

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
(Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Die Bedeutung der Deubiquitinase OTUD4  
in Bezug auf die  
Tumorprogression epithelialer Tumoren**

---

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Georg-August-Universität zu Göttingen  
der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von

**Eva Loidl**

aus

Neumarkt i.d.Opf.

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/ in: Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi

Ko-Referent/ in: .....

Drittreferent /in: .....

Datum der mündlichen Prüfung: .....

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	EINFÜHRUNG.....	1
1.2	EPITHELIALE TUMOREN .....	1
1.2.1	<i>Epidemiologie und Klinik.....</i>	<i>1</i>
1.2.2	<i>Kanzerogenese .....</i>	<i>3</i>
1.2.3	<i>Klassifikation von Tumoren .....</i>	<i>4</i>
1.2.4	<i>Diagnose und Therapieprinzipien.....</i>	<i>7</i>
1.3	PROTEASOMALE DEGRADATION VON EIW EIWEIßEN .....	11
1.3.1	<i>OTUD4 (Ovarian tumor domain-containing protein 4) .....</i>	<i>11</i>
1.3.2	<i>Ubiquitin.....</i>	<i>12</i>
1.3.3	<i>26S-Proteasomkomplex.....</i>	<i>14</i>
1.4	ALKBH3 (ALKYLATION REPAIR HOMOLOG 3).....	15
1.5	ZUSAMMENWIRKEN VON OTUD4 UND ALKBH3.....	16
1.6	ZIELSETZUNG .....	18
<b>2</b>	<b>ARBEITSPROGRAMM UND MATERIALIEN.....</b>	<b>19</b>
2.1	ZELLKULTUR.....	19
2.1.1	<i>Zelllinien und Medien.....</i>	<i>19</i>
2.1.2	<i>Handhabung der Zelllinien .....</i>	<i>19</i>
2.2	WESTERN BLOT.....	22
2.2.1	<i>Proteinisolation.....</i>	<i>22</i>
2.2.2	<i>Gelelektrophorese .....</i>	<i>23</i>
2.2.3	<i>Transfer auf PVDF-Membran.....</i>	<i>24</i>
2.2.4	<i>Antikörper (Immunoblot).....</i>	<i>24</i>
2.3	MG132-EXPERIMENT.....	25
2.3.1	<i>Prinzip .....</i>	<i>25</i>
2.3.2	<i>Versuchsaufbau und -ablauf.....</i>	<i>26</i>
2.4	RNA - INTERFERENZ (RNAi) .....	26
2.4.1	<i>Prinzip der gezielten genetischen Repression mittels RNAi (Knockdown) .....</i>	<i>26</i>
2.4.2	<i>Amplifikation spezifischer shRNAi-Vektoren .....</i>	<i>29</i>
2.4.3	<i>Transfektion.....</i>	<i>29</i>
2.4.4	<i>Infektion.....</i>	<i>30</i>
2.4.5	<i>Selektion .....</i>	<i>30</i>
2.4.6	<i>Analyse der Effektivität der genetischen Repression .....</i>	<i>32</i>
2.5	ZYTOTOXIZITÄTSANALYSE.....	33
2.5.1	<i>Prinzip .....</i>	<i>33</i>
2.5.2	<i>Versuchsaufbau und -ablauf.....</i>	<i>33</i>
2.6	PROLIFERATIONSASSAY.....	34
2.6.1	<i>Prinzip .....</i>	<i>34</i>
2.6.2	<i>Versuchsaufbau und -ablauf.....</i>	<i>34</i>
2.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	34

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>35</b>
3.1	AUSWAHL DER ZELLINIEN.....	35
3.2	AUSWAHL DER SHRNAs .....	36
3.3	MG132-EXPERIMENT.....	37
3.4	ZYTOTOXIZITÄTSANALYSE UND PROLIFERATIONSASSAY .....	38
3.4.1	<i>Western Blots</i> .....	39
3.4.2	<i>Zytotoxizitätsanalyse</i> .....	40
3.4.3	<i>Proliferationsassay</i> .....	43
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>46</b>
4.1	MG132-EXPERIMENT.....	46
4.2	ZYTOTOXIZITÄTSANALYSE UND PROLIFERATIONSASSAY .....	47
4.2.1	<i>Zytotoxizitätsanalyse</i> .....	47
4.2.2	<i>Proliferationsassay</i> .....	48
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>56</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Das Thema dieser Arbeit bezieht sich auf das Enzym OTUD4 aus der Gruppe der Deubiquitinasen. Es gibt Hinweise darauf, dass das Enzym eine Rolle in der Entwicklung von Tumoren spielt. Diese Annahme begründet die Motivation, sich durch Grundlagenforschung der Bedeutung von OTUD4 in Bezug auf die Tumorprogression zu nähern, mit dem Ziel, neue Ansatzpunkte für onkologische Therapien zu finden. Deshalb war es wichtig, zunächst in Grundzügen die klinische Bedeutung von Tumorerkrankungen mit dem derzeitigen Standard der Therapieverfahren darzulegen und anschließend die Grundlagen der Arbeitsweise von OTUD4 zu erläutern.

## 1.2 Epitheliale Tumoren

### 1.2.1 Epidemiologie und Klinik

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes sind Tumoren die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland. Während Herz-Kreislaufkrankungen zwar noch immer die Spitze der Todesursachen einnehmen, ist ihr Anteil an allen im Jahre 2011 verstorbenen

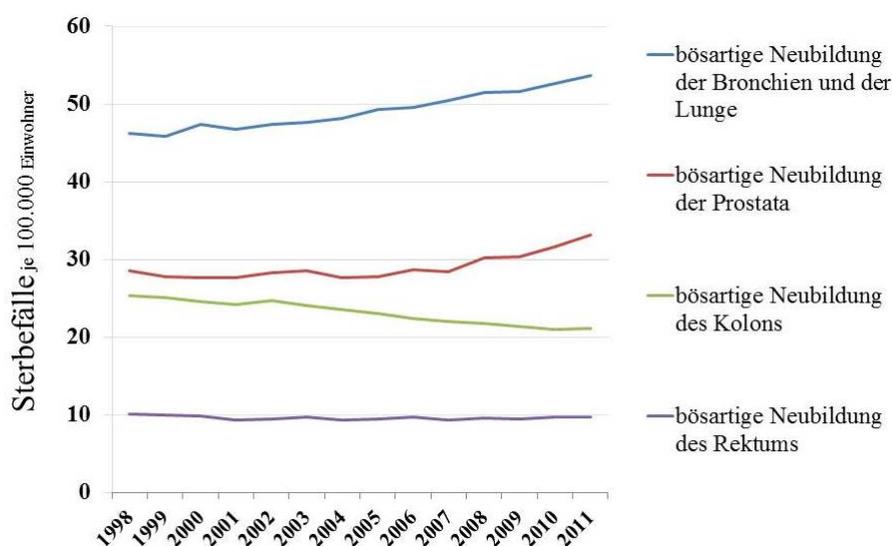


Abbildung 1: Sterbefälle in Deutschland nach ausgewählter Tumorentität; je 100.000 Einwohner; altersstandardisiert; 1998-2011 (Statistisches Bundesamt, DESTATIS, Todesursachenstatistik 1998 – 2011)

Personen auch auf Grund verbesserter Therapien in den letzten 30 Jahren um 23% zurückgegangen. Um mehr als diese Prozentzahl (um 25%) hingegen, ist der Anteil der diagnostizierten Tumorerkrankungen in Deutschland im gleichen Zeitraum gestiegen (Statistisches Bundesamt 2013).

Weltweit verstarben 2012 8,2 Millionen Menschen an Tumoren. Ein weiterer Anstieg der Tumorerkrankungen wird von der World Health Organization (WHO) für die nächsten Jahrzehnte vorausgesagt. Nach Hochrechnungen werden die Zahlen in den kommenden zwei Dekaden von 14 Millionen Neuerkrankungen im Jahre 2012 auf 22 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr ansteigen (WHO 2015).

Die in Deutschland häufigsten Tumoren sind in Abhängigkeit vom Geschlecht zu betrachten. Bei Männern steht der Prostatakrebs und bei Frauen der Brustkrebs an oberster Stelle, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs (*siehe Abbildung 2*).

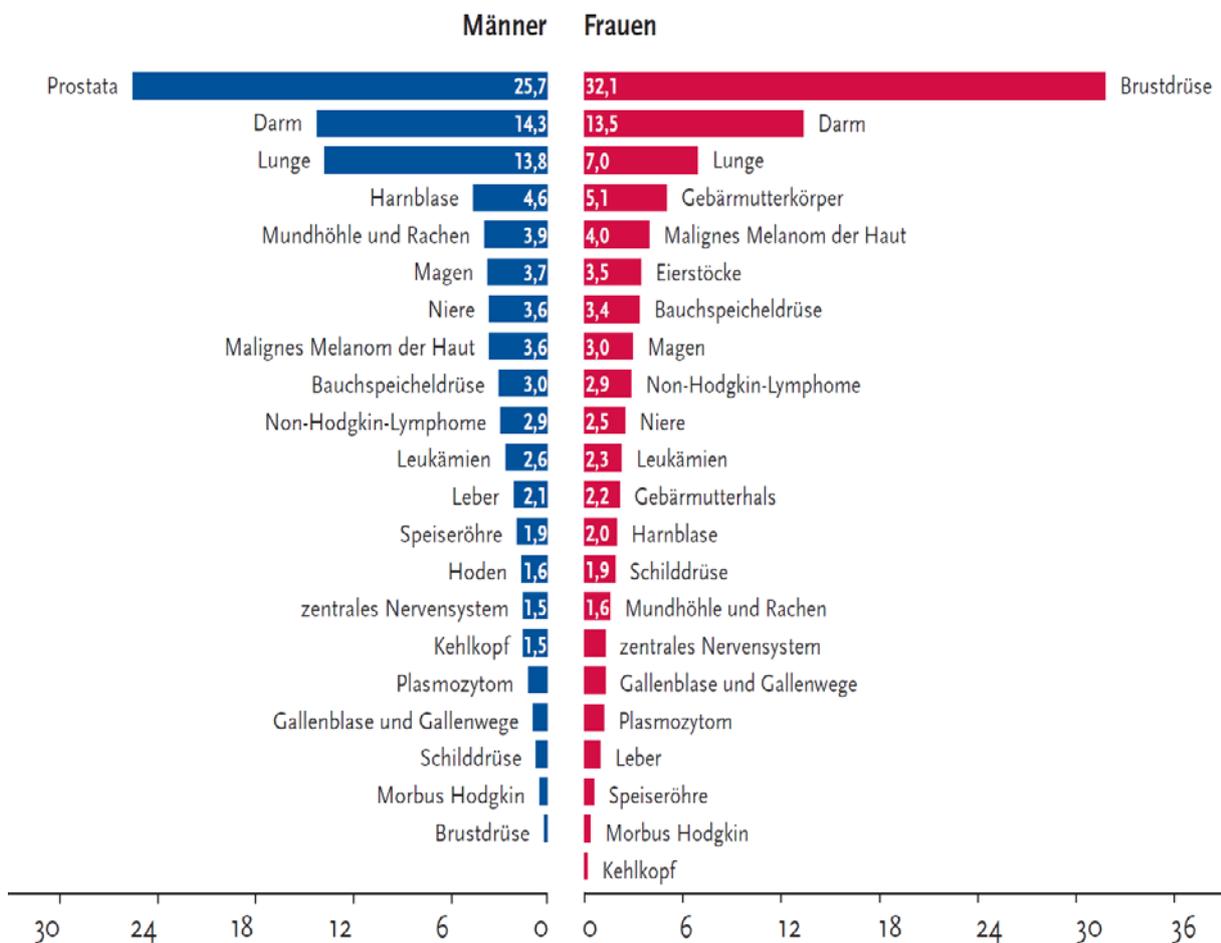


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 - ohne nicht melanotischen Hautkrebs (Krebs in Deutschland 2012)

Während der prozentuale Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen - an allen Krebssterbefällen in Deutschland - bei den Frauen die gleiche Hierarchie aufweist wie die Verteilung der Tumorlokalisationen in Abbildung 2, tritt bei den Männern der Prostatakrebs bei Betrachtung der Krebssterbefälle auf Grund geringerer Letalität nach Lungen- und Darmkrebs an die dritte Stelle (Krebs in Deutschland 2012).

## 1.2.2 Kanzerogenese

Die Entstehung von Tumoren ist bedingt durch endogene und exogene Faktoren. Endogen bezeichnet die genetische Prädisposition, die jeder Mensch in sich trägt. Exogen bedeutet, dass externe Faktoren die Tumorentstehung beeinflussen. Dies können in der Umwelt vorkommende physikalische Karzinogene wie UV-Strahlung und ionisierende Strahlung, chemische Karzinogene wie Aflatoxin, Arsen und Nitrosamine oder biologische Karzinogene wie Viren, Bakterien und Parasiten sein. Außerdem ist die Entstehung von Neubildungen maßgeblich vom Verhalten der Bevölkerung abhängig, welches Risikofaktoren für die Kanzerogenese birgt. So sind 30 % der Todesfälle auf Grund eines Tumors bedingt durch einen hohen Body-Mass-Index, geringen Verzehr von Obst und Gemüse, mangelnde Bewegung und Tabak- oder Alkoholkonsum (WHO 2015). Genetische Disposition und Mutationen spielen bei der Tumorgenese eine wesentliche Rolle. Da mit zunehmendem Alter Mutationen kumulieren, steigt im Alter das Risiko, an Krebs zu erkranken (Doenecke et al. 2005).

Man kann den Ablauf von Krankheitsentstehung und -entwicklung in vier Krankheitsstadien unterteilen. Am Anfang steht die Induktionsphase, in welcher in einem präklinischen Stadium im Zeitraum zwischen 15 und 30 Jahren Mutationen stattfinden. Anschließend folgt die In-situ-Phase, das heißt, die Zellveränderung tritt in Form einer präkanzerösen Läsion zu Tage. Diese Phase nimmt einen Zeitraum von 5 - 10 Jahren ein. In der Infiltrationsphase schließlich durchbricht der Tumor die Grenzen der Basalmembran, und man spricht von nun an von einem klinisch etablierten Malignom. Folgt keine rechtzeitige kurative Therapie, geht die Erkrankung letztendlich in die Disseminationsphase über, in welcher sich Metastasen bilden und auch andere Organe befallen werden. Die beiden letzten Phasen für sich genommen, erstrecken sich in der Regel auf jeweils 1 - 5 Jahre (Wittekind 2012).

### 1.2.3 Klassifikation von Tumoren

Die Klassifikation von Tumoren ist wichtig, um behandelnden Ärzten die Einschätzung der Krankheitsausbreitung, die Therapieplanung und die Einschätzung für eine Prognose zu erleichtern. Außerdem lässt sich durch Klassifizierung die Evidenz der Therapievorgehen prüfen und ein nationaler und internationaler Austausch von Behandlungs- und Forschungszentren wird ermöglicht (Wittekind 2012).

#### **TNM-Klassifikation**

Die TNM-Klassifikation wird von der internationalen Organisation *Union internationale contre le cancer (UICC)* geführt und dient dazu, die anatomische Tumorausbreitung zu bestimmen. T bezieht sich hierbei auf die Tumorausdehnung, N auf den Nodalstatus (Lymphknotenmetastasierung) und M auf die Fernmetastasierung. Zu unterscheiden ist die TNM-Klassifikation auf Grundlage der klinischen Untersuchungen, bildgebenden Verfahren, Endoskopie und Biopsie (cTNM) und der Pathologischen Klassifikation (pTNM), welche nach chirurgischem Eingriff und pathologischer Untersuchung von Tumor und Lymphknoten festgelegt wird (Wittekind 2012). In Tabelle 1 ist das TNM-System grob dargestellt, wie es sich mit Modifikationen in den Grundzügen auf alle Organsysteme anwenden lässt.

#### **Grading**

Das Grading dient dazu, die histopathologische Graduierung zu klassifizieren. Durch die histopathologische Graduierung erhält man Informationen über die Differenzierung des Tumors. Dabei lassen sich vier Graduierungen ableiten (*siehe Tabelle 1*) (Wittekind 2012).

#### **Staging**

Das Staging teilt die Tumorerkrankung in Krankheitsstadien ein. Die Grundlage dazu liefert die TNM-Klassifikation. Man erhält durch die Einteilung eine Auskunft über die Krankheitsprognose, und es lassen sich anhand von Stadien tumorspezifische Therapievorgehensweisen festlegen und evaluieren (Wittekind 2012).

**R-Klassifikation**

Die Beurteilung nach Vorhandensein eines Residualtumors ist nach primär chirurgischer Therapie zwingend erforderlich, um den Tumorstatus zu erheben, weiteres Vorgehen zu planen und die Prognose abschätzen zu können. Die Einteilung erfolgt nach R0, R1 und R2. R0 bedeutet hierbei, dass kein Residualtumor mehr vorhanden ist, R1 bedeutet, dass mikroskopisch noch ein Residualtumor nachgewiesen werden kann und R2, dass ein makroskopisch sichtbarer Residualtumor zurückgeblieben ist. Rx ist die Bezeichnung für einen Residualtumor, dessen Vorhandensein nicht beurteilt werden kann (Wittekind 2012).

**Ausbreitungsklassifikation**

Die Ausbreitungskennntnis und -diagnostik sind entscheidend für Therapie und Prognose. Meist breiten sich Tumorzellen über eine Lymphgefäßinvasion (L-Klassifikation) oder eine Veneninvasion (V-Klassifikation) aus. L0 bedeutet, dass keine Lymphgefäßinvasion nachweisbar ist, während bei L1 eine Lymphgefäßinvasion festgestellt werden konnte. Entsprechend bedeutet V0 keine Veneninvasion. Zusätzlich wird hier noch zwischen mikroskopisch nachweisbarer Veneninvasion (V1) und makroskopisch nachweisbarer Veneninvasion (V2) unterschieden. Der Nachweis von Lymphgefäß- und Veneninvasion lässt zwar auf aggressives Verhalten eines Tumors schließen, es wird allerdings erst von Metastasierung gesprochen, wenn die Tumorzellen eine Angiogenese induzieren (Wittekind 2012).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Differenzierungssysteme, welche auf jede Tumorart spezifisch angewendet werden, jedoch in den Grundsätzen auf nachfolgenden Kriterien beruhen:

*Tabelle 1: Tumorklassifikation nach TNM, Grading und Staging (Wittekind 2012, S. 167ff)*

<b>Klassifikation</b>		<b>Bedeutung</b>
<b>TNM</b>	<b>T</b>	Primärtumor
	<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
	<b>T0</b>	keine Anzeichen für einen Primärtumor
	<b>T1,2,3,4</b>	zunehmende Größe und Ausdehnung des Tumors
	<b>Tx</b>	keine Aussage zum Primärtumor möglich
	<b>N</b>	regionäre Lymphknoten
	<b>N0</b>	keine Anzeichen für einen Lymphknotenbefall
	<b>N1,2,3</b>	zunehmender Befall, Einteilung zum Beispiel nach ipsi-/kontralateralem Befall und Beweglichkeit
	<b>Nx</b>	keine Aussage zu den Lymphknoten möglich
	<b>M</b>	Fernmetastasen
	<b>M0</b>	keine Anzeichen für Fernmetastasen
	<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden
	<b>Mx</b>	keine Aussage über Fernmetastasen möglich
<b>Grading</b>	<b>G1</b>	gut differenziert
	<b>G2</b>	mäßig differenziert
	<b>G3</b>	schlecht differenziert
	<b>G4</b>	undifferenziert
<b>Staging</b>	<b>Stadium 0</b>	Carcinoma in situ
	<b>Stadium I,II</b>	auf Organ begrenzt
	<b>Stadium III</b>	Lymphknotenmetastasen
	<b>Stadium IV</b>	Fernmetastasen

## 1.2.4 Diagnose und Therapieprinzipien

Auf Grund einer meist fehlenden Symptomatik wird die Diagnose oft im Rahmen von Zufallsbefunden oder Screeningmaßnahmen gestellt. Die Diagnose sollte prätherapeutisch zum einen mikroskopisch durch eine angepasste und saubere Biopsie gesichert und zum anderen durch ein prätherapeutisches Tumorstaging ergänzt werden. Das Staging beinhaltet die Abklärung der lokalen Ausbreitung und den Ausschluss beziehungsweise die Diagnose von Fernmetastasen mit Hilfe von bildgebenden Verfahren und gegebenenfalls einer Laparoskopie. Der Nodalstatus kann jedoch erst sicher nach einer operativen Therapie festgelegt werden (Wittekind 2012).

