

**Die Rolle von Embryonic Lethal Abnormal Vision-Like 1 im klarzelligen  
Nierenzellkarzinom und Chromosome 10 Open Reading Frame 99 als  
potentieller Biomarker**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Vanessa Kirsch

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Bayram Edemir

Gutachter: Prof. Dr. Martin Staeger, Halle (Saale)  
Prof. Dr. Giuliano Ciarimboli, Münster

Datum der Verteidigung: 16.02.2024

## Referat

Das mRNA-bindende Protein Embryonic Lethal Abnormal Vision-Like 1 (ELAVL1) wird in menschlichen Geweben nahezu ubiquitär exprimiert und ist in vielen Krebsarten überaktiv, da es Onkogenese-assoziierte RNAs stabilisiert (Wang, J. et al., 2013). Eine erhöhte *ELAVL1*-Expression ist im klarzelligem Nierenzellkarzinom (ccRCC) mit ungünstiger Prognose assoziiert (Ronkainen et al., 2011). Der Knockout (KO) von *Elavl1* in gesunden proximalen Sammelrohrzellen der Maus führt zur Herabregulierung von über 2700 Genen, u.a. *2610528A11Rik* (*C10ORF99* im Mausorganismus) (Bornkessel et al., 2020). Im ccRCC-Mausmodell ist *2610528A11Rik* hingegen das am stärksten heraufregulierteste (Harlander et al., 2017). Die vorliegende Arbeit untersucht, ob *ELAVL1* die Genexpression von *C10ORF99* im humanen ccRCC moduliert und ob *C10ORF99* im Serum von RCC-Patienten detektierbar ist. Als Modell dienen die ccRCC-Zelllinien Caki-1 und Caki-2, in denen ein CRISPR/Cas9-vermittelter funktioneller *ELAVL1*-KO etabliert wurde. Zunächst wurden phänotypische Auswirkungen des KO betrachtet. Migrationsassays ergaben keine signifikanten Veränderungen. In Caki-1-Zellen wurde eine Verminderung der Koloniegröße, in Caki-2-Zellen eine verminderte Proliferation gemessen. Genexpressionsanalysen ergaben starke Veränderungen im Genprofil *ELAVL1*-defizienter Caki-Zellen, wobei mehr Gene herab- als heraufreguliert werden. Differentiell exprimiert werden u.a. Signalwege der Tumorgenese und Inflammation und Gene mit Assoziation zu „Zelladhäsion“ und „extrazelluläre Matrix“. Entgegen murinen Sammelrohrzellen besteht für Caki-Zellen kein Effekt eines *ELAVL1*-KO auf die Genexpression von *C10ORF99*. Jedoch konnte mittels qPCR die für *ELAVL1* bekannte Autoregulation anhand des funktionellen KO auch in ccRCC-Zelllinien nachgewiesen werden. Mittels ELISA wurde gezeigt, dass *C10ORF99* in den Zellüberstand von Caki-Zellen sezerniert wird. Daher sollte die Eignung des Proteins als potentieller Biomarker für ein RCC evaluiert werden. In Kooperation mit der Universitätsklinik für Urologie Halle (Saale) wurde die *C10ORF99*-Konzentration in humanen Serumproben von Patienten mit RCC (n=70) und benignen Nierentumoren (n=20) gegenüber Nierengesunden (n=10) im ELISA gemessen. RCC-Seren (m=21,05 ng/ml, SE=1,727) als auch benigne Nierentumorseren (m=17,44 ng/ml, SE=2,666) wiesen signifikant erhöhte *C10ORF99*-Konzentrationen gegenüber gesunden Kontrollen (m=3,31 ng/ml, SE=0,83) auf. Demnach wurde *C10ORF99* als potenzieller Biomarker für eine renale Raumforderung oder ein Inflammationsgeschehen diskutiert.

Kirsch, Vanessa: Die Rolle von Embryonic Lethal Abnormal Vision-Like 1 im klarzelligem Nierenzellkarzinom und C10 Open Reading Frame 99 als potenzieller Biomarker, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2024

# Inhalt

1 Einleitung .....	1
1.1 Das Nierenzellkarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	1
1.1.2 Klassifikation .....	1
1.2 Embryonic Lethal Abnormal Vision-Like 1 (ELAVL1).....	2
1.2.1 Allgemeine Charakterisierung.....	2
1.2.2 Bedeutung im Pathologischen .....	3
1.2.3 Bedeutung in der Tumorgenese .....	4
1.2.4 Bedeutung im Nierenzellkarzinom .....	5
1.3 Chromosome 10 Open Reading Frame 99 (C10ORF99) .....	6
2 Zielstellung .....	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Material.....	9
3.1.1 Antikörper.....	9
3.1.2 Chemikalien .....	9
3.1.3 Geräte .....	10
3.1.4 Kits .....	11
3.1.5 Material .....	12
3.1.6 Oligonukleotide und Primer .....	13
3.1.6.1 Oligonukleotide .....	13
3.1.6.2 Genomische Primer .....	13
3.1.6.3 Real-Time Primer .....	13
3.1.7 Puffer .....	14
3.1.8 Zelllinien, Bakterienstämme und Nährmedien .....	14
3.1.9 Vektoren.....	14
3.1.10 Analyse-Software .....	15
3.2 Methoden.....	15
3.2.1 Zellkultur.....	15

3.2.1.1 Auftauen .....	15
3.2.1.2 Mediumwechsel .....	15
3.2.1.3 Passagieren.....	16
3.2.1.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	16
3.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	16
3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	16
3.2.2.2 Agarosegel-Elektrophorese.....	17
3.2.2.3 RNA-Isolation.....	17
3.2.2.4 cDNA-Synthese .....	18
3.2.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	18
3.2.2.6 Probenaufbereitung zum Next Generation Sequencing.....	19
3.2.3 Generierung eines CRISPR-Cas9 vermittelten <i>ELAVL1</i> -Knockouts in den Zelllinien Caki-1 und Caki-2.....	19
3.2.3.1 Design von gRNAs gegen <i>ELAVL1</i> .....	19
3.2.3.2 Annealing der Oligonukleotid-Paare.....	20
3.2.3.3 Klonierung und Ligation der gRNAs in den lenti-CRISPRv2-Vektor.....	21
3.2.3.4 Transformation des lenti-CRISPRv2-Vektors in kompetente DH5 $\alpha$ - Zellen.....	21
3.2.3.5 Übernacht-Vorkultur in kompetenten DH5 $\alpha$ -Zellen.....	22
3.2.3.6 Plasmid-Isolation und gRNA-Nachweis mittels Sequenzierung.....	22
3.2.3.7 Übernacht-Vollkultur und Maxi-Präparation.....	22
3.2.3.8 Virusproduktion durch Transfektion von HEK 293-T-Zellen.....	22
3.2.3.9 Transduktion der Zielzelllinien Caki-1 und Caki-2.....	23
3.2.3.10 Isolation genomischer DNA und Bestätigung der Mutation in den Mischkulturen.....	24
3.2.3.11 Isolation von Einzelklonen.....	24
3.2.3.12 Bestätigung der Deletion in den Einzelklonen .....	24
3.2.3.13 Mutationsanalyse mittels Tracking of Indels by DEcomposition (TIDE) .....	25
3.2.4 Proteinanalyse .....	25

3.2.4.1	Immunfluoreszenz.....	25
3.2.4.2	Proteinisolation .....	26
3.2.4.3	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	26
3.2.4.4	Antikörper-Stripping .....	26
3.2.4.5	Western Blot .....	27
3.2.5	Funktionelle Assays .....	28
3.2.5.1	Proliferationsassay.....	28
3.2.5.2	Migrationsassay .....	28
3.2.5.3	Colony Forming Assay .....	29
3.2.6	Detektion von C10ORF99 in Zellüberständen von Caki-Zellen .....	30
3.2.7	Detektion von C10ORF99 in humanen Serumproben.....	30
3.2.7.1	Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien.....	30
3.2.7.2	Probengewinnung und -aufbereitung .....	32
3.2.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	32
3.2.9	Statistische Auswertung .....	32
4	Ergebnisse .....	33
4.1	Generierung eines CRISPR-Cas9 vermittelten <i>ELAVL1</i> -Knockouts in den Zelllinien Caki-1 und Caki-2 .....	33
4.1.1	Bestätigung des funktionellen Knockouts auf DNA-Ebene.....	33
4.1.2	Bestätigung des funktionellen Knockouts auf Protein-Ebene .....	36
4.2	Einfluss eines <i>ELAVL1</i> -Knockouts auf den Phänotyp von Caki-1- und Caki-2- Zellen.....	38
4.2.1	Proliferation .....	38
4.2.2	Migration .....	40
4.2.3	Koloniebildung.....	42
4.3	Einfluss des <i>ELAVL1</i> -Knockouts auf die Genexpression .....	45
4.3.1	Einfluss auf das Genprofil.....	45
4.3.1.1	Allgemein .....	45
4.3.1.2	KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) - Analyse.....	50
4.3.1.3	GO (Gene Ontology) - Analyse .....	50

4.3.2 Einfluss auf die Genexpression von <i>ELAVL1</i> und <i>C10ORF99</i> .....	51
4.3.2.1 Next Generation Sequencing (NGS) .....	51
4.3.2.2 Verifizierung der Ergebnisse mittels quantitativer PCR .....	52
4.4 <i>C10ORF99</i> als potenzieller Biomarker .....	53
4.4.1 Detektion von <i>C10ORF99</i> in Zellüberständen von Caki-Zellen .....	53
4.4.2 Detektion von <i>C10ORF99</i> in humanen Serumproben.....	54
5 Diskussion.....	56
Ein <i>ELAVL1</i> -KO scheint die Zellproliferation von Caki-2-Zellen zu verlangsamen....	56
Ein <i>ELAVL1</i> -KO hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Caki-Zellen...56	
Ein <i>ELAVL1</i> -KO führt zu einer verminderten Koloniegröße von Caki-1-Zellen .....	57
Interklonale Heterogenität in Gene-Editing-Experimenten.....	58
Ein <i>ELAVL1</i> -KO beeinflusst das Genexpressionsprofil von Caki-Zellen.....	59
Ein <i>ELAVL1</i> -KO beeinflusst Signalwege in Caki-Zellen .....	60
<i>ELAVL1</i> -Defizienz in Caki-Zellen führt zu einer Destabilisierung der eigenen mRNA.....	61
<i>C10ORF99</i> scheint in Caki-Zellen nicht durch <i>ELAVL1</i> reguliert zu werden.....	61
Caki-Zellen sezernieren <i>C10ORF99</i> .....	62
Patienten mit Nierentumoren weisen erhöhte <i>C10ORF99</i> -Proteinlevel im Serum auf .....	62
<i>C10ORF99</i> als inflammatorischer Marker .....	64
6 Zusammenfassung.....	66
7 Literaturverzeichnis .....	68
8 Thesen .....	80
Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung .....	IX
Danksagung.....	X

In dieser Arbeit wird zur Wahrung der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet, das neben männlichen, ausdrücklich weibliche sowie andere Geschlechteridentitäten gleichberechtigt mit einbezieht. Die verkürzte Sprachform beinhaltet dabei keinerlei Wertung.

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ccRCC	clear cell Renal Cell Carcinoma (klarzelliges Nierenzellkarzinom)
C10ORF99	Chromosome 10 Open Reading Frame 99
cDNA	complementary DNA
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas9	CRISPR-associated Nuclease 9
DEG	differentiell exprimierte Gene
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAVL1	Embryonic Lethal Abnormal Vision Like 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FPKM	Fragments Per Kilobase Of exon per Million reads
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPR15L	G-Protein gekoppelter Rezeptorligand 15
gRNA	guide ribonucleic acid (guide Ribonukleinsäure)
KO	Knockout
log2FC	log2FoldChange
MeOH	Methanol
mRNA	messenger ribonucleic acid (messenger Ribonukleinsäure)
NGS	Next Generation Sequencing
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	Phosphate Buffered Saline
(q)PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
rpm	rounds per minute



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Autoregulation von ELAVL1 .....	3
Abb. 2: Eine hohe <i>ELAVL1</i> -Expression geht im klarzelligen Nierenzellkarzinom mit einer ungünstigen Prognose einher.....	6
Abb. 3: Lage der <i>ELAVL1</i> -gRNAs im <i>ELAVL1</i> -Gen, schematisch (NM_001419.3).....	20
Abb. 4: Chromatogramm von Caki-1-Zellen mit <i>ELAVL1</i> -Mutation.....	33
Abb. 5: Mutationsanalyse einer Mischkultur mittels Tracking of Indels (TIDE).....	34
Abb. 6: Chromatogramm des Einzelklons Caki2_E8.....	34
Abb. 7: Mutationsanalyse von Einzelklonen mittels Tracking of Indels (TIDE).....	35
Abb. 8: Bestätigung des <i>ELAVL1</i> -KO in Caki-1-Zellen durch Immunfluoreszenz.....	36
Abb. 9: Bestätigung des <i>ELAVL1</i> -KO auf Proteinebene im Western Blot.....	37
Abb. 10: Proliferationsanalyse von Caki-1-Zellen.....	38
Abb. 11: Berechnung der relativen Wachstumsrate von Caki-1- und Caki-2-Zellen über nicht-lineare Regression.....	39
Abb. 12: Zellproliferation von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter einem <i>ELAVL1</i> -KO.....	39
Abb. 13: Migrationsverhalten von Caki-Zellen unter einem <i>ELAVL1</i> -KO.....	40
Abb. 14: Berechnung der relativen Wunddicke (RWD) von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter <i>ELAVL1</i> -KO über lineare Regression.....	41
Abb. 15: Migration von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter <i>ELAVL1</i> -KO.....	41
Abb. 16: Koloniegröße von Caki-Zellen im Soft-Agar unter <i>ELAVL1</i> -KO .....	42
Abb. 17: Einfluss eines <i>ELAVL1</i> -KO auf die Koloniegröße.....	43
Abb. 18: Koloniezahl von Caki-Zellen im Soft-Agar unter <i>ELAVL1</i> -KO.....	44
Abb. 19: Einfluss eines <i>ELAVL1</i> -KO auf die Koloniezahl.....	45
Abb. 20: Ein <i>ELAVL1</i> -KO beeinflusst die globale Genexpression in Caki-1- und Caki-2-Zellen.....	46
Abb. 21: Durch einen <i>ELAVL1</i> -KO in Caki-Zellen werden mehr gemeinsam differentiell exprimierte Gene (DEG) herunter- als heraufreguliert.....	48
Abb. 22: Top 20 der unter <i>ELAVL1</i> -KO in Caki-Zellen deregulierten Signalwege.....	50
Abb. 23: Top 30 der unter <i>ELAVL1</i> -KO in Caki-Zellen deregulierten GO-Klassifikationen.....	51
Abb. 24: Relative Genexpression von <i>ELAVL1</i> und <i>C10ORF99</i> in Caki-Zellen im NGS.....	52
Abb. 25: Relative Genexpression von <i>ELAVL1</i> und <i>C10ORF99</i> in Caki-Zellen nach <i>ELAVL1</i> -KO in der qPCR.....	53
Abb. 26: Detektion von <i>C10ORF99</i> im Zellüberstand von Caki-Zellen.....	54
Abb. 27: <i>C10ORF99</i> -Serum-Konzentration in RCC-Patienten gegenüber Nierengesunden und in Abhängigkeit vom UICC-Stadium.....	55

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Virusproduktion.....	23
Tabelle 2: Patientenkollektiv.....	30
Tabelle 3: Top 10 der gemeinsam regulierten DEG unter <i>ELAVL1</i> -KO in Caki-Zellen.....	47
Tabelle 4: Top 10 der in Caki-Zellen unter <i>ELAVL1</i> -KO am stärksten herauf- und herunterregulierten Gene.....	48
Tabelle 5: Unter einem <i>ELAVL1</i> -KO in Caki-Zellen invers regulierte Gene.....	49

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Nierenzellkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Mit einer weltweiten Inzidenz von ca. 2 % ist Nierenzellkrebs einer der 10 häufigsten Krebsarten des Erwachsenen [1]. Im Jahr 2020 wurden unter Europäern 138.600 Neuerkrankungen sowie 54.100 Todesfälle durch Nierenkarzinome registriert. Dabei erkrankten Männer 1,6-mal häufiger als Frauen [2]. Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist mit 85% der häufigste maligne Nierentumor. Es geht von renalen Tubulus-Epithelzellen aus und wird durch hereditäre und erworbene Risikofaktoren begünstigt [3]. 5% aller Nierenzellkarzinome sind mit genetischen Syndromen wie dem Von Hippel Lindau- oder Birt-Hogg-Dubé Syndrom assoziiert [4]. Darüber hinaus zählen Adipositas, chronische Niereninsuffizienz und damit verbundene Dialysepflichtigkeit, Nikotinabusus sowie arterielle Hypertonie zu erworbenen Risikofaktoren [5]. Die Diagnosestellung erfolgt in 60% der Fälle aufgrund des überwiegend asymptomatischen Verlaufs als Zufallsbefund abdomineller Bildgebungen [3], was innerhalb der letzten Jahre zu einem leichten Inzidenzanstieg geführt hat [6]. Diese Tumore befinden sich zumeist in frühen Stadien und weisen durch chirurgische R0-Resektion, d. h. es befindet sich kein Tumorgewebe mehr im Resektionsrand, hohe Heilungsraten von über 90% auf. Jedoch entwickeln 30% der Patienten mit lokalisiertem Primärtumor im Verlauf Metastasen [7], verbunden mit einer wesentlichen Reduktion der Lebenserwartung. Je nach UICC-Stadium beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 95% (UICC I) und 17% (UICC IV) [8]. Nierenzellkarzinome werden erst spät symptomatisch, u. a. durch Flankenschmerz, schmerzlose Makrohämaturie, Gewichtsverlust oder allgemeine Leistungsminderung [9].

### 1.1.2 Klassifikation

Histologisch werden 3 Haupttypen des Nierenzellkarzinoms unterschieden, wobei 75% dem klarzelligen (ccRCC), 15% dem papillären (pRCC) und 5% dem chromophoben (chRCC) Nierenzellkarzinom zuzuordnen sind. Weitere noch seltenere Subtypen sind bspw. das medulläre und das Sammelrohrkarzinom [1]. Die Einteilung in klinische Stadien gemäß Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) erfolgt auf Grundlage der TNM-Klassifikation maligner Tumore. Diese Klassifikation beschreibt den Tumor anhand seiner Größenausdehnung (T=Tumor), des lokalen Lymphknoten-Befalls (N=Nodus) sowie der Fernmetastasierung (M=Metastasierung) [10]. Die UICC-Stadien I und II umfassen Tumore, die auf die Niere begrenzt und kleiner (Stadium I) oder größer als 7 cm (Stadium II) sind. Stadium III beschreibt Tumore, die umliegende Bereiche oder

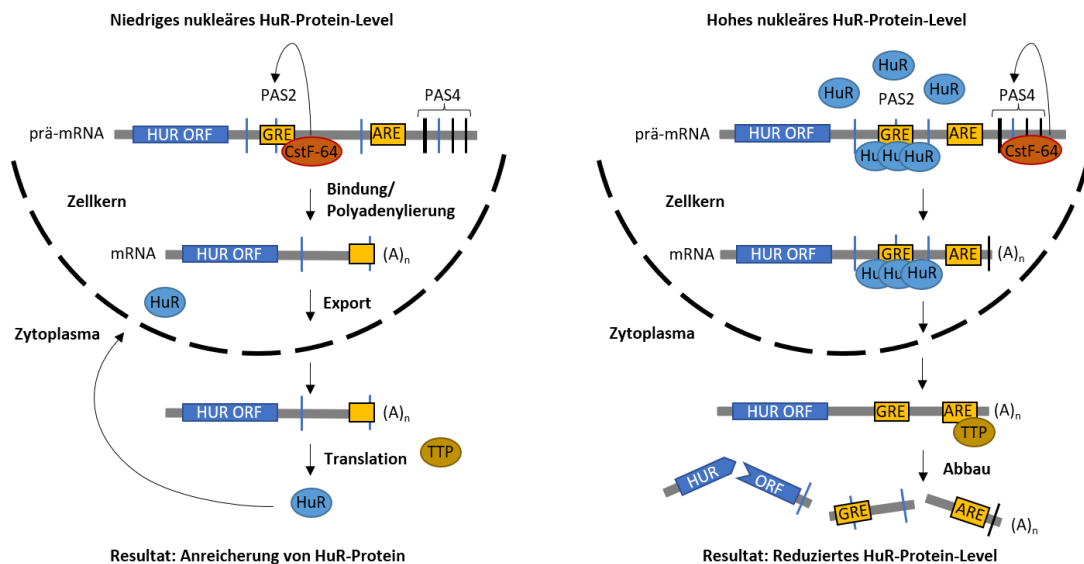
Gefäße innerhalb der Nierenfaszie infiltrieren, ohne gleichseitigen Nebennierenbefall. Weiterhin werden Tumore im Stadium I und II dazugerechnet, die bereits einen regionalen Lymphknoten befallen haben. Als Stadium IV eingestuft werden Tumore, die die Nierenfaszie überschreiten, die gleichseitige Nebenniere infiltrieren, bereits einen regionalen Lymphknoten befallen haben oder fernmetastasiert sind. Manifestationsorgane für Fernmetastasen sind Lungen-, Knochen-, Leber-, Lymphknoten-, Nebennieren- und Hirnmetastasen [11].

