen SASH1-Verlusts für das Überleben von KrebspatientInnen des TCGA GDAC Firehose Kollektivs [140].</b> .....	49
<b>Abbildung 11: Hypopigmentierungsphänotyp und signifikant reduzierte Sash1-Expression der Haut von homozygoten <i>Sash1</i><sup>RFΔHy</sup>-Mäusen.</b> .....	51
<b>Abbildung 12: CRISPR/Cas9-vermittelter SASH1-Knockout in MeJuSo-Zellen unter Verwendung der Guide-RNA S1 und S2.</b> .....	53
<b>Abbildung 13: Proliferations- und Migrationsverhalten von MeJuSo-Wildtyp und SASH1-Knockout Zellen.</b> .....	55
<b>Abbildung 14: Hautschnitte von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten <i>Sash1</i><sup>RFΔHy</sup>-Mäusen.</b> .....	56
<b>Abbildung 15: <i>MITF</i>-Expression in verschiedenen Zellkompartimenten von Wildtyp und SASH1-Knockout MeJuSo-Zellen sowie Expression wichtiger Regulatoren und Enzyme der Melanogenese in <i>Sash1</i><sup>RFΔHy</sup>-Mäusen.</b> .....	58
<b>Abbildung 16: Morphologie von Wildtyp- (wt) und SASH1-defizienten (S1-1, S1-9) MeJuSo-Melanomzellen und Nachweis von Melanosomen.</b> .....	61

Abbildung 17: Erhöhte Anzahl intrazellulärer Melanosomen in SASH1-defizienten MelJuSo-Zellen.....	62
Abbildung 18: Melanosomentransport in MelJuSo Wildtyp- und SASH1-defizienten Zellen.....	65
Abbildung 19: Intrazellulärer Melaningehalt nach SASH1-(Re)-Expression in MelJuSo-Wildtyp und SASH1-Knockout Zellen. ....	67
Abbildung 20: Exogenes SASH1-V5 interagiert mit endogenem EXOC8 in HEK293-Zellen. ....	70
Abbildung 21: Intrazelluläre Melanosomen nach EXOC8-Knockdown in MelJuSo-Wildtyp-Zellen.....	72
Abbildung 22: Mosaik aus 36 Aufnahmen zur Quantifizierung tumorinfiltrierender T-Lymphozyten in Kolonkarzinomen. ....	77
Abbildung 23: Risiko einer Fernmetastase unter Berücksichtigung immunologischer und genetischer Marker. ....	78
Abbildung 24: Prädiktiver Wert der immunologischen Marker für das Entstehen einer Fernmetastase nach 5-FU Monotherapie. ....	80
Abbildung 25: Hypothese des Einflusses von SASH1 auf die Exozytose. ....	93
Abbildung S 1: CRISPR/Cas9-vermittelter SASH1-Knockout in MelJuSo-Zellen unter Verwendung der Guide-RNA S1 und S2. ....	114
Abbildung S 2: MITF-Proteinlevel in Gesamtzelllysaten von Wildtyp und SASH1-defizienten MelJuSo-Zellen.....	115
Abbildung S 3: Erhöhte Anzahl intrazellulärer Melanosomen und intrazelluläre Melaninkonzentration in SASH1-defizienten MelJuSo-Zellen.....	115
Abbildung S 4: Intrazelluläre Melaninkonzentration nach SASH1-Re-Expression in SASH1-Knockout Zellen. ....	116
Abbildung S 5: Einfluss von Osteopontin (OPN) auf das Metastasen-freie Überleben.....	116
Abbildung S 6: Vollständiger Immunoblot der Abbildung 20.....	117

## 6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vererbung der Gene Trap Kasette in <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> -Mäusen. ....	40
Tabelle 2: Tumorphänotyp in einer Kohorte von <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> -Mäusen mit Sv129-Hintergrund. ....	43
Tabelle 3: Genotyp, Tumorentität, Geschlecht und Alter von <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> -Mäusen mit einem Tumorphänotyp.....	44
Tabelle 4: Stratifizierung heterozygoter <i>Sash1</i> <sup>ROSAFARY</sup> -Mäuse nach Alter und Geschlecht. ....	45
Tabelle 5: Genomischer <i>SASH1</i> -Verlust in Krebspatientinnen signifikant häufiger als in männlichen Betroffenen.....	48
Tabelle 6: Hypopigmentierungsphänotyp in <i>Sash1</i> <sup>RFAHy</sup> -Mäusen.....	50
Tabelle 7: Y2H- und masenspektrometrisches Screening von SASH1-Co-Immunpräzipitationen.....	69
Tabelle 8: Eingeschlossene PatientInnen mit Kolonkarzinomen des UICC Stadiums III. ....	75
Tabelle 9: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zur Bestimmung des prognostischen Vorhersagewerts der untersuchten Marker. ....	79
Tabelle 10: Wichtige Puffer .....	119
Tabelle 11: Oligonukeloide.....	119
Tabelle 12: Primäre und Sekundäre Antikörper .....	120
Tabelle 13: Wichtige Chemikalien .....	121
Tabelle 14: Wichtige Verbrauchsmaterialien .....	123
Tabelle 15: Wichtige kommerziell erhältliche molekulargenetische Kits .....	124
Tabelle 16: Bakterien, Zelllinien, Mausmodell .....	124
Tabelle 17: Technische Hilfsmittel .....	124
	126