### Operative Therapie

Die vollständige chirurgische Entfernung von lokal begrenzten Tumoren in situ ist aktuell bei epithelialen Tumoren im Sinne eines kurativen Ansatzes zu sehen. Auch die Resektion von Tumoren mit vorhandener mono- oder oligotoper Fernmetastasierung kann in einigen Fällen, je nach Tumorart und Zustand des Patienten, in kurativer Absicht erfolgen. Weder Chemo- noch Strahlentherapie erzielen alleine bei lokal begrenzter Tumorausbreitung einen vergleichbaren Erfolg, spielen aber im Rahmen von multimodalen Konzepten (*siehe Systemtherapie S. 8*) eine wesentliche Rolle. Wie in der Anwendung der multimodalen Konzepte, so gibt es auch in der Vorgehensweise der chirurgischen Therapie kein Standardverfahren, welches auf jeden Patienten übertragbar wäre. Vielmehr geht die Bemühung dahin, möglichst individuelle Therapiekonzepte zu erzielen (Wittekind 2012).

In der Operationsplanung ist die Bestimmung der Histologie und das Grading anhand von Biopsien wichtig und ein klinisches Staging (*siehe 1.2.3*) durchzuführen. Intraoperativ ist die Fernmetastasierung, die Tumorausdehnung im Ursprungsorgan und die Adhärenz zu Nachbarorganen genau zu untersuchen und festzulegen. Während der Tumorresektion ist auf einen adäquaten Sicherheitsabstand, welcher sich an der Anatomie und der Tumorlokalisation orientiert, sowie auf ein minimales Risiko der Tumorzell dissemination streng zu achten. Eine Ausschwemmung der Tumorzellen soll durch die *No-touch-Technik* und gegebenenfalls eine *En-bloc-Entfernung* von Primärtumor und Lymphabflussgebiet verhindert werden (Juhl 2007). Eine Operation kann auch in bestimmten palliativen Situationen, in Abwägung des Risikos, erfolgen, um die Lebensqualität zu verbessern oder um die Überlebenszeit zu erhöhen (Wittekind 2012).

## **Systemtherapie**

In der Systemtherapie kommen zur Anwendung Chemotherapie, Hormontherapie, Immuntherapie und Strahlentherapie. In Form von multimodalen Konzepten werden chirurgische und adjuvante beziehungsweise neoadjuvante Therapien kombiniert angewandt (Wittekind 2012).

Die adjuvante Therapie meint eine primär chirurgische Tumorexzision mit nachfolgender systemischer Therapie zur Bekämpfung von disseminierten Tumorzellen. Neoadjuvant bedeutet, dass vor der chirurgischen Entfernung eine Systemtherapie durchgeführt wird, um ein sogenanntes *Downstaging* des Tumors zu erzielen. Auch Kombinationstherapien aus präoperativer neoadjuvanter Therapie, chirurgischer Therapie und einer abschließenden adjuvanten postoperativen Therapie können angewendet werden (Juhl 2007).

## **Strahlentherapie**

Die Strahlentherapie arbeitet mit lokal applizierten ionisierenden Strahlen in Form von Röntgenstrahlen, Photonenstrahlen, *High-LET-Strahlen (linear energy transfer)* wie Neutronenstrahlen oder der Gabe von radioaktiven Isotopen, wie Jod-131. Die Wirkung der Strahlung auf das Gewebe kann durch direkte Schädigung der Zellen beziehungsweise deren DNA, Enzyme und Membranen entstehen oder auf der Entstehung von Radikalen beruhen, welche die Zellen indirekt schädigen. Primär wird die Strahlentherapie zur lokalen Kontrolle eingesetzt (Juhl 2007).

## **Chemotherapie**

Die Wirkung der Chemotherapie beruht auf ihren zytostatischen beziehungsweise zytotoxischen Effekten. Ihr Wirken ist zwar systemisch, sie greift aber besonders schnell proliferierende Gewebe an. Damit wird primär das Tumorgewebe getroffen, aber auch gesundes Gewebe mit hoher Proliferationsrate wie zum Beispiel Knochenmark und intestinale Schleimhäute. Zusätzlich zur systemischen Behandlung ist auch eine lokale Chemotherapie in Form von intraarterieller Perfusion der tumoreigenen Gefäße möglich. Für jede Tumorart kommen je nach Sensibilität des Tumors sowie abhängig von Alter und Allgemeinzustand des Patienten verschiedene Kombinationstherapien (Kombination von zwei oder mehr Chemotherapeutika) zum Einsatz (Juhl 2007).

Um die verschiedenen Ansatzmechanismen von Chemotherapeutika erkennbar werden zu lassen und das Prinzip einer möglicherweise aus dem Wissen der Dissertation entwickelbaren

Substanz einordnen zu können, sind die Wirkprinzipien und zugehörige Beispielsubstanzen im Folgenden kurz in Grundzügen dargestellt.

Angriffspunkt DNA-Synthese und DNA-Interferenz:

Ein Mechanismus, die DNA-Synthese zu verhindern, ist die Hemmung der Synthese von DNA-Bausteinen. Beispielsweise beruht ein Wirkmechanismus der klinisch sehr wichtigen Substanz Methotrexat darauf, direkt Enzyme zu hemmen, welche für die Synthese von Purinen und Thymidin notwendig sind. Insbesondere aber dient Methotrexat statt Folsäure dem Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase als Substrat und verhindert somit die Bildung der Tetrahydrofolsäure und damit die Herstellung von Purinen und Thymidin, welche auf die Tetrahydrofolsäure angewiesen sind. Ein weiterer Mechanismus zur Hemmung der DNA-Synthese ist das Einschleusen falscher DNA-Bausteine. Dies geschieht durch Purin-Antimetabolite (6-Mercaptopurin) oder Pyrimidin-Antimetabolite (5-Fluorouracil), welche als „falsche“ Nukleobasen statt Purin- beziehungsweise Pyrimidinbasen eingebaut werden (Lüllmann et al. 2010).

Eine weitere wichtige Gruppe bilden die interkalierenden Substanzen. Als Beispielsubstanz soll hier das Anthracyclin-Derivat Doxorubicin dienen. Es lagert sich in die DNA ein und induziert damit DNA-Strangbrüche. Darüber hinaus ist die Gruppe der Topoisomerase-Hemmstoffe, wie Etoposid, (hemmt Topoisomerase II) zu nennen. Durch Hemmung der Enzyme Topoisomerase I oder II wird die Wiederverknüpfung der DNA-Stränge unvollständig, sodass DNA Strangbrüche verbleiben (Lüllmann et al. 2010).

Die für diese Arbeit am wichtigsten zu nennende Gruppe ist die Gruppe der alkylierenden Substanzen, welche Alkyl-Reste (zum Beispiel Chlorethyl- oder Methylreste) auf die DNA übertragen und somit die Zellteilung hemmen. Beispiel einer Leitsubstanz dieser Gruppe ist das Cyclophosphamid. Andere Substanzen, wie Cisplatin, gehören der Gruppe der Platin freisetzenden Verbindungen an. Sie bilden Platin-Brücken zwischen oder innerhalb von DNA-Molekülen und unterbinden somit sämtliche Stoffwechselfvorgänge an der DNA (Lüllmann et al. 2010).

Angriffspunkt Mikrotubuli:

Eine Gruppe, welche nicht direkt die DNA als Angriffspunkt hat, sondern auf dem Mechanismus der Interferenz mit Mikrotubuli der Mitosespindel beruht, wird hier lediglich der Voll-

ständigkeit halber angeführt. Leitsubstanzen dieser Gruppe sind Vincristin und Paclitaxel (Lüllmann et al. 2010).

Neuere Ansätze:

Neben den oben genannten, relativ unspezifischen Mechanismen haben neuere Ansätze die Besonderheiten, welche die Tumorzellen gegenüber normalen Zellen angreifbar machen, im Fokus. Dies können die Überexpression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Hormone, spezifische Oberflächenrezeptoren oder eine abnorme Enzymexpression sein. Das heißt, neuere Ansätze zielen darauf ab, Mechanismen, die dem Tumor zum Überleben und Wachstum verhelfen, auszuschalten und greifen sehr viel spezifischer maligne Zellen an. Allerdings überschneiden sich auch hier körpereigene und tumorspezifische Steuerungswege, sodass zum Teil auch hier gesunde Zellen mit angegriffen werden. Prinzipiell können Rezeptoren oder Hormone blockiert oder auch Oberflächenproteine für das Immunsystem markiert werden. Diese neueren und spezifischeren Therapien werden zum Teil als Reservetherapeutika und in Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt und gewinnen zunehmend an Bedeutung (Lüllmann et al. 2010).

Um Tumorerkrankungen effizient zu bekämpfen, sind weiterhin Prävention und Aufklärung vonnöten, sowie umfassende Screeningprogramme durchzuführen. Vor allem aber sind ein weiteres Verständnis der molekularen Grundlage der Tumoren und eine daraus ableitbare spezifische Angriffsmöglichkeit auf molekularer Ebene erforderlich.

## 1.3 Proteasomale Degradation von Eiweißen

Im Folgenden wird der Prozess der proteasomalen Degradation von Eiweißen erläutert. Mit Einfluss auf zum Beispiel Zellzyklus und DNA-Reparatur, scheint das *Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)* eine zentrale Rolle in der Tumorentwicklung zu spielen. Es ist Gegenstand aktueller Forschungen, mit dem Ziel neue Angriffspunkte in der Tumorthherapie zu etablieren (Frankland-Searby und Bhaumik 2012).

Zunächst wird das Enzym OTUD4 beschrieben, um es anschließend in seiner Funktion im Rahmen des UPS einzuordnen.

### 1.3.1 OTUD4 (*Ovarian tumor domain-containing protein 4*)

OTUD4 gehört zu der Familie der Deubiquitinasen und ist als solche der übergeordneten Gruppe der Proteasen angehörig. Die Deubiquitinasen (DUBs) teilen sich wiederum in Unterfamilien auf (Fraile et al. 2012; Fortelny et al. 2014):

1. UCHs (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*)
2. USPs (*ubiquitin-specific proteases*)
3. JAMMs (*JAMM/MPN domain-associated metalloisopeptidase domain proteins*)
4. MCPIP (*Monocyte chemotactic protein-induced protein*)
5. **OTUs** (*Ovarian tumor domain proteases*)

Der letzten Gruppe wird OTUD4 zugeordnet und als Cystein-Peptidasen identifiziert (Atanassov et al. 2011).

Das Gen, welches für OTUD4 kodiert, liegt auf Chromosom 4 und ist an der Stelle 4q31.21 lokalisiert. Das Protein OTUD4 setzt sich aus 1049 Aminosäuren zusammen und hat eine atomare Masse von circa 117 Kilodalton (kDa). Das Enzym besitzt eine OTU-Domäne, welche sich über die Aminosäuren 2 bis 84 erstreckt (*National Center for Biotechnology Information (NCBI)* 2015). Die OTU-Domäne ist ein Homologon der OTU in *Drosophila*. Innerhalb dieser Domäne stellen hoch konservierte Cysteine und Histidine die katalytischen Residuen dar (Balakirev et al. 2003). Ein schematischer Aufbau von OTUD4 ist aus den oben genannten Informationen in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Proteinstruktur von OTUD4 mit N-terminaler funktioneller OTU-Domäne (blau) und Bindungsstelle (grün) für potentielle Ubiquitinmoleküle (rot)

Die Aufgabe von Deubiquitinasen besteht darin, die als posttranslationale Modifikation an Proteinen angehängten Ubiquitinmoleküle wieder abzuspalten. Sie sind somit daran beteiligt, das ständige Wechselspiel der Ubiquitinierung und Deubiquitinierung aufrechtzuerhalten (Atanassov et al. 2011).

Über das in dieser Dissertation behandelte Enzym OTUD4 ist derzeit noch sehr wenig bekannt.

### 1.3.2 Ubiquitin

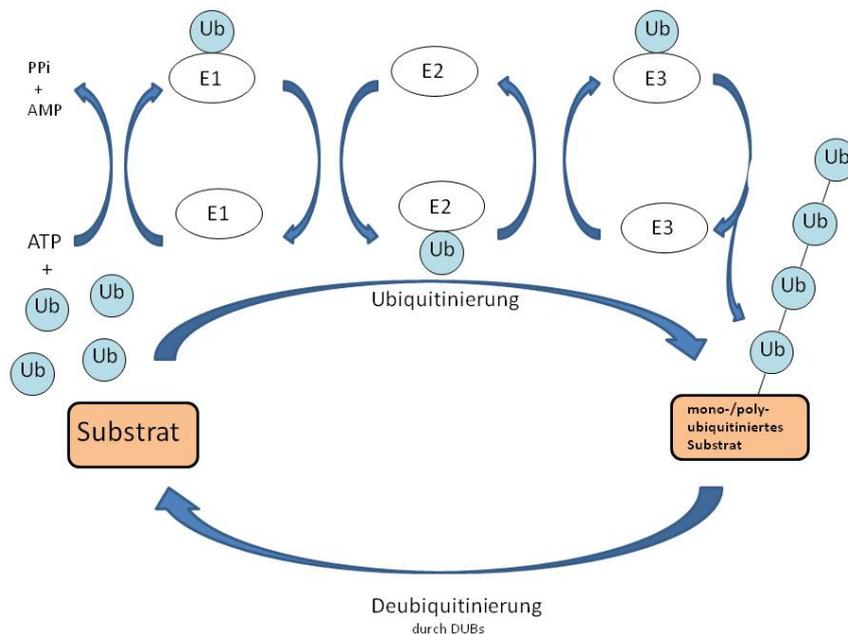
Ubiquitin (Ub) ist ein Protein, welches in allen eukaryoten Zellen zu finden ist und aus 76 Aminosäuren besteht. Evolutionär ist es sehr stark konserviert. So besteht die Differenz in der Zusammensetzung der Aminosäuren vom Menschen zur Hefe im Unterschied von nur 3 Aminosäuren (Doenecke et al. 2005).

Es besitzt viele Aufgaben und ist beteiligt an der Regulation sämtlicher DNA-Vorgänge, wie Replikation, Transkription, Rekombination und Reparatur (Atanassov et al. 2011).

Posttranslational werden über Lysinreste an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins Ubiquitinmoleküle angehängt (Kouranti et al. 2012). Dieses Anhängen ermöglicht der Enzymkomplex aus E1 (Ubiquitin aktivierendes Enzym), E2 (Ubiquitin konjugierendes Enzym) und E3 (Ubiquitinligase) (siehe Abbildung 4). Hierbei entsteht eine Isopeptidbindung zwischen dem Lysin des Zielproteins und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins (Doenecke et al. 2005). Substratspezifität wird vor allem über eine Reihe unterschiedlicher E-Ligasen, welche spezifisch für ubiquitinierte Proteine sind, erreicht. Einen geringeren Anteil an der Spezifität trägt auch das Enzym E2 bei (Bergink und Jentsch 2009).

In Abbildung 4 wird der oben beschriebene Weg der Ubiquitinierung eines Substrates durch die Enzyme E1, E2, E3 dargestellt. Ein solches ubiquitiniertes Substrat ist damit zum Abbau

markiert. Diese Markierung kann aber auch wieder durch Deubiquitinasen aufgehoben werden und das Substrat bleibt damit funktionsfähig (Bergink und Jentsch 2009).



**Abbildung 4:** Kreislauf der Ubiquitinierung über die Enzyme E1, E2 und E3 und der Deubiquitinierung durch Deubiquitinasen (DUBs); ATP (Adenosintriphosphat); AMP (Adeninmonophosphat); PPI (anorganische Phosphatgruppen); Ub (Ubiquitinmolekül); modifiziert nach Frankland-Searby und Bhaumik 2012 (S. 64-76) und Bergink und Jentsch 2009 (S. 461-467)

Die Monoubiquitinierung kann zu einer Ubiquitinkette (Polyubiquitinierung) erweitert werden, indem weitere Ubiquitinmoleküle an ein Lysin des vorhergehenden Moleküls gebunden werden (Atanassov et al. 2011). Außerdem können an ein Zielprotein an verschiedenen Lysinresten Ubiquitinverbindungen geknüpft werden. Es entstehen dann sogenannte Multiubiquitinierungen. Ubiquitin besitzt 7 potentielle Lysinbindungsstellen. Je nachdem, über welche Stelle im Molekül die Kette geknüpft wird, können potentiell eine Vielzahl an unterschiedlichen Polymeren gebildet werden und entsprechend groß ist die Breite an unterschiedlichen Funktionen (Kouranti et al. 2012).

Während über K63-Ketten vor allem die Veränderung der Proteinstruktur, die Lokalisation von Proteinen oder ihre Aktivität reguliert werden (Atanassov et al. 2011), werden über K48-Ketten sowie über K11-Ketten Proteine für den proteosomalen Abbau markiert (Kouranti et al. 2012). Im Folgenden soll vor allem der Einfluss auf den Abbau von Proteinen dargelegt werden, da dieser Prozess grundlegend für die Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit ist. Der Abbau geschieht durch den 26S-Proteasomkomplex.

### 1.3.3 26S-Proteasomkomplex

Der 26S-Proteasomkomplex ist ein Proteinkomplex, welcher für die nicht lysosomale Proteindegradation in Eukaryonten verantwortlich ist. Er stellt damit den wichtigsten Mechanismus bei Säugetieren dar, Proteine abzubauen. Über den Prozess der Proteindegradation ist er an der Progression des Zellzyklus, inflammatorischen Prozessen, Antigenpräsentation, Signaltransduktion, DNA-Reparatur, Apoptose und anderen wichtigen regulatorischen Prozessen der Zelle beteiligt. Er hat damit direkten Einfluss auf Karzinogenese und Tumorprogression sowie durch Proteasominhibition gezeigt auch indirekten Einfluss auf Angiogenese und Metastasierung (Frankland-Searby und Bhaumik 2012).