## **1.2 Embryonic Lethal Abnormal Vision-Like 1 (ELAVL1)**

### **1.2.1 Allgemeine Charakterisierung**

Das Embryonic Lethal Abnormal Vision Like-1 (ELAVL1) oder Human Antigen R (HuR) zählt zu den RNA-bindenden Proteinen (RBP). Die eukaryotische mRNA als Mittler zwischen Gen und Protein liegt während ihrer gesamten Existenz im Komplex mit RBP vor [12]. RBPs beeinflussen Prozessierung, Stabilität und Translation ihrer Ziel-Transkripte und vermitteln darüber hinaus ihren Abbau [13,14]. Sie ermöglichen damit eine flexible Anpassung der Genexpression an äußere Umwelteinflüsse, was eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung differenzierter Gewebe darstellt [15]. ELAVL1 wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* als eines mehrerer ELAV-Proteine identifiziert, die wichtige Regulatoren in der Steuerung der neuronalen Entwicklung darstellen [16]. Unter den für Hu-Proteine kodierenden Genen ist *ELAVL1* das einzige, das ubiquitär exprimiert wird [17]. Es ist auf Chromosom 19p13.2 lokalisiert [18]. Das Protein ist im Kern angereichert und beeinflusst das Spleißen sowie die alternative Polyadenylierung [19]. Das Vorhandensein dreier RNA-Erkennungsmotive (RRM) und einer variablen HuR-Nucleozytoplasmatische-Shuttling-Sequenz (HNS) ist den ELAV-Proteinen gemein [20,21]. Über diese RRM vermittelt das 36 kDa-Protein ELAVL1 seine Hauptfunktion – die Stabilisierung von mRNAs [22]. Damit leistet es einen wesentlichen Beitrag zur post-transkriptionellen Genregulation in Eukaryoten, in der der schnelle ARE-abhängige mRNA-Abbau ein zentraler Mechanismus ist [23]. Adenylat-/Uridylat-reiche Elemente (ARE) kommen im 3'-UTR-Bereich von RNA vor und wirken destabilisierend, indem sie den Abbau des schützenden Poly(A)-Schwanzes durch Deadenylierung vermitteln [24]. Dabei erfolgt die ARE-Bindung über die ersten beiden RRM, wodurch eine Polyadenylierung am RRM 3 ausgelöst wird [25]. Dadurch wird das Transkript vor dem Abbau durch Exonucleasen geschützt und stabilisiert [26,27]. Zudem wirkt ELAVL1 als IRES trans-aktiver Faktor (ITAF). Es bindet die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und initiiert die Translation seiner Ziel-mRNAs [28]. Darüber hinaus vermag ELAVL1 die Translation auch zu inhibieren, indem es Strukturen am 5'-UTR-Ende bindet oder miRNP zum 3'-UTR rekrutiert [29].

Eine Besonderheit von ELAVL1 ist die Fähigkeit zur Autoregulation seiner Genexpression. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert ELAVL1 seine Konzentration ausgehend von seiner eigenen Anreicherung im Kern. Dabei wirkt es auf seine prä-mRNA [30,31]. Niedrige nukleäre Protein-Level erlauben durch die freie Polyadenylierungsstelle 2 (PAS2) die Bindung des CstF-64 (Cleavage-stimulating factor 64) und damit die Stabilisierung kurzer *ELAVL1*-Transkripte. Die Folge ist eine Protein-Anreicherung im Kern. Überschreitet *ELAVL1* schließlich ein gewisses Konzentrationslevel, blockiert es Guanin-reiche Sequenzen (GRE) seiner prä-mRNA und verhindert die Rekrutierung von CstF-64 an PAS2. Folglich werden längere ARE-tragende Transkripte gebildet, die schließlich abgebaut werden und das Protein-Level von *ELAVL1* sinkt [32].



**Abb. 1: Autoregulation von ELAVL1.** Abbildung adaptiert nach Dai, Zhang und Makeyev, 2012 [32]. HuR = ELAVL1, CstF-64 = Cleavage-stimulating factor 64, PAS2 = Polyadenylierungsstelle, GRE = Guanin-reiche Einheit, ARE = Arginin-reiche Elemente, TTP=Tristetraprolin

### 1.2.2 Bedeutung im Pathologischen

Um seine stabilisierende Funktion ausüben zu können, muss ELAVL1 im Zytoplasma lokalisiert sein [33]. Dazu bedarf es der Aktivierung des überwiegend nukleär angereicherten Proteins. Unter dem Einfluss ex- oder intrinsischen Zellstress, wie UV-Strahlung, Hypoxie oder Hypoglykämie, vermittelt die HNS den Transfer aus dem Zellkern [34–36]. Eine chronische Aktivierung von ELAVL1 bedingt durch die Stabilisierung pro-inflammatorischer Cytokine und Enzyme einen inflammatorischen Phänotyp. Hierbei stellen die Interleukine IL-6 und -8, Wachstumsfaktoren wie TGF- $\alpha$

und  $\beta$  oder das Interferon  $\gamma$  neben der Cyclooxygenase-2 (COX-2) oder dem Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) nur einige Beispiele dar, die durch ELAVL1 stabilisiert werden [37–40]. Damit ist das Protein an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen wie Atherosklerose, rheumatoider Arthritis oder Pankreatitis beteiligt [41–43]. Darüber hinaus wirkt ELAVL1 direkt stabilisierend auf Proto- und Onkogene [44,45].

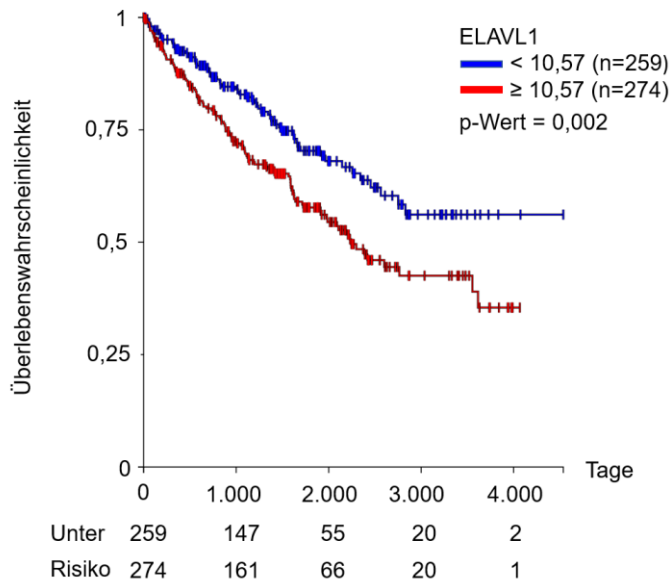
### 1.2.3 Bedeutung in der Tumorgenese

*ELAVL1* ist in den meisten Krebsarten, darunter Lymphome, Magen-, Mamma-, Pankreas-, Prostata-, Mundboden-, Kolon-, Lungen-, Ovarialkarzinomen sowie Hirntumoren und Melanomen überexprimiert [46–57]. Die Höhe der Zytoplasma-Konzentration ist dabei meist mit einem fortgeschritteneren Tumorstadium und schlechterer Prognose assoziiert [58–60]. Dies liegt vor allem darin begründet, dass für die Karzinogenese relevante Proteine unter ELAVL1 vermehrt abgelesen werden, wie für Zellwachstum und -überleben, lokale Angiogenese, Zellinvasion, Metastasierung und den Entzug des Immunsystems [61]. Über die Aktivierung von Cyclinen und Cyclin-abhängiger Kinasen fördert ELAVL1 die Zellproliferation [62]. Indem ELAVL1 die Expression anti-apoptotischer Gene verstärkt und pro-apoptotischer Gene hemmt, fördert es das Zellüberleben [63,64]. Angiogenese, die Neubildung von Gefäßen, ermöglicht die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen und wird durch ELAVL1 im Wesentlichen über die Stabilisierung von VEGF, HIF-1 $\alpha$  und COX-2 begünstigt [57,65,66]. Ein weiteres Tumorcharakteristikum stellt die Fähigkeit zur Zellinvasion und Metastasierung dar, die das Loslösen aus dem soliden Tumorgewebe, den Übertritt in das Blutgefäßsystem und die Extravasation im Fernen voraussetzt [67]. Hierzu trägt ELAVL1 durch die Stabilisierung von Faktoren bei, die den Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix bewirken [68,69]. Weiterhin werden unter ELAVL1-Bindung vermehrt Gene abgelesen, von denen die Initiation der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) ausgeht [70,71]. Darüber hinaus beeinflusst ELAVL1 die Zellmigration, indem es TGF- $\beta$  stabilisiert. TGF- $\beta$  ermöglicht der Zelle dem Immunsystem zu entgehen, was einen weiteren Aspekt der Karzinogenese darstellt [71,72]. Seine zentrale Rolle in der Regulation der Onkogenese macht ELAVL1 zu einem interessanten Target in der Krebstherapie. Unter dem Einfluss von Zellstress durch Chemotherapeutika wird *ELAVL1* überexprimiert und fördert die Resistenz gegenüber wirksamen Krebstherapeutika. Diese Resistenz konnte mittels *ELAVL1*-Knockout (KO) durch siRNA-enthaltende Nanopartikel in Lungenkarzinomen durchbrochen werden [73]. Auch Zelllinien des duktales Adenokarzinoms des Pankreas zeigten nach CRISPR/Cas9-vermitteltem *ELAVL1*-KO eine erhöhte Sensitivität gegenüber Poly-ADP-

Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren [74]. Demgegenüber wird jedoch unter *ELAVL1*-Überexpression die Wirksamkeit des Pyrimidin-Analogons Gemcitabine verbessert [75]. Aus diesem Grund ist der Einsatz von *ELAVL1*-Inhibitoren je nach Tumorentität differenziert zu betrachten [76] und wirft die Frage nach seiner Funktion im Nierenzellkarzinom auf.

#### **1.2.4 Bedeutung im Nierenzellkarzinom**

Während der Einfluss von *ELAVL1* auf die Karzinogenese in vielen Tumorentitäten, darunter Kolon-, Mamma-, Lungen- oder Prostata-Karzinom [47,50,52,77], bereits weitreichend erforscht ist, ist über seine Bedeutung im Nierenzellkarzinom (RCC) weitaus weniger bekannt. Molekularbiologisch liegt dem Großteil der RCC, die dem histologischen Subtyp der klarzelligigen Karzinome (ccRCC) angehören, eine biallelische Mutation im Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Gen (*VHL*) zugrunde, obgleich diese Mutation allein nicht ausreicht, um ein RCC zu induzieren [1]. *VHL* ist das Substrat des E3-Ligase-Komplexes, der die Hypoxie induzierten Faktoren  $1\alpha$  und  $-\beta$  (*HIF-1 $\alpha$* ,  $-\beta$ ) unter normoxischen Bedingungen dem proteasomalen Abbau zuführt. Ein *VHL*-Verlust führt somit zur Daueraktivierung von *HIF-1 $\alpha$*  und  $-\beta$ , die die Angiogenese und damit die Aufrechterhaltung eines Tumormikromilieus fördern. Datta et al. beschreiben eine inhibitorische Wirkung von *VHL* über dessen Elongin-bindende Domäne an das RRM1 von *ELAVL1*. Durch eine *VHL*-Mutation in RCC sei diese Inhibition aufgehoben [78]. Laut Danilin et al. ist *ELAVL1* unabhängig vom *VHL*-Status in RCC überexprimiert und stabilisiert die Expression von *HIF-1 $\alpha$*  und *VEGF*. Darüber hinaus hat *ELAVL1* Anteil an der Aktivierung der Tumor-Signalwege PI3K/Akt und MAPK sowie der Signalwege der Zellproliferation und Anti-Apoptose im RCC [79,80]. Die Arbeitsgruppe um Ronkainen konnte eine positive Korrelation zwischen der Expression von *ELAVL1* und *COX-2* im RCC feststellen [81]. Dabei gehe eine erhöhte Expression eines oder beider Gene mit einer schlechteren Prognose aufgrund geringerer Differenzierung, fortgeschrittenerem Tumorstadium und höherer Tumormasse einher [79,82]. Mit der Bindung des Parathormon related Protein (PTHrP) stabilisiert *ELAVL1* zudem einen negativen Prognose-Faktor des RCC [82,83]. Diese Daten decken sich für den histologischen Subtyp der klarzelligigen Nierenzellkarzinome mit Überlebensanalysen des TCGA (The Cancer Genome Atlas), wonach eine hohe *ELAVL1*-Expression in ccRCC-Patienten mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist (Abb. 2). Diese Aspekte machen *ELAVL1* zu einem interessanten Target im Nierenzellkarzinom.



**Abb. 2: Eine hohe *ELAVL1*-Expression geht im klarzelligen Nierenzellkarzinom mit einer ungünstigen Prognose einher.** Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der *ELAVL1*-Expression (rot = hohe Expression, blau = niedrige Expression). Die Kaplan-Meier-Kurve enthält die Daten der TCGA Clear Cell Renal Cell Carcinoma-Kohorte und wurde mithilfe der UCSC Xena-Plattform [84] erstellt.

### 1.3 Chromosome 10 Open Reading Frame 99 (*C10ORF99*)

Eine Arbeitsgruppe um Harlander beschrieb mithilfe ihres Mausmodells für das ccRCC und daraus hervorgehender RNA-Sequenzierungsanalysen ein ähnliches Genmutationsprofil muriner und humaner ccRCC [85]. Dabei konnte *2610528A11Rik* als das am stärksten heraufregulierteste Gen im murinen ccRCC-Modell gegenüber normalem Nierengewebe identifiziert werden ( $\log_2FC$ : 6,11). Eine Vorarbeit um Bornkessel et. al, die sich mit der Genregulation von murinen Zellen des kortikalen Sammelrohrs unter einem *ELAVL1*-KO beschäftigte, ergab eine Herabregulierung von ca. 2700 Genen, darunter *2610528A11Rik* [86]. Dieses Gen entspricht dem Chromosome 10 Open Reading Frame 99 (*C10ORF99*) im humanen Organismus. Seine Rolle im humanen RCC wurde bisher nicht beschrieben.

*C10ORF99* ist auf Chromosom 10q 23.1, unmittelbar neben dem Tumorsuppressorgen *10q23.3 PTEN* lokalisiert [87,88] und kodiert für ein nur wenig charakterisiertes 9 kDa-Protein. Dieses wird als löslicher Faktor beschrieben [89], der je nach Gewebe unterschiedliche Rezeptoren bindet. Er wird am stärksten im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt [90] sowie der Cervix [91] exprimiert, in Zelllinien des Kolonkarzinoms ist die Expression hingegen vermindert [88]. Pan et al. beschrieben das Genprodukt von *C10ORF99* erstmalig als Cytokin, das klassisch über den ER/Golgi-Weg sezerniert wird und als Tumorsuppressor wirkt, der auch als Colon-derived Sushi Domain Containing 2



binding factor (CSBF) bezeichnet wird. Indem es den Sushi Domain Containing 2 (SUSD2) - Rezeptor im Kolon bindet und die Herabregulierung von Cyclin D und Cyclin-abhängige Kinsase (CDK)-6 vermittelt, induziert es einen G1-Zellzyklus-Arrest und inhibiert so das Wachstum von Kolonkarzinom-Zelllinien [88]. CSBF wird auch als G-Protein-gekoppelter Rezeptor-15-Ligand (GPR15L) bezeichnet, da es den GPR15-Rezeptor auf Lymphozyten bindet und so die Chemotaxis von Memory-B-Zellen, Plasmablasten und regulatorischen T-Zell-Subgruppen im Kolon [92] und in der Haut [93] vermittelt. Zudem wirkt GPR15L als Chemokin immunmodulatorisch. In der neo- und postnatalen Entwicklung von Mäusen bewirken hohe epidermale *2610528A11Rik*-Level die Migration dendritischer epidermaler T-Vorläufer-Zellen (pDETC) in die Haut. Zum Erwachsenenalter hin nimmt die *2610528A11Rik*-Expression jedoch ab und steigt nur noch unter inflammatorischen Bedingungen wieder an [90]. So wurden während der Wundheilung in Mäusen hohe *2610528A11Rik*-Level gemessen [94]. Verschiedene Maus-Modelle [94,95] und Studien an humanen Patientenproben [95–97] konnten eine erhöhte *2610528A11Rik/C10ORF99*-Expression in Individuen mit Psoriasis detektieren, sodass das Protein als Marker zur Klassifikation von Psoriasis dienen könnte [96]. Entgegen dem Kolon hat eine epidermale Überexpression des Gens eine verstärkte G1/S-Transition zur Folge. Durch Aktivierung des ERK1/2- und NFκB-Signalwegs in Keratinozyten bewirkt *C10ORF99* in der Haut eine gesteigerte Zellproliferation [95]. Aus den bisherigen Erkenntnissen über die Funktion von *C10ORF99* konnten erste therapeutische Ansätze für Hauterkrankungen abgeleitet werden. Neben der klinischen Besserung Imiquimod-vermittelter Psoriasis durch einen *C10ORF99*-Knockdown [98], konnte unter *2610528A11Rik*-Defizienz eine verzögerte Abstoßungsreaktion allogener Hauttransplantate in Mäusen beobachtet werden [91]. Unter IL-17-Antikörper-Therapie in Psoriasis-Patienten war ein Verbesserung des Schweregrades mit einer Herabregulation von *C10ORF99* verbunden [91]. GPR15L wird aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces*, *Aspergillus niger* und Mycoplasmen auch als Antimikrobielles Peptid mit 57 Aminosäure-Residuen (AP-57) bezeichnet [99]. Es verlangsamt darüber hinaus das Wachstum Gram-negativer Bakterien wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* und *Pseudomonas aeruginosa* und reduziert die Infektionseffizienz von Lentiviren [99]. AP-57 konnte, über Nanopartikel in einem Hydrogel angereichert, die kutane Wundheilung von Ratten durch Zunahme der Gewebsgranulation, Kollagen-Formation und Angiogenese verbessern [100]. In dieser Arbeit wird von dem Gen im Mausorganismus als *2610528A11Rik*, im humanen Organismus als *C10ORF99* gesprochen. Das zugehörige Protein wird ungeachtet seiner organbezogen verschiedenen Bezeichnungen einheitlich als *C10ORF99* bezeichnet.

## 2 Zielstellung

Das mRNA-bindende Protein ELAVL1 wird in menschlichen Geweben nahezu ubiquitär exprimiert und ist in vielen Krebsarten überaktiv, indem es Onkogenese-assoziierte RNAs stabilisiert [101]. Eine erhöhte *ELAVL1*-Expression ist im Nierenzellkarzinom mit einem geringeren Überleben assoziiert [81]. Der Knockout von *ELAVL1* in gesunden proximalen Sammelrohrzellen der Maus führte zu einer Herabregulierung von mehr als 2700 Genen, darunter *2610528A11Rik*, dem Äquivalent für *C10ORF99* im Mausorganismus [86]. In einem Mausmodell für das ccRCC der Arbeitsgruppe um Harlander hingegen ist *2610528A11Rik* das am stärksten heraufregulierteste [85]. Die vorliegende Arbeit untersucht in erster Linie, ob *ELAVL1* die Expression von *C10ORF99* im humanen ccRCC moduliert. Als Zellmodell dienen die humanen ccRCC-Zelllinien Caki-1 und Caki-2. Während Caki-1-Zellen einer Metastase entstammen, haben Caki-2-Zellen ihren Ursprung im Primärtumor [102]. Anhand eines CRISPR/Cas9-induzierten *ELAVL1*-Knockouts sollen zudem die Auswirkungen einer *ELAVL1*-Defizienz auf den Phänotyp der Zellen betrachtet werden. Neben den Untersuchungen am Zellmodell soll in zweiter Linie die Nachweisbarkeit von *C10ORF99* in-vivo überprüft und eine mögliche Eignung als diagnostischer Biomarker abgeleitet werden. Hierzu wurden in Kooperation mit der Universitäts- und Poliklinik für Urologie Halle (Saale) Patienten- und Kontrollprobanden-Seren mittels ELISA auf das Vorhandensein des Proteins untersucht und Konzentrationsunterschiede ermittelt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Antikörper

Typ	Protein	Hersteller	Verdünnung	Artikelnummer
primär	HuR/ELAV1 (3A2)	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	1:200 (IF) 1:500 (WB)	sc-5261
	Anti-C10orf99	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	1:500	HPA050920
	GAPDH (14C10)	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)	1:5000	2118
sekundär	Alexa Fluor™ 568 goat anti- mouse IgG H+L	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	1:1000	A-11004
	Alexa Fluor™ 488 goat anti- mouse IgG	Thermo Fisher Scientific	1:1000	A-11034
	Goat anti- mouse IgG	Dianova (Hamburg, Deutschland)	1:5000	115-035-146
	Goat anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Europe (Cambridgeshire, UK)	1:10.000	111-035-144

#### 3.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
2-Propanol	Honeywell (Charlotte, North Carolina)	33539
4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)	Thermo Fisher Scientific	D1306
Alexa Fluor™ 568 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific	A12380
Ampicillin	Merck (Darmstadt, Dtl.)	A9518
Ampuwa Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH © (Bad Homburg, Dtl.)	1088811
Bacillol® AF Lösung zur Flächendesinfektion	BODE Chemie GmbH (Hamburg, Dtl.)	9802143
Gelatine aus Schweinehaut	Merck	G6144
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe, Dtl.)	A994.2
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Scientific™	R0611
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X	Anprotec (Bruckberg, Dtl)	AC-BS-0015
Ethanol, ≥99.8 % (GC)	Sigma Aldrich	32205
Ethidium bromide solution 1 %	Carl Roth	2218.1
FBS Supreme	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Dtl.)	P30-3031
Fluoroshield™	Sigma Aldrich	F6182
GeneRuler 1 kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific	SM0311