<b>Tabelle S 1: Gruppengröße und Signifikanzniveaus aus Abbildung 8.</b> .....	117
<b>Tabelle S 2: Signifikanzniveaus der Abbildung 13.</b> .....	118
<b>Tabelle S 3: Erhöhte und erniedrigte Proteinlevel in den Proteomanalysen der Gehirne von Sash1<sup>RFAHy</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen.</b> .....	118

## 7. Publikationen

### Forschungsartikel

“Genetic and immunological biomarkers predict metastatic disease recurrence in stage III colon cancer”, *BMC Cancer*, Oktober 2018.

A. Sperlich, A. Balmert, D. Doll, S. Bauer, F. Franke, G. Keller, D. Wilhelm, A. Mur, M. Respondek, H. Friess, U. Nitsche, K.-P. Janssen.

“The emerging and diverse roles of the SLy/SASH1-protein family in health and disease—Overview of three multifunctional proteins”, *The FASEB Journal*, März 2021.

J. Jaufmann, F. C. Franke, A. Sperlich, C. Blumendeller, I. Kloos, B. Schneider, D. Sasaki, K.-P. Janssen, S. Beer-Hammer.

### Posterpräsentationen

A. Sperlich et al., „SASH1 is involved in skin pigmentation and has multi-tissue tumor-suppressive properties *in vivo*“, 19<sup>th</sup> International AEK Cancer Congress, 1. - 3. März 2017, Heidelberg.

## 8. Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen danken, der durch seine unschätzbare Expertise und seine ehrliche, menschliche Art eine Umgebung geschaffen hat, in der es ein Privileg war arbeiten zu dürfen. Neben den klaren Strukturen einer guten wissenschaftlichen Praxis habe ich auch die Freiheit erfahren, einer aufkeimenden wissenschaftlichen Intuition zu folgen und eigenen Ideen nachgehen zu können.

Weiterhin möchte ich meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Bernhard Holzmann für seine konstruktiven Vorschläge an entscheidenden Wegpunkten meiner Arbeit in seiner für ihn so bezeichnenden bedachten, menschlichen Art danken.

Auch PD. Dr. Melanie Laschinger gilt mein herzlichster Dank. Ihre Zielstrebigkeit, Struktur und Liebe zum Detail machen aus ihr eine ausgezeichnete Lehrerin und ihre Unterstützung beim Mikroskopieren war von unschätzbarem Wert für mich und diese Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung und das hervorragende Curriculum möchte ich mich bei der Else Kröner-Fresenius-Stiftung, der DocGS und der TUMGS der Technischen Universität München bedanken.

Ohne ein Team ist in einem Labor nichts möglich. Deswegen empfinde ich für die Menschen, denen ich während dieser Forschungsarbeit begegnet bin, große Dankbarkeit für die unermüdliche Unterstützung und die herausragende Expertise, die mir zuteilwurde. Durch eure menschliche Art und euren Teamgeist habt ihr nicht nur meine Arbeit bereichert, sondern auch mich selbst. Nach dieser langen Reise entscheidet hier nur der Zeitpunkt, zu dem ich die jeweiligen Personen kennenlernen durfte, über die Erwähnung in dieser Danksagung. Ein großer Dank gilt Dr. Fabian Franke, der in der gemeinsamen Zeit Lehrer, Impulsgeber, Motivator, weltbesten Kaffeemacher und Filmmusik-DJ zugleich war und mit dem es zu jedem Zeitpunkt eine Freude war, frühmorgens und spätabends die Extrameile zu gehen. Ein großes Dankeschön gilt Widya, Anja, Felicitas und Gabi für ihre handwerkliche Einarbeitung und Unterstützung bei annähernd allen Labortätigkeiten und der Organisation so vieler Teamevents. Widya, beste Rezept-Austauschpartnerin der Welt, möchte ich dabei besonders für ihr stets offenes Ohr danken. Christian, Markus, Andrea und Christoph, danke euch für die vielen schönen Stunden während und nach der Arbeit, in denen ihr auch bei Durststrecken der Laborarbeit eine unglaubliche emotionale Unterstützung wart. Mit Dr. Johannes Müller-Reif, auf den dies mindestens genauso zutrifft, konnte ich mich in stundenlangen Diskussionen verschiedenster Hypothesen bei Kühlgetränken verlieren und bin für seine Proteom-Analysen überaus dankbar. Diese Arbeit profitierte von Ludwigs Sinn für biologische Zusammenhänge und konstruktive Kritik, Fähigkeiten, welche nur durch seine Liebe zu Cucurbitaceae übertroffen werden. In der letzten Phase meiner Arbeit hatte ich das Glück von Anna und Laura begleitet zu werden, deren positive Ausstrahlung und hilfsbereites Engagement eine Bereicherung für mich und diese Arbeit darstellten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die lange Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit danken. Ganz besonders danke ich Kathi für ihre verständnisvolle, geduldige und einfach wunderbare Art, ohne die ich diesen Weg nicht hätte gehen wollen.