Der 26S-Proteinkomplex besteht aus 2 Untereinheiten, einem 20S-Kernpartikel und der 19S-regulatorischen-Untereinheit. In der Zelle ist er sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert. Die 20S-Untereinheit trägt die proteolytische Aktivität und wird gebildet aus 4 Ringen (zwei  $\alpha$ -Ringen und zwei  $\beta$ -Ringen), welche aufeinander liegend einen Zylinder formen. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringe bestehen wiederum aus je 7 Untereinheiten ( $\alpha 1-7$  und  $\beta 1-7$ ) und bilden somit Heptamereinheiten. Drei der  $\beta$ -Untereinheiten besitzen katalytische Aktivität, die nach ihrer Spaltungsaktivität benannt sind. So trägt  $\beta 1$  den Namen *caspase-like*,  $\beta 2$  *trypsin-like* und  $\beta 5$  *chymotrypsin-like*. Den namengebenden Enzymen entsprechend, spaltet  $\beta 1$  nach sauren,  $\beta 2$  nach basischen und  $\beta 5$  nach hydrophoben Aminosäureresten. Die 19S-regulatorische-Untereinheit ist zuständig für Erkennung, Entfaltung, ATP-abhängige-Translokation des Substrates und Abspaltung sowie Recycling von Ubiquitin. Sie bildet mit diesen Aufgaben die Spezifität für die Ubiquitinverbindungen (Frankland-Searby und Bhaumik 2012).

#### Einfluss des 26S-Proteasomkomplexes auf die DNA-Reparatur

Das 26S-Proteasom ist in vielschichtiger Weise für die DNA-Reparatur wichtig, da es als proteolytisches Signal die den Prozess der DNA-Reparatur behindernden Proteine entfernt oder durch Initiierung von Signalkaskaden die für die Reparatur benötigten Proteine rekrutiert. Der 26S-Proteasomkomplex ermöglicht so das Überleben der Zelle (Kouranti et al. 2012). Außerdem werden durch den 26S-Proteasomkomplex allgemein pro-apoptotische Faktoren wie p53 herunterreguliert und anti-apoptotische-Faktoren wie NF $\kappa$ B heraufreguliert. Damit steigt die Tendenz zur DNA-Reparatur. Der Prozess der Apoptose wird verhindert und eine Tumorentstehung erleichtert (Frankland-Searby und Bhaumik 2012).

## 1.4 ALKBH3 (*Alkylation repair homolog 3*)

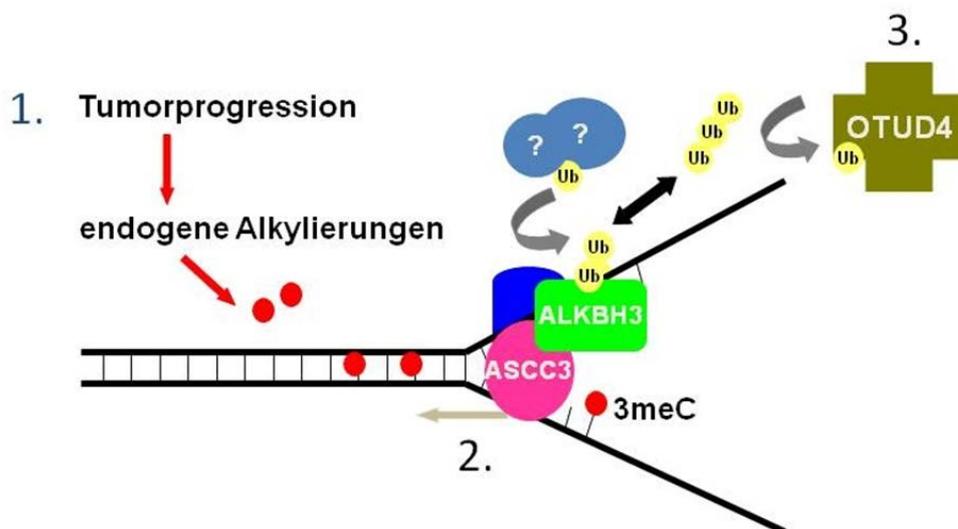
ALKB ist ein ursprünglich in Bakterien entdecktes Enzym. In Säugetieren sind dieser Gruppe bis dato acht Enzyme angehörig (ALKBH 1-8). Sie sind der Familie der Nicht-Häm-Eisen/2-oxoglutarat-abhängigen-Dioxygenasen untergeordnet (Drabløs et al. 2004; Dango 2011). Die Demethylierung durch ALKB ist neben der Basenexzisionsreparatur (BER) oder die DNA-Reparatur durch Methyl-Guanin-Methyltransferasen (MGMT) eine Möglichkeit, um Alkylierungsschäden zu reparieren (Sedgwick 2004).

ALKBH3 ist als Demethylase/Dealkylase zuständig für die Reparatur von N-alkylierten Nucleotiden, insbesondere für die Demethylierung von 1-Methyladenin (1meA) und von 3-Methylcytosin (3meC). Als Substrat bevorzugt es als alleinstehendes Enzym einzelsträngige DNA und RNA (Aas et al. 2003). Allerdings ist es ALKBH3 mit Hilfe der Helicase ASCC3, welche mit ALKBH3 einen Komplex bildet, auch möglich, doppelsträngige Substrate zu demethylieren (Dango et al. 2011).

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass ALKBH3 für die Reparatur von Alkylierungsschäden und somit das Überleben der Zelle wichtig ist. So konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von ALKBH3 zu vermehrter Ansammlung von 3meC und verminderter Zellproliferation führt. Durch Verwendung von Methylmethanesulfonate (MMS), einer alkylierenden Substanz, wurde gezeigt, dass eine genetische Repression (Knockdown) von ALKBH3 die Sensitivität gegenüber MMS signifikant erhöht, jedoch in sehr spezifischer Weise. So wurde eine erhöhte Sensitivität für die PC3 (Adenokarzinomzelllinie der Prostata) und H23 (nichtkleinzelliges Adenokarzinom der Lunge) nachgewiesen, während eine erhöhte Sensitivität für RWPE (benignes Prostataepithel), U2OS (Osteosarkomzelllinie) oder embryonale Mausembryoblasten nicht festgestellt werden konnte (Ringvoll et al. 2006). Weiter konnte gezeigt werden, dass auch in Abwesenheit von exogenen Alkylantien ein Knockdown zu einem geringeren Überleben der Zellen führte. ALKBH3 dient der Zelle somit auch zum Überleben nach endogenen Alkylierungsschäden (Dango et al. 2011). Die Spezifität und die Überexpression von ALKBH3 in einzelnen Tumorentitäten wie Lungenkarzinom sprechen für eine spezifische Funktion in bestimmten Tumorzelllinien (Konishi et al. 2005; Tasaki et al. 2011).

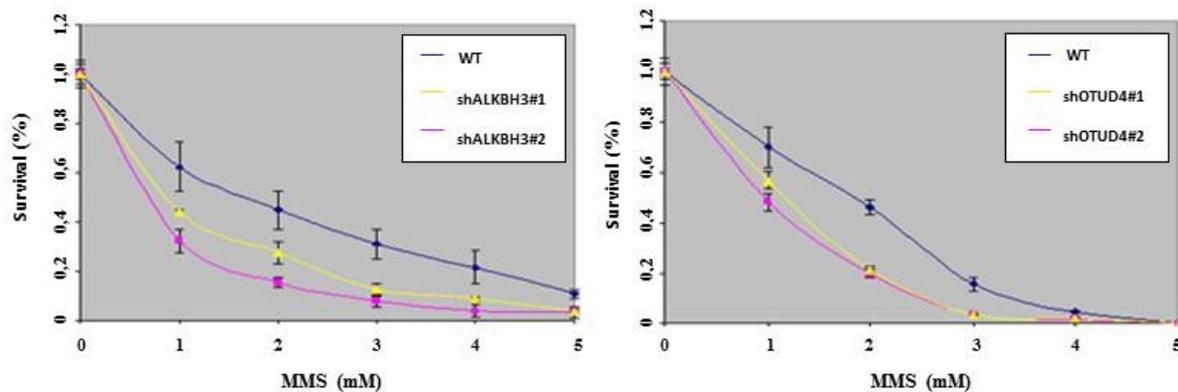
## 1.5 Zusammenwirken von OTUD4 und ALKBH3

Durch oben dargelegte Relevanz von ALKBH3 für spezifische Tumorzelllinien wurde die Frage nach der Funktionsweise und Regulation des Enzyms notwendig. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde im Rahmen von Vorversuchen eine Komplexausfällung durchgeführt. Die Vorversuche sind nicht Teil dieser Arbeit, jedoch aus eigenen Daten bekannt und dienten der Hinführung und als Grundlage der vorliegenden Arbeit. Das Ziel der Vorversuche war es, Partner zu identifizieren, welche mit ALKBH3 interagieren und das Enzym regulieren. Die Komplexausfällung ergab neben der oben erwähnten Helicase ASCC3 das Enzym OTUD4 als möglichen Aktionspartner von ALKBH3 (*eigene Daten unveröffentlicht*). Abbildung 5 zeigt im Modell die mögliche Interaktion zwischen ALKBH3 und OTUD4. Wir gehen von der Hypothese aus, dass OTUD4 als Deubiquitinase zum proteasomalen Abbau markiertes ALKBH3 durch Deubiquitinierung vor dem Abbau schützt und ALKBH3 somit als Demethylase funktionsfähig bleibt (*siehe Abbildung 5*).



**Abbildung 5:** Modell einer möglichen Interaktion zwischen ALKBH3 und OTUD4 in Tumorzelllinien. 1. Die hohe Stoffwechselleistung in Tumorzelllinien führt zu vermehrten endogenen Alkylierungen (rot). Es entsteht 3meC. 2. ALKBH3 (grün) repariert mit Hilfe der Helicase ASCC3 (pink) diese Schäden durch den Abbau der Methylgruppen. 3. OTUD4 (braun) verhindert den vorzeitigen Abbau von ALKBH3 durch Deubiquitinierung.

Ebenfalls im Rahmen der Vorversuche wurden erste experimentelle Untersuchungen mit der Zelllinie PC3 (Adenocarcinom der Prostata) begonnen. Es wurde eine Zytotoxizitätsanalyse nach der unten beschriebenen Methode (*siehe Kapitel 2.5*) durchgeführt. Dabei wurde zum einen das Enzym ALKBH3 genetisch supprimiert und die Zellen der alkylierenden Substanz MMS ausgesetzt. Zum anderen und als Erweiterung der bekannten Ergebnisse bislang (*siehe 1.4*), wurde das Enzym OTUD4 genetisch supprimiert und mit den Zellen ebenso verfahren, wie mit den ALKBH3-Knockdownzellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6:** Zytotoxizitätsanalyse der Adenokarzinomzelllinie der Prostata PC3 a) nach genetischer Suppression von ALKBH3 durch 2 verschiedene short hairpin RNAs (shRNAs); WT=Wildtyp als Kontrolle b) nach genetischer Suppression von OTUD4 durch 2 verschiedene shRNAs und WT als Kontrolle

Die Graphen nach genetischer Suppression der Enzyme OTUD4 (*siehe Abbildung 6b*) zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf wie die Graphen nach Suppression von ALKBH3 (*siehe Abbildung 6a*). Sowohl nach Suppression von ALKBH3 als auch nach der von OTUD4 ist eine erhöhte Sensitivität der Zelllinie gegenüber exogenen Noxen im Vergleich zur Kontrolle (*siehe jeweils blauer Graph*) auszumachen (*eigene Daten unveröffentlicht*).

Dies stellt ein erwartetes Ergebnis dar und unterstützt somit die Vermutung, dass es sich bei den Enzymen ALKBH3 und OTUD4 um abhängige Partner handelt.

## 1.6 Zielsetzung

Um die dargelegte Annahme, dass OTUD4 als Deubiquitinase den proteasomalen Abbau von ubiquitiniertem ALKBH3 verhindert, zu überprüfen und die spezifische Bedeutung von OTUD4 in Bezug auf die Tumorprogression epithelialer Tumoren zu untersuchen, wurde folgende Frage abgeleitet:

Hat OTUD4 einen Einfluss auf die Funktion von ALKBH3 und respektive auf die Tumorprogression?

Das Vorgehen bestand darin, in Zellkulturen effiziente genetische Suppression von OTUD4 zu erzielen und die Zellen anschließend exogenen und endogenen Alkylierungsschäden auszusetzen sowie ihr Überleben beziehungsweise Wachstumsverhalten zu beurteilen. Außerdem sollte im Rahmen des MG132-Experimentes gezeigt werden, dass ALKBH3 proteasomal abgebaut wird.

## 2 Arbeitsprogramm und Materialien

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zelllinien und Medien

Für die In-vivo-Versuche in der Zellkultur wurden kommerziell erhältliche Zelllinien humanen Ursprungs verwendet. Alle Zelllinien sind bei der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) erhältlich. Die Handhabung der für die Experimente benötigten Zelllinien, wurde nach dem Handbuch „Zell und Gewebekultur“ (Lindl 2002) durchgeführt. Die in der Tabelle gelisteten Zelllinien wurden mit den ebenfalls in der Tabelle angegebenen Medien in Petrischalen 100x20mm (P10) (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) gezüchtet. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Zelllinien, ihre Wachstumsbedingungen, sowie die verwendeten Medien dargestellt (*siehe Tabelle 2*). Alle verwendeten Medien (Invitrogen, USA) sind von der Firma Life Technologies (USA) bezogen worden. Die Zusammensetzung der Medien wurde vor dem Gebrauch durch Zugabe von 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, USA) als Kontaminationsschutz erweitert. Vor allen Manipulationen in der Zellkultur wurden die Medien auf 37 °C erwärmt. Die Lagerung erfolgte gemäß Herstellerangaben bei 4 °C.

#### 2.1.2 Handhabung der Zelllinien

##### 2.1.2.1 Auftauen/Einfrieren der Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte grundsätzlich bei -150 °C in Kryo-Röhrchen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) und die Zellen wurden zur Verwendung nach folgendem Prinzip aufgetaut: Nach dem Erwärmen der Zellsuspension (Zellen, Medium und Dimethylsulphoxide (DMSO)) (Sigma-Aldrich, USA) auf 37 °C im Wasserbad wurde die Suspension in ein 15-ml-Reagenzröhrchen (Sarstedt) überführt. Nach Zugabe von 9 ml Medium wurde das Reagenzröhrchen zentrifugiert (1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 Minuten). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und tröpfchenweise

10 ml des entsprechenden Mediums zugegeben. Im letzten Schritt wurden die Zellen wieder resuspendiert. Das Einfrieren der trypsinierten, abzentrifugierten und resuspendierten Zellen zur Lagerung erfolgte in frischem Medium mit 10 % DMSO zunächst bei -80 °C, gefolgt von dem Transfer auf Trockeneis in den -150 °C-Tiefkühlschrank. Während der gesamten Zeit wurden Zellpools vorgehalten und die Zellen nach Bedarf weggefroren oder aufgetaut.

**Tabelle 2: Zelllinien, Wachstumsbedingungen und Medien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellart</b>	<b>Medium</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Kultivierung</b>
<b>293T</b>	embryonale Nierenzelllinie	DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> [+] 4,5 g/L D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate	adhärent/ monolayer	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C
<b>PC3</b>	Adenokarzinom der Prostata ( <i>Grade IV</i> )	DMEM (siehe oben)	adhärent/ monolayer	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C
<b>RWPE</b>	Prostataepithel	Keratinocyte – SFM (1X) <i>Serum Free Medium</i> [+] L – Glutamine	adhärent/ monolayer	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C
<b>sw 480</b>	kolorektales Adenokarzinom ( <i>Dukes B</i> )	Leibovitz's L-15 [+] L-Glutamine [+] L-Amino Acids	adhärent/ monolayer	100 % O <sub>2</sub> , 37 °C
<b>sw 837</b>	Adenokarzinom des Rektums ( <i>Grade IV</i> )	Leibovitz's L-15 [+] L-Glutamine [+] L-Amino Acids	adhärent/ monolayer	100 % O <sub>2</sub> , 37 °C
<b>H23</b>	nichtkleinzelliges Adenokarzinom der Lunge	RPMI – 1640 [+] L-Glutamine	adhärent/ monolayer	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C
<b>HCT116</b>	Kolonkarzinom	Mc Coy's 5a [+] high Glucose [+] L-Glutamine	adhärent/ monolayer	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C
<b>Panc1</b>	Pankreaskarzinom	DMEM (siehe oben)	adhärent/ monolayer	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C

### **2.1.2.2 Teilen der Zellen**

Um Zellkontaktinhibition zu verhindern und damit Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 - 90 % geteilt beziehungsweise in den nächsten Arbeitsschritt gebracht. Dies wurde durch folgende Arbeitsweise erreicht: Nach Erwärmen von Medium, Phosphat Buffered Saline (PBS sterile, pH 7,2) (Life Technologies) und Trypsin (Life Technologies) im Wasserbad auf 37 °C wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml Trypsin hinzugegeben und je nach Zelllinie diese 3 - 7 min im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Petrischale gelöst haben. Es wurde ein 0,25 % - Trypsin zur Proteolyse der extrazellulären Haftproteine (Integrine) verwendet. Um die Trypsinwirkung abzustoppen, wurden anschließend 8 ml Medium hinzugegeben und mit Hilfe einer Pipette in ein 15-ml-Reagenzröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde erneut zentrifugiert und die Zellen mit 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend nach Bedarf in Petrischalen gesetzt.

### **2.1.2.3 Medienwechsel**

Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu sichern, wurde das Medium regelmäßig gewechselt. Je nach Zelllinie war dies alle 2 bis 4 Tage notwendig. Als orientierender Indikator diente neben der Zelldichte der durch den Stoffwechsel der Zellen bedingte pH-induzierte Farbumschlag von rot nach gelb. Da ausschließlich adhärente Zelllinien verwendet wurden, konnte das Medium unkompliziert abgesaugt und anschließend ersetzt werden.

### **2.1.2.4 Ermittlung der Zellzahl**

Zum Setzen der benötigten Anzahl von Zellen wurden diese mit dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) gezählt. Hierzu wurden in einem 1,5-ml-Eppendorfröhrchen (Sarstedt) 900 µl Trypanblau (Merck Millipore, USA) mit 100 µl Zellen (in frischem Medium resuspendiert) gemischt. Der anionische Diazofarbstoff Trypanblau dient der farblichen Darstellung der Zellkerne von lysierten Zellen und ermöglicht eine visuelle Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen unter dem Mikroskop (10-fache Vergrößerung). Im Labor wurde das Mikroskop, invers, „Leica DM IL“ (Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. 10 µl der Mischung wurden je Seite zwischen Zählkammer und Deckgläschen gegeben und die 4 Quadrate der Neubauer Zählkammer ausgezählt und summiert. Anschließend wurde die errechnete Zahl durch 4 geteilt, um einen Mittelwert pro

Quadrat zu erhalten. Dieser Wert, multipliziert mit  $10^5$  entsprach der Zellzahl/ml in der Suspension (*y* in *Abbildung 7*). Um nun aus der errechneten Zellzahl/ml eine gewünschte Zellzahl aus der Suspension als Volumen abmessen zu können, wurde nach dem Prinzip des Dreisatzes folgende Rechnung angestellt:

$$\frac{x}{y} = \text{Ergebnis (Pipettiermenge) in ml}$$

*Abbildung 7: Rechnerische Ermittlung einer gewünschten Zellzahl nach Zellzahlzählung mit der Neubauer Zählkammer; x=gewünschte Zellzahl, y=errechneter Mittelwert  $\times 10^5$*

Das entsprechende Volumen der Zellsuspension konnte dann in die Petrischale pipettiert und mit frischem Medium auf das benötigte Gesamtvolumen aufgefüllt werden.