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	10309339
JumpStart™ Taq DNA-Polymerase	Sigma Aldrich	D4184-50UN
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Dtl.)	840004
Milchpulver	Carl Roth	T145.3
NuPAGE™ LDS Sample Buffer 4X	Thermo Fisher Scientific	NP0007
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	P0781
Ponceau S	Sigma Aldrich	P7170
Protease-Inhibitor-Mix	Roche (Basel, Schweiz)	11836153001
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad	5000006
Puromycin-Dihydrochlorid	Sigma Aldrich	P9620
RIPA Lysis Buffer	Sigma Aldrich	R0278
SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific	LC5925
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	34094
SYBR™ Select Master Mix for CFX	Thermo Fisher Scientific	4472937
T4 Ligase	Thermo Fisher Scientific	15224041
T4 DNALigase Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific	B69
Triton® X-100	Sigma Aldrich	93426
Trypsin-EDTA Solution 10X	Sigma Aldrich	59418C
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific	R0531
Tween® 20 (Polysorbat)	Sigma Aldrich	817072

### 3.1.3 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Absorptions-Mikroplatten-Reader</b>	Infinite F50 + Magellan™ Reader- und Analyse Software	Tecan Trading AG (Schweiz)
<b>Chemilumineszenzdetektor</b>	ChemiDoc™ Imaging System	Bio-Rad
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	BBD 6220 CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
<b>Fluoreszenz-Mikroskop</b>	Biorevo BZ-9000	Keyence Corporation (Osaka, Japan)
<b>Gelelektrophorese</b>	PowerPac™ Basic power supply (Mini-, Wide-) Sub Cell GT Cell	Bio-Rad
<b>Inkubationsschüttler</b>	ThermoMixer F1.5	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	New Brunswick™ Excella E24 <i>Incubator Shaker-Series</i>	Eppendorf AG & Inc. (Hamburg, Dtl., USA)
	Multitron Standard	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Lebendzellanalyse-System</b>	IncuCyte® Life Cell Analysis System	Sartorius (Göttingen, Dtl.)
<b>Mikroskop</b>	Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen, Dtl.)
<b>Minizentrifuge</b>	Micro Centrifuge 220 Vac	Carl Roth (Karlsruhe, Dtl.)
<b>Multizentrifuge</b>	Multifuge 1 S-R	Heraeus (Hanau, Dtl.)
<b>Photometer</b>	BioPhotometer® D30	Eppendorf AG (Hamburg, Dtl.)
<b>Pipetten (Ein-/Mehrkanal)</b>	Eppendorf Research® plus 0,5-1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Dtl.)
<b>Pipettierhilfe</b>	pipetus® standard Filter	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Dtl.)
<b>Fotodokumentationssystem</b>	Analytik Jena US UVP UVsolo Touch	Analytik Jena GmbH (Jena, Dtl.)
<b>Real-Time-PCR-Cycler</b>	CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
<b>SDS-Page-Elektrophorese-System</b>	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad
<b>Sterilbank</b>	HeraSafeKSP	Heraeus Thermo Fisher Scientific
<b>S2-Sterilbank</b>	HeraSafeKendro	Heraeus Thermo Fisher Scientific
<b>Thermocycler</b>	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
<b>Tischzentrifuge</b>	Biofuge Primo R	Heraeus (Hanau, Dtl.)
<b>Trockenschrank</b>	Kelvitron®T	Heraeus
<b>Ultraschall-Homogenisator</b>	Sonifier® W-250 D	Branson Ultrasonics (Danbury, Connecticut, USA)
<b>Vortexer</b>	ZX3 Advanced Vortex Mixer	VELP Scientifica (Usmate Velate, Italien)
<b>Wasserbad</b>	WNB	Memmert
<b>Western Blot System</b>	Mini Trans-Blot® Cell-System	Bio-Rad
<b>Sonstiges</b>	Woundmaker™	Sartorius

### 3.1.4 Kits

<b>Anwendung</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Plasmid-Isolation</b>	QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, Dtl.)
	GeneJET™ Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific
	Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Thermo Fisher Scientific
<b>Virusproduktion</b>	ViraPower Lentiviral Packaging Mix	Thermo Fisher Scientific
<b>DNA-Isolation</b>	Gene Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits	MERCK
<b>PCR-Aufreinigung</b>	Gen Elute PCR-Clean-Up Kit	MERCK
	Nucleo-Spin Gel & PCR Clean Up	Maclery Nagel

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
<b>cDNA-Synthese</b>	M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L)	Thermo Fisher Scientific
<b>RNA-Isolation</b>	Gene Elute Mammalian Total RNA Miniprep Kit	Sigma Aldrich
<b>ELISA</b>	Human Putative Uncharacterized Protein C10orf99 ELISA Kit 96 well	MyBioSource (San Diego, USA)
	ELISA Kit for Colon Derived SUSD2 Binding Factor (CSBF) 96 well	Cloud-Clone corp. (Texas, USA)

### 3.1.5 Material

Material	Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
<b>qPCR Folie</b>	Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad	MSB1001
<b>qPCR Platte</b>	0,2 ml Non-skirted Low profile 96-well PCR Plate;	Thermo Fisher Scientific	AB0700
	Hard-Shell® 384-Well PCR Plates	Bio-Rad	HSP3805
<b>Scratchplatte</b>	Incucyte® Imagelock 96-well Plate	Sartorius	4806
<b>(SDS)-Page Gele</b>	4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, 10 well	Bio-Rad	4568083
<b>Nitrocellulose-Membran</b>	Cytiva Amersham™ Protran™ NC Nitrocellulose-Membranen	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Dtl.)	15279814
<b>Filterpapier</b>	Whatman™ Grade 3MM Chr Chromatography Paper	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Dtl.)	11330744
<b>Zellkulturflaschen</b>	TPP Zellkulturflasche 25, 75 cm <sup>2</sup>	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)	90026, 90076
<b>Zellkulturtestplatten</b>	TPP Zellkulturtestplatten 6-, 12-, 24-, 48-, 96 Well	TPP Techno Plastic Products AG	92406, 92412, 92424, 92448, 92696
<b>Zellkulturschale</b>	Zellkulturschale Standard, 58 cm <sup>2</sup> , 13 ml, 100 mm	Sarstedt (Sarstedt, Dtl.)	KKH6.1
<b>Kryoröhrchen</b>	TPP Kryoröhrchen 1,5 ml	TPP Techno Plastic Products AG	89020
<b>Zellkulturröhrchen</b>	CELLreaktor™-Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)	CLY3.1, CLY4.1

### 3.1.6 Oligonukleotide und Primer

Das Design der CRISPR-gRNA-Oligonukleotide erfolgte nach dem Protokoll von Zhang Lab [103,104]. Alle Oligonukleotide sowie Primer wurden von der Firma Biologio B.V. (Nijmegen, Niederlande) bezogen. Die scrambled (Scr)-gRNA wurde von Dmitry Chernyakov mit dem Tool von Zhang Lab (<https://zlab.bio/guide-design-resources>) entworfen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die PCR-Primer wurden mithilfe von NCBI-Primer-Blast [105] erstellt.

#### 3.1.6.1 Oligonukleotide

Zielgen	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Exon
<b>ELAVL1</b>	hELAVL1_gRNA1_O1	CACCG CAC ATG GCC GAA GAC TGC AG	2
	hELAVL1_gRNA1_O2	AAAC CTG CAG TCT TCG GCC ATG TGC	
	hELAVL1_gRNA2_O1	CACCG TGT GAA CTA CGT GAC CGC GA	3
	hELAVL1_gRNA2_O2	AAAC TCG CGG TCA CGT AGT TCA CAC	
	hELAVL1_gRNA3_O1	CACCG TCA ACA CGC TGA ACG GCT TG	3
	hELAVL1_gRNA3_O2	AAAC CAA GCC GTT CAG CGT GTT GAC	
	Scrambled-gRNA-Oligo1	CACCG ATA TCC GGA ATT CGC GCG AT	-
	Scrambled-gRNA-Oligo2	AAAC ATC GCG CGA ATT CCG GAT ATC	-

#### 3.1.6.2 Genomische Primer

Zielgen	Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3')
<b>ELAVL1</b>	hELAVL1genom1_S	CAA GAG CAA TGG ACA GAG TTT G
	hELAVL1genom1_AS	AAT GCA GTT ACT AGT TTT GCC TTC
	hELAVL1genom2_S	AGT GGG TCC TGA GAC ACT CAT
	hELAVL1genom2_AS	GGA ACC TGT GTT CAT TGC AGA
	hU6 Primer	GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT

#### 3.1.6.3 Real-Time Primer

Zielgen	Primer	Sequenz (5'-3')
<b>ELAVL1</b>	hELAVL1_Real_S	CCA ACT TGT ACA TCA GCG GG
	hELAVL1_Real_AS	AAA CCG GAT AAA CGC AAC CC
<b>GPR15I</b>	hGPR15I_Real_S	CCT TTC CAG CCT GCT CTG TA
	hGPR15I_Real_AS	AGC CTC ACA TGA TGT CCT TTC A
<b>GAPDH</b>	GAPDH_Real_S	TGG CCT TCC GTG TTC CTA CC
	GAPDH_Real_AS	GGT CCT CAG TGT AGC CCA AGA TG

### 3.1.7 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% w/v SDS
PBST (1x)	1x PBS 0,1% Tween
TAE-Puffer (1x)	1 mM EDTA 40 mM Tris-Acetat Aqua dest
Transferpuffer (Towbin-Puffer)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) MeOH
Stripping-Buffer	7,5 g Glycine (2M) 0,5 g SDS 5 ml Tween Aqua dest., HCl

### 3.1.8 Zelllinien, Bakterienstämme und Nährmedien

Zelllinie	Ursprung	Nährmedium
HEK-293T	Niere, Embryo, human	Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium GlutaMAX (DMEM) + 10 % fetales Kälberserum (FKS) + 1 % Penicillin/Streptomycin
Caki-1	Klarzelliges Nierenzellkarzinom Hautmetastase, adult, human	Sigma Aldrich RPMI 1640 Medium + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin
Caki-2	Klarzelliges Nierenzellkarzinom, Primärtumor, adult, human	Sigma Aldrich RPMI 1640 Medium + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin

Stamm	Organismus	Nährmedium
DH5α	Escherichia coli	Sigma Aldrich Lutreia Broth (LB)

### 3.1.9 Vektoren

Der lentiCRISPR v2-Vektor wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Feng Zhang (Addgene plasmid # 52961; <http://n2t.net/addgene:52961>; RRID: Addgene\_52961).

Vektor	Hersteller	Artikelnummer
lentiCRISPR v2 (Plasmid #52961)	addgene	52961
ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix pLP1, pLP2, pLP/VSVG	Thermo Fisher Scientific	K497500



### **3.1.10 Analyse-Software**

- BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 [106]
- BioRad CFX Maestro 1.1 Version 4.1.2433.1219 (© Bio-Rad Laboratories)
- ImageJ 1.53c [107]
- IncuCyte® 2022A
- GraphPad Prism 5 for Windows Version 5.03, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)
- Magellan™ 7.2 SP1
- TIDE-Webtool [108]

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

In dieser Arbeit verwendete Zelllinien wurden als adhärenente Monolayer in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (CO<sub>2</sub>-Gehalt 5%) konstant bei 37°C und 95% Luftfeuchte kultiviert. Alle Arbeitsschritte erfolgten stets unter einer Sterilwerkbank. Vor den Zellkulturarbeiten wurden verwendetes Medium, 1x-PBS-Lösung sowie 1x-Trypsin-EDTA im Wasserbad auf 37°C angewärmt und die Werkbankfläche desinfiziert. Nach S2-Arbeiten erfolgte neben der abschließenden Flächendesinfektion eine Behandlung mit UV-Licht für 20-30 Minuten.

#### **3.2.1.1 Auftauen**

Zur Inkulturnahme wurden die kryokonservierten Zellen dem Stickstofftank entnommen und rasch im Wasserbad erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden in 3-5 ml Kulturmedium aufgenommen und in einem 15 ml-Falcon bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 5 ml angewärmtem Kulturmedium resuspendiert und zu 5 ml vorgelegtem Medium in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche gegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C bis zur gewünschten Konfluenz.

#### **3.2.1.2 Mediumwechsel**

Zeigte der Zellrasen noch keine Konfluenz, das Medium jedoch einen allmählichen Farbumschlag im Sinne einer Ansäuerung, erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Hierbei wurde das verbrauchte Medium abgenommen und je nach Kultivierungsdauer durch 5 -10 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

### 3.2.1.3 Passagieren

Erreichten die Zellen in den 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen eine Konfluenz von 80-90% wurden sie passagiert. Hierzu wurde das verbrauchte Kulturmedium vollständig abgenommen und 3-5 ml 1x PBS in die Flasche gegeben. Unter kurzem Schwenken wurde der Zellrasen darin gewaschen, um Mediumreste und Zelldebris zu mobilisieren. Anschließend wurde der Überstand kontaktlos dekantiert und Reste durch vorsichtiges Abklopfen auf einer sterilen Mullkompressen entfernt. Zum Lösen der Zell-Substrat-/Zell-Zell-Adhäsion wurde der Monolayer mit 500 µl 1x Trypsin-EDTA benetzt und in diesem für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Klopfen vollständig vom Flaschenboden gelöst und in 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen, um die Protease-Reaktion des Trypsins abzustoppen. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde in einer neuen Zellkulturflasche Medium vorgelegt und 300-500 µl der gelösten Zellen überführt. Das Gesamtvolumen in einer 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche betrug je nach Kulturdauer und Zellzahl 5 bis 10 ml. Welches Zellvolumen weitergeführt wurde, war abhängig von der Anzahl an Kulturtagen und geplantem Assay.

### 3.2.1.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Im Rahmen funktioneller Assays ist das genaue Ausschneiden bestimmter Zellzahlen von Bedeutung. Hierzu wurden die Zellen nach dem Trypsinieren in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml – Falcon überführt. Dieser Suspension wurden 10 µl entnommen und über Kapillarkräfte in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Zählung erfolgte über das 10x-Objektiv des *Axiovert 40 C*-Mikroskops, in dem in allen 4 Quadranten der Zählkammer die optisch vitalen Zellen gezählt wurden. Aus diesen 4 Zellzahlen wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Resuspensionsvolumen gelöster Zellen sowie dem Kammerfaktor der Zählkammer multipliziert.

## 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung eines bestimmten Genabschnittes erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierzu wurde folgender Ansatz/Probe hergestellt:

JumpStart Taq Polymerase	25 µl
Primer Sense	1 µl
Primer Antisense	1 µl
DNA	1 µl
Aqua dest.	ad 50 µl Gesamtvolumen

In einem Thermocycler wurde folgendes Programm durchlaufen:

95 °C	3 Min	
95 °C Denaturierung	30 s	} 34 x Wiederholung
58 °C Annealing	30 s	
72 °C Elongation	45 s	
72 °C	5 Min	
12 °C	∞	

### 3.2.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die gröÙenspezifische Auftrennung und Visualisierung von PCR-Produkten erfolgte je nach Länge in 1 bis 2 %-igen Agarosegelen. Hierzu wurde die entsprechende Agarosemenge in 1x TAE-Puffer (pH 8,2) aufgekocht bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte, umgehend Ethidiumbromid (1:12.500) hinzugefügt und die Masse zügig in einen Gelschlitten mit passendem Kamm gegossen. Nach 1h wurde das ausgehärtete Gel im Schlitten in eine entsprechende Elektrophorese-Zelle überführt und vollständig mit 1x TAE-Puffer bedeckt. 20 µl der aufzutrennenden Probe wurden mit 1 Tropfen 6x-DNA-Gel-Ladefarbstoff versetzt, um die Dichte der Probe gegenüber dem Puffer zu erhöhen und die Lauffront im Gel sichtbar zu machen. Die Proben wurden schließlich in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurden 5 µl *GeneRuler Plus DNA Ladder* der entsprechenden Probengröße (100 bp – 1 kb) als Marker aufgetragen. Unter Anlegen einer Spannung von 120 V über ein *PowerPac™ Basic power supply* wurden die DNA-Amplifikate gemäß ihrer Größe vom Minus- zum Pluspol hin aufgetrennt. Hatte die Lauffront das Gel durchwandert, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Banden im Gel am *Analytik Jena US UVP UVsolo Touch* unter UV-Licht betrachtet.

### 3.2.2.3 RNA-Isolation

In Vorbereitung auf Genexpressionsanalysen wurde die RNA der zu untersuchenden Zellen isoliert. Hierzu wurden die Zellen im Rahmen der Zellpassage gewaschen, trypsinisiert, in Kulturmedium resuspendiert (3.2.1) und zu 3 verschiedenen Dichten auf einer 24-Well-Platte ausgesät (10 %, 20 %, 30% Konfluenz). Nach 48h wurden die Wells einer Konzentrationsreihe gepoolt geerntet. Dazu wurden die Zellen des ersten Wells mit 500 µl Lysis Puffer des *Gene Elute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* gelöst und vollständig in das nächste Well überführt, dessen Zellen unter Auf- und Abpipettieren ebenfalls lysiert und anschließend in das letzte Well überführt. Auf diese Weise sollten Einflüsse von Kulturhandling und Zellkonfluenz auf die Genexpression möglichst geringgehalten werden. Das Zell-Lysat wurde nach dem Protokoll des *Gene Elute*

*Mammalian Total RNA Miniprep Kit* bearbeitet und die RNA letztlich in 40 µl Elutionspuffer isoliert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

#### **3.2.2.4 cDNA-Synthese**

Zur Umschreibung isolierter RNA (3.2.2.3) in komplementäre DNA (cDNA) wurden Material und Protokoll des *M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µL) Kits* verwendet. Zunächst wurde je RNA-Probe folgender Ansatz hergestellt:

RNA	2 µg
Oligo(dt)	0,5 µl
Random Hexamer Primer	0,5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
RNase-freies Wasser	ad 13 µl

Nach 5-minütiger Inkubation bei 65 °C im ThermoCycler wurden je Probe 4 µl 5x First Strand Buffer sowie 2 µl 0,1 M dTT zugesetzt und gevortext. Nach 2-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Reaktion 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase hinzugegeben, durchmischt und der Ansatz für 10 Minuten bei 2°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Umschreibung bei 37°C für 50 Minuten. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

#### **3.2.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Die Messung relativer Genexpressionsunterschiede verschiedener cDNA-Proben wurde je nach Anzahl betrachteter Gene und zu analysierender Proben im 96- bzw. 384-Well Format durchgeführt. Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung, als Referenz diente bei jeder Messung das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*). Zunächst wurde die pure cDNA 1:40 in Aqua dest. verdünnt und folgender Ansatz je Probe hergestellt:

cDNA (1:40)	3 µl
Real-Sense-Primer	1 µl
Real-Antisense-Primer	1 µl
SYBR® Select Master Mix	5 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Mit einer Mehrkanalpipette wurden die Ansätze auf eine qPCR-Platte überführt und mittels Folie verschlossen. Nach kurzem Zentrifugieren erfolgte die Messung im *CFX Connect Real-Time PCR Detection System* nach dem folgenden Protokoll:

50°C	2 min	
95°C	2 min	
95°C	15 s	} 39 x Wiederholung
60°C	30 s	
65°C auf 95°C	in 0,5°C/5 s	

Anschließend fand die Analyse mithilfe der Software BioRad CFX Maestro 1.1 statt. Anhand der  $\Delta\Delta$ CT-Methode nach Livak und Schmittgen [109] wurden die relativen Genexpressionsunterschiede zwischen Kontrolle und Zielgen auf das ubiquitär exprimierte Housekeeping-Gen *GAPDH* normalisiert.

### **3.2.2.6 Probenaufbereitung zum Next Generation Sequencing**

Um die Auswirkung des *ELAVL1*-Knockouts neben *C10ORF99* auf weitere Gene untersuchen zu können, wurde die RNA von Kontroll- und Knockoutproben schließlich zur Transkriptom-Analyse verschickt. Insgesamt wurden von jeder Probe 4 gepoolte RNA-Isolationen (3.2.2.3) versandt. Novogene (UK) Company Limited führte die RNA-Sequenzierung und bioinformatische Auswertung als Dienstleistung durch.

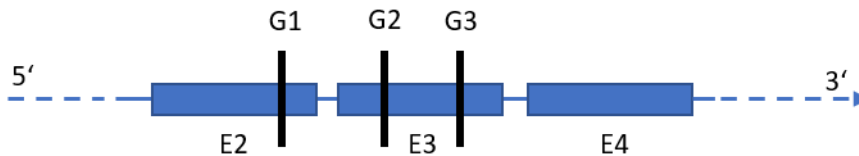
### **3.2.3 Generierung eines CRISPR-Cas9 vermittelten *ELAVL1*-Knockouts in den Zelllinien Caki-1 und Caki-2**

In dieser Arbeit wurde durch Gene Editing ein funktioneller Knockout am *ELAVL1*-Locus generiert. Mithilfe der CRISPR/Cas9 – Genschere wird ein sequenzspezifischer DNA-Doppelstrangbruch im Zielgen induziert, den die zelluläre Reparationsmaschinerie durch Verbindung der entstandenen nicht homologen Enden (non-homologous end joining) repariert [110]. Dadurch entstehen zufällige Mutationen wie Deletionen oder Insertionen, sogenannte Indels, die zu einer Leserasterverschiebung führen und das Zustandekommen von Stopp-Codons bewirken. Dadurch wird das Gen dauerhaft inaktiviert und die Synthese eines funktionellen Genproduktes verhindert [111].

#### **3.2.3.1 Design von gRNAs gegen *ELAVL1***

Anhand der genomischen Sequenz von *ELAVL1* (National Center for Biotechnology Information, Gene ID: 1994) wurden mithilfe des CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictors [112,113] spezifische Zielregionen des *ELAVL1*-Gens identifiziert. Es wurden

Sequenzen ausgewählt, die sich durch ihre Einzigartigkeit im Genom sowie ihr Vorkommen unmittelbar nach einem Protospacer Adjacent Motif (PAM) auszeichnen. Dieses ist essentiell für die Bindung des Cas9-gRNA-Komplexes an die Zielsequenz. Gemäß des Target Guide Sequence Cloning Protocol wurden 3 Oligonukleotide designt, die von der Firma Biolegio synthetisiert wurden. Abb. 3 zeigt die Lage der gRNAs auf Exon 2 und 3 des Gens, die durch die Endonuclease aufgesucht und geschnitten werden sollten.