## 2.2 Western Blot

Der direkte Nachweis von exprimierten Proteinen bezüglich der zellulären Expression der Zieleiweiße erfolgte mit der klassischen Western-Blot-Analyse. Zunächst sind hierfür die Proteinisolation aus den Zellen und die Denaturierung der Proteine in ihre Peptidfraktionen nötig. Nach Auftrennen der Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung mittels Gel-Elektrophoresetechnik und der Übertragung auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran folgt schließlich die Proteindetektion der membrangebundenen Eiweiße mit spezifischen Antikörpern (Immunoblot). Im letzten Schritt wird die Visualisierung der entsprechenden Banden nach Applikation eines Sekundärantikörpers, gerichtet gegen die Fc-Region des Primärantikörpers (Immunkonjugat), erzielt. Der Sekundärantikörper trägt ein Reporterenzym (HRP, *horseradish peroxidase*), welches die Oxidation von Dioxetanen (Luminol) katalysiert und dabei eine Chemolumineszenz hervorruft. Die Lumineszenz kann mittels Kamera detektiert und aufgezeichnet werden.

### 2.2.1 Proteinisolation

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums, gefolgt von einem PBS-Waschgang mit 4 °C kühlem PBS (pH 7,4), mit Hilfe eines Zellschabers (TPP *Techno Plastik Products*) vom Boden gelöst und mit Hilfe einer Pipette in ein Eppendorfröhrchen überführt. Bei 14 000 Um-

drehungen pro min wurde dieses für eine halbe min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und je nach Größe des Zellsatzes mit 50 - 120 µl Sodium Dodecyl Sulfate (SDS; Roth, Karlsruhe, Deutschland), versehen mit 2 % Bromophenol Blau (Sigma-Aldrich), resuspendiert. Durch Erhitzen auf 95 °C im „*Thermomixer compact*“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 5 min wurden die Proteine anschließend denaturiert. Bei Bedarf erfolgte die Lagerung der Zellextrakte bei -20 °C.

### 2.2.2 Gelelektrophorese

In einem zweiten Schritt erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels Tris/Glycin SDS-Gelelektrophorese. Verwendet wurde die Elektrophoresekammer „*Mini Protean Tetra Cell*“ (Bio-Rad Laboratories, USA). Der ungestörte Ionentransfer und die Pufferung wurden durch Zugabe eines Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-SDS-Puffer (15,1 g Tris-Base (AppliChem, Darmstadt, Deutschland); 94 g Glycerin (Merck Millipore), 10 % SDS), gelöst in 900 ml destilliertem H<sub>2</sub>O, gewährleistet. Das Zelllysate wurde dann in die Kammern eines Elektrophorese-Gels aufgetragen und nach Zugabe von 12 µl - 20 µl Lysat der Transfer bei 130 V für ca. 1,5 h komplettiert. Als Referenzmarker für die Proteingröße (in kDa) wurden 10 µl des *Ladders „Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards*“ (Bio-Rad Laboratories) geladen. Je nach Proteingröße und Anzahl der zu analysierenden Proteine wurden unterschiedliche Gele verwendet:

1. Polyacrylamid-Gel 10 % für die Expressionsanalyse von OTUD4 und ALKBH3.

Das Gel setzte sich aus 9,9 ml H<sub>2</sub>O; 8,3 ml 30 %-Acrylamide-Mix (Roth); 6,3 ml 1,5M-Tris (pH 8,8); 0,25 ml 10 %-SDS; 0,25 ml 10 %-Ammoniumperoxodisulfat (APS; AppliChem) und 0,01 ml Tetramethylethylendiamin (TEMED; AppliChem) zusammen. Der *Stack*, welcher dazu dient, dass sich die Proteine vor der eigentlichen Auftrennung auf einer Linie aufreihen, enthielt eine Zusammensetzung aus 4,1 ml H<sub>2</sub>O; 1 ml 30%-Acrylamide-Mix; 0,75 ml 1M-Tris (pH 6,8); 0,06 ml 10 %-SDS; 0,06 ml 10%-APS und 0,006 ml TEMED.

2. Kommerzielle Gradienten-Gele zur Analyse von Proteinfractionen sehr unterschiedlicher Größe (Expressionsanalyse nach genetischer Repression (Knockdown)) beziehungsweise zur Testung der Spezifität von Antikörpern. Hierfür wurden 4 - 12 % NuPAGE-Bis-Tris-Gele 1.0 mm, 10 Well (Life Technologies) verwendet.

### 2.2.3 Transfer auf PVDF-Membran

Zur Proteinimmobilisation wurde eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran (*Immobilien-P Transfer Membran*; Merck Millipore) verwendet. Der Arbeitsschritt gestaltete sich folgendermaßen:

Nach Sensibilisierung der PVDF-Membran in Methanol (Roth) wurde das Gel auf die eine Seite der Membran geschichtet und die Membran-Gel-Schicht, umgeben von einem Mini-Trans-Blot-Filter-Papier (Bio-Rad Laboratories) und einem Schwamm auf jeder Seite, in die Transferkammer eingespannt. Verwendet wurde die „*Mini Trans-Blot-Cell*“-Transferkammer (Bio-Rad Laboratories) und das Blotting erfolgte bei 230 V für 3 h auf Eis in 100 ml Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris base, 0,037 % -SDS) mit 200 ml Methanol (20 %) und 700 ml destilliertem H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Membran in 5 % Milch gelegt (*blocking*), um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verringern. 5 % Milch wurde aus 2,5 g Milchpulver (Blottin Pulver fettarm; Roth), gelöst in PBST (PBS + 0,05 % Tween) (AppliChem), hergestellt. Die Membran wurde in der Milch für 45 min geblockt und anschließend, entsprechend der zu analysierenden Proteingröße anhand des *Ladders* zugeschnitten.

### 2.2.4 Antikörper (Immunoblot)

Ein spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichteter Antikörper  $\alpha$  (Primärantikörper) bildet beim Immunoblot gemeinsam mit dem Membran-fixierten-Protein einen Antigen-Antikörper-Komplex. Im Anschluss an die Inkubationszeit folgt das Auftragen des Sekundärantikörpers. Die Arbeitsschritte sind nachfolgend erläutert:

Zunächst wurde der Primärantikörper zugegeben und in entsprechender Konzentration und nach entsprechender Inkubationszeit (*siehe Tabelle 3*) in 5 % Milch inkubiert. Danach wurde die Membran dreimalig mit PBST (0,05 % Tween) gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper in 5 % Milch inkubiert. Aus unseren Vordaten waren die Konzentrationen und Inkubationszeiten bekannt (Dango et al. 2011);  $\alpha$ OTUD4 wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 3: Charakteristika der Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalognummer (CatNo.)	Konzentration	Inkubationszeit
<b>Primärantikörper</b>				
$\alpha$ OTUD4	Abcam, Milton, GB	#ab106971	1:2000	2,5 h bei Raumtemperatur (RT)
$\alpha$ ALKBH3	Merck Millipore, USA	# 09882	1:2000	2 h bei RT
$\alpha$ H3 (Ladungskontrolle )	Abcam, Milton, GB	# ab1791	1:3000	1 h bei RT
<b>Sekundärantikörper</b>				
goat-anti-rabbit	Acris, Herford, BRD	R1364HRP	1:30000	45 min bei RT

Nach erneutem Waschen mit PBST (0,05 % Tween) erfolgte die Zugabe von 1500  $\mu$ l (750  $\mu$ l farblos; 750  $\mu$ l braun) ECL Lumina Forte Western HRP (*enhanced luminol-based chemiluminescent substrate*; Merck Millipore). ECL enthält das Dioxetan Luminol. Durch Zugabe des Substrates wird die Oxidation von Luminol gestartet. Die dabei entstehende Lumineszenz wurde mittels Kamera „Image Quant LAS 4000 mini“ (GE Healthcare-Bio Sciences AB, Little Chalfont, Großbritannien) aufgefangen und die gesuchten Proteinbanden sichtbar gemacht.

## 2.3 MG132-Experiment

### 2.3.1 Prinzip

Um sich der Hypothese zu nähern, dass ALKBH3 proteasomal degradiert wird, wurde in diesem Experiment der proteasomale Abbau durch den Proteasominhibitor MG132 unterbunden und die Auswirkung auf die Konzentration von ALKBH3 beobachtet. MG132 ist ein spezifischer, reversibler und membrangängiger Proteasominhibitor, welcher den Abbau von ubiquitin-gebundenen Proteinen durch den 26S-Proteasomkomplex reduziert. Anhand unterschiedlicher Einwirkdauer des Inhibitors wurde eine Veränderung in der Konzentration an ALKBH3 mittels Western Blot abgebildet.

## 2.3.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Es wurden in einer 6-Well-Platte pro Well je 10  $\mu$ M MG132 (Merck Millipore) zu PC3 hinzugegeben. Nacheinander, das heißt in jedem Well für sich, wurde das Experiment durch Zellyse abgestoppt. Dies geschah nach 1, 2, 4, 8, 16 und 24 h. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Da der Inhibitor in DMSO gelöst ist, wurde eine Kontrolle mit der Zugabe von 0,1 % DMSO angefertigt, um einen Einfluss desselben auszuschließen.

## 2.4 RNA - Interferenz (RNAi)

### 2.4.1 Prinzip der gezielten genetischen Repression mittels RNAi (Knockdown)

Die gezielte Repression einzelner Gene und konsekutiv ihrer Proteinprodukte ist eine Methode, welche von Craig Mello und Andrew Fire 1998 entwickelt wurde und für die sie 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten ([www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org) 2014).

Ziel ist es, die Expressivität von Genen durch An- und Abschalten derselben zu beeinflussen. Technisch wird der Vorgang genutzt, um ein Gen beziehungsweise das Translationsprodukt, funktionell untersuchen zu können.

Der Prozess ist darüber hinaus ein endogener Prozess in Zellen, welcher physiologisch bei der autogenen Regulation bei Tumoren eine Rolle spielt. Im Prinzip wird durch Ausschalten einer spezifischen *messenger RNA* (mRNA) die Translation verhindert und somit das zugehörige Gen in seiner Expressivität herunter reguliert (*siehe Abbildung 8*).

Hauptagent der technisch genutzten RNAi ist ein doppelsträngiges RNA-Molekül, die sogenannte *small interfering RNA* (siRNA). Durch das Enzym *Dicer* wird dieses in Fragmente von 21 Basenpaaren (bp) geschnitten. An den Enden gibt es symmetrische Überhänge von 2 - 3 Nukleotiden (nt) am 3'-Ende sowie 3'-hydroxyl(OH)Gruppen und Phosphatgruppen am 5'-Ende. Letztere müssen bei exogenen siRNAs durch Kinasen unter ATP-Verbrauch angehängt werden. Die siRNA formt nun mit zellulären Proteinen den *RNA-induced-silencing-complex* (RISC). RISC enthält eine Helicase und entwindet so den siRNA-Doppelstrang unter ATP-Verbrauch. Eine zur gegebenen siRNA komplementäre mRNA kann nun durch eine an RISC assoziierte Endoribonuclease geschnitten und damit unbrauchbar gemacht werden. Je nach Organismus können verschiedene Moleküle eine RNAi-vermittelte Repression triggern,

zum Beispiel lange doppelsträngige RNAs (dsRNAs), *endogene hairpin micro RNAs* (miRNAs) oder Plasmid-basierende *short hairpin RNAs* (shRNAs) (Mittal 2004).

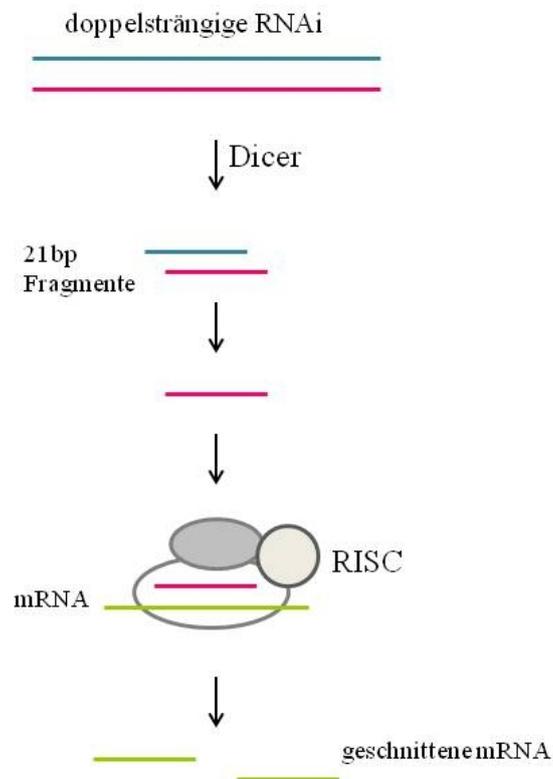
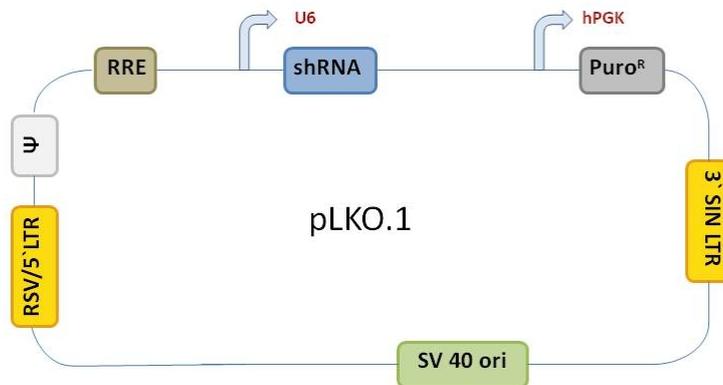


Abbildung 8: RNAi-vermittelte genetische Repression in Säugetieren (modifiziert nach Mittal 2004; S.355-365)

Die gezielte genetische Repression der für die Dissertation verwendeten Enzyme ALKBH3 und OTUD4 erfolgte durch den Einsatz kommerziell erhältlicher *Short-hairpin-RNA*-Konstrukte, welche eine Haarnadel-Struktur ermöglichen und erzwingen. Diese ist im Gegensatz zu der doppelsträngigen siRNA haarnadelförmig strukturiert und somit stabiler, arbeitet jedoch nach dem gleichen Prinzip. Verwendet wurden in den Versuchen Plasmidprodukte, welche nach Amplifikation und Aufreinigung, gefolgt von der Virusherstellung eine lentivirale Infektion der Zielzelle und eine gezielte genetische Repression ermöglichen. Im Prinzip enthalten die Konstrukte neben der eigentlichen Zielsequenz einen Promotor, Transkriptionsfaktoren sowie Selektionsmarker. Promotor und Transkriptionsfaktoren dienen dazu, den Vektor in der Zielzelle exprimieren zu können. Die Selektionsmarker ermöglichen es, in der Selektion (*siehe 2.4.5*) ausschließlich Zellen zu erhalten, welche die shRNA integriert haben.

In der nachfolgenden Abbildung 9 ist der verwendete Vektor pLKO.1 von Open Biosystems schematisch in modifizierter Ansicht dargestellt. Die Erklärung der einzelnen Vektorbestandteile findet sich in Tabelle 4.



**Abbildung 9:** Schematische Übersicht über den pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektor (modifiziert nach OpenBiosystems); Abkürzungen sind in Tabelle 4 erläutert

**Tabelle 4:** Abkürzungen der Vektorelemente des pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektors

Vektorelement	Funktion
U6	Promotor für die Expression des Zielgens in den Zielzellen
shRNA	Sequenz des Zielgens der angestrebten genetischen Repression
hPGK	Humane Phosphoglycerat Kinase (Promotor für die Expression des Puromycin-Resistenzgens)
Puro <sup>R</sup>	Puromycin-Resistenzgen
3'SIN LTR	3' self-inactivating long terminal repeat für mehr lentivirale Sicherheit
SV 40 ori	Promotor für vermehrte Expression
RSV/ 5'LTR	RSV Promotor / 5' long terminal repeat für eine starke lentivirale Transkription
Ψ	Psi packing sequenz für das lentivirale "Genompacking"
RRE	Rev response element für mehr Effizienz beim „Packing“

## 2.4.2 Amplifikation spezifischer shRNAi-Vektoren

Alle für unsere Versuche verwendeten shRNAis sind kommerziell von der Firma OpenBio-systems (USA) erhältlich. Eine Übersicht gibt die Tabelle 5 unter Punkt 2.4.6. Nach Erhalt wurden die Vektoren in 250 ml *lysogeny broth* (LB) Nährmedium mit Ampicillin (Roth; Konzentration 100 mg/ml) bei 37 °C über Nacht inkubiert und am Folgetag das Plasmid aufgereinigt. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte gemäß den Herstellerangaben des verwendeten *PureLink<sup>®</sup> HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (Life Technologies). Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert (7500 rpm, 10 min, 4 °C) und in R3-Puffer mit RNase resuspendiert. Anschließend wurden eine Lyse in L7-Puffer und die Präzipitation in N3-Puffer durchgeführt. Abschließend folgte das Auftragen auf eine *PureLink<sup>®</sup> HiPure Plasmid Filtersäule* und zweimaliges Waschen (W8). Die Plasmidausfällung erfolgte dann zunächst mit Isopropanol (Merck Millipore) und der anschließenden Resuspension in 50 µl 10 mM-Tris-HCL Puffer (TrisBase). Schließlich konnte mittels Spektrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) die Plasmidkonzentration bestimmt werden.

## 2.4.3 Transfektion

Im nächsten Schritt erfolgte unter Zuhilfenahme lentiviraler Helfervektoren das Vermehren der Plasmidvektoren in 293T-Zellen, im Prozess der Transfektion. Ziel war dabei die Herstellung lentiviraler Partikel, die nach Lyse der synthetisierenden Zellen den Überstand mit dem Lentivirus-tragenden Plasmid beinhalten. Für die Transfektion wurde die embryonale Nierenzelllinie 293T verwendet. Es wurden lentivirale Helfervektoren benötigt, welche die Information über die für die Replikation des Plasmidvektors benötigten Enzyme tragen und ein Einschleusen in das Genom der humanen Zielzelle erreichen.