**Abb. 3: Lage der *ELAVL1*-gRNAs im *ELAVL1*-Gen, schematisch (NM\_001419.3).** Dargestellt sind Exon 2-4 (E2, E3, E4) von insgesamt 6 Exons in 5'-3'-Richtung der genomischen Sequenz. G1 = gRNA1, G2 = gRNA2, G3 = gRNA3

### 3.2.3.2 Annealing der Oligonukleotid-Paare

Annealing, Ligation und Klonierung der gRNAs gegen *ELAVL1* in den lentiviralen Vektor erfolgten in Anlehnung an das Protokoll der Gruppe Zhang [103,104]. Verwendet wurde der von Dmitry Chernyakov freundlicherweise zur Verfügung gestellte Vektor, der nach demselben Protokoll verdaut wurde. Hierbei wurden die Oligonukleotide wie folgt zusammengelagert: hELAVL1\_gRNA1\_O1 und hELAVL1\_gRNA1\_O2 für gRNA1, hELAVL1\_gRNA2\_O1 und hELAVL1\_gRNA2\_O2 für gRNA2 und hELAVL1\_gRNA3\_O1 und hELAVL1\_gRNA3\_O2 für gRNA3.

Für die Zusammenlagerung der Oligonukleotid-Paare wurde je gRNA folgender Ansatz hergestellt:

- 1 µl Oligo 1 (100 µM)
- 1 µl Oligo 2 (100 µM)
- 1 µl 10x T4-Ligase-Puffer
- 7 µl nuklease-freies H<sub>2</sub>O

In einem ThermoCycler wurden die Ansätze wie folgt inkubiert:

30 Minuten bei 37°C  
5 Minuten bei 95°C  
35 Minuten Abkühlung um 5°C/Min. auf 25°C

Letztlich entstand auf diese Weise je gRNA ein Oligonukleotid-Ansatz. hELAVL1\_G1 enthielt die zusammengelagerten Oligonukleotide gegen die gRNA1 (hELAVL1\_gRNA1\_O1 und \_O2), hELAVL1\_G2 die Oligonukleotide gegen gRNA2 und hELAVL1\_G3 die Oligonukleotide gegen gRNA3. Die je gRNA zusammengelagerten Oligonukleotide wurden im Anschluss 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

### **3.2.3.3 Klonierung und Ligation der gRNAs in den lenti-CRISPRv2-Vektor**

Um die Oligonukleotide (3.2.3.2) in den lenti-CRISPR-Vektor einzubringen, wurde je gRNA folgender Ligationsansatz hergestellt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert:

2 µl Bsmbl-verdauter lenti-CRISPRv2-Vektor  
1 µl Doppelstrang-Oligo verdünnt (hELAVL1\_G1, hELAVL1\_G2 oder hELAVL1\_G3)  
1 µl 10x T4-Ligase-Puffer  
1 µl T4-Ligase  
1 µl ATP (1 mM)  
4 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O

### **3.2.3.4 Transformation des lenti-CRISPRv2-Vektors in kompetente DH5α-Zellen**

Zur Vervielfältigung jedes Vektors wurde der kompetente E. coli-Stamm DH5α genutzt. Hierfür wurden 5 µl des Ligationsansatzes (3.2.3.3) jedes Konstruktes (hELAVL1\_G1, \_G2, \_G3) zu 50 µl E. coli gegeben und nach kurzem Auf- und Abpipettieren für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfuhren die Zellen für 2 Minuten einen Hitzeschock bei 42°C und wurden danach für 2 Minuten erneut auf Eis gekühlt. Je Transformationsansatz wurden 400 µl LB-Medium hinzugegeben und diese bei 37°C für 1h geschüttelt. Im Anschluss wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und der flüssige Überstand bis auf 100 µl verworfen, in denen das verbliebene Pellet resuspendiert wurde. Schließlich wurde je Konstrukt (hELAVL1\_G1, -\_G2, -\_G3) die entsprechende Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden im Vorfeld aus Ampicillin-haltigem LB-Medium (100 µg/ml) gegossen. Dies geschah, wie das Ausplattieren, neben offener Flamme.

### **3.2.3.5 Übernacht-Vorkultur in kompetenten DH5α-Zellen**

Von den Agarplatten wurden am Folgetag je Konstrukt (hELAVL1\_G1, -\_G2, -\_G3) 3 Kolonien abgenommen und jede in ein Röhrchen mit 3 ml Ampicillin-haltigen LB-Medium (100 µg/ml) überführt. Hierin wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C geschüttelt.

### **3.2.3.6 Plasmid-Isolation und gRNA-Nachweis mittels Sequenzierung**

Am Folgetag wurden die Plasmide mittels *QIAprep Spin Mini PrepKit* isoliert. Hierbei wurde die Plasmid-DNA durch Elution in 30 µl Elutionspuffer gewonnen. Die Isolation wurde zunächst durch Konzentrationsbestimmung am Photometer, anschließend mittels Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese auf ihren Erfolg hin überprüft. Im Reaktionsansatz waren neben 2 µl Plasmid-DNA (c=60-90 ng/µl) 1 µl hU6-Primer und 1 µl des Antisense-Primers des jeweiligen Konstruktes enthalten. Dabei enthielt der Ansatz für die gRNA1 den Antisense-Primer hELAVL1genom1\_AS; die gRNA2 und 3 wurden mit dem Primer hELAVL1genom2\_AS nachgewiesen. Um das Vorhandensein der klonierten gRNA in den Plasmiden zu bestätigen, wurden 9 µl Plasmid-DNA und 1 µl hU6-Primer (3.1.6.2) zur Sequenzierung an die Firma GATC Biotech AG verschickt.

### **3.2.3.7 Übernacht-Vollkultur und Maxi-Präparation**

Nachdem in den Sequenzierungen die spezifische gRNA mithilfe der Software BioEdit detektiert werden konnte, sollten die vorhandenen Plasmide vermehrt werden. Hierzu wurde erneut eine Übernacht-Kultur aus 20 µl Vorkultur und 100 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium angesetzt und bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Maxi-Präparation der Plasmide nach Protokoll des *Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit* durchgeführt und die Konzentration der isolierten DNA photometrisch bestimmt. Zudem wurden eine erneute PCR und Gelelektrophorese (3.2.2.1, 3.2.2.2) durchgeführt, um die erfolgreiche Vermehrung des Plasmids zu überprüfen. Die verwendeten genomischen Primer entsprechen den AS-Primern unter 3.2.3.6. Schließlich wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

### **3.2.3.8 Virusproduktion durch Transfektion von HEK 293-T-Zellen**

Zur Herstellung lentiCRISPR-v2-Vektor tragender Viren, die die gRNA-Konstrukte gegen *ELAVL1* (3.2.3.4) enthalten, wurden HEK 293-T-Zellen verwendet. Genutzt wurden die Vektoren des *ViraPower Lentiviral Packaging Mix* von Thermo Fisher Scientific (Tab. 1). An Tag 1 wurden je *ELAVL1*-Konstrukt  $5 \times 10^6$  HEK 293-T-Zellen auf Zellkulturschalen (ø 100 mm) ausgesät und in 10 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium mit 10% FKS (fetales Kälberserum) über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurden je gRNA 2 Ansätze hergestellt. Ansatz 1 enthielt die Vektoren pLP1, pLP2, pLP/VSVG sowie den



entsprechenden lenti-CRISPRv2-Vektor hELAVL1\_G1, -\_G2 oder -\_G3. Das Vektorgemisch wurde auf 300 µl mit serumfreiem Medium aufgefüllt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem 2. Ansatz wurde zur Optimierung des Transfektionserfolges 252 µl serumfreies Medium mit 48 µl TurboFect-Reagenz versetzt. Anschließend wurden je Konstrukt beide Ansätze vereint und bei Raumtemperatur wiederum für 20 Minuten inkubiert. Aus den mit HEK 293-T-Zellen kultivierten Schalen wurden je 4 ml Medium abgenommen und je 600 µl Transfektionsansatz des entsprechenden Konstruktes hinzugefügt. Die Transfektion erfolgte bei 37°C. Nach 24h wurde ein erster Mediumwechsel durchgeführt, nach weiteren 24 h konnte der Virus-haltige Überstand unter der Sterilbank abgenommen und bei 2900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert werden. Nach Filtration durch einen 0,45 µm-Sterilfilter waren die Viruspartikel bei -20 °C lagerbar.

**Tabelle 1: Virusproduktion**

Ansatz 1		Ansatz 2	
pLP1	7,2 µg	TurboFect	48 µl
pLP2	2,4 µg		
pLP/VSVG	4 µg		
lentiCRISPRv2			
(hELAVL1_G1, -_G2 oder -_G3)	10,4 µl		
Serumfreies Medium	ad 300 µl	Serumfreies Medium	ad 300 µl

### 3.2.3.9 Transduktion der Zielzelllinien Caki-1 und Caki-2

Über ein lentivirales Transduktionssystem erfolgte schließlich der Transfer der gRNA-tragenden Vektoren in die Zielzellen. Diese wurden hierzu im 6-Well Format kultiviert, wobei zunächst eine Kavität je Konstrukt ausgesät wurde. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 50% erreicht hatten, wurde das gesamte Medium abgenommen und durch 1 ml Kulturmedium und 1 ml Virusüberstand pro Well ersetzt. Neben der Transduktion mit den *ELAVL1*-gRNA-Konstrukten wurde ein Well/Zelllinie mit dem Überstand des Scr-Leervektors behandelt. Nachdem die Zellen für 48 h bei 37°C inkubiert worden waren, wurden sie vollständig in eine 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt und in diesem Format unter Puromycin selektiert. Zuvor wurde an den Wildtyp-Zellen die optimale Puromycin-Konzentration zur Selektion anhand von Konzentrationsreihen im 24-Well-Format ermittelt. Ab einer Konzentration von 1-1,5 µg/µl starben die meisten Zellen ab, sodass in dieser Arbeit zur sicheren Selektion gRNA-tragender Zellen eine Konzentration von 2 µg/µl Antibiotikum im Kulturmedium eingesetzt wurde.

### **3.2.3.10 Isolation genomischer DNA und Bestätigung der Mutation in den Mischkulturen**

Um den Transduktionserfolg in den Mischkulturen zu überprüfen, wurde DNA isoliert und zur Sequenzierung verschickt. Hierzu wurde bei Erreichen von 80 % Konfluenz in den 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen im Rahmen der Zellpassage (3.2.1.3) 1 ml der gelösten Zellen bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen und aus dem Zellpellet nach Protokoll des *Gene Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits* die genomische DNA der Mischkultur isoliert. Zur Amplifizierung des Genabschnittes, der die gewünschte Mutation tragen sollte, wurde eine PCR mit den genomischen *ELAVL1*-Primern durchgeführt (3.1.6.2) und das Amplifikat über eine Gelelektrophorese (3.2.2.2) visualisiert. Dabei erfolgte der Nachweis der Konstrukte wie folgt: hELAVL1\_G1 mit den Primern hELAVL1genom1\_S und -\_AS und hELAVL1\_G2 und -\_G3 mit den Primern hELAVL1genom2\_S und -\_AS. Schließlich wurde das PCR-Produkt mit dem *Gen Elute PCR-Clean-Up Kit* aufgereinigt und 9 µl DNA mit 1 µl Primer (3.1.6.2) zur Sanger-Sequenzierung verschickt. Je Probe wurde sowohl in 5'-3' als auch in 3'-5'-Richtung sequenziert, d.h. entweder der passende genomische Sense- oder Antisense-Primer zugesetzt. Die mit dem Leervektor Scr transduzierten Zellen wurden als Positivkontrolle ebenfalls sequenziert.

### **3.2.3.11 Isolation von Einzelklonen**

Mithilfe der Software BioEdit konnten die Sequenzierungsergebnisse ausgewertet werden. Zeigte das Chromatogramm nach ungefähr 200 bp einen Übergang der sauberen Sequenz hin zu Signalüberlagerung im Sinne einer Mutation, wurden die Mischkulturen vereinzelt. Auf diese Weise sollten Zelllinien generiert werden, die genau einer Zelle entstammten und somit dieselbe Mutation tragen. Zunächst wurden die Zellen der Mischkultur abgelöst und gezählt (3.2.1.3, 3.2.1.4). Mithilfe folgender Verdünnungsreihe wurden rechnerisch 1, 0,5 und 0,25 Zellen/Well auf eine 96-Well-Platte überführt.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in 1 ml Kulturmedium aufgenommen ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml) und davon nach dem Vortexen 100 µl in 10 ml Kulturmedium ( $1 \times 10^3$  Zellen/ml) überführt. Nach erneutem Vortexen wurden hieraus 75 µl in 15 ml Puromycin-haltiges Kulturmedium (0,5 Zellen/100 µl) gegeben und aus diesem Ansatz 200 µl, 100 µl und 50 µl Zellsuspension in je 32 Wells überführt. Schließlich wurde mit Puromycin-haltigem Kulturmedium ad 200 µl Gesamtvolumen/Well aufgefüllt.

### **3.2.3.12 Bestätigung der Deletion in den Einzelklonen**

Nach einer Kultivierungszeit von ungefähr 14 Tagen im 96-Well-Format wurden diejenigen Wells geerntet, die lediglich eine Zellkolonie enthielten und auf 24-Well-

Platten überführt. Unter kontinuierlicher Puromycin-Selektion ( $c = 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) sind die Zellklone schrittweise in das nächstgrößere Well-Format überführt worden. Von den 6-Well-Platten wurde aus 1/3 der konfluenten Zellen erneut genomische DNA isoliert, mit den zum Konstrukt passenden genomischen Primern amplifiziert (3.2.3.10) und die PCR-Produkte in einer Gelelektrophorese überprüft (3.2.2.1, 3.2.2.2). Nach der Aufreinigung des PCR-Amplifikates (3.2.3.10) wurden 9  $\mu\text{l}$  DNA je Zellklon mit 1  $\mu\text{l}$  genomischem Sense- oder Antisense-Primer zur Sequenzierung verschickt.

### **3.2.3.13 Mutationsanalyse mittels Tracking of Indels by DEcomposition (TIDE)**

Neben der Chromatogramm-Analyse mittels BioEdit wurden die genomischen Sequenzen der Einzelklone über das Webtool TIDE [108] auf ihre spezifische Mutation hin verifiziert. Hierzu wurden die Chromatogramme der Scr-Kontrolle und des zu analysierenden Einzelklons im ab1-Format hochgeladen und die entsprechende gRNA-Sequenz des jeweiligen Konstruktes angegeben. Durch Aneinanderlegen der Sequenzen ermittelte die Software die prozentuale Abweichung im Sequenzmuster nach dem erwarteten Schnitt der Cas9-Endonuclease sowie die vorherrschenden Insertionen und Deletionen (Indels).

## **3.2.4 Proteinanalyse**

### **3.2.4.1 Immunfluoreszenz**

Die Überprüfung des funktionellen Knockouts erfolgte auf Proteinebene zunächst durch die Immunfluoreszenz. Hierzu wurden die Einzelklone nach dem Erreichen einer 70-80-prozentigen Konfluenz in den 25  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen trypsinisiert. Anschließend sind daraus je 100 bis 200  $\mu\text{l}$  Zellen auf Deckgläser in einer 24-Well-Platte überführt und mit 1 ml entsprechendem Medium über Nacht kultiviert worden. Am Folgetag wurden die Deckgläser für 20 Minuten in 400  $\mu\text{l}$  Fixierpuffer inkubiert und dreimalig für 15 Minuten mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Durch eine 5-minütige Inkubation in 400  $\mu\text{l}$  0,1% Triton-PBS sollte die Zugänglichkeit der Zellen für die Antikörperbindung erhöhen. Nach weiteren 3 Waschschritten in 1x PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 0,3%-iger Gelatine für insgesamt 20 Minuten. Die Inkubation mit den primären Antikörpern fand bei 37°C für 1 Stunde statt. Nach dreimaliger Waschung mit PBS für jeweils 15 Minuten folgte die einstündige Inkubation mit den sekundären Antikörpern, woran sich eine letzte dreimalige Waschung mit 1x PBS anschloss. Die Fixierung der Deckgläser auf dem Objektträger erfolgte in einem Tropfen *Fluoroshield*<sup>TM</sup>. Nach 24-stündiger Aushärtung konnten die Deckgläser unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die angefertigten Präparate waren bei 4°C dauerhaft lagerbar.

### **3.2.4.2 Proteinisolation**

Zur Isolation des zellulären Proteins wurden die gelösten Zellen zunächst bei 1200 rpm für 5 Minuten pelletiert und der Überstand hiernach verworfen. In Abhängigkeit von der Größe des Zellpellets wurden je Probe 100-200 µl RIPA-Puffer mit 40 µl/ml Protease-Inhibitor-Mix versetzt und das Pellet hierin resuspendiert. Hierdurch sollten Einflüsse wie Proteindenaturierung oder Proteolyse während des Zellaufschlusses minimiert werden. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden die Proben in einem Eisbad mittels Ultraschalls fragmentiert (*Sonifier W-250D*, Dauer 1 Minute, Amplitude 50%, Abbruchtemperatur 60°C). Zelltrümmer und gelöstes Protein wurden schließlich für 30 Minuten bei 15.000 rpm pelletiert und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Die Konzentrationsbestimmung des isolierten Gesamtproteins erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode [114]. Hierzu wurden 2 µl Probe mit 798 µl destilliertem Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm am *BioPhotometer® D30* ermittelt. Anhand einer Eichgeraden mit 6 Standards (0,5, 1, 2, 3, 5, 10 µg/ml) konnte die Proteinkonzentration durch lineare Regression berechnet werden.

### **3.2.4.3 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der isolierten Zellproteine (3.2.4.1) erfolgte gemäß SDS-PAGE-Methode nach Laemmli [115]. Zunächst wurden 20 µg Protein-Probe mit 5 µl NuPAGE™LDS Sample Buffer 4X versetzt, mit RIPA Lysis Buffer auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und dieser Ansatz in einem Heizblock bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Es wurden 4–15% *Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gele* in die *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell* eingesetzt und die Apparatur samt Geltaschen zunächst mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden 8 µl *SeeBlueBuffer* als Marker sowie 20 µl der zu analysierenden Proben in die entsprechenden Taschen pipettiert. Über den *PowerPac™ Basic Power Supply* wurde eine Spannung von 80-100 V angelegt und die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

### **3.2.4.4 Antikörper-Stripping**

Da das Zielprotein ELAVL1 und das Referenzprotein GAPDH dieselbe molekulare Größe besitzen (36 kDa), wurde der Western Blot zunächst mit dem Primärantikörper für GAPDH durchgeführt. Nach der Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran 2x für jeweils 10 Minuten in Stripping Buffer (pH 2,2) geschwenkt und anschließend 2x für je 10 Minuten in 1x PBST gewaschen. Pufferzusammensetzung und Protokoll stammen von der Firma abcam®. Hiernach konnte die Membran erneut geblockt und mit dem Primärantikörper für ELAVL1 inkubiert werden.

### 3.2.4.5 Western Blot

Der Proteintransfer auf eine Trägermembran und ihre immunologische Detektion über spezifische Antikörper mittels Chemilumineszenz erfolgte nach der Methode von Towbin [116]. Alle verwendeten Materialien waren Teil des *Mini Trans-Blot® Cell-Systems*. Nach vollständiger Auftrennung der Proteine (3.2.4.3) wurden die PAGE-Gele der Elektrophorese-Apparatur entnommen und auf eine 0,45 µm Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Unter kontinuierlicher Feuchthaltung aller Komponenten in Transferpuffer (pH 8,3) wurde folgendes „Sandwich“ in der Gel-Haltebox aufgebaut:

- Schwamm
  - Filterpapier
  - Gel
  - Nitrocellulose-Membran
  - Filterpapier
- + Schwamm

Die Haltebox wurde möglichst luftblasenfrei verschlossen und zwischen die Plattenelektroden der Transferkammer gebracht, wobei sich das Gel zur Kathode, die Membran zur Anode hin orientierte. Zusätzlich zum Transferpuffer wurde die Kammer mit einem Kühlakku beladen. Nach Anlegen einer Spannung von 80 V erfolgte bei 4°C für 2,5 - 3 Stunden der gerichtete Proteintransfer. Hierbei bewegten sich die durch den Puffer negativ geladenen Proteine hin zum Pluspol des elektrischen Feldes und damit auf die Trägermembran. Im Anschluss wurde das Transfer-System auseinander gebaut und die Membran vorsichtig vom Gel getrennt. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. erfolgte die 5-minütige Färbung im Säurefarbstoff Ponceau S, um den erfolgreichen Transfer sowie die Gleichmäßigkeit der Banden zu überprüfen. Unter Orientierung an der Marker-Bande konnte die Membran je nach Proteingröße geschnitten werden, um die Inkubation mit verschiedenen Antikörpern zu ermöglichen. Nach nochmaligem Waschen wurde die Membran für 30 Minuten in 5%-iger Tris-Milch (5% Trockenmilch in 1x PBST) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren und die Hintergrundlumineszenz zu reduzieren. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht schwenkend bei 4°C. Die Verdünnung wurde nach den Angaben des Herstellers in 5%-iger Tris-Milch vorgenommen. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimalig für 10 Minuten in 1x PBST gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für 2 h mit dem sekundären Antikörper der entsprechenden Spezies behandelt. Diesmal erfolgte die Verdünnung in 1x PBST. Nach erneuter Waschung in 1x PBST für je 10 Minuten wurde die Membran schließlich je nach Größe mit je 150-300 µl

*SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* und *Pierce™ Western Blot Signal Enhancer* benetzt und luftblasenfrei in Folie verpackt. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz am *ChemiDoc™ Imaging System*.

### **3.2.5 Funktionelle Assays**

#### **3.2.5.1 Proliferationsassay**

In Vorbereitung auf das Proliferationsassay wurden die Zellen in ihren 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert und schließlich trypsiniert (3.2.1.3). Anhand der Konfluenz in den Zellkulturflaschen wurde das Zellvolumen berechnet, das pro Kavität überführt werden musste, um auf der 96-Well-Platte (ø 0,3 cm<sup>2</sup>) eine Konfluenz von 5 % und 10 % je Well zu erreichen (gilt für Caki-1). Da die Caki-2-Zellen in Vorversuchen schneller konfluent waren, wurden diese stets zu einer Konfluenz von 2,5 % und 5 % gesetzt. Mit einer Mehrkanalpipette wurde je Kavität 100 µl Kulturmedium vorgelegt und anschließend das entsprechende Zellvolumen zu 5 % und 10 % bzw. 2,5 % und 5 % Konfluenz in Doppelbestimmung ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit erfolgte ein Mediumwechsel zu 200 µl frischem Medium und die Überführung in das *IncuCyte® Life Cell Analysis System*. Hier wurden im Zeitraum von 60 h sechsstündlich 4 Bilder/Kavität aufgenommen (Kultivierung bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit). Zu jedem Messzeitpunkt wurde die konfluente Fläche pro Well in Prozent auf den Zeitpunkt 0 h normalisiert. Auf diese Weise wurden Wachstumskurven generiert, die exportiert und in der Software GraphPad Prism 5 mit der Gleichung für exponentielles Wachstum regressiert wurden. Hierbei wurden je Zelllinie und Bedingung (niedrige und hohe Konfluenz) insgesamt 88 Messwerte einbezogen (4 Bilder à 11 Messzeitpunkte in Doppelbestimmung). Anhand des ermittelten Wachstumskoeffizienten konnte die Software die Verdopplungszeit der Zellen berechnen. In die Analyse wurden lediglich Werte eingeschlossen, deren Bestimmtheitsmaß  $R^2 \geq 0,9$  betrug.

#### **3.2.5.2 Migrationsassay**

Um ein potenziell verändertes Migrationsverhalten von Caki-Zellen durch *ELAVL1-KO* beobachten zu können, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit an den Proliferationsrändern einer Wunde im Zellrasen untersucht. Dazu wurden die zu analysierenden Zellen in ihren 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90-100 % kultiviert und trypsiniert (3.2.1.3). Anhand der Konfluenz in den Kulturflaschen wurde das Volumen an zu überführenden Zellen bestimmt, um in einer Kavität einer *IncuCyte® Imagemock 96-well Platte* (ø 0,3 cm<sup>2</sup>) eine mindestens 100 % -ige Konfluenz zu erreichen. Davon ausgehend wurden die Zellen nach Vorlegen von 100 µl Kulturmedium pro Well

je Zellklon in Doppelbestimmung ausgesät und für 24 h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit). Im Anschluss wurde dem Zellrasen mithilfe des *Woundmaker*<sup>TM</sup> eine Wunde zugefügt. Hiernach wurde das Kulturmedium abgenommen, die Wells mit 1x PBS gewaschen, um gelöste Zellen zu entfernen und 200 µl frisches Kulturmedium hinzugegeben. Im *IncuCyte®Life Cell Analysis System* wurden die Zellen für 60 h kultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) und alle 6 h 2 Bilder/Kavität aufgenommen. Zur Auswertung wurde auch hier die IncuCyte® Software verwendet, die zur Quantifizierung der relativen Unterschiede die relative Wunddichte (RWD) in Prozent zu jedem Messzeitpunkt ermittelte. Die RWD gibt hierbei die Zelldichte der Wunde relativ zur Zelldichte im Zellrasen an und normalisiert somit gegenüber Dichteveränderungen im konfluenten Zellrasen. Aus den ermittelten RWD (t)-Werten wurde mit GraphPad Prism 5 ein RWD/(t)-Diagramm erstellt und die Messwerte bis zum Erreichen der Wundkonfluenz (Zeitpunkte 0-18 h) in eine lineare Regression einbezogen. Aus den resultierenden Anstiegen wurde schließlich ein Mittelwert je Messung gebildet und diese über 4 Messungen auf die jeweilige Scr-Kontrolle normalisiert.

### **3.2.5.3 Colony Forming Assay**

Um einen potenziellen Einfluss von *ELAVL1* auf die Kolonieformation von Nierenzellkarzinom-Zelllinien untersuchen zu können, wurde ein Soft Agar Assay durchgeführt. Es bietet durch seine Dreidimensionalität ein etabliertes Modell, um ein wesentliches Tumorzell-Charakteristikum *in vitro* nachzustellen - die Ausbildung von Kolonien ausgehend von einer einzelnen Zelle. Hierzu war zunächst die Herstellung eines 2 % Soft Agars aus Agar und 1x PBS nötig, der nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert wurde. Die Base-Agar-Platten wurden in Vorbereitung auf das Assay wie folgt präpariert. Um eine 48-Well-Platte mit je 200 µl Base Agar (0,5 %) füllen zu können, wurden 12 ml Base Agar hergestellt. Hierzu wurden 9 ml Kulturmedium auf 37 °C erwärmt und der autoklavierte Soft Agar in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis sich der gesamte Agar gelöst hatte. Anschließend wurden 3 ml des heißen Soft Agars mit dem erwärmten Medium vermischt und davon mithilfe einer Repetierpipette zügig 200 µl/Well auf die Platte pipettiert. Nach dem Aushärten des Base Agars konnten die Platten unter Abdichtung mit Parafilm für einige Tage bei 4 °C gelagert werden. In dieser Arbeit wurde die Kolonieformation unter Aussaat von 2.500 und 5.000 Zellen/Well gemessen. Hierbei fand in jeder Messung pro Zelllinie eine 3-fach Bestimmung je Zellkonzentration statt. Zur Anfertigung des Top Agars, der die Zellen enthielt, wurden im Rahmen der Zellpassage die zu untersuchenden Zellen trypsiniert, in Kulturmedium aufgenommen und gezählt (3.2.1.3, 3.2.1.4). Zur Aussaat von 2.500 Zellen/Well wurden 62.500 Zellen in 4 ml Medium aufgenommen, für 5.000 Zellen waren es doppelt so viele in einem

zweiten Falcon. Nach Zugabe von jeweils 0,5 ml FKS inkubierten die Ansätze für 30 Minuten bei 37 °C. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde der Soft Agar (2%) erwärmt, beiden Falcons je 500 µl hinzugefügt und nach kurzem Vermischen je 200 µl Top-Agar je Well und Konzentration auf den Base Agar gegeben. Als der Top Agar nach ca. 30 Minuten erkaltet war, wurden 200 µl Kulturmedium hinzugegeben, welches aller 3-4 Tage durch vorsichtiges Abnehmen erneuert wurde. Nach 11, 14 und 18 Tagen wurden die Wells unter dem Mikroskop *Axio Vert A.1* bei 2,5x-Vergrößerung betrachtet. Je Kavität wurden 3 verschiedene Schichten des Top-Agars fotografiert und mithilfe der Software *ImageJ* ausgewertet. Hierzu wurden die Bilder in das 8-bit-Format konvertiert und die Schichtbilder einer Kavität in einem Stapelbild vereint. Diese wurden mithilfe eines Makros (Abzug Hintergrundsignal bis zu 100 Pixel, Schwellenwert 208 Pixel, Analyse von Partikeln der Größe 70-2000 Pixel) hinsichtlich Koloniezahl und -größe analysiert. Die Messergebnisse wurden anschließend in *GraphPad Prism 5* graphisch dargestellt. Zur Relativierung von Messschwankungen zwischen den einzelnen Experimenten wurden pro Messung die Mittelwerte berechnet und die Mittelwerte der Einzelklone auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle normalisiert.

### **3.2.6 Detektion von C10ORF99 in Zellüberständen von Caki-Zellen**

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen *ELAVL1*-Status und C10ORF99-Sekretion in Caki-Zellen herstellen zu können, wurde die C10ORF99-Konzentration in Zellüberständen gemessen. Hierzu wurde das Kulturmedium von Caki-1- und Caki-2-Scr-Zellen sowie der *ELAVL1*-KO-Klone nach 2 und 3 Tagen Kulturdauer in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen vollständig abgenommen, bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei - 80 °C gelagert. Um ein Vorhandensein von C10ORF99 im reinen Kulturmedium auszuschließen, wurde frisches RPMI-Kulturmedium (+10% FKS, +1% Penicillin/Streptomycin) als Kontrollprobe äquivalent aufbereitet und schließlich als Negativkontrolle verwendet. Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Sandwich-ELISA (3.2.8).

### **3.2.7 Detektion von C10ORF99 in humanen Serumproben**

#### **3.2.7.1 Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien**

Um die Eignung von C10ORF99 als möglicher diagnostischer Biomarker für das Vorliegen eines RCC zu prüfen, sollte die Konzentration des Proteins in humanen Serumproben von RCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen bestimmt werden. Es wurden 90 Serumproben gemessen, die freundlicherweise von der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Halle (Saale) zur Verfügung gestellt und im Rahmen der Studie „Optimierung der Isolierung und Charakterisierung von zirkulierenden



Tumorzellen“ (Ethikvotum Nr. 2012-65, Amendment 01 und 02) gewonnen wurden. Einschlusskriterien der ursprünglichen Studie waren neben einem Mindestalter von 18 Jahren die Diagnose eines benignen oder malignen Nierentumors bzw. Nierengesundheit im Falle der 10 Kontrollindividuen. Hierbei wurden Patienten aller UICC-Stadien berücksichtigt, bei denen die Indikation zur Tumorexzision oder Nephrektomie bestand. Die Serumproben wurden im Rahmen der präoperativen Routine-Diagnostik gewonnen und anhand des post-operativen histopathologischen Befundes die Dignität zugeordnet. Weitere Einschlusskriterien stellten die Durchführung eines ärztlichen Aufklärungsgesprächs und das Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung des Patienten dar. Ausschlusskriterien waren neben einem Patientenalter von unter 18 Jahren die fehlende Einwilligungsfähigkeit des Patienten. Es wurden 70 RCC-Serumproben (RCC) gemessen, die weiterhin nach histologischem Subtyp des Nierenzellkarzinoms unterschieden wurden: klarzellig (ccRCC), papillär (pRCC), chromophob (chRCC) und klarzellig-papillär (cpRCC). Die Probe mit dem klarzellig-papillären RCC-Befund kann dabei keinem UICC-Stadium zugeordnet werden und ist im Vergleich der histologischen Subtypen nicht enthalten. Die in dieser Arbeit gemessenen benignen Serumproben (BEN) stammten von Patienten, bei denen ein Onkozytom, Angiomyolipom oder pyogenes Granulom diagnostiziert wurde. Makroskopisch stellen sich Onkozytome mahagoni-farben mit zentraler Narbe dar [117], während Angiomyolipome Gefäß-, Fett- oder Muskelanteile aufweisen können [118]. Pyogene Granulome sind gefäßreiche gutartige Tumoren der Haut oder Schleimhäute, extrem selten werden auch intravasale Granulome beschrieben [119]. Zudem wurden Serumproben von 10 nierengesunden männlichen Probanden als Kontrollen gemessen.

**Tabelle 2: Patientenkollektiv**

Entität	Individuenzahl (n)	Alter (Jahre)	mittleres Alter (Jahre)	Geschlecht		UICC-Stadium			
				w	m	I	II	III	IV
<b>RCC</b>	<b>70</b>		64,6						
ccRCC	51	44-82	65,8	21	30	21	9	17	4
pRCC	11	47-69	59,4	4	7	6	4	1	-
chRCC	7	56-73	65,3	3	4	2	5	-	-
cpRCC	1	55	-	-	1	-	-	-	-
<b>BEN</b>	<b>20</b>								
Onkozytom	14	30-81	63	7	7				
Angiomyolipom	5	49-76	61	5	-				
Pyogenes Granulom	1	53	-	1	-				
<b>CTR</b>	<b>10</b>	43-65	52,3	-	10				

### **3.2.7.2 Probengewinnung und -aufbereitung**

Die Gewinnung und Aufbereitung der verwendeten Serum-Proben fand durch die Klinik für Urologie der Universitätsklinik Halle (Saale) im Rahmen vorheriger Studien statt. Die Probenverarbeitung erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach Abnahme. Je Patient wurde peripher-venöses Blut einer Serum-Gel-Monovette bei 3000 U/min und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert, der Serumüberstand vorsichtig abgenommen und zu Aliquots bei -80 °C gelagert.

### **3.2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zur Detektion und Quantifizierung relativer Konzentrationsunterschiede von C10ORF99 in diversen biologischen Proben wurden zwei ELISA-Kits herangezogen. Die Analyse von Serum-Proben erfolgte mit dem Kit von MyBioSource (625 – 20.000 pg/ml), die Messung von Zellüberständen mit dem Kit von Cloudclone (31,2 – 2000 pg/ml). Die Messung erfolgte nach Protokoll des jeweiligen Kits in Einfach- (Serumproben) oder Doppelbestimmung (Zellüberstände) unter Einsatz von 50 - 100 µl Probe gemäß Herstellerangabe, wobei Serumproben im Verhältnis 1:2 – 1:3, Zellüberstände 1:2 bis 1:10 mit Sample Diluent verdünnt wurden. Bei jeder Messung wurde entweder RPMI-Medium oder dieselben Kontrollen 6 gesunder männlicher Probanden mitgeführt. Um eine vergleichbare Inkubationszeit aller 80 Proben zu gewährleisten, wurden diese zunächst auf einer DNase-/RNA-se freien Platte vorgelegt und anschließend mittels Mehrkanalpipette auf die Messplatte überführt. Innerhalb von 15 Minuten nach dem finalen Abstoppen der Enzym-Substrat-Reaktion erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung der optischen Dichte (O.D.) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Im Absorptions-Mikroplatten-Reader konnte anhand einer Eichkurve von 7-8 Standards je Kit aus der gemessenen optischen Dichte der Proben die Proteinkonzentration in ng/ml bzw. pg/ml berechnet werden. Dies erfolgte unter Abzug des Leerwertes (blank). Verwendet wurde die Software von *Magellan*<sup>TM</sup>. Die so ermittelten Proteinkonzentrationen wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.

### **3.2.9 Statistische Auswertung**

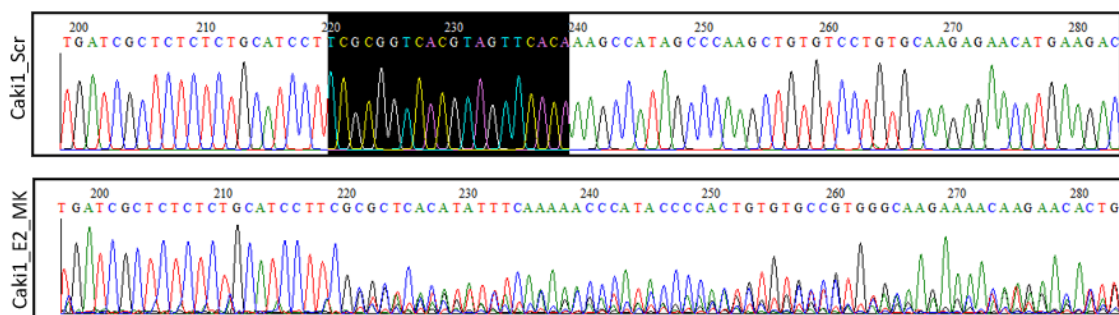
In dieser Arbeit gezogene 2-Gruppen-Vergleiche bezüglich einer Variable erfolgten mit dem ungepaarten t-Test. Mehrgruppenvergleiche wurden mittels One-Way-ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test über die Software *GraphPad Prism 5* durchgeführt. Eine Beratung zur Biometrie und Statistik durch Herrn apl. Prof. Dr. Andreas Wienke vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle hat im Voraus stattgefunden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Generierung eines CRISPR-Cas9 vermittelten *ELAVL1*-Knockouts in den Zelllinien Caki-1 und Caki-2

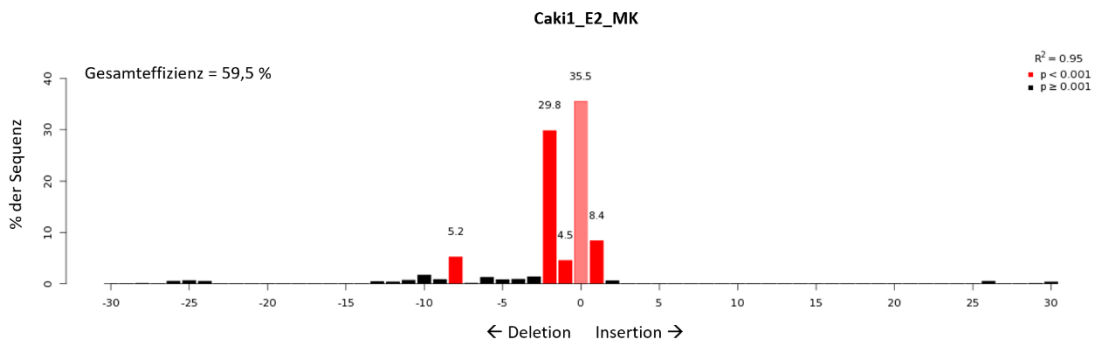
#### 4.1.1 Bestätigung des funktionellen Knockouts auf DNA-Ebene

Die Klonierung der gegen *ELAVL1* gerichteten gRNAs an Exon 2 und 3 erfolgte wie unter Punkt 3.2.3.3 beschrieben. Anhand einer Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA konnten die Konstrukte detektiert und damit eine erfolgreiche Klonierung nachgewiesen werden. Nach Vermehrung der Konstrukt-tragenden Plasmide in *E. coli* (3.2.3.4) wurden diese mithilfe eines lentiviralen Transduktionssystems in die Zielzellen überführt. Unter kontinuierlicher Puromycin-Exposition konnten positiv transduzierte Zellen selektiert werden. Schließlich wurde aus diesen Zellen DNA isoliert, die gRNA flankierenden Bereiche mittels PCR amplifiziert und sequenziert (3.2.3.10). Die Induktion von Mutationen im *ELAVL1*-Gen zeigte sich durch eine Überlagerung der Signale im Chromatogramm (Abb. 4).



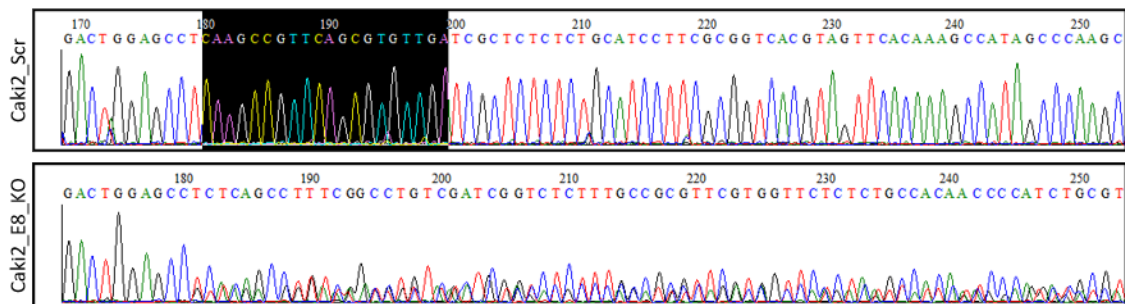
**Abb. 4: Chromatogramm von Caki-1-Zellen mit *ELAVL1*-Mutation.** Exemplarische Sequenzierung genomischer DNA von Kontroll- (Scr) und Mischkultur- (MK) Zellen nach Transduktion mit der *ELAVL1*-gRNA 2 (schwarz hinterlegt). Während die Scr-Sequenz regelmäßige Peaks und eine vollständige gRNA aufweist, lassen sich in der MK-Sequenz nur wenige Nucleotide der gRNA gefolgt von einer Überlagerung der Signale detektieren.

Abb. 4 veranschaulicht, dass durch die Transduktion Mutationen am Ziel-Lokus induziert wurden. Um die Art der entstandenen Mutationen zu bestimmen, wurden die Sequenzen mithilfe der Applikation Tracking of Indels by DEcomposition TIDE [108] analysiert (3.2.3.13).