Die Transfektion wurde nach folgender Arbeitsweise durchgeführt: Zu 900 µl *Opti-MEM Reduced Serum Medium* (Optimem, Life Technologies) wurden 30 µl TransIT-293 (Mirus Bio, USA) zugegeben, gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. In einem zweiten Eppendorfröhrchen wurden zu 100 µl Optimem 8 µg aufgereinigtes Plasmid (shRNA) mit dem Gemisch aus lentiviralen Helfervektoren zusammengefügt. Der Lenticocktail enthält insgesamt vier Helferplasmide (pHDM-VSVG, pHDM-tat1b, pHDM-Hg<sub>PM2</sub> und pRC-CMV-RaII; Konzentrationen und Bezug der Vektoren von Yang Shi Lab, Harvard University, Boston, USA; Details siehe Dango et al. 2011). Der Inhalt des zweiten Eppendorfröhrchens wurde sehr vorsichtig zum ersten dazugegeben und für 20 min bei

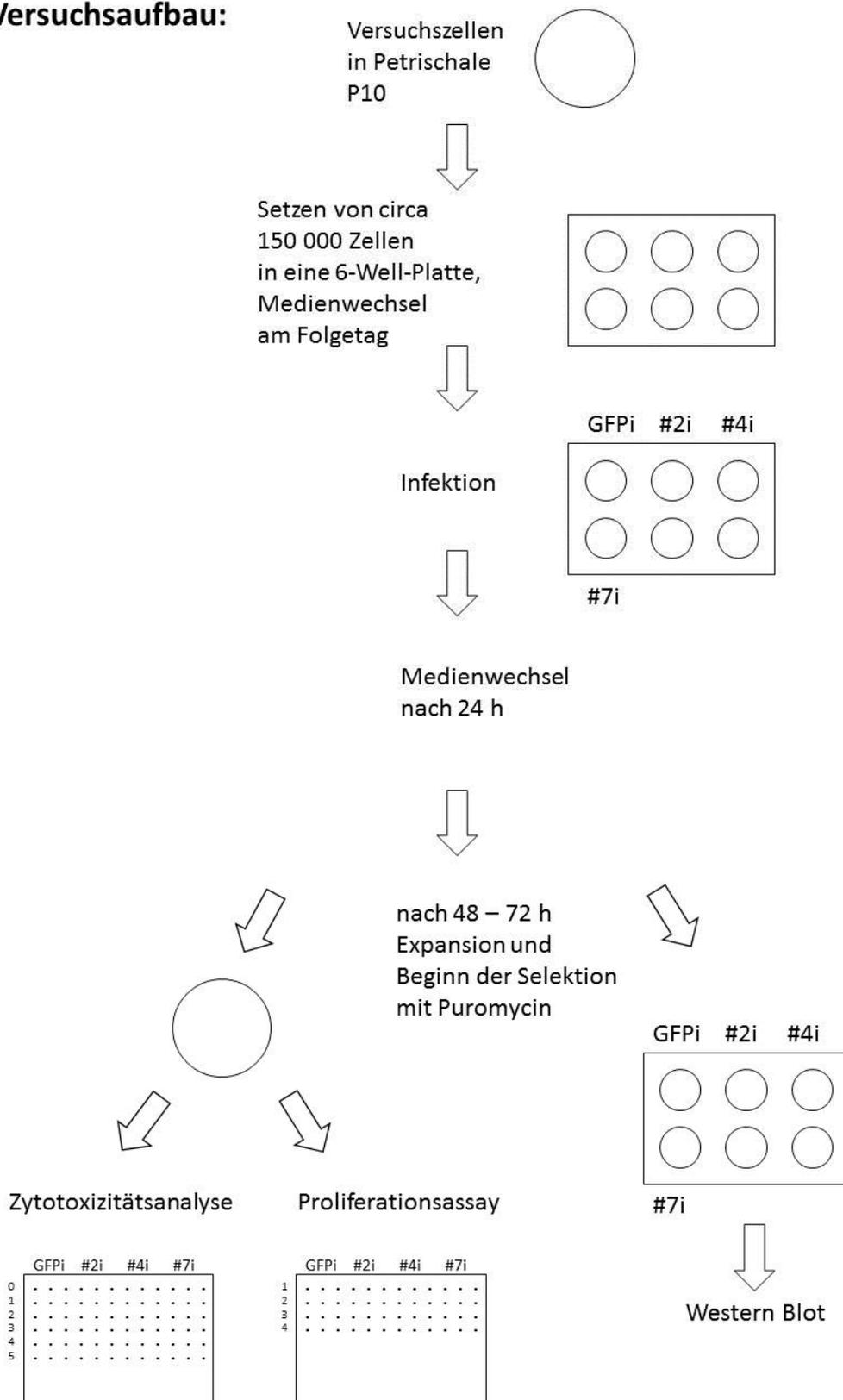
Raumtemperatur stehen gelassen. Zuletzt wurde die Mischung tropfenweise zu den 293T Zellen mit einer Zelldichte von circa 60 - 70 % in die 10-cm-Petrischalen gegeben und über Nacht inkubiert. Nach 48 - 72 h (Farbumschlag von rot zu gelb/orange) wurde der virale Überstand gefiltert (0,2 µm Filter, Rotilabo R-Spritzenfilter, Roth) und bei -80 °C eingefroren. Alle lentiviralen Manipulationen in der Zellkultur verlangten eine Durchführung im S2-Labor der Abteilung Kardiologie (Leiter AG Molekulare Kardiologie PD Dr. T. Seidel) der Universitätsmedizin Göttingen.

#### **2.4.4 Infektion**

Im Anschluss an die Transfektion wurden die humanen Zielzellen mit den lentiviralen shRNAi-Plasmiden infiziert. Eine Übersicht über den Versuchsablauf gibt Abbildung 10. Die zu infizierenden Zellen wurden in 6-Well-Platten gesetzt und am Folgetag nach einem Mediumwechsel erfolgte die Infektion. Die Zellen wurden mit 1 - 2 ml lentiviralem Überstand und 1 ml Medium über Nacht inkubiert. Zusätzlich wurde das kationische Polymer Polybrene (Hexadimethrin Bromid, Sigma) in der Konzentration 3 - 5 µg/ml hinzugegeben. Polybrene dient der Neutralisierung ladungsbedingter Interferenzen zwischen dem Virion und Molekülen der Zelloberfläche und ermöglicht eine bessere Aufnahme der viralen Partikel in die Zelle. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und ein Waschgang mit PBS durchgeführt.

#### **2.4.5 Selektion**

Die Selektion ist notwendig, um mit ausschließlich den Zellen weiterarbeiten zu können, welche die shRNA auch wirklich in ihr Genom integriert haben. Da der Plasmidvektor ein Resistenzgen gegen Puromycin enthält, kann man durch Zugabe von Puromycin prüfen, ob die shRNA integriert ist. Nur infizierte Zellen tragen das Resistenzgen und dieses ist für das Überleben der Zellen unter Selektionsdruck zwingend erforderlich. Für die Selektion wurden die infizierten Zellen in Petrischalen P10 unter der simultanen Gabe von 1 - 1,5 µg Puromycin-Dihydrochlorid (Life Technologies) expandiert. Die Prüfung auf Effizienz der genetischen Repression (Knockdown) erfolgte konsekutiv auf Proteinebene mittels Western Blot (*siehe Kapitel 2.2*).

**Versuchsaufbau:**

**Abbildung 10:** Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau mit Infektion, Selektion, Zytotoxizitätsanalyse, Proliferationsassay und Western Blot

## 2.4.6 Analyse der Effektivität der genetischen Repression

Um eine effiziente genetische Repression in den Versuchen zu erzielen, wurden zunächst in Vorversuchen in 293T-Zellen eine Reihe von shRNAi-Vektoren getestet, welche eine Repression von OTUD4 erzielen. Als Positivkontrolle wurde in den Vorversuchen der shRNAi-Vektor #48i verwendet, da mit diesem Vektor ein effizienter Knockdown von ALKBH3 erreichbar ist (Dango et al. 2011). Als Negativkontrolle haben wir sowohl in den Vorversuchen als auch für die späteren Versuchsreihen den shRNAi-Vektor #GFPi (*Green fluorescent protein*) verwendet. #GFPi ist ein Vektor, welcher sich wie alle oben genannten in das Genom integriert, aber keinen biologischen Effekt generiert. Für die Zelllinien RWPE und H23 wurde als Negativkontrolle die Zelllinie als Wildtyp (WT) gewählt, da diese zu sensibel auf die shRNA #GFPi reagieren.

Die Effektivität des Knockdowns, wurde mittels Western Blot abgebildet. Getestet wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten und darunter stehenden Vektoren:

*Tabelle 5: Übersicht der getesteten shRNAis*

shRNAi-Vektor	CatNo.	Herkunft/ Firma
#48i (ALKBH3#1i)	TCRN0000064748	Open Biosystems
#11i (OTUD4#3i)	TCRN0000134411	Open Biosystems
#53i (OTUD4#4i)	TCRN0000135253	Open Biosystems
#58i (OTUD4#5i)	TCRN0000134658	Open Biosystems
#59i (OTUD4#6i)	TCRN0000133659	Open Biosystems
#70i (OTUD4#7i)	TCRN0000138670	Open Biosystems

Die verwendeten shRNAi-Vektoren #2i (OTUD4#2i), #3i (OTUD4#1i) und #GFPi wurden freundlicherweise von Yang Shi (Lab, Harvard University, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Vektoren aus Tabelle 5 sind im Ergebnis- und Diskussionsteil unter den in Klammern stehenden Bezeichnungen genannt.

## 2.5 Zytotoxizitätsanalyse

### 2.5.1 Prinzip

In diesem Experiment wurden in genetisch manipulierten Zelllinien im Sinne von Repression der OTUD4-Expression exogen DNA-Methylierungsschäden induziert. Ziel war es, anschließend das Überleben der Zellen (ohne das Vorhandensein von OTUD4) zu untersuchen. Eine Substanz, die einen solchen exogenen Methylierungsschaden induziert, ist Methylmethansulfonat (MMS). Nach Zugabe dieser Substanz werden Basen der DNA durch Anhängen einer Methylgruppe verändert (Alkylierung). Unter anderem entsteht so das 3Methylcytosin mit toxischer und mutagener Wirkung. Das Überleben wurde nach Behandlung mit MMS mittels photometrischen Verfahrens ermittelt. Die Durchführung des Assays wurde in Triplikaten angelegt.

### 2.5.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Nach abgeschlossener Selektion wurden 4000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte gesetzt. Am nächsten Tag wurde Methylmethansulfonat (MMS; Sigma-Aldrich) in Konzentrationen von 0, 1, 2, 3, 4 und 5 mM zugegeben. In einer Verdünnungsreihe wurden die Konzentrationen im entsprechenden Medium so hergestellt, dass pro Well 100 µl gefüllt werden konnten. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Verdünnung durch frisches Medium ersetzt. 48 h nach Setzen des Alkylierungsschadens folgte die Messung der lebenden Zellen. Als Messverfahren diente das *Cell Titer 96 Aqueous One Solution-Kit* (Promega, USA). Die Lösung des *Cell Titer 96 Aqueous One Solution-Kits* beinhaltet kombiniert ein Tetrazolium-Gemisch (MTS) und ein Electron-Bindungs-Reagenz (PES). Das gelbe MTS wird von den Zellen zu braunem Formazan reduziert. Da dies nur bei lebenden Zellen der Fall ist, ist die Zahl der lebenden Zellen proportional zu der Quantität von Formazan. Die Messung basiert also auf einem semiquantitativen Messverfahren. Um die Reaktion zu starten, wurde die *PMS Solution* als Aktivator zu *Cell Titer 96 Aqueous One Solution* zugegeben und gemischt. Zu 1 ml *Cell Titer 96 Aqueous One Solution* wurden 50 µl *PMS Solution* gegeben. Unmittelbar nach Aktivierung wurde die Lösung zu den Zellen in die 96-Well-Platten (20 µl pro Well) gegeben. Nach 3 h Inkubationszeit bei 37 °C wurde das gebildete Formazan bei einer Wellenlänge von 490 nm mit „*Victor™ X4 2030 Multilabel Reader*“ (PerkinElmer, USA) gemessen und der Farbumschlag semiquantitativ dokumentiert.

## 2.6 Proliferationsassay

### 2.6.1 Prinzip

Diesem Experiment lag die Untersuchung des durch Stoffwechselfvorgänge entstehenden zell-eigenen (endogenen) Methylierungsschadens zugrunde. Es wurde hier also, im Gegensatz zur Zytotoxizitätsanalyse, keine exogene Methylierungsquelle verwendet. Der Versuch erfolgte über vier Tage mit täglichen Messungen der lebenden Zellen, ebenfalls semiquantitativ, durch Verwendung des *Cell Titer 96 AQueous One Solution-Kits* (siehe 2.5.2). Ziel war es, das Wachstum in der An- beziehungsweise Abwesenheit von OTUD4 zu objektivieren. Auch dieser Assay wurde in Triplikaten angelegt.

### 2.6.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Der Proliferationsassay wurde parallel zur Zytotoxizitätsanalyse durchgeführt. Die Zellen wurden ebenso nach erfolgter Selektion in 96-Well-Platten gesetzt. Hierzu lag die Zellzahl jedoch bei 2000 Zellen pro Well. An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurde, zu je einer Reihe der Platte, MTS hinzugegeben und nach oben beschriebener Methode (siehe 2.5.2), mittels *Cell Titer96 AQueous One Solution Kits* gemessen.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel (Office 2007). Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit einem abhängigen T-Test (Paardifferenztest) überprüft.

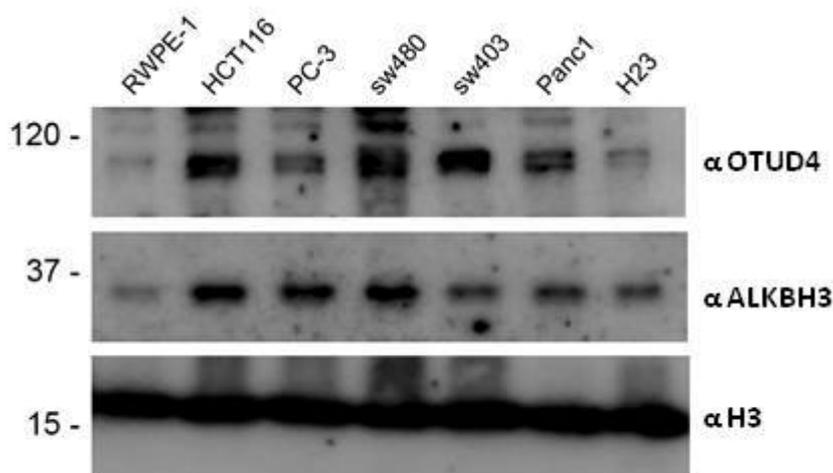
Es wurde von einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  ausgegangen. Als hochsignifikant wurde  $\alpha = 0,01$  festgelegt. Daraus ergibt sich, dass bei einem  $p < 0,05$  die Alternativhypothese zulässig wird.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Auswahl der Zelllinien

Die Charakterisierung der Interaktion von ALKBH3 und OTUD4 erfolgte initial mit der Expressionsanalyse beider Proteine mittels Western Blot. Untersucht wurden die Tumorzelllinien HCT116, PC3, sw480, sw403, Panc1 und H23. Als nicht maligne Zelllinie zum Vergleich wurde die benigne Prostatazelllinie RWPE verwendet.

In nachfolgender Abbildung sind links am Bildrand die atomaren Massen skaliert und rechts die untersuchten Zielproteine angegeben. Von oben nach unten stehen die Banden von OTUD4 mit einer atomaren Masse von circa 117 Kilodalton (kDa), darunter ALKBH3 mit einer atomaren Masse von circa 33 kDa und in der untersten Reihe H3 als Ladungskontrolle mit einer atomaren Masse von circa 16 kDa. Die Darstellung in dieser Reihenfolge, nach Proteingröße, wird für alle unten stehenden Western Blots beibehalten und hier exemplarisch erklärt. Der obere Bildrand gibt in allen unten stehenden Western Blots jedoch, abweichend von der hier dargestellten Abbildung, die unterschiedliche Behandlung jeweils derselben Zelllinie an.



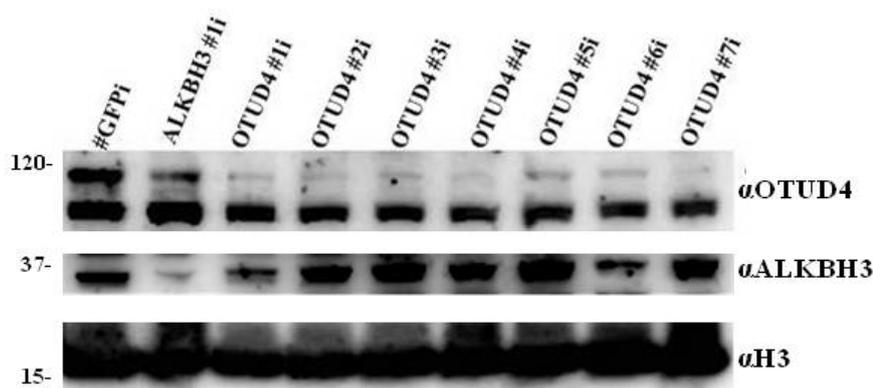
**Abbildung 11:** *Expressionsmuster von OTUD4 und ALKBH3 in den verschiedenen Zelllinien; Detektion mittels spezifischer Antikörper gegen OTUD4 und ALKBH3*

Abbildung 11 zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Ladung (*siehe H3*). In allen Tumorzelllinien ist eine Koexpression von OTUD4 und ALKBH3 erkennbar. Eine besonders starke Expression beider Enzyme zeigen die Kolorektalen Zelllinien (HCT116, sw480 und sw403).

Für PC3 und Panc1 ist ebenso eine deutliche Expression beider Proteine in etwas geringerem Ausmaß zu erkennen. H23 zeigt eine eher schwache Expression von OTUD4, insbesondere im Vergleich mit der Expression von ALKBH3. Die benigne Prostatazelllinie RWPE stellt eine nur schwache Expression beider Enzyme dar.

## 3.2 Auswahl der shRNAs

Zum Erzielen einer bestmöglichen genetischen Suppression (Knockdown) wurden 7 verschiedene shRNAs, welche OTUD4 herunterregulieren, in 293T-Zellen getestet. Daneben sind #GFPi als Negativkontrolle und die shALKBH3#1i, welche einen etablierten effizienten Knockdown von ALKBH3 generiert (Dango et al. 2011), als Positivkontrolle dargestellt.



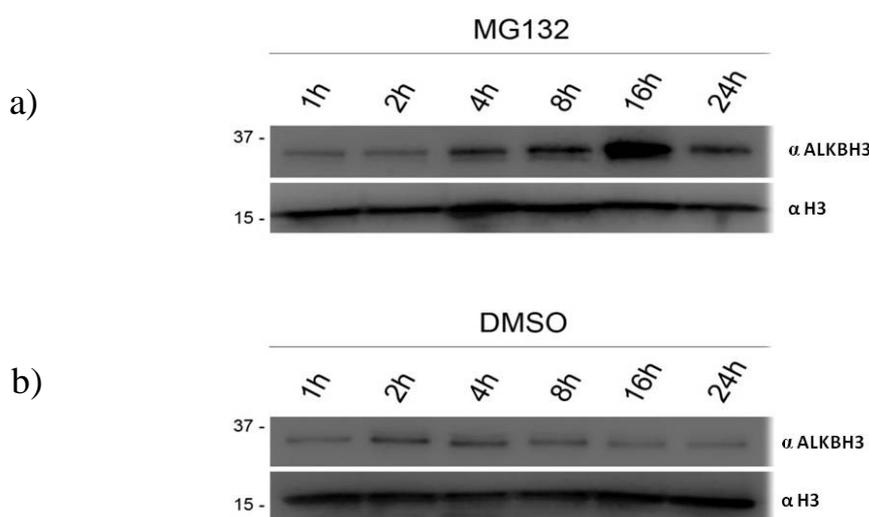
*Abbildung 12: Knockdownvergleich von OTUD4 der verschiedenen shRNAs; Detektion mittels spezifischer Antikörper gegen OTUD4 und ALKBH3*

Auch hier zeigt sich in der obigen Abbildung eine gleichmäßige Ladungsverteilung von H3. Alle ausgewählten shRNAs mit dem Zielgen OTUD4 erzielen auch einen Knockdown von OTUD4. Einen sehr effizienten Knockdown zeigen die shRNAs OTUD4#2i, OTUD4#4i und OTUD4#7i. Sie wurden deshalb für die Zytotoxizitätsanalyse und den Proliferationsassay ausgewählt. Mit allen drei shRNAs wurde zunächst innerhalb jeder Zelllinie parallel gearbeitet und es wurden, je nach Effizienz des Knockdowns, die jeweils 2 besten jeder Zelllinie unter Punkt 3.4 dargestellt. Die Negativkontrolle #GFPi zeigt keine Suppression von OTUD4. Die Positivkontrolle ALKBH3#1i zeigt eine gute Suppression von ALKBH3 und interessanterweise auch eine leichte Suppression von OTUD4.