**Abb. 5: Mutationsanalyse einer Mischkultur mittels Tracking of Indels (TIDE).** Exemplarisch für die ELAVL1-Mischkultur Caki1\_E2\_MK. Als Balken dargestellt ist die prozentuale Abweichung von der Gesamtsequenz eines Allels, hervorgerufen durch das Indel (Deletion oder Insertion). Die Farbe des Balkens gibt die Signifikanz des ermittelten Indels an.  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß

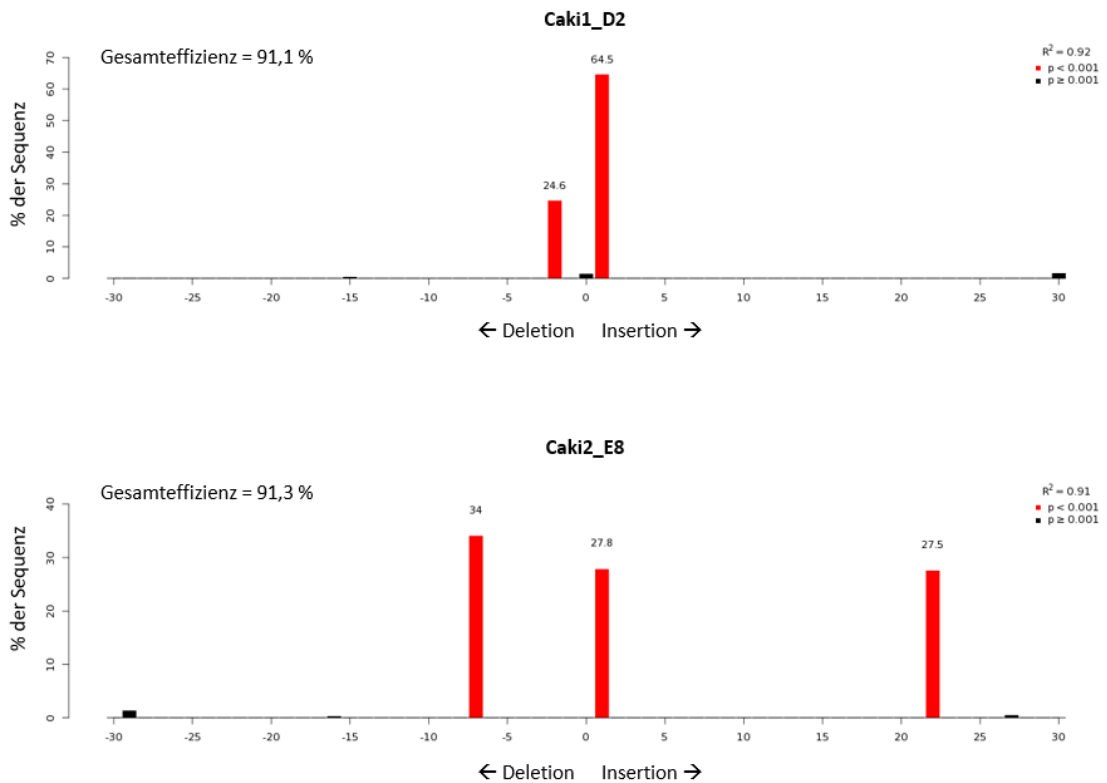
Anhand von Abb. 5 wird deutlich, dass Zellen unterschiedlicher Mutationen in der Zellkultur vorhanden sind. Es handelt sich also um eine Mischkultur. Daher wurden die Zellen vereinzelt (3.2.3.11), um Klone zu erhalten, die einen kompletten funktionellen *ELAVL1*-Verlust aufweisen. Dadurch sollte außerdem ein Überwachsen durch den Wildtyp verhindert werden. Analog zu den Mischkulturen wurde auch für die Einzelklone die Mutationsanalyse mithilfe der Sanger-Sequenzierung und der TIDE-Applikation durchgeführt. Abb. 6 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm einer Einzelklon-Sequenzierung.



**Abb. 6: Chromatogramm des Einzelklons Caki2\_E8.** Exemplarische Sequenzierung genomischer DNA von Kontroll- (Scr) und Einzelklon (KO)-Zellen nach Transduktion mit der *ELAVL1*-gRNA 3 (schwarz hinterlegt). Während die Scr-Sequenz regelmäßige Peaks und eine vollständige gRNA aufweist, lässt sich in der KO-Sequenz eine Überlagerung der Signale im Sinne einer Mutation detektieren.

Art und Größe der am *ELAVL1*-Locus verursachten Mutationen wurden über das Webtool TIDE [108] verifiziert. Abb. 7 zeigt exemplarisch die Analyseergebnisse zweier Einzelklone und lässt erkennen, dass der CRISPR/Cas9-vermittelte KO zu spezifischen Deletionen und Insertionen (Indels) im *ELAVL1*-Gen geführt hat. Ein Balken steht für ein Allel und gibt die prozentuale Sequenzabweichung durch das Indel an der

Gesamtsequenz an. Caki1\_G3 und Caki2\_E8 weisen 3 Allele auf und gehen somit vermutlich aus 2 Zellen hervor. Durch die Insertion und Deletion von Nucleotiden einer Anzahl von ungleich 3 wird nach der Mutation in allen Klonen eine Verschiebung des Leserasters hervorgerufen, wodurch eine komplett neue Basensequenz abgelesen wird, die das vorzeitige Zustandekommen eines Stopp-Codons hervorrufen kann. Damit wird die Synthese eines funktionellen Proteins verhindert.

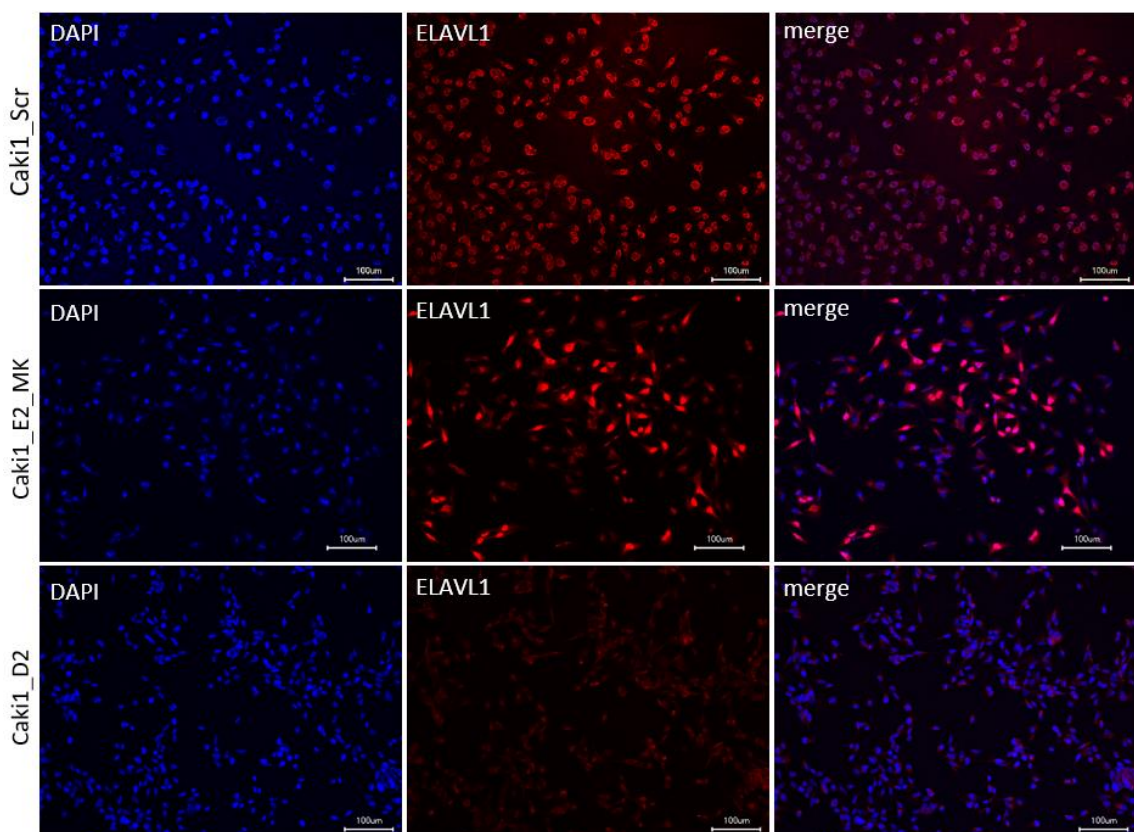


**Abb. 7: Mutationsanalyse von Einzelklonen mittels Tracking of Indels (TIDE).** Exemplarisch für die *ELAVL1*-KO-Klone Caki1\_D2 und Caki2\_E8. Als Balken dargestellt ist die prozentuale Abweichung von der Gesamtsequenz eines Allels, hervorgerufen durch das Indel (Deletion oder Insertion). Die Farbe des Balkens gibt die Signifikanz des ermittelten Indels an. R<sup>2</sup> = Bestimmtheitsmaß

Es ließen sich für die gRNA1 keine Einzelklone isolieren. Für die Caki-1-Zellen war zudem keine Isolation eines Einzelklones mit der gRNA3 möglich. Letztlich konnten für Caki-1 zwei *ELAVL1*-KO-Klone mit der gRNA2 isoliert werden (Caki1\_D2, Caki1\_G3). Aus den Mischkulturen der Caki-2-Zellen gingen drei *ELAVL1*-Einzelklone mit der gRNA2 (Caki2\_E4, Caki2\_F8, Caki2\_G5) und 1 Einzelklon der gRNA3 (Caki2\_E8) hervor.

#### 4.1.2 Bestätigung des funktionellen Knockouts auf Protein-Ebene

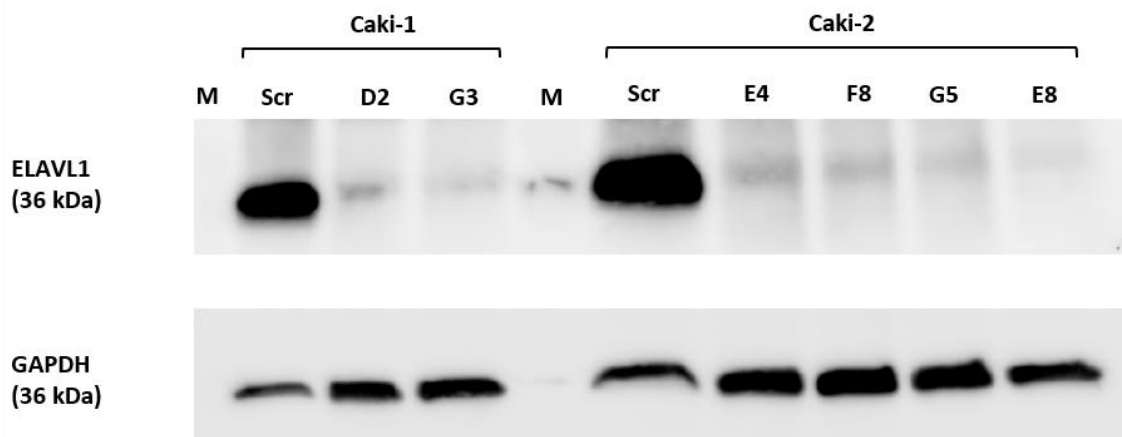
Um zu bestätigen, dass durch die Mutation auf DNA-Ebene kein funktionelles Protein mehr gebildet werden kann, wurden Immunfluoreszenzaufnahmen gemacht (3.2.4.1). Hierzu wurden Scr-, Mischkultur- und KO-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit einem gegen ELAVL1 gerichteten Primärantikörper inkubiert. Nur bei Vorhandensein des Proteins im Zellkern war die Bindung eines fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers und damit die immunhistochemische Detektion eines Fluoreszenzsignals bei einer Wellenlänge von 568 nm möglich. Sowohl Caki 1- als auch Caki-2-Scr-Zellen emittierten erwartungsgemäß ein starkes kernassoziertes ELAVL1-Signal, was dem Bild des jeweiligen Wildtyps entsprach. In den Mischkulturen Caki-1 und Caki-2 wies bereits die Hälfte der Zellen kein spezifisches Kernsignal mehr auf. Bei Betrachtung der isolierten Einzelklone beider Zelllinien hingegen konnte gar kein kernbezogenes Signal mehr detektiert werden, was auf ein Fehlen von ELAVL1 im Kern schließen lässt. Abb. 8 zeigt exemplarisch die Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Caki-1-Zellen.



**Abb. 8: Bestätigung des ELAVL1-KO in Caki-1-Zellen durch Immunfluoreszenz.** Immunfluoreszenzaufnahmen von Kontrollen (Caki1\_Scr), Mischkultur der gRNA2 (Caki1\_E2\_MK) und eines Einzelklons (Caki1\_D2) der Zelllinie Caki-1 am Keyence Fluoreszenz-Mikroskop. 20x-Vergrößerung (Maßstab 100 µm). DAPI (blau) = Zellkern, ELAVL1 (rot) = ELAVL1 im Kern, merge = Schichtbild beider Fluoreszenzsignale



Zudem wurde der funktionelle Verlust von ELAVL1 mittels Western Blot dargestellt. Hierzu wurde sowohl von Kontrollzellen als auch von den Einzelklonen der Caki-1- und Caki-2-Zellen Protein isoliert (3.2.4.2), das über eine SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (3.2.4.3) und schließlich mittels Western-Blot-Methode auf eine Membran transferiert wurde (3.2.4.5). War ELAVL1 in den Proteinproben enthalten, konnte der ELAVL1-spezifische Primärantikörper an der Membran binden und durch die Kopplung an seinen Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz eine Bande auf der Höhe von 36 kDa detektiert werden. Da ELAVL1 damit dasselbe Molekulargewicht besitzt wie die ubiquitär exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche als Kontrolle diente, wurde zunächst GAPDH detektiert und fotodokumentiert. Nach einem Antikörper-Stripping (3.2.4.4) wurde dieselbe Membran dann mit dem ELAVL1-Antikörper behandelt. Abb. 9 zeigt, dass erwartungsgemäß alle Proben unabhängig vom ELAVL1-Status eine gleich starke GAPDH-Bande aufwiesen. Für ELAVL1 lassen sich in den Proben der Scr-Zellen von Caki-1 als auch für Caki-2 ebenfalls starke Banden detektieren, wohingegen die Proben der KO-Klone keine spezifische ELAVL1-Bande mehr erkennen lassen. Daraufhin wurden alle Klone in den Analysen dieser Arbeit als ELAVL1-defizient angesehen. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Protein-Isolationen auf diese Weise untersucht, die dasselbe Ergebnis hervorbrachten.

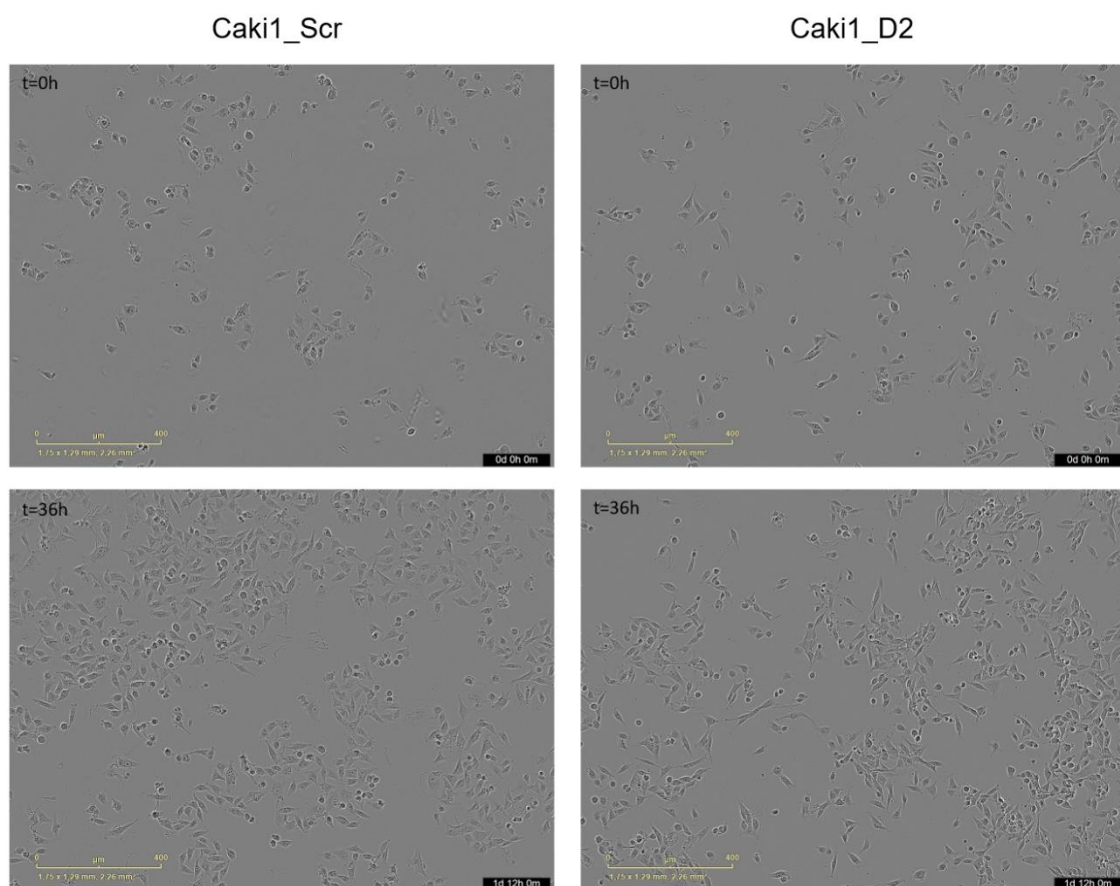


**Abb. 9: Bestätigung des *ELAVL1*-KO auf Proteinebene im Western Blot.** Western Blot mit 20 µg Protein je Bande unter Behandlung mit dem primären Antikörper gegen ELAVL1 (oben) und GAPDH (unten). Während GAPDH in allen Proben vorhanden ist, ist ELAVL1 lediglich in den Scr-Zellen nachweisbar. Die Einzelklone beider Zelllinien (D2, G3, E4, F8, G5, E8) sind ELAVL1-defizient. Es handelt sich um dieselbe Membran vor und nach Stripping des GAPDH-Antikörpers. M=Marker

## 4.2 Einfluss eines *ELAVL1*-Knockouts auf den Phänotyp von Caki- 1- und Caki-2-Zellen

### 4.2.1 Proliferationsassay

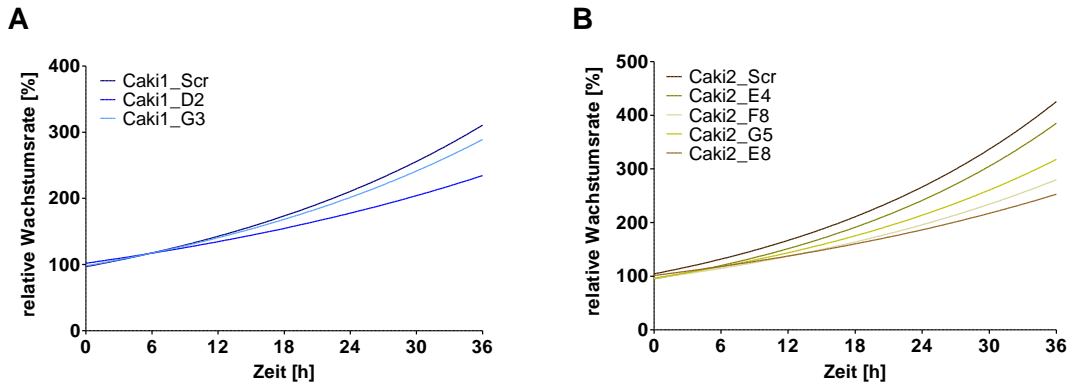
Nach der erfolgreichen Generierung von *ELAVL1*-defizienten Einzelklonen für beide Zelllinien sollte untersucht werden, welchen Einfluss der funktionelle Genverlust auf das Zellwachstum von Caki-1- und Caki-2-Zellen hat. Hierzu wurde ihr Proliferationsverhalten über einen Zeitraum von 60 h mithilfe eines Lebendzellanalyse-Systems gemessen (3.2.5.1). Abb. 10 zeigt exemplarisch für Caki-1-Zellen Proliferationsaufnahmen von Scr- und KO-Zellen nach 0 und 36 h.



**Abb. 10: Proliferationsanalyse von Caki-1-Zellen.** Exemplarische Aufnahmen eines Proliferationsassays von Caki-1-Scr- und -KO-Zellen (Caki1\_D2) nach Aussaat im 96-Well-Format nach 0 und 36 Stunden ( $t = 0$  h,  $t = 36$  h) am *IncuCyte® Life Cell Analysis System*. Maßstab 400 µm.

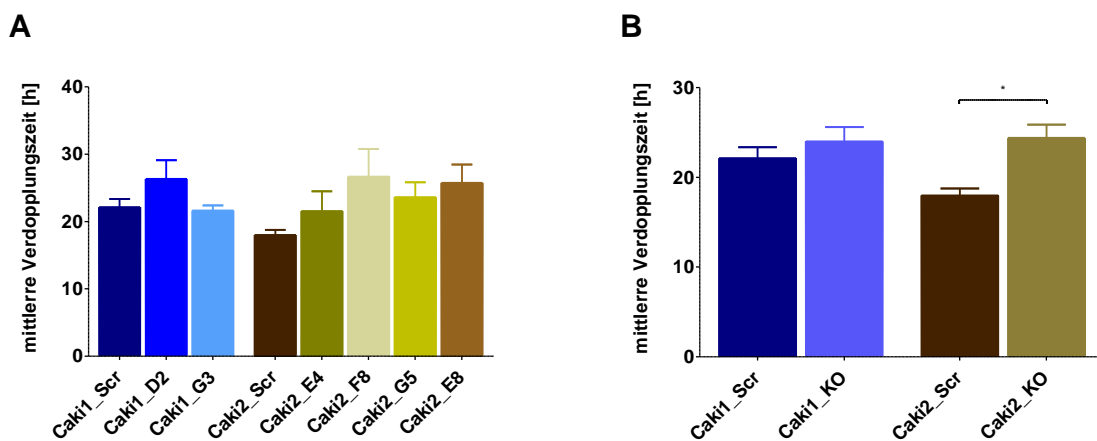
Aus den resultierenden Wachstumskurven konnte über eine nicht-lineare Regression die Verdopplungszeit der Zellen berechnet werden (3.2.5.1). In Abb. 11 ist dies exemplarisch für eine von 4 Messungen gezeigt.





**Abb. 11: Berechnung der relativen Wachstumsrate von Caki-1- und Caki-2-Zellen über nicht-lineare Regression.** Relative Wachstumsrate in % von **A** Caki-1-Zellen und **B** Caki-2-Zellen. Dargestellt sind exemplarisch die Wachstumskurven aus einer von insgesamt 4 unabhängigen Analysen (n=1) mit ihrer nicht-linearen Regression.

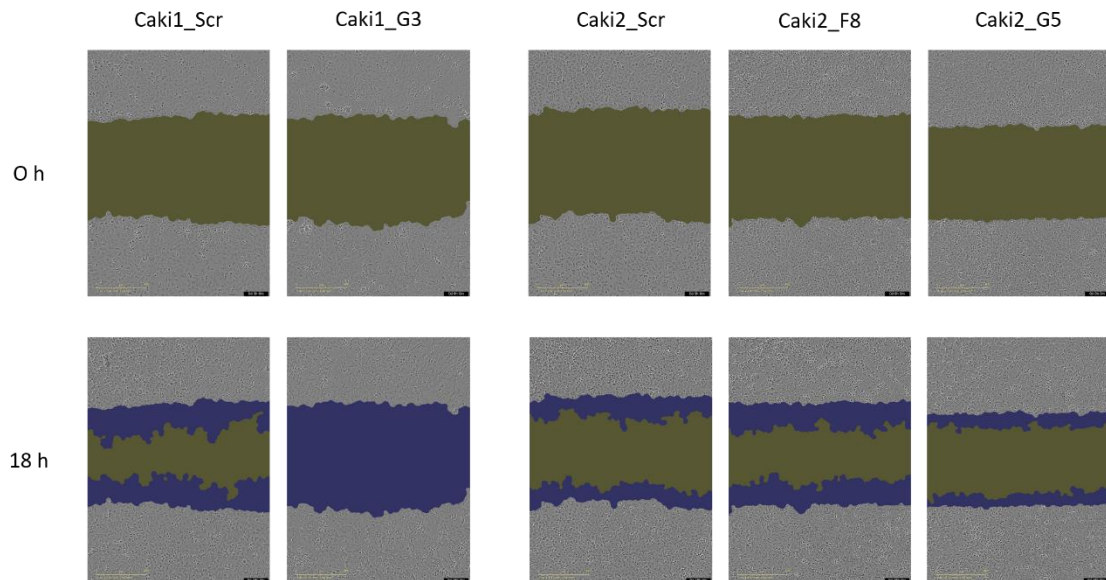
Betrachtet man die daraus berechneten mittleren Verdopplungszeiten (Abb. 12), ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Scr- und den KO-Zellen der beiden Zelllinien. Mittelt man die Verdopplungszeiten der Einzelklone in einer KO-Gruppe, zeigt sich für die Caki-2-Zellen mit 24 h eine signifikant langsamere Proliferation der ELAVL1-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (18 h). Für die Caki-1-Zellen kann im Mittel kein Effekt der ELAVL1-Defizienz auf die Verdopplungszeit abgeleitet werden.



**Abb. 12: Zellproliferation von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter einem ELAVL1-KO.** Mittlere Verdopplungszeit in Stunden von Scr- und ELAVL1-KO-Zellen der Zelllinien Caki-1 und Caki-2 basierend auf relativer Wachstumsrate und nicht-linearer Regression (Abb. 11). **A** Einzelklone gegenüber Scr und **B** Zusammenfassung aller Einzelklone in einer KO-Gruppe. Dargestellt sind die Messwerte aus 4 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung (n=4, t-Test, \* = p < 0,01).

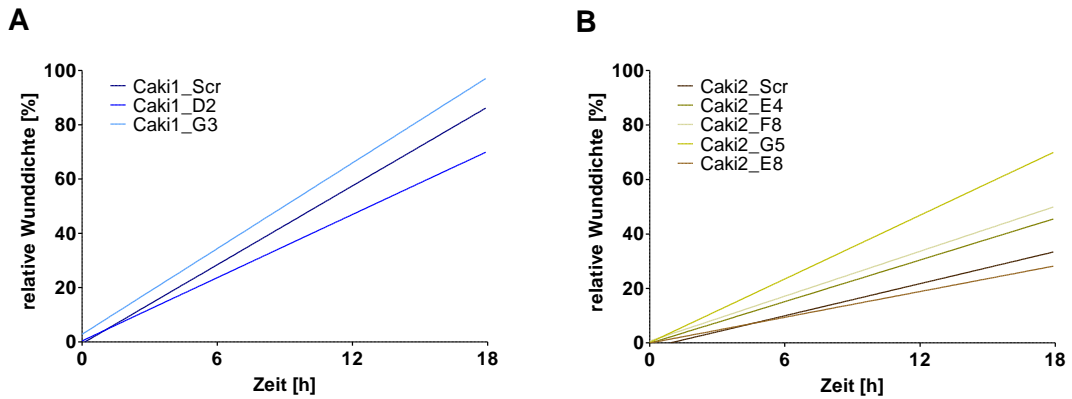
#### 4.2.2 Migrationsassay

Ob eine ELAVL1-Defizienz Einfluss auf das Migrationsverhalten von Caki-1- und Caki-2-Zellen hat, sollte im Rahmen weiterer Lebendzellanalysen im 96-Well-Format untersucht werden. Abb. 13 zeigt exemplarisch Ausschnitte dieses Migrationsassays.



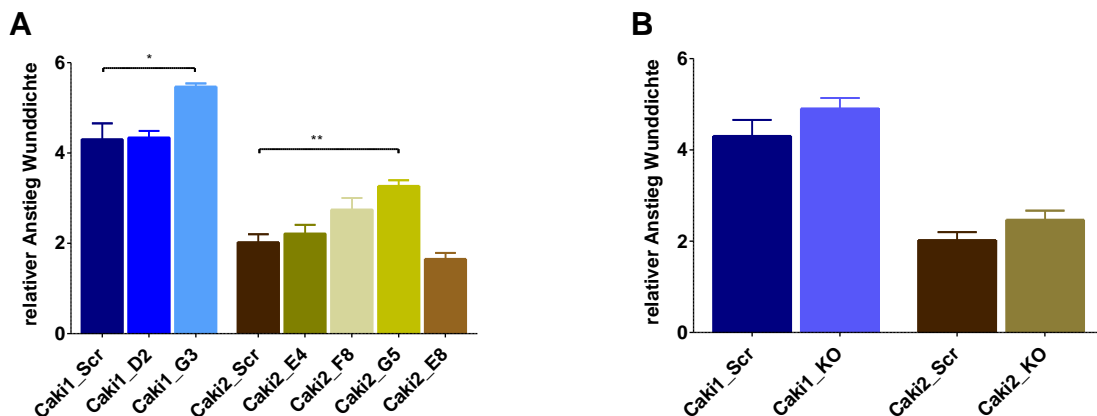
**Abb. 13: Migrationsverhalten von Caki-Zellen unter einem *ELAVL1*-KO.** Ausschnitte aus einem Migrationsassay in Doppelbestimmung zur Ermittlung der relativen Wunddicke (RWD) in % an einem Wundspalt im Zellrasen von Caki-Zellen. Dargestellt ist je 1 Kavität einer 96 Well-Platte. Nach Zufügen einer Wunde (ockerfarben) wurden die Migrationsränder (blau) über 60 h hinweg alle 6 h fotografiert. Dargestellt sind exemplarisch Ausschnitte nach 0 und 18 h. Maßstab 400  $\mu$ m.

Beobachtet man das Proliferationsverhalten an der Wunde im Zellrasen über 60 h hinweg (3.2.5.2), erreichten bereits nach 18 h die ersten Einzelklone den Wundspaltverschluss, sodass zur Ermittlung der Anstiege im Relative Wunddicke-Zeit-Diagramm (RWD-t-Diagramm, Abb. 14) nur die ersten 4 Messwerte (Zeitpunkte 0-18 h) einbezogen wurden.



**Abb. 14: Berechnung der relativen Wunddichte (RWD) von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter *ELAVL1-KO* über lineare Regression.** RWD-t-Diagramm aus einer von 4 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung, bei der das Migrationsverhalten an einer Wunde im Zellrasen über 60 h beobachtet wurde. Dargestellt sind die ersten 4 Messzeitpunkte vor Erreichen der Wundkonfluenz aus einer von 4 unabhängigen Messungen mit ihrer linearen Regression (n=1). Relative Wunddichte in % für **A** Caki-1-Zellen und für **B** Caki-2-Zellen.

Die relativen Migrationsunterschiede aller Messungen wurden schließlich mithilfe eines Säulendiagrammes dargestellt (Abb. 15).



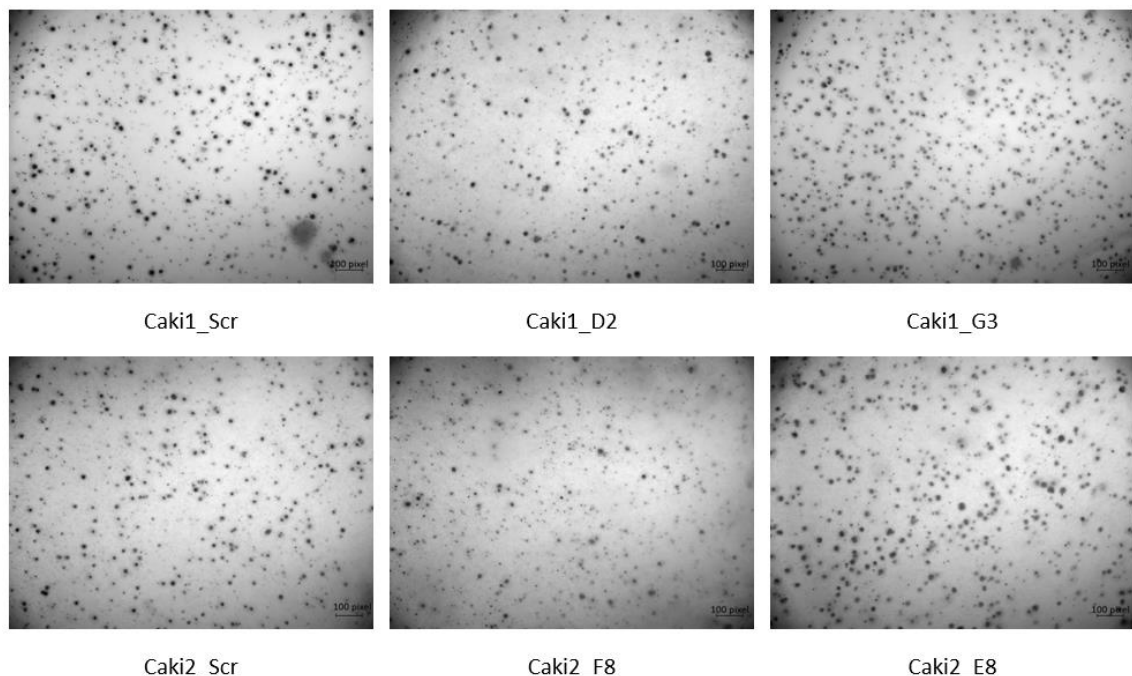
**Abb. 15: Migration von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter einem *ELAVL1-KO*.** Dargestellt ist der Anstieg der relativen Wunddichte (RWD) an den Proliferationsrändern einer Zellwunde im Zeitraum von 18 h. Dieser entstammt den Anstiegen der Kurven im RWD-t-Diagramm (Abb. 14). Die Messerwerte entsprechen den Mittelwerten aus 4 unabhängigen Messreihen in Doppelbestimmung (n=3-4, \* = p < 0,01) **A** Anstieg relativer Wunddichte von *ELAVL1-KO*-Klonen der Zelllinien Caki-1 und Caki-2 gegenüber ihren Scr-Kontrollen. **B** Zusammenfassung aller Einzelklone in einer KO-Gruppe.

Betrachtet man das Migrationsverhalten der *ELAVL1-KO*-Klone gegenüber ihren Scr-Kontrollen, zeigt sich für Caki-1-Zellen ein steilerer Anstieg der RWD über die Zeit als für Caki-2-Zellen. Unter den Caki-1-Zellen wies D2 mit 4,35 denselben Anstieg der RWD

auf wie die Scr-Zellen (4,3), G3 migrierte hingegen mit 5,46 signifikant schneller (Abb. 15A). ELAVL1-defiziente Klone der Caki-2-Zellen wurden im Mittel schneller konfluent als ihre Scr-Kontrolle, wobei dieser Migrationsvorsprung nur bei F8 und G5 statistische Signifikanz aufweist. Der Einzelklon E8 hingegen migrierte als einziger Klon langsamer als die Scr-Kontrolle, jedoch blieb dieser Effekt ohne Signifikanz. Mittelte man die Messwerte aller Messreihen für alle Klone, war der Unterschied von ELAVL1-defizienten Klonen zu ihren Scr-Kontrollen ebenfalls nicht mehr signifikant (Abb. 15B). Insgesamt fand die Messung für die Caki-1-Zellen in 4, für die Caki-2-Zellen in 3 unabhängigen Messreihen statt.

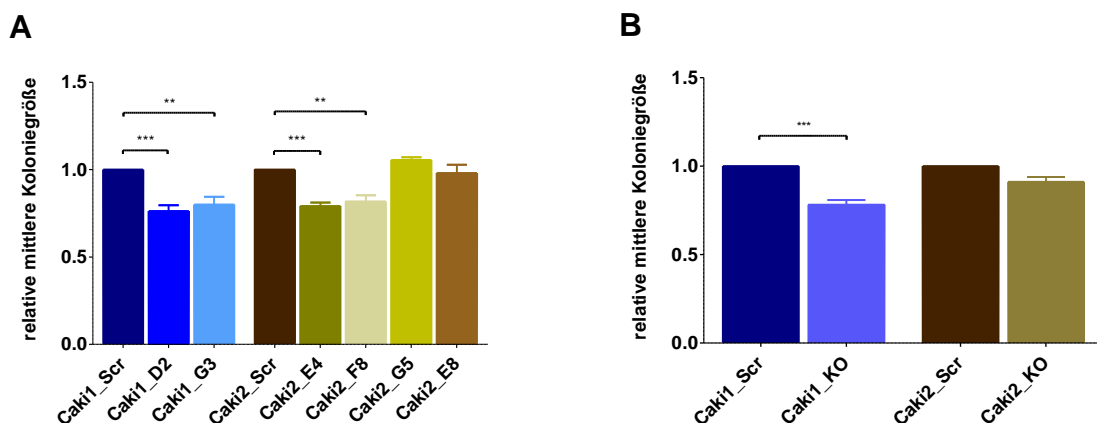
#### 4.2.3 Koloniebildung

Die Durchführung eines Colony Forming Assay sollte die Fähigkeit der Caki-Zellen überprüfen, ausgehend von einer Einzelzelle dreidimensionale Kolonien bilden zu können. Dabei sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen *ELAVL1*-Status und der Koloniegröße bzw. -zahl hergestellt werden. Grundsätzlich hatten beide Zelllinien nach 11, 14 und 18 Tagen Kultivierung im Soft Agar (3.2.5.3) Kolonien formiert. In Abb. 16 sind exemplarisch einige für die relative Koloniegröße repräsentative Ausschnitte des Assays dargestellt.



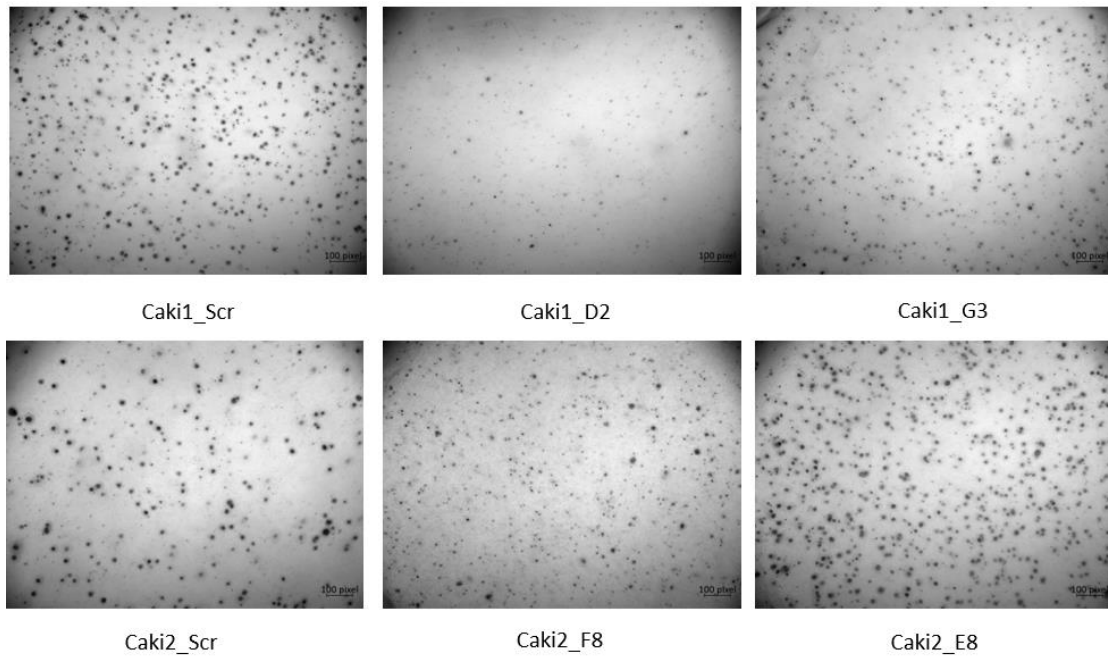
**Abb. 16: Koloniegröße von Caki-Zellen im Soft-Agar unter *ELAVL1*-KO.** Exemplarische Schichtbilder eines Colony-Forming-Assays zur Ermittlung der Koloniegröße von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter *ELAVL1*-KO. Dargestellt sind Ausschnitte der Schicht-Bilder von 2500 Zellen/Well nach 14 Tagen. Maßstab 100 µm.

Abb. 17 zeigt die gemessenen relativen Unterschiede in der Koloniegröße von Caki-Zellen nach *ELAVL1*-KO in einem Säulendiagramm und lässt erkennen, dass *ELAVL1*-defiziente Caki-1-Zellen signifikant kleinere Kolonien bildeten als ihre Scr-Kontrollen (Abb. 17A). Unter den Caki-2-Zellen bestand dagegen eine größere Inhomogenität. Während die Klone E4 und F8 ebenfalls signifikant kleinere Kolonien bildeten als ihre Scr-Kontrolle, bestand für die Einzelklone G5 und E8 kein signifikanter Unterschied (Abb. 17A). Um Zellklon-spezifische Effekte zu relativieren, wurden die Messwerte aller KO-Klone einer Zelllinie in einer KO-Gruppe gemittelt und die relativen Unterschiede in der Koloniegröße gegenüber der Kontrollgruppe betrachtet. Hierbei bestand lediglich für die Caki-1-KO-Zellen ein signifikanter Unterschied, deren Kolonien um 26% kleiner als die Kontroll-Kolonien waren. Die Koloniegröße der KO-Gruppe der Caki-2-Zellen unterschied sich nicht von der der Kontrollzellen (Abb. 17B).



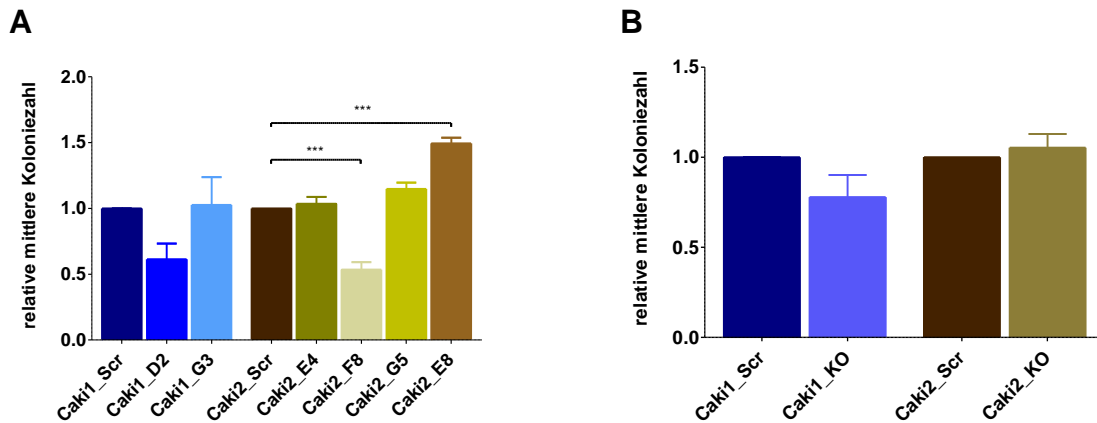
**Abb. 17: Einfluss eines *ELAVL1*-KO auf die Koloniegröße.** Relative Unterschiede der mittleren Koloniegröße von *ELAVL1*-KO-Zellen der Zelllinien Caki-1- und Caki-2 gegenüber ihrer Scr-Kontrolle. Enthalten sind Daten aus 4-5 unabhängigen Messreihen (n=4-5, One-Way ANOVA, \* = p < 0,01). **A** Relative mittlere Koloniegröße nach Mitteln von Kulturdauer (11, 14, 18 Tage) und Zellzahl (2500, 5000 Zellen) **B** Zusammenfassung aller Einzelklone in einer KO-Gruppe.

Weiterhin wurde die Anzahl formierter Kolonien der *ELAVL1*-KO-Klone gegenüber ihren Scr-Kontrollen gemessen und ebenfalls ein inhomogenes Verhalten der KO-Klone gegenüber ihren Kontrollen festgestellt. Abb. 18 zeigt exemplarisch Ausschnitte des Assays zur Ermittlung der relativen Koloniezahl, die relativen Unterschiede sind in Abb. 19 graphisch dargestellt.



**Abb. 18: Koloniezahl von Caki-Zellen im Soft-Agar unter *ELAVL1*-KO.** Exemplarische Schichtbilder eines Soft-Agar-Assays zur Ermittlung der Koloniezahl von Caki-1- und Caki-2-Zellen unter *ELAVL1*-KO. Dargestellt sind Ausschnitte der Schicht-Bilder von 2500 Zellen/Well nach 14 Tagen. Maßstab 100 µm.