### 3.3 MG132-Experiment

Die Grundlage dieses Experiments bildet die Annahme, dass ALKBH3 proteasomal abgebaut wird. Da Ubiquitin Proteine zum Abbau markiert, könnte OTUD4 als Deubiquitinase an der Regulation des Abbaus von ALKBH3 beteiligt sein. Um Hinweise zur Bekräftigung der Hypothese zu erhalten, dass ALKBH3 über den Ubiquitin-Abbauweg degradiert wird, war das MG132-Experiment wichtig.

Es wurde der Proteasominhibitor MG132 verwendet, um nach unterschiedlicher Einwirkdauer einen Effekt auf die Proteinmenge an ALKBH3 abbilden zu können.



**Abbildung 13:** Western Blot zum Nachweis unterschiedlicher Mengen an ALKBH3 in Abhängigkeit von der proteosomalen Aktivität; Expression detektiert mittels spezifischer Antikörper gegen ALKBH3 a) Zeitverlauf über 24 h Einwirkzeit des Proteasominhibitors MG132 b) Zeitverlauf über 24 h Einwirkzeit von DMSO (Kontrolle)

Der Western Blot in Abbildung 13a) zeigt zunächst eine gleichmäßige Ladungsverteilung (H3). Die Proteinmenge an ALKBH3 steigt nach einer Einwirkzeit von 4 h an und erreicht ihren Höhepunkt bei einer Einwirkzeit von 16 h. Bei der Messung nach 24 h hat die Menge an ALKBH3 bereits wieder abgenommen.

Abbildung 13b) zeigt einen Durchlauf des Experiments mit der Substanz DMSO als Kontrolle (siehe 2.3. Arbeitsprogramm und Materialien). Auch hier ist zunächst eine gleichmäßige Ladungsverteilung festzustellen (H3). Ein minimaler Anstieg der Menge an ALKBH3 ist nach 2 h und 4 h Stunden ablesbar. Insgesamt ist jedoch eine nahezu gleiche Menge an ALKBH3 zu allen Zeitpunkten vorhanden.

### 3.4 Zytotoxizitätsanalyse und Proliferationsassay

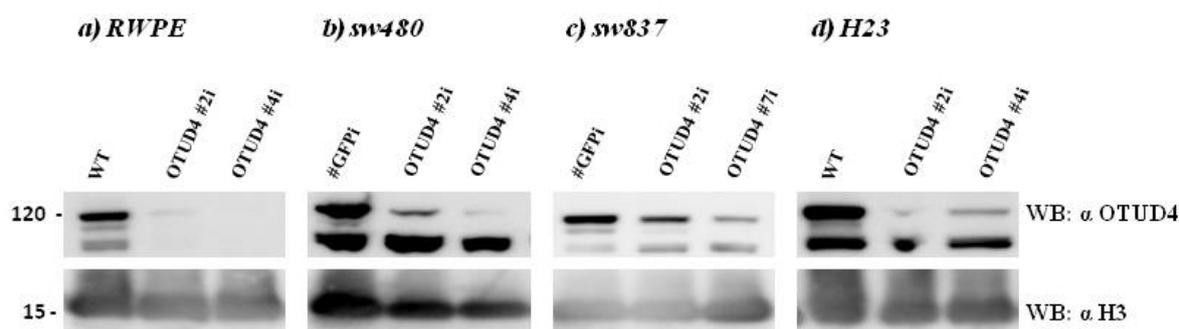
Die Zytotoxizitätsanalyse und der Proliferationsassay waren der Kern der Untersuchungen, mit dem Ziel, den Einfluss von OTUD4 auf die Resistenz der Zellen gegenüber exogenen und endogenen Noxen beurteilen zu können. Nach der genetischen Repression des Enzyms OTUD4 wurden die Zellen im Rahmen der Zytotoxizitätsanalyse der alkylierenden Substanz MMS in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt, um die Resistenz gegenüber exogenen Noxen abzubilden. Die Abbildung der Resistenz gegenüber endogenen Noxen (toxische Zellstoffwechselprodukte) erfolgte im Rahmen des Proliferationsassays, welcher ebenfalls nach Knockdown des Enzyms OTUD4 durchgeführt wurde. Hierbei wurde das Wachstum an vier aufeinanderfolgenden Tagen verfolgt. In beiden Experimenten war das relative Überleben der Zellen der maßgebende Faktor.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Zytotoxizitätsanalyse und Proliferationsassay jeder Zelllinie einzeln unter den Punkten 3.4.2 und 3.4.3 in Form von Graphen abgebildet. Vorangehend sind die zugehörigen Abbildungen der Knockdowns aller Zelllinien unter 3.4.1 zusammenfassend dargestellt.

Die Darstellungen der Wachstumskurven von Zytotoxizitätsanalyse und Proliferationsassay beruhen auf den Mittelwerten aus den als Triplikaten angelegten Versuchen. Um die Graphen besser vergleichen zu können, wurden sie alle auf 1 genormt. Der blaue Graph stellt sowohl in der Ergebnisdarstellung der Zytotoxizitätsanalyse als auch des Proliferationsassays die Kontroll-shRNA #GFPi beziehungsweise im Falle der Zelllinien RWPE und H23 den Wildtyp (WT) dar. Der rote und der grüne Graph stellen jeweils eine der zwei besten shRNAs der Zelllinie dar. Dies waren für RWPE, sw480 und H23 OTUD4#2i und OTUD4#4i. Für die Zelllinie sw837 wurden OTUD4#2i und OTUD4#7i ausgewählt. Zur vereinfachten Darstellung sind die Graphen nach der Behandlung mit den shRNAs benannt und da es sich im Folgenden immer um shRNAs von OTUD4 handelt, sind sie ab Punkt 3.4.2 fortlaufend in abgekürzter Form im Sinne von #2i, #4i und #7i beschriftet.

### 3.4.1 Western Blots

Zum Nachweis der genetischen Repression von OTUD4 in den Zelllinien, mit welchen die Zytotoxizitätsanalyse und der Proliferationsassay durchgeführt wurden, sind nachfolgend die Western Blots abgebildet.



**Abbildung 14:** Darstellung der Western Blots aller Zelllinien a) RWPE b) sw480 c) sw837 d) H23; Detektion mittels spezifischer Antikörper gegen OTUD4

Abbildung 14a) der Zelllinie RWPE zeigt eine gering höhere Proteinladung unter der Bande WT (*siehe H3*). Die genetische Repression von OTUD4 ist bei OTUD4#4i vollständig und bei OTUD4#2i nahezu vollständig.

Die Zelllinie sw480 in Abbildung 14b) zeigt ebenfalls eine geringfügig höhere Ladungsverteilung der Bande #GFPi (*H3*). Unter der Bande OTUD4#2i ist gegenüber #GFPi eine deutlich verminderte Proteinmenge von OTUD4 sichtbar, während unter der Proteinbande OTUD4#4i nahezu kein OTUD4 mehr vorhanden ist.

Sw837 (*Abbildung 14c*) zeigt eine nahezu ausgeglichene Ladungsverteilung (*H3*) und eine abnehmende OTUD4-Bandenstärke von #GFPi über OTUD4#2i zu OTUD4#7i.

Abbildung 14d) der Zelllinie H23 zeigt eine vollständig ausgeglichene Ladungsverteilung (*H3*) und eine kräftige Abbildung der OTUD4-Bande WT. Unter OTUD4#2i ist nur noch eine sehr geringe Menge an OTUD4 vorhanden und unter OTUD4#4i ist die OTUD4-Bande deutlich geschwächt.

### 3.4.2 Zytotoxizitätsanalyse

Die folgenden Abbildungen zeigen das relative Überleben der Zellen nach Behandlung mit der alkylierenden Substanz MMS, als Ergebnis der Zytotoxizitätsanalyse.

Auf der X-Achse ist die zugegebene Menge an MMS in mM aufgetragen; auf der Y-Achse das entsprechende relative (rel.) Überleben der Zellen. Die p-Werte für jede Konzentration an MMS sind jeweils rechts neben den Abbildungen in einer Tabelle, auf zwei Nachkommastellen gerundet, angegeben und relevante Werte (*siehe Kapitel 4 Diskussion*) mit dem Sternchensymbol \* als signifikant beziehungsweise \*\* hochsignifikant in den Graphen abgebildet.

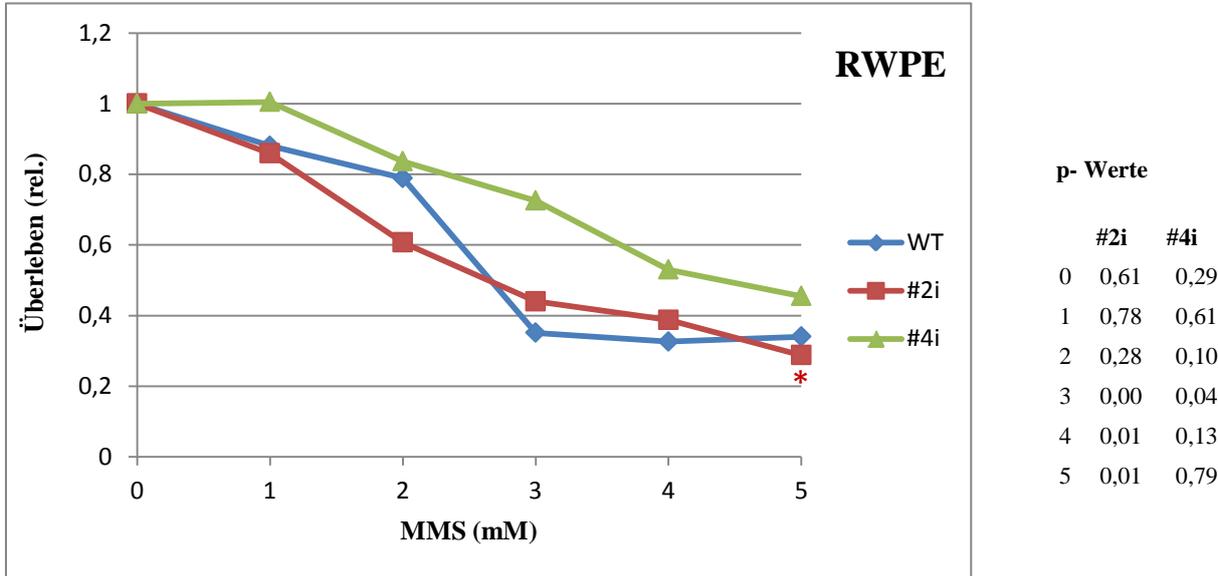


Abbildung 15: Zytotoxizitätsanalyse der benignen Prostatazelllinie RWPE

Abbildung 15 zeigt die Reaktion der benignen Prostatazelllinie RWPE. Mit steigender Konzentration von MMS fallen die Graphen gemäß der Erwartung, jedoch liegt der Graph der Kontrolle WT zwischen und unterhalb der Graphen #2i und #4i.

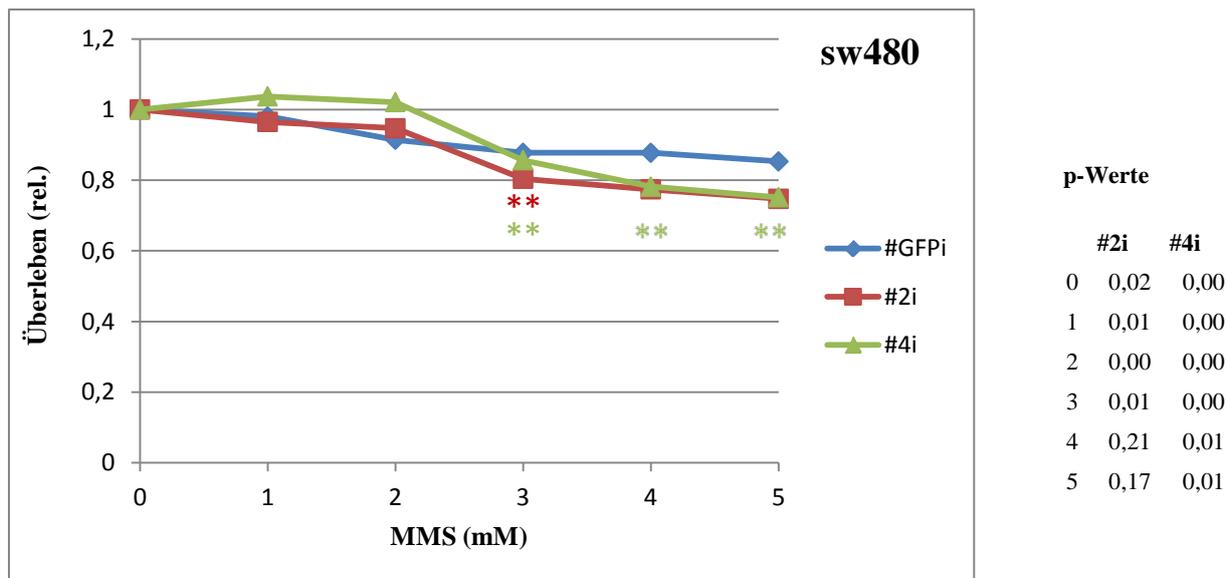


Abbildung 16: Zytotoxizitätsanalyse der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie sw480

Die Zelllinie des Kolorektalen Adenokarzinoms sw480 zeigt anhand des Verlaufs der Graphen in Abbildung 16 eine geringe Sensitivität gegenüber MMS. Dennoch ist auch hier mit steigender Konzentration an MMS ein Abfall der lebenden Zellen dargestellt, jedoch ohne kontinuierlich erkennbarem Unterschied zwischen #GFPi und #2i oder #4i.

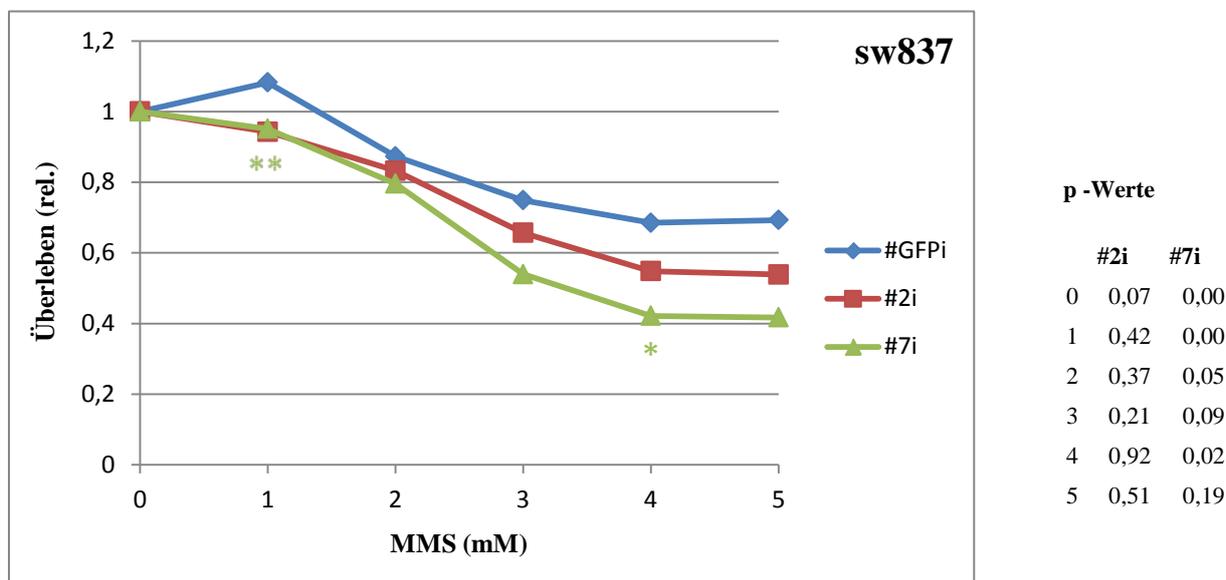


Abbildung 17: Zytotoxizitätsanalyse der rektalen Adenokarzinomzelllinie sw837

Abbildung 17 zeigt die rektale Adenokarzinomzelllinie sw837. Insgesamt ist ein Abfall der Kurven zu sehen mit Abflachung ab 4 mM MMS.

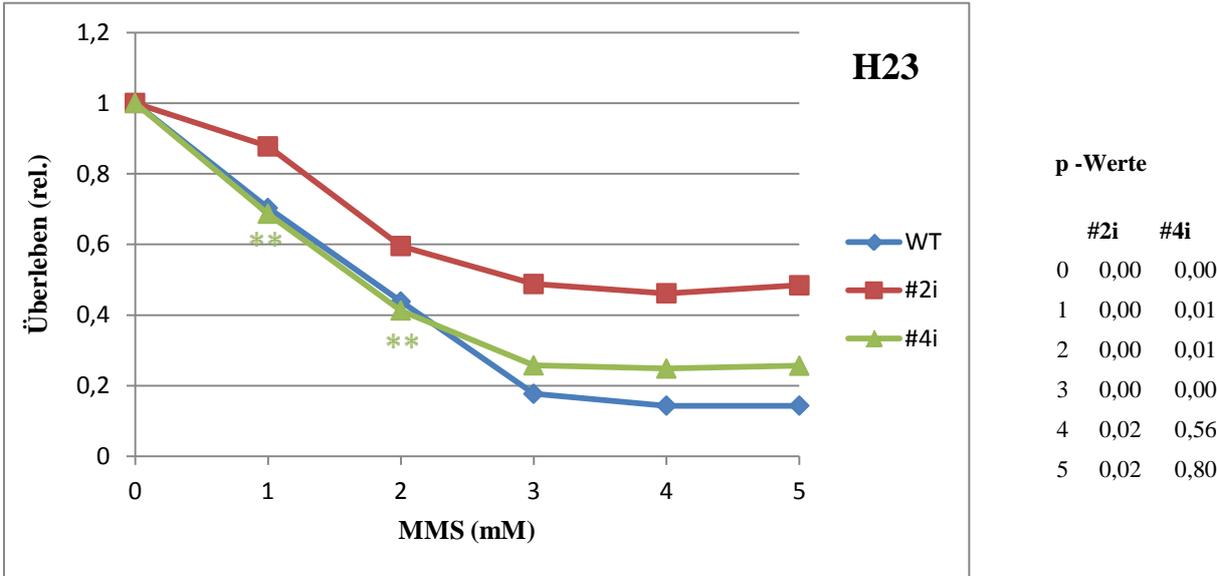


Abbildung 18: Zytotoxizitätsanalyse der nichtkleinzelligen Adenokarzinomzelllinie der Lunge H23

In Abbildung 18 sind die Graphen der nichtkleinzelligen Adenokarzinomzelllinie der Lunge H23 dargestellt. Es zeigt sich eine starke Sensitivität gegenüber der Substanz MMS. Die Graphen fallen mit einer Abflachung ab 3 mM MMS stark ab. Der Graph #2i verläuft bei allen Konzentrationen signifikant oberhalb der Kontrolle WT. Dieser Effekt ist für den Graphen #4i erst ab 3 mM in sehr schwacher Ausprägung erkennbar.

### 3.4.3 Proliferationsassay

Nachfolgend sind die Ergebnisse des Proliferationsassays abgebildet. Hier sind die Tage, an denen sich endogene Methylierungsschäden entwickeln konnten, auf der X-Achse und die an den entsprechenden Tagen gemessenen Absorptionen von Formazan auf der Y-Achse aufgetragen. Wie auch in der Zytotoxizitätsanalyse, entspricht die gemessene Absorption der Menge an lebenden Zellen in relativen Zahlen. Zur einheitlichen Darstellung und auf Grund des gleichen Messverfahrens wird auch hier die Y-Achse mit „Überleben (rel.)“ beschriftet. Rechts von den Graphen sind auch hier die p-Werte für jeden Tag einzeln in einer Tabelle angegeben (gerundet auf zwei Nachkommastellen). Signifikante und hochsignifikante Werte mit Relevanz sind durch das Sternchensymbol (\* beziehungsweise \*\*) in den Graphen selbst gekennzeichnet.