Unter den Caki-1-Zellen ließ sich kein signifikanter Effekt des *ELAVL1*-Verlustes auf die Koloniezahl erkennen (Abb. 19A). Die KO-Klone der Caki-2-Zellen hingegen zeigten ein inhomogenes Verhalten – während F8 signifikant weniger Kolonien formierte, bildete E8 signifikant mehr Kolonien aus. Die Einzelklone E4 und G5 hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Kolonien gegenüber den Kontrollzellen. Zur Relativierung möglicher Zellklon-spezifischer Differenzen wurden die Einzelklone jeder Zelllinie in einer KO-Gruppe gemittelt und die relativen Gruppenunterschiede zur Scr-Kontrolle graphisch dargestellt (Abb. 19B). Hierbei ergab sich kein Unterschied in der Koloniezahl *ELAVL1*-defizienter Zellen gegenüber Kontrollzellen.



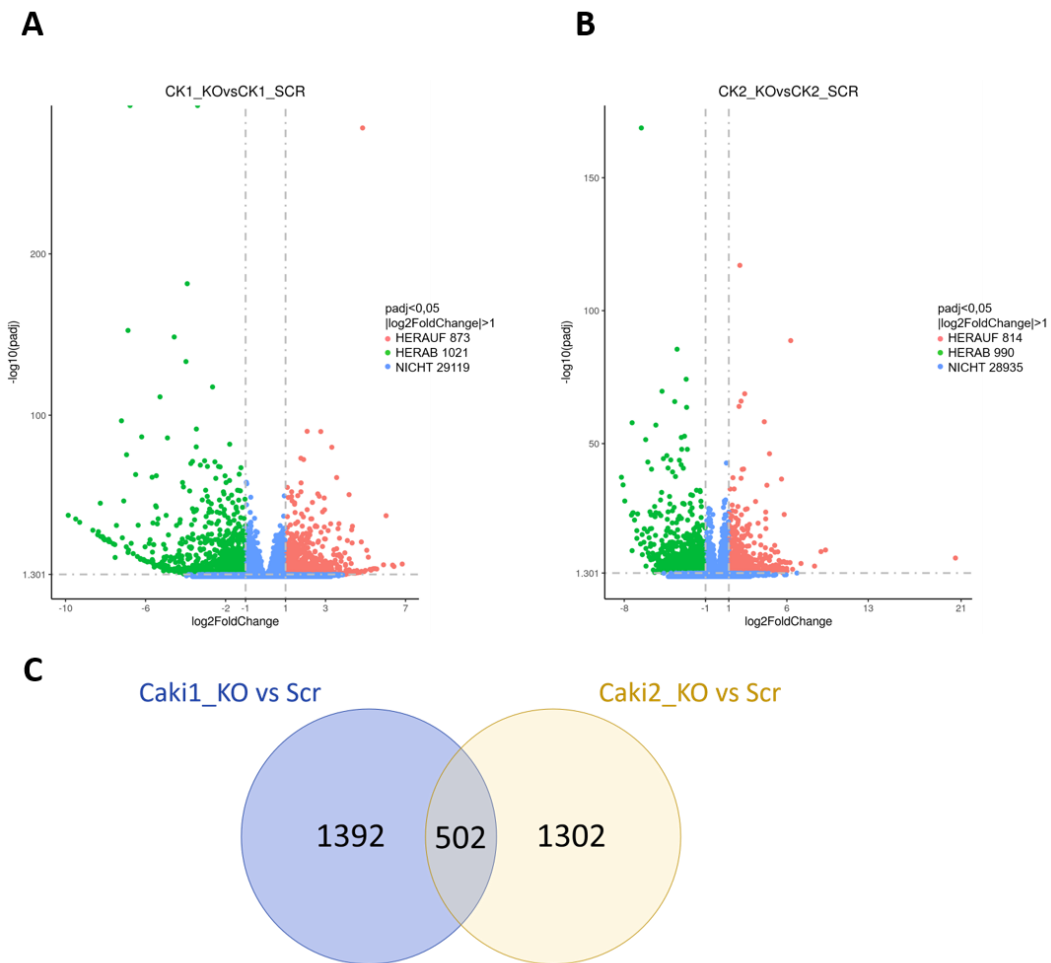
**Abb. 19: Einfluss eines *ELAVL1*-KO auf die Koloniezahl.** Relative Unterschiede der mittleren Koloniezahl von *ELAVL1*-KO-Klonen der Zelllinien Caki-1 und Caki-2 gegenüber ihrer Scr-Kontrolle. Enthalten sind die Messwerte aus 4 unabhängigen Messreihen (n=4, One-way-ANOVA, \* = p < 0,01). **A** Relative mittlere Koloniezahl der Einzelklone nach Mitteln von Kulturdauer (11, 14, 18 Tage) und Zellzahl (2500, 5000) **B** Zusammenfassung aller Einzelklone in einer KO-Gruppe.

### 4.3 Einfluss des *ELAVL1*-Knockouts auf die Genexpression

#### 4.3.1 Einfluss auf das Genprofil

##### 4.3.1.1 Allgemein

Um die Auswirkungen des *ELAVL1*-KO auf die globale Genexpression betrachten zu können, wurden 4 RNA-Isolationen für das Next Generation Sequencing aufgearbeitet und als Dienstleistung von Novogene Ltd. analysiert (3.2.2.6). Nicht in die Analyse einbezogen wurde der Einzelklon Caki2\_G5, da er dieselbe Mutation aufweist wie Caki2\_E4. Für die Analyse wurden alle 4 RNA-Isolationen der *ELAVL1*-KO-Klone der jeweiligen Zelllinie in einer KO-Gruppe zusammengefasst. Für die Caki-1-Zellen sind hier 2, für Caki-2-Zellen 3 KO-Klone inbegriffen. Auch die Isolationen der Scr-Zellen wurden in einer Gruppe je Zelllinie vereint. Zunächst wurde betrachtet, wie der Verlust von *ELAVL1* die Expression weiterer Gene beeinflusst, indem das Genprofil von Scr- und KO-Gruppe miteinander verglichen wurde (CK1\_KOvsCK1\_Scr, CK2\_KOvsCK2\_Scr). In Abb. 20A und B sind alle exprimierten Gene dargestellt, die in der Transkriptomanalyse erfasst wurden. Durch das Fehlen von *ELAVL1* werden in Caki-1-Zellen 1021 Gene (2,8%) und in Caki-2-Zellen 990 Gene (3,2%) signifikant herunterreguliert. Hingegen durch den KO signifikant heraufreguliert werden 873 Gene in den Caki-1-Zellen (3,3%) und 814 Gene in den Caki-2-Zellen (2,6%). Letztlich sind damit durch einen *ELAVL1*-KO in Caki-Zellen ebenso viele Gene herauf- wie herabreguliert.



**Abb. 20: Ein *ELAVL1*-KO beeinflusst die globale Genexpression in Caki-1- und Caki-2-Zellen.** Durch einen *ELAVL1*-KO in Caki-1- und Caki-2-Zellen differenziell exprimierte Gene (DEG). Vergleich aller analysierten Gene der *ELAVL1*-KO-Gruppe mit der jeweiligen Scr-Gruppe. DEG in **A** Caki-1-KO-Zellen (enthält 2 KO-Klone) und in **B** Caki-2-KO-Zellen (enthält 3 KO-Klone) gegenüber Scr. Gene mit  $\log_2FC \leq -1$  (grün) sind herabreguliert, Gene mit  $\log_2FC \geq 1$  (rot) heraufreguliert. Gene mit  $\log_2FC$  -1 bis +1 werden nicht differenziell exprimiert (blau). **C** Gemeinsam DEG für Caki1\_KOvs\_Scr und Caki2\_KOvs\_Scr. Enthalten sind alle statistisch signifikant regulierten Gene. Abb. A und B wurden bereitgestellt von Novogene Ltd. Der Vergleich der DEG erfolgte mithilfe des Online-Tools VENNY 2.1.0 (Oliveros J.C., 2007-2015). Enthalten sind die Messergebnisse aus 4 unabhängigen RNA-Isolationen ( $n=4$ ,  $p_{adj} < 0,05$ ).

Mithilfe von Listen zur differentiellen Genexpression, die im Rahmen des Next Generation Sequencing erstellt und von Novogene Ltd. zur Verfügung gestellt wurden, konnten gemeinsam regulierte Gene beider Zelllinien identifiziert werden (Abb. 20C). Hierzu wurden zunächst die Gene aus der Liste differentiell exprimierter Gene (DEG) des Vergleiches CK1\_KOvs\_Scr mit der gleichen Liste für die Caki-2-Zellen verglichen. Dazu wurde das Online-Tool VENNY 2.1.0 (Oliveros J.C., 2007-2015) verwendet. Während in Caki-1-Zellen durch ein *ELAVL1*-KO 1894 Gene differentiell exprimiert werden, sind es bei Caki-2-Zellen 1804 Gene. Beide Zelllinien haben 502 DEG gemein.

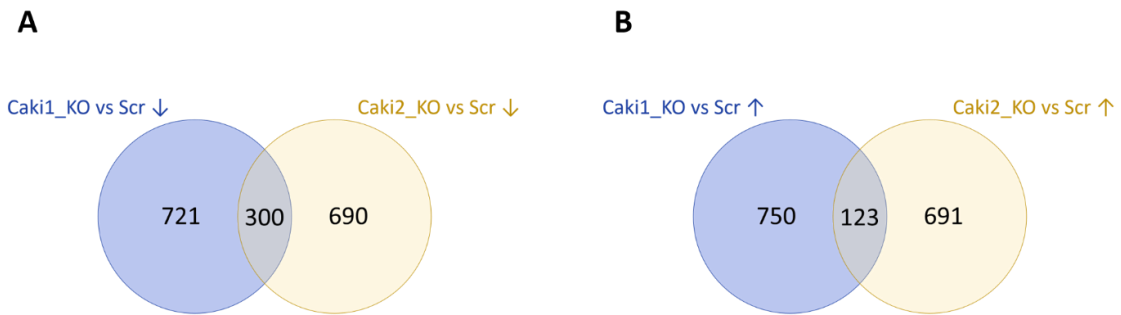


In der nachfolgenden Tabelle 3 sind für den Vergleich aller signifikant DEG die 10 am stärksten gemeinsam herauf- und herunterregulierten DEG ( $p_{adj} < 0,05$ ) unter *ELAVL1*-KO in Caki-1- und Caki-2-Zellen aufgelistet.

**Tabelle 3: Top 10 der gemeinsam regulierten DEG unter *ELAVL1*-KO in Caki-Zellen.**

Heraufreguliert ↑	Caki-1 log2FC	Caki-2 log2FC	Herabreguliert ↓	Caki-1 log2FC	Caki-2 log2FC
<i>ZFP28</i>	6,833	1,054	<i>ICA1</i>	-9,866	-4,036
<i>GCNT1P3</i>	6,353	5,738	<i>GALNT13</i>	-9,295	-4,277
<i>CHI3L1</i>	3,964	6,491	<i>JAKMIP2</i>	-8,392	-6,596
<i>ZNF66</i>	3,840	1,088	<i>MCTP2</i>	-8,359	-2,662
<i>TLE2</i>	3,779	1,809	<i>LPAR4</i>	-8,150	-4,062
<i>CD24</i>	3,739	3,841	<i>NRXN3</i>	-8,112	-4,465
<i>XKR7</i>	3,623	1,725	<i>TLR4</i>	-7,865	-3,560
<i>BEND7</i>	3,308	2,755	<i>ITM2A</i>	-7,867	-3,125
<i>FN1</i>	3,128	2,121	<i>COL4A6</i>	-7,832	-5,970
<i>ZNF345</i>	2,995	1,357	<i>PRKAA2</i>	-7,522	-3,190

Schließlich wurden jeweils die Listen signifikant herauf- und herabregulierter Gene beider Zelllinien unter einem *ELAVL1*-KO miteinander verglichen (Abb. 21). Unter den herunterregulierten DEG in Caki-1- und Caki-2-KO-Zellen sind für beide Zelllinien 300 Gene identisch, gemeinsam heraufreguliert werden dagegen nur 123 Gene.



**Abb. 21: Durch einen *ELAVL1*-KO in Caki-1- und Caki-2-Zellen werden mehr gemeinsam differentiell exprimierte Gene (DEG) herunter- als heraufreguliert.** Vergleich aller statistisch signifikant DEG der *ELAVL1*-KO-Gruppen der Zelllinien Caki-1 und Caki-2 **A** Vergleich aller gemeinsam statistisch signifikant heraufregulierten Gene ( $\log_2FC \geq 1$ ) **B** Vergleich aller gemeinsam statistisch signifikant herunterregulierten Gene ( $\log_2FC \leq -1$ ). Die Erstellung des Venn-Diagramms erfolgte mithilfe Online-Tool VENNY 2.1.0 (Oliveros J.C., 2007-2015). Enthalten sind die Messwerte aus 4 unabhängigen Messungen ( $n=4$ ,  $p_{adj} < 0,05$ ).

In Tabelle 4 sind die 10 am stärksten herauf- und herunterregulierten Gene jeder Zelllinie dargestellt (DEG,  $p_{adj} < 0,05$ ).

**Tabelle 4: Top 10 der in Caki-Zellen unter *ELAVL1*-KO am stärksten herauf- und herunterregulierten Gene, grün = prognostisch vorteilhaft, rot = prognostisch unvorteilhaft im ccRCC nach Human Protein Atlas [120]**

Vergleich	Caki1_KO vs Scr (log2FC)	Caki2_KO vs Scr (log2FC)
<b>Herunterreguliert (Abb. 21A)</b>	<i>ICA1</i>	<i>SNAP25</i>
	<i>DCAF12L2</i>	<i>CTTNBP2</i>
	<i>GALNT13</i>	<i>KCNJ8</i>
	<i>IGSF1</i>	<i>EPHA4</i>
	<i>JAKMIP2</i>	<i>CNKSR2</i>
	<i>MCTP2</i>	<i>MAOA</i>
	<i>MARK1</i>	<i>COL25A1</i>
	<i>SLITRK4</i>	<i>PGR</i>
	<i>LPAR4</i>	<i>PRKG1</i>
	<i>NRXN3</i>	<i>PTPRZ1</i>
<b>Heraufreguliert (Abb. 21B)</b>	<i>ZFP28</i>	<i>GAGE1J</i>
	<i>RNF183</i>	<i>TSPAN8</i>
	<i>GCNT1P3</i>	<i>SHANK1</i>
	<i>FOXS1</i>	<i>TP53I11</i>
	<i>ZNF793</i>	<i>TNS1</i>
	<i>AC025470.2</i>	<i>CHI3L1</i>
	<i>MRPS36P5</i>	<i>SLCO2B1</i>
	<i>AP000221.1</i>	<i>SLC37A1</i>
	<i>TTC22</i>	<i>SSTR5</i>
	<i>PKD2L1</i>	<i>EPB41L3</i>

Interessanterweise ergibt sich hier ein Defizit zwischen den insgesamt signifikant deregulierten Genen unter einem *ELAVL1*-KO in beiden Zelllinien, nämlich 502 (Abb.

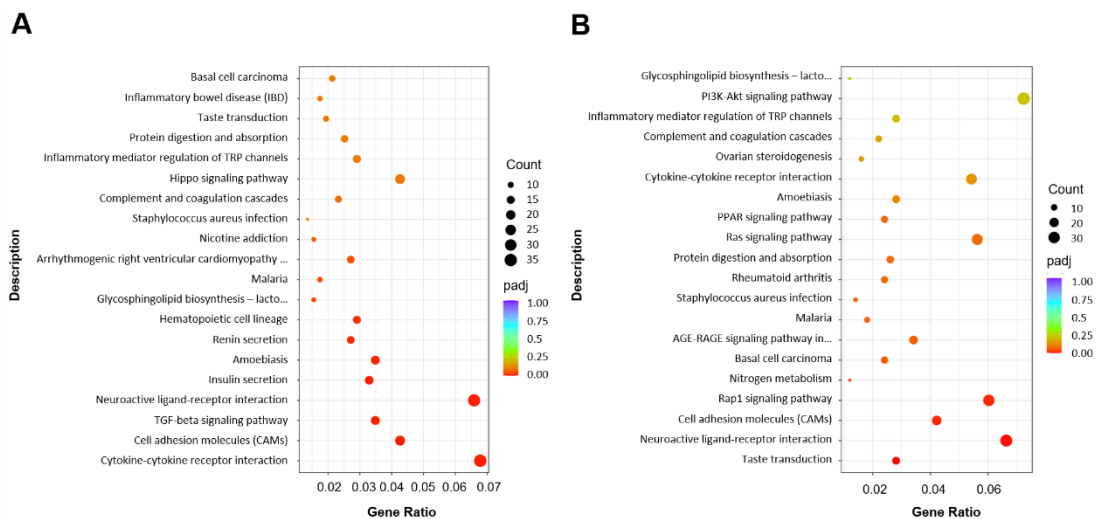
20C, graue Schnittmenge), und der Summe der gemeinsam herauf- und herunter regulierten Gene (Abb. 21, graue Schnittmengen), nämlich 423. Dies bedeutet, dass 79 der gemeinsam deregulierten Gene in beiden Zelllinien invers reguliert werden. Diese sind in Tab. 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Unter einem *ELAVL1*-KO in Caki-Zellen invers regulierte Gene**

Gen	log2FC		Gen	log2FC	
	Caki-1 ↓	Caki-2 ↑		Caki-1 ↑	Caki-2 ↓
<i>FOLH1</i>	-6,26	3,37	<i>AC104083.1</i>	5,14	-2,79
<i>BCL11A</i>	-5,46	4,42	<i>DHRS9</i>	5,06	-1,86
<i>ANKRD20A2</i>	-4,47	1,55	<i>GUCY1A1</i>	4,09	-4,23
<i>POF1B</i>	-4,28	4,79	<i>ROS1</i>	3,40	-2,67
<i>AL161431.1</i>	-3,56	2,23	<i>AC092919.2</i>	3,67	-2,47
<i>FA2H</i>	-3,07	5,98	<i>AFAP1L2</i>	3,55	-3,58
<i>GATA5</i>	-2,21	4,04	<i>TNIK</i>	3,31	-2,53
<i>MEGF11</i>	-2,18	2,50	<i>NPR3</i>	2,21	-1,58
<i>HSD17B2</i>	-2,09	2,67	<i>FLRT3</i>	2,19	-2,75
<i>CDHR1</i>	-2,05	1,86	<i>DIRAS3</i>	2,15	-2,14
<i>CALB2</i>	-2,01	4,55	<i>JAM2</i>	2,13	-2,79
<i>SCARF1</i>	-1,86	1,22	<i>CRABP1</i>	2,13	-3,19
<i>LMO2</i>	-1,82	2,03	<i>EDIL3</i>	2,08	-2,22
<i>PRRX2</i>	-1,78	2,41	<i>GUCY1B1</i>	2,03	-2,30
<i>PPP1R14A</i>	-1,73	1,46	<i>COL14A1</i>	1,98	-2,34
<i>B4GALNT3</i>	-1,71	1,93	<i>CREB3L1</i>	1,90	-2,33
<i>MGAT5B</i>	-1,65	1,04	<i>RNF128</i>	1,84	-5,07
<i>KRTAP2-3</i>	-1,64	2,09	<i>PDE1C</i>	1,83	-2,99
<i>STAT5A</i>	-1,61	1,40	<i>C16ORF45</i>	1,76	-1,46
<i>FLG-AS1</i>	-1,55	1,67	<i>MAGED4</i>	1,74	-3,20
<i>SHH</i>	-1,53	4,06	<i>MLPH</i>	1,70	-1,36
<i>SHANK3</i>	-1,53	1,06	<i>RFLNA</i>	1,59	-5,18
<i>SPNS2</i>	-1,49	1,98	<i>AL137796.1</i>	1,58	-1,46
<i>F2RL1</i>	-1,46	1,61	<i>AL353751.1</i>	1,57	-1,17
<i>SGIP1</i>	-1,40	3,76	<i>ADGRF4</i>	1,57	-2,16
<i>CASZ1</i>	-1,31	1,26	<i>RN7SL3</i>	1,53	-1,26
<i>TMEM255B</i>	-1,27	2,02	<i>SLC26A9</i>	1,42	-2,25
<i>FXVD2</i>	-1,24	5,54	<i>ZFHX4-AS1</i>	1,41	-1,98
<i>INPP5J</i>	-1,23	1,09	<i>LHX1</i>	1,38	-1,03
<i>FXVD6</i>	-1,10	4,53	<i>MTSS1</i>	1,35	-1,66
<i>MYO5B</i>	-1,07	1,34	<i>ADAMTSL3</i>	1,34	-2,46
<i>LAMA5</i>	-1,07	1,76	<i>SYTL5</i>	1,33	-1,58
<i>PHLDB3</i>	-1,06	1,51	<i>CLDN2</i>	1,28	-2,25
<i>SP6</i>	-1,06	1,19	<i>SNTB1</i>	1,22	-1,02
<i>SHANK1</i>	-1,04	8,94	<i>ALDH1A1</i>	1,21	-4,84
<i>AC124276.1</i>	-1,01	1,38	<i>MIR137HG</i>	1,19	-1,27
			<i>PLA1A</i>	1,16	-2,21
			<i>TAS2R2P</i>	1,16	-1,25
			<i>RBMS3-AS3</i>	1,09	-1,54
			<i>AC022509.3</i>	1,07	-1,96
			<i>GCNT1</i>	1,07	-1,22
			<i>PLEKHH2</i>	1,02	-1,82
			<i>BMP2</i>	1,00	-4,01

#### 4.3.1.2 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) - Analyse