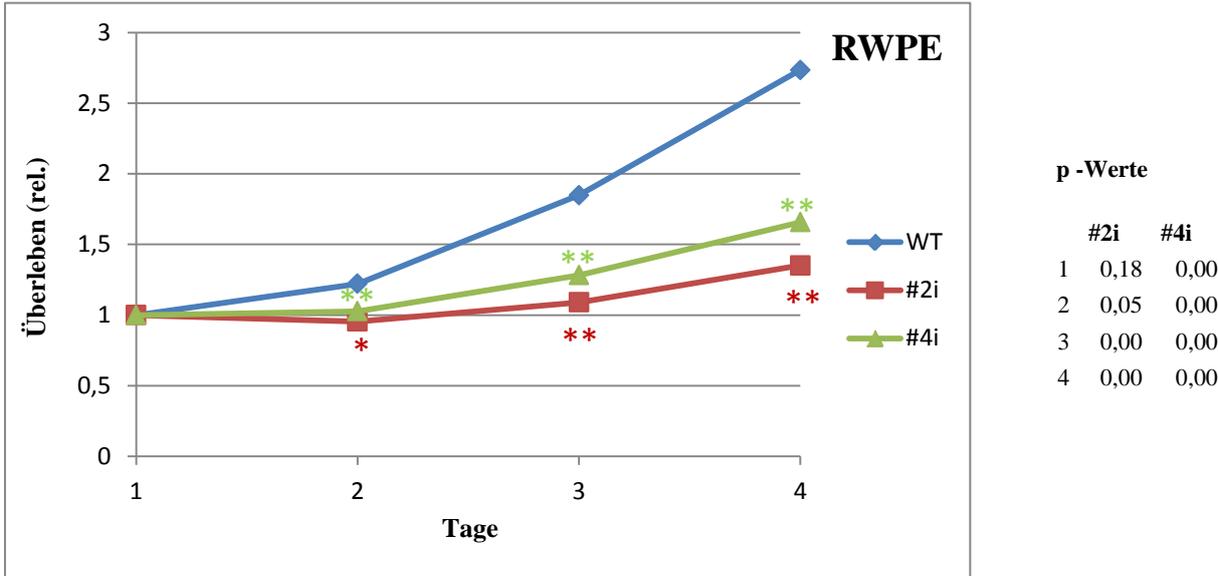


Abbildung 19: Proliferationsassay der benignen Prostatazelllinie RWPE

In Abbildung 19 lässt sich für die gutartige Prostatazelllinie RWPE ein steigender Wachstumsverlauf in allen drei Graphen erkennen. Die Steigung des Graphen WT als Kontrolle ist im Vergleich mit Graph #2i als auch #4i signifikant bis hochsignifikant höher.

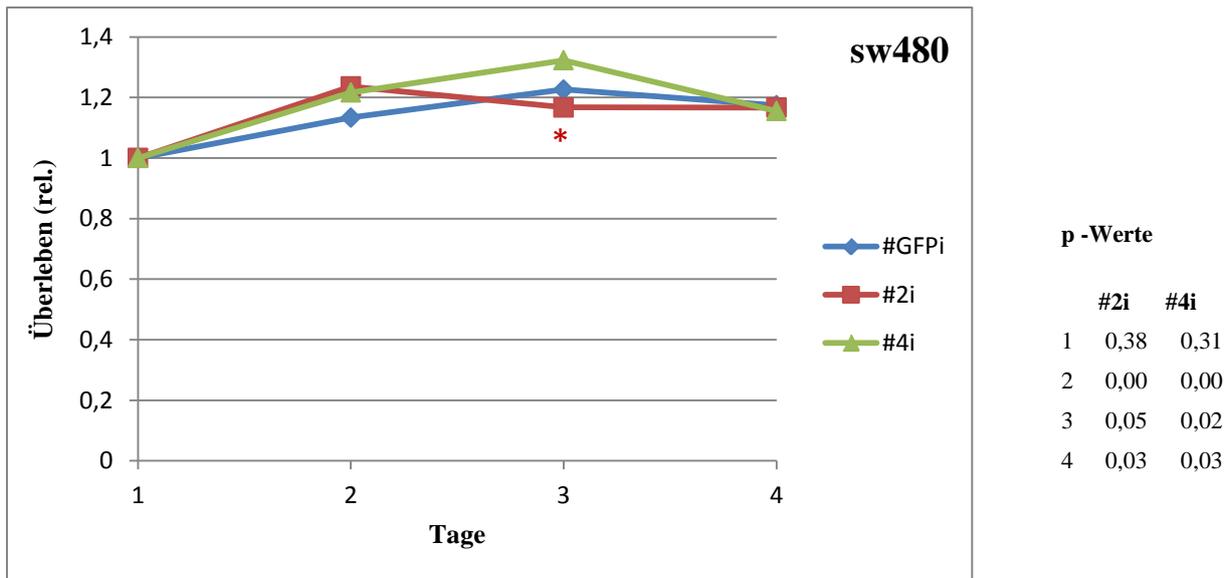


Abbildung 20: Proliferationsassay der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie sw480

In der Darstellung der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie sw480 beschreiben alle drei Graphen über vier Tage hinweg ein sehr langsames Wachstum, mit Abflachung und anschließendem Abfall der Kurven ab Tag drei. Die Kontrolle #GFPi verläuft unterhalb und zwischen den Graphen #2i und #4i.

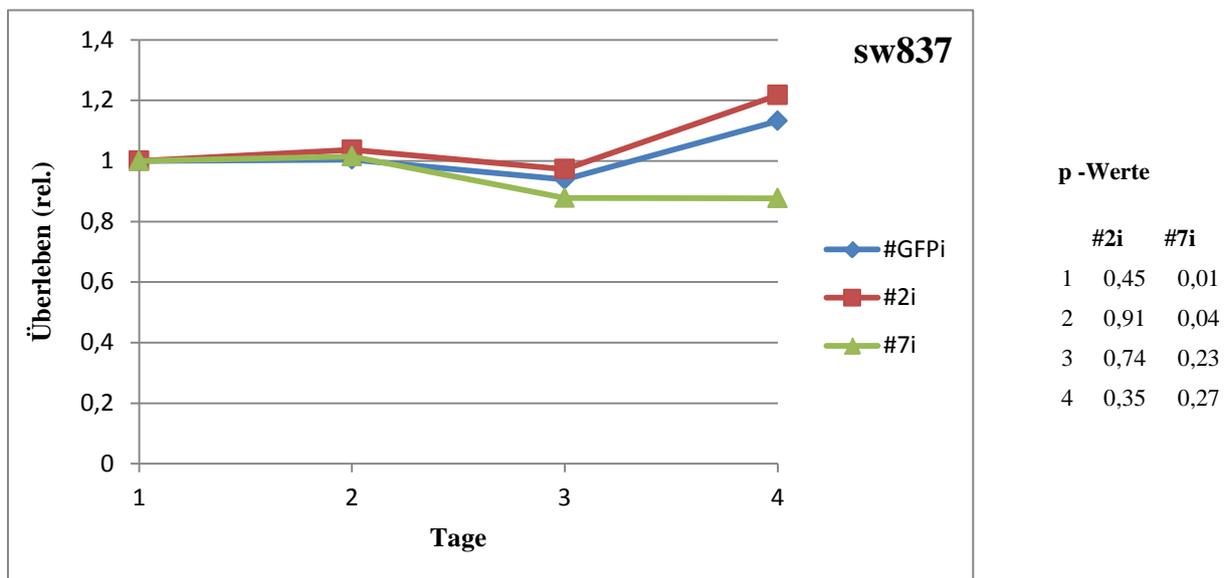


Abbildung 21: Proliferationsassay der rektalen Adenokarzinomzelllinie sw837

In Abbildung 21 ist das Wachstum der rektalen Adenokarzinomzelllinie sw837 dargestellt. Die Graphen zeigen auch hier insgesamt ein sehr langsames Wachstum der Zelllinie, welches zunächst kaum vorhanden und erst ab Tag drei, zumindest für die Graphen #GFPi und #2i, zu verzeichnen ist. Auch hier verläuft der Graph #GFPi zwischen den Knockdowngraphen.

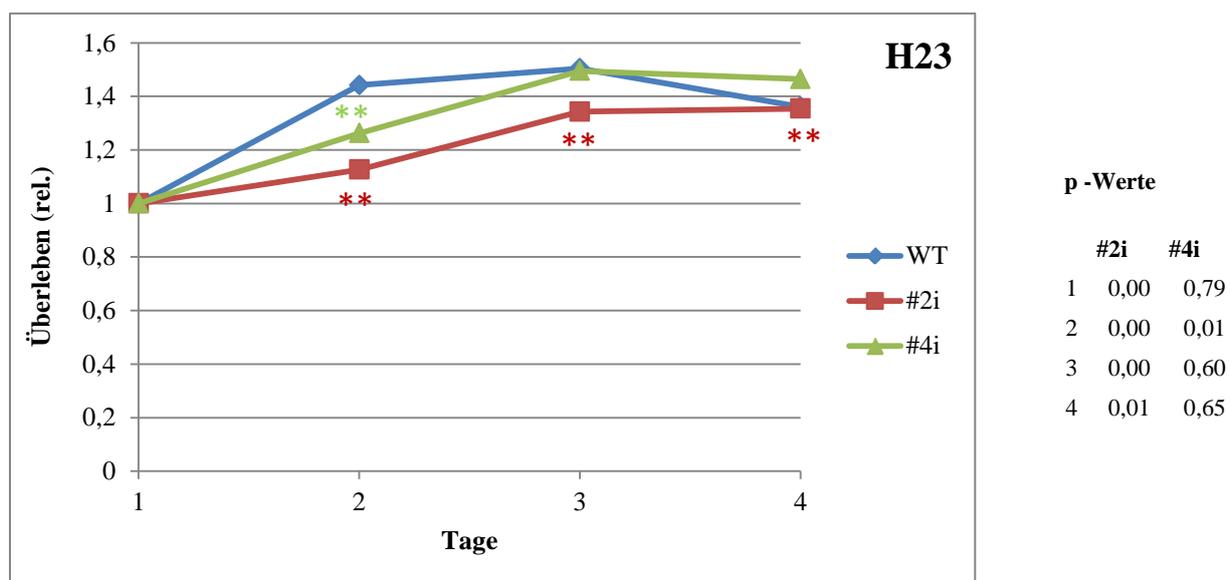


Abbildung 22: Proliferationsassay der nichtkleinzelligen Adenokarzinomzelllinie der Lunge H23

Abbildung 22 zeigt den Wachstumsverlauf der Zelllinie H23. Diese wird klassifiziert als nichtkleinzelliges Adenokarzinom der Lunge. Die Graphen verlaufen steigend bis Tag drei, um dann zu Tag vier abzufachen beziehungsweise abzufallen. Der Graph #2i steigt an allen Tagen hochsignifikant geringer, als der Graph WT. Für den Graphen #4i ist dies nur an Tag zwei feststellbar.

## 4 Diskussion

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung war, ob OTUD4 Einfluss auf die Funktion von ALKBH3 und respektive Tumorprogression hat.

OTUD4, als Deubiquitinase und als ein Aktionspartner von ALKBH3 klassifiziert und identifiziert, schien auch auf Grund der vielversprechenden Vorergebnisse in der Zelllinie PC3 (*aus eigenen Daten unveröffentlicht siehe 1.5 Zusammenwirken von OTUD4 und ALKBH3*) eine entscheidende Rolle in der Regulation von ALKBH3 zu spielen. Die dargelegten Ergebnisse geben einen ersten Hinweis auf die Regulation von ALKBH3 durch OTUD4 und auf eine gemeinsame Funktion bei der Tumorpheriferation epithelialer Tumore.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des MG132-Experimentes, der Zytotoxizitätsanalyse und des Proliferationsassays im Einzelnen interpretiert und unter Einbeziehung von Vorergebnissen und Methodik diskutiert.

### 4.1 MG132-Experiment

Der deutliche Anstieg der Menge an ALKBH3 nach Blockieren des proteasomalen Abbauges durch den Proteasominhibitor MG132 spricht für den vermuteten proteasomalen Abbau von ALKBH3. Nach 4 h Einwirkzeit des Inhibitors MG132 ist eine Zunahme der Menge an ALKBH3 sichtbar. Bei den Messungen nach 1 h und nach 2 h ist zunächst kein Effekt erkennbar (*siehe Abbildung 13a*). Dies kann bedeuten, dass die Wirkung von MG132 nur langsam einsetzt oder dass es alternative Abbauges gibt, die zunächst die Blockade des proteasomalen Abbaus kompensieren können und dann ab einer gewissen Menge an ALKBH3 nach 4 h nicht mehr ausreichen. Hinzu kommt, dass die Methode keine absolute Messung von ALKBH3 ermöglicht und eine Mengenänderung von ALKBH3 in der Abbildung nur bei einer stärkeren Zunahme erkannt wird. Die Abnahme der Menge an ALKBH3 bei der letzten Messung, die nach 24 h erfolgte, könnte ebenso dafür sprechen, dass der proteasomale Abbauges nicht der einzig mögliche ist und eventuell zeitabhängig, alternativ mögliche Abbauges die Blockade des proteasomalen Abbauges vollständig kompensieren können. Da es sich bei MG132 um einen reversiblen Inhibitor handelt, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass die Wirkung von MG132 bei der Messung nach 24 h schon wieder weitestgehend aufgehoben worden ist. Ein Effekt der Lösungssubstanz DMSO konnte bei gleichbleibender Menge an ALKBH3 (*siehe Abbildung 13b*) ausgeschlossen werden. Bei der Untersuchung handelt es sich um

eine indirekte Untersuchung, welche zum Beweis der Hypothese nicht ausreichend ist, jedoch den Stellenwert eines proteasomalen Abbaus von ALKBH3 hinreichend untermauert. Die Erkenntnis des proteasomalen Abbaus von ALKBH3 findet sich auch in neueren Untersuchungen wieder. Durch Immunoprecipitation konnte gezeigt werden, dass ALKBH3 tatsächlich durch das UPS abgebaut und unter Einwirkung des Proteasominhibitor MG132 stabilisiert, das heißt vor dem Abbau geschützt ist (Zhao et al. 2015).

## 4.2 Zytotoxizitätsanalyse und Proliferationsassay

### 4.2.1 Zytotoxizitätsanalyse

Die Annahme zu dieser Untersuchung war, dass OTUD4 wichtig für die Bewältigung von exogen induzierten Methylierungsschäden ist, indem es den proteasomalen Abbau von ALKBH3 durch Deubiquitinierung desselben verhindert.

Respektive sind wir davon ausgegangen, dass die genetische Repression von OTUD4 einen zumindest indirekten Einfluss auf die Funktion von ALKBH3 beziehungsweise die Tumorpherifation in An- und Abwesenheit von alkylierenden Substanzen hat. Die Hypothese wurde durch die Zytotoxizitätsanalyse in Anwesenheit von MMS geprüft.

Die benigne Prostatazelllinie RWPE zeigt eine gute Sensitivität gegenüber MMS, unabhängig von der vorherigen Behandlung. Der Kontrollgraph verläuft zwischen den beiden Knockdownreihen und es ist daher kein kontinuierlicher Effekt der Suppression von OTUD4 feststellbar. Einzelne signifikante Werte sind nicht in einem sinnvollen Zusammenhang als Effekt des Knockdowns zu werten. Die benigne Zelllinie RWPE dient in der Versuchsreihe unter anderem dazu, einen Vergleich zwischen malignen und benignen Zelllinien anstellen zu können. Sie zeigt in Abbildung 11 eine nur geringe Expressivität von sowohl OTUD4 als auch ALKBH3. Dies lässt daher eine geringe Abhängigkeit von OTUD4 zur Bewältigung von exogenen und endogenen Noxen vermuten.

Die Überlebenskurven der Zytotoxizitätsanalyse bilden insbesondere für die Zelllinie sw480 und in geringerem Ausmaße auch für die Zelllinie sw837 eine geringe Sensitivität gegenüber der Substanz MMS ab. Dies ist unserer Einschätzung nach im Zusammenhang mit einem sehr langsamen Wachstum (*siehe Abbildung 20 und 21*) zu sehen. Die Zelllinie sw480 zeigt signifikante bis hochsignifikante p-Werte, allerdings beziehen sich diese zum Teil auf einen Unterschied in umgekehrter als der zu erwartenden Richtung. Das heißt die Kurven verlaufen oberhalb der Kontrolle #GFPi beziehungsweise in der auf 1 genormten Darstellung (*Abbildung*

16) sowohl oberhalb als auch unterhalb. Es ist somit kein kontinuierlicher Effekt auszumachen.

Die Zelllinie sw837 zeigt eine etwas stärkere Sensitivität im Vergleich zu sw480. Der Verlauf in der genormten Darstellung (*Abbildung 17*) lässt einen Effekt des Knockdowns vermuten. Tatsächlich jedoch geben die p-Werte nur für die sh#7i und hier nur für einzelne Werte Signifikanz an. Die Graphen beider Knockdowngraphen verlaufen oberhalb des #GFPi-Graphen in der nicht genormten Darstellung. Insgesamt ist also auch hier von keinem Effekt des Knockdowns auszugehen.

Die Zelllinie H23 zeigt eine starke Sensitivität gegenüber MMS, dennoch auch hier ohne erkennbaren Effekt des Knockdowns in erwarteter Weise. Die p-Werte sind ebenso signifikant bis hochsignifikant, jedoch verlaufen die Knockdowngraphen hauptsächlich oberhalb der Kontrolle WT (*siehe Abbildung 18*). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den neueren Untersuchungen, welche eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber MMS nach Knockdown von OTUD4 nachweisen (Zhao et al. 2015). Da es sich um eine gleiche Untersuchung handelt sind bei unseren Versuchen die Qualität der shRNAs und die erzielten Knockdowns kritisch zu hinterfragen. Es wurde in unseren Versuchen der WT als Kontrolle verwendet und ein Einfluss der verwendeten shRNAs ist nicht sicher auszuschließen.

## 4.2.2 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay wurde durchgeführt, um den Einfluss von OTUD4 auf endogene Methylierungsschäden abzubilden. Durch die oben genannte Annahme war zu erwarten, dass Zellen, in welchen das Enzym OTUD4 herunterreguliert worden war, weniger gut mit den natürlichen endogenen Methylierungsschäden umgehen können und deshalb weniger gut wachsen würden.

Die benigne Prostatazelllinie RWPE zeigt einen signifikanten Effekt sowohl der mit #2i als auch der mit #4i behandelten Zellen. Bis auf Tag 2 für #2i sind die Werte sogar als hochsignifikant zu werten. Da RWPE als Zelllinie wichtig ist, zum Vergleich zwischen benignen Zellen und malignen Zellen, war die Erwartung auch auf Grund der Vorergebnisse (*siehe Dango et al. 2011*) ein Ausbleiben des Effektes in dieser Zelllinie. Die geringe Menge an OTUD4 und ALKBH3 im Western Blot (*siehe Abbildung 11*), insbesondere im Vergleich mit den malignen Zelllinien, ließ darüber hinaus, wie auch für die Zytotoxizitätsanalyse, eine geringe Abhängigkeit von OTUD4 und ALKBH3 zur Bewältigung von exogenen und endogenen Noxen

vermuten. Allerdings ist in dem Knockdown in Abbildung 14 ein nahezu vollständiges Verschwinden von OTUD4 zu sehen. Dies könnte bedeuten, dass bei vollständigem Ausschalten des Enzyms OTUD4 auch in der benignen Zelllinie ein Effekt erkennbar wird. Fraglich bleibt aber dennoch die Differenz dieses Ergebnisses zu dem Ergebnis von RWPE in der Zytotoxizitätsanalyse.

Die Wachstumskurven des Proliferationsassays zeigen für die Zelllinien sw480 und sw837 bei insgesamt sehr langsamem Wachstum keinen kontinuierlichen Effekt, denn in beiden Fällen verläuft die Kontrolle #GFPi zwischen den Graphen von #2i und #4i beziehungsweise #7i. Einzelne Werte erscheinen als signifikant, sind jedoch auch hier in keinen sinnvollen Zusammenhang im Sinne eines Effektes von OTUD4 zu bringen. Vermutlich ist für diese beiden Zelllinien auf Grund des langsamen Wachstums die Anzahl der gemessenen Tage nicht ausreichend, um einen Effekt feststellen zu können. Zur Beurteilung von endogenen und exogenen Noxen und des Einflusses von OTUD4 wäre es daher sicherlich in der Zukunft interessant, diese Zelllinien noch einmal über einen längeren Zeitraum beobachten zu können.

Die Zelllinie H23 zeigt einen kontinuierlichen Effekt in der mit #2i behandelten Reihe, für die mit #4i behandelten Zellen ist jedoch nur an Tag zwei ein Effekt erkennbar. Bei dieser Zelllinie ist der erwartete Effekt zunächst sehr stark und geht dann mit Abflachung der Kurven für die mit #4i behandelten Zellen gänzlich verloren. Für die mit #2i behandelten Zellen bleibt der Effekt zwar vorhanden, jedoch liegen die relativen Werte vor dem Normen auf 1 von WT und #2i auch sehr viel niedriger als die Werte von #4i. Dennoch wäre ein Effekt für diese Zelllinie mit den neueren Ergebnissen von Zhao et al. vereinbar. Eine mögliche Erklärung für die Abflachung könnte eine Hemmung des Wachstums durch die zunehmende Zelldichte sein. Für diesen Fall wäre es sinnvoll, die Zellzahl zu Beginn des Versuchs, beim Setzen der Zellen in die 96-Well-Platten zu reduzieren oder über eine andere geeignete Messmethode in größeren Platten nachzudenken. Es wurden in der hier vorgelegten Arbeit Protokolle mit definierten Zeitpunkten für die Versuchsreihe vorgesehen, jedoch erlauben unsere Ergebnisse weitere Tests in der Zukunft und könnten dazu beitragen, weitere Zellen über längere Zeiträume zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich sowohl für die Zytotoxizitätsanalyse als auch für den Proliferationsassay kein eindeutiger Effekt der genetischen Repression von OTUD4 in erwarteter Weise feststellen. Zumindest in den untersuchten Zelllinien ist der angenommene Effekt, welcher bei

den PC3 Zellen in den Vorversuchen zu sehen war, nicht reproduzierbar. Die Gründe hierfür können sehr vielfältig sein. Wie für H23 schon erwähnt, könnte dies auch bei den übrigen Zelllinien an den verwendeten shRNAs liegen und möglicherweise auf On/Off-Target-Effekten beruhen. Dies bedeutet, dass die shRNAs selber das Experiment und den zellulären Effekt beeinflusst haben könnten. Wie ebenfalls oben erwähnt, ist für die Zelllinien sw480 und sw837 ein Ausbleiben des Effektes auf Grund des langsamen Wachstumsverhaltens wahrscheinlich. Um dies zu optimieren, wäre eine Variation der untersuchten Tage (*Proliferationsassay*) und eventuell auch eine Verlängerung der Zeit zwischen Setzen der Zellen in die 96-Well-Platten und Zugabe von MMS (*Zytotoxizitätsanalyse*) für weitere Untersuchungen sinnvoll, um eine längere Wachstumsphase und bessere Beurteilbarkeit dieser Zelllinien zu gewährleisten. Denkbar wäre außerdem eine Variation der Zahl der zu setzenden Zellen oder der zugegebenen Menge an MMS (*Zytotoxizitätsanalyse*) im Allgemeinen.

Darüber hinaus ist es wichtig zu bedenken, dass die Untersuchungen auf einem In-vitro-Modell basieren, welches in verschiedenen Zelllinien angewandt wurde. Damit sind die Bedingungen der Zellen für Wachstum anhand von wissenschaftlichen Standards sichergestellt, es wird jedoch möglicherweise nur ein Teil der Komplexität eines Organismus abgebildet. Dies bedeutet auch, dass Regulationsmechanismen eines Modells sich dem In-vivo-Mechanismus annähern, jedoch nicht vollständig darauf übertragen werden können. Unbekannte Faktoren können nicht erfasst werden, und technische Effekte sind trotz sorgfältiger Arbeit nach wissenschaftlichem Standard nicht gänzlich auszuschließen. Zudem ist es wahrscheinlich, dass sich das Modell nicht auf jede Zelllinie übertragen lässt und manche der Zelllinien möglicherweise über einen bis dato ungeklärten Mechanismus einen etwaigen Effekt der genetischen Repression von OTUD4 kompensieren können. Ein solcher Mechanismus wäre zum Beispiel die Überexpression von ALKBH3 (Zhao et al. 2015). Zumindest für die Zelllinie sw480 ließe sich dies als Argument nachvollziehen, da sie eine sehr gute Expression von ALKBH3 zeigt (*siehe Abbildung 11*).

Auch wenn die Ergebnisse von Zytotoxizitätsanalyse und Proliferationsassay unter den oben genannten Aspekten nicht den Erwartungen entsprechen, so ist ein Nebenbefund der Untersuchungen dennoch herauszustellen. Abbildung 12 stellt den Knockdownvergleich von OTUD4 der verschiedenen shRNAs dar. Hierbei zeigt die Positivkontrolle ALKBH3#1i eine gute Suppression von ALKBH3 und interessanterweise auch eine leichte Suppression von OTUD4. Dies lässt eine Abhängigkeit von OTUD4 von der Expression von ALKBH3 vermuten und unterstreicht die Hypothese, dass OTUD4 und ALKBH3 abhängige Partner sind.

---

Neuere Ergebnisse beantworten die Fragestellung, ob OTUD4 Einfluss auf die Funktion von ALKBH3 hat, grundlegend. Nach Spezifizierung der Struktur und Arbeitsweise von OTUD4 konnte gezeigt werden, dass OTUD4 innerhalb eines DUB-Komplexes arbeitet. So ist OTUD4 mit Hilfe der Domäne DRD (*deubiquitinase recruiting domain*) dafür zuständig, zwei weitere DUBs (USP7, USP9X) zu rekrutieren. USP7 und USP9X deubiquitiniere ALKBH3 und können das Protein somit stabilisieren (Zhao et al. 2015). Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich um ein sehr komplexes und dynamisches Regulationssystem handelt, und es sind deshalb noch weitere Faktoren zu identifizieren und zu spezifizieren. Zum Beispiel bleibt es weiter spannend zu untersuchen, welche Aufgabe die eigentliche katalytische Einheit von OTUD4 erfüllt (Zhao et al. 2015). Es ist außerdem bekannt, dass OTUD4 als Regulator mehrerer Substrate fungiert und nicht exklusiv ALKBH3 reguliert. So ist es unter anderem daran beteiligt, *xeroderma pigmentosum complementation group C* (XPC) zu recyceln (D`Arcy et al. 2015).

Die Fragestellung nach dem Einfluss von OTUD4 auf die Tumorprogression ist aus den durchgeführten Untersuchungen nicht klar zu beantworten. Die dargelegten Ergebnisse lassen zunächst keinen Einfluss vermuten. Jedoch lässt die von Zhao et al. untersuchte Regulationsweise von OTUD4 und die Zytotoxizitätsanalyse der Zelllinien PC3 und H23 die begründete Hoffnung zu, in naher Zukunft eine weitergehende Beantwortung der Frage nach der Tumorprogression zu erlangen und behält OTUD4 als Therapieansatzpunkt weiterhin im Blickpunkt.

## 5 Zusammenfassung

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob OTUD4 einen Einfluss auf die Funktion von ALKBH3 und respektive die Tumorprogression hat.

Ein in den letzten Jahren intensiv beforschtes Gebiet ist die Inhibition von Deubiquitinasen mit einem möglichen Einfluss auf die antitumorale Therapie. Das *ubiquitin proteasom system* (UPS) ist ein grundlegender Mechanismus, um in Zellen Proteine abzubauen und ist damit an Prozessen wie Zellproliferation und Apoptose beteiligt (D`Arcy et al. 2015).

Die Annahme war, dass ALKBH3 proteasomal degradiert wird, OTUD4 diesen Prozess jedoch durch Deubiquitinierung verhindern könne und ALKBH3 somit stabilisiert.

Um diese Annahme zu untermauern, wurde zunächst die Menge an ALKBH3 nach Inhibition des 26S-Proteasomkomplexes durch eine Western-Blot-Analyse abgebildet und anschließend der Einfluss von Alkylierungsschäden in An- und Abwesenheit von OTUD4 in ausgewählten Tumorzelllinien mittels Zytotoxizitätsanalyse und Proliferationsassay untersucht.

Die Ergebnisse legen eine proteasomale Degradation von ALKBH3 nahe und weisen weiter auf eine Interaktion von OTUD4 und ALKBH3 hin. Die Untersuchungen in den Tumorzelllinien zeigen zunächst keinen Effekt von OTUD4 auf die Tumorprogression. Neuere Untersuchungen stellen den gesuchten Effekt in bestimmten Tumorzelllinien dar und spezifizieren OTUD4 als Teil eines Enzymkomplexes (Zhao et al. 2015). Diese neuen Erkenntnisse stützen somit die Annahme, welche dieser Arbeit zugrunde lag.

## 6 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Sterbefälle in Deutschland nach ausgewählter Tumorentität; je 100.000 Einwohner; altersstandardisiert; 1998-2011 .....</i>	<i>1</i>
<i>Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 - ohne nicht melanotischen Hautkrebs.....</i>	<i>2</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von OTUD4 mit N-terminaler funktioneller OTU-Domäne und Bindungsstelle für potentielle Ubiquitinmoleküle .....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 4: Kreislauf der Ubiquitinierung über die Enzyme E1, E2 und E3 und der Deubiquitinierung durch Deubiquitinasen (DUBs).....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 5: Modell einer möglichen Interaktion zwischen ALKBH3 und OTUD4 in Tumorzelllinien.. .....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 6: Zytotoxizitätsanalyse der Adenokarzinomzelllinie der Prostata PC3 a) nach genetischer Suppression von ALKBH3 b) nach genetischer Suppression von OTUD4 .....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 7: Rechnerische Ermittlung einer gewünschten Zellzahl nach Zellzahlzählung mit der Neubauer Zählkammer.....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 8: RNAi-vermittelte genetische Repression in Säugetieren .....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 9: Schematische Übersicht über den pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektor.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 10: Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau mit Infektion, Selektion, Zytotoxizitätsanalyse, Proliferationsassay und Western Blot .....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 11: Expressionsmuster von OTUD4 und ALKBH3 in den verschiedenen Zelllinien.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 12: Knockdownvergleich von OTUD4 der verschiedenen shRNAs.....</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 13: Western Blot zum Nachweis unterschiedlicher Mengen an ALKBH3 in Abhängigkeit von der proteosomalen Aktivität a) Zeitverlauf über 24 h Einwirkzeit des Proteasominhibitors MG132 b) Zeitverlauf über 24 h Einwirkzeit von DMSO (Kontrolle) .....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 14: Darstellung der Western Blots aller Zelllinien a) RWPE b) sw480 c) sw837 d) H23.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 15: Zytotoxizitätsanalyse der benignen Prostatazelllinie RWPE.....</i>	<i>40</i>

---

<i>Abbildung 16: Zytotoxizitätsanalyse der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie sw480</i> .....	41
<i>Abbildung 17: Zytotoxizitätsanalyse der rektalen Adenokarzinomzelllinie sw837</i> .....	41
<i>Abbildung 18: Zytotoxizitätsanalyse der nichtkleinzelligen Adenokarzinomzelllinie der Lunge H23</i> .....	42
<i>Abbildung 19: Proliferationsassay der benignen Prostatazelllinie RWPE</i> .....	43
<i>Abbildung 20: Proliferationsassay der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie sw480</i> .....	44
<i>Abbildung 21: Proliferationsassay der rektalen Adenokarzinomzelllinie sw837</i> .....	44
<i>Abbildung 22: Proliferationsassay der nichtkleinzelligen Adenokarzinomzelllinie der Lunge H23</i> .....	45

---

## 7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Tumorklassifikation nach TNM, Grading und Staging .....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 2: Zelllinien, Wachstumsbedingungen und Medien .....</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 3: Charakteristika der Antikörper .....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 4: Abkürzungen der Vektorelemente des pLKO.1 Puromycin-resistenten shRNAi-Vektors .....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 5: Übersicht der getesteten shRNAis .....</i>	<i>32</i>

## 8 Literaturverzeichnis

Aas PA, Otterlei M, Falnes PO, Vågbo CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjørås M, Slupphaug G, Seeberg E, Krokan HE (2003): Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421, 859–863

Atanassov BS, Koutelou E, Dent SY (2011): The role of deubiquitinating enzymes in chromatin regulation. *FEBS Lett* 585, 2016–2023

Balakirev MY, Tcherniuk SO, Jaquinod M, Chroboczek J (2003): Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep* 4, 517–522

Bergink S, Jentsch S (2009): Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461–467

Dango S, Mosammaparast N, Sowa ME, Xiong L, Wu F, Park K, Rubin M, Gygi S, Harper JW, Shi Y (2011): DNA unwinding by ASCC3 helicase is coupled to ALKBH3-dependent DNA alkylation repair and cancer cell proliferation. *Mol Cell* 44, 373–384

D'Arcy P, Wang X, Linder S (2015): Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 147, 32–54

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W: *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie* 15., komplett überarb. und neugestalt. Auflage; Thieme, Stuttgart [u.a.] 2005, 202-229; 745-760

Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2004): Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3, 1389–1407

Fortelny N, Cox JH, Kappelhoff R, Starr AE, Lange PF, Pavlidis P, Overall CM (2014): Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS Biol* 12, e1001869

Fraile JM, Quesada V, Rodríguez D, Freije JMP, López-Otín C (2012): Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 31, 2373–2388

Frankland-Searby S, Bhaumik SR (2012): The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1825, 64–76

Juhl H: Chirurgische Onkologie In: Henne-Bruns D, Kremer B, Dürig M (Hrsg.): Chirurgie. Duale Reihe. 3., vollständig überarb. und erw. Auflage; Thieme, Stuttgart 2007, 201–221

Konishi N, Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Mitsui E, Yoshikawa R, Yamamoto H, Tsujikawa K (2005): High expression of a new marker PCA-1 in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* 11, 5090–5097

Kouranti I, Peyroche A (2012): Protein degradation in DNA damage response. *Semin Cell Dev Biol* 23, 538–545

Krebs in Deutschland 2007/2008.

8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012

Lindl T: Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5., überarb. und erw. Auflage; Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin 2002

Lüllmann H, Mohr K, Hein L: Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen; 17., vollständig überarb. und neugestalt. Auflage; Thieme, Stuttgart [u.a.] 2010, 455-473

Mittal V (2004): Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* 5, 355–365

National Center for Biotechnology Information 2015: OTU domain-containing protein 4. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001096123.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001096123.1) (16.07.2015)

Nobelprize.org 2014. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/) (16.07.2015)

Ringvoll J, Nordstrand LM, Vågbo CB, Talstad V, Reite K, Aas PA, Lauritzen KH, Liabakk NB, Bjørk A, Doughty RW, Falnes PØ, Krokan HE, Klungland A (2006): Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *EMBO J* 25, 2189–2198

Sedgwick B (2004): Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 148–157

Statistisches Bundesamt 2013: Krebs immer häufiger Todesursache. [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/02/PD13\\_042\\_232.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/02/PD13_042_232.html) (16.07.2015)

Statistisches Bundesamt, DESTATIS, Todesursachenstatistik 1998 – 2011: Tabelle erstellt unter [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de) (02.07.2013)

Tasaki M, Shimada K, Kimura H, Tsujikawa K, Konishi N (2011): ALKBH3, a human AlkB homologue, contributes to cell survival in human non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 104, 700–706

WHO 2015: Cancer. Fact sheet N°297. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (16.07.2015)

Wittekind C: Klassifikation von Tumoren In: Siewert JR, Brauer RB, Stein HJ, Allgöwer M (Hrsg.): *Chirurgie*. 9., vollständig überarb. und neugestalt. Auflage; Springer-Medizin, Berlin/Heidelberg 2012, 160–178

Zhao Y, Majid MC, Soll JM, Brickner JR, Dango S, Mosammaparast N (2015): Noncanonical regulation of alkylation damage resistance by the OTUD4 deubiquitinase. *EMBO J* 34, 1687–1703

---

## **Danksagung**

Danken möchte ich der Klinik der Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, insbesondere der Arbeitsgruppe KFO179 für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Sebastian Dango, der diese Arbeit begleitet hat, angefangen von der Einführung in das Arbeiten im Labor bis zur Fertigstellung der Arbeit.

---

# Lebenslauf

Mein Name ist Eva Loidl, geboren in Neumarkt i. d. Opf. am 15.09.1987. Ich bin unverheiratet und habe keine Kinder.

Von 1994 - 1998 besuchte ich die Grundschule in Gersfeld/Rhön, gefolgt von dem Übergang auf die Gesamtschule „Rhönschule Gersfeld“ mit Absolvierung des gymnasialen Zweiges von 2000 - 2004. Beim Abgang von der Rhönschule Gersfeld in 2004 erlangte ich die Mittlere Reife. Die gymnasiale Oberstufe absolvierte ich 2004 - 2007 auf der Eduard-Stieler-Schule in Fulda. Im Juni 2007 schloss ich meine Schulbildung mit der Allgemeinen Hochschulreife ab.

Aus Interesse an sozialen Projekten und internationaler Zusammenarbeit schloss sich an die Hochschulreife ein 10-monatiger Europäischer Freiwilligendienst vom 01.09.07 – 30.06.08 in Finnland an. Der Inhalt war die Arbeit mit geistig behinderten Kindern und Jugendlichen.

Zum Wintersemester 2008/09 schlug ich die Studienlaufbahn ein. Zunächst begann diese mit dem Studium der Tiermedizin in München. Schon bald war ich von der Medizin sehr begeistert und wechselte zum Sommersemester 2009 zur Humanmedizin nach Göttingen. Nach dem 4. Semester absolvierte ich im März 2011 erfolgreich das Physikum.

Zum Wintersemester 2012/13 begann ich aus Interesse an der Onkologie in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral, und Kinderchirurgie am Universitätsklinikum Göttingen meine experimentelle Doktorarbeit.

Im April 2015 absolvierte ich den schriftlichen Teil des Staatsexamens erfolgreich und werde voraussichtlich im Nov/Dez 2016 mein Studium durch den mündlichen Teil des Staatsexamens vollständig abschließen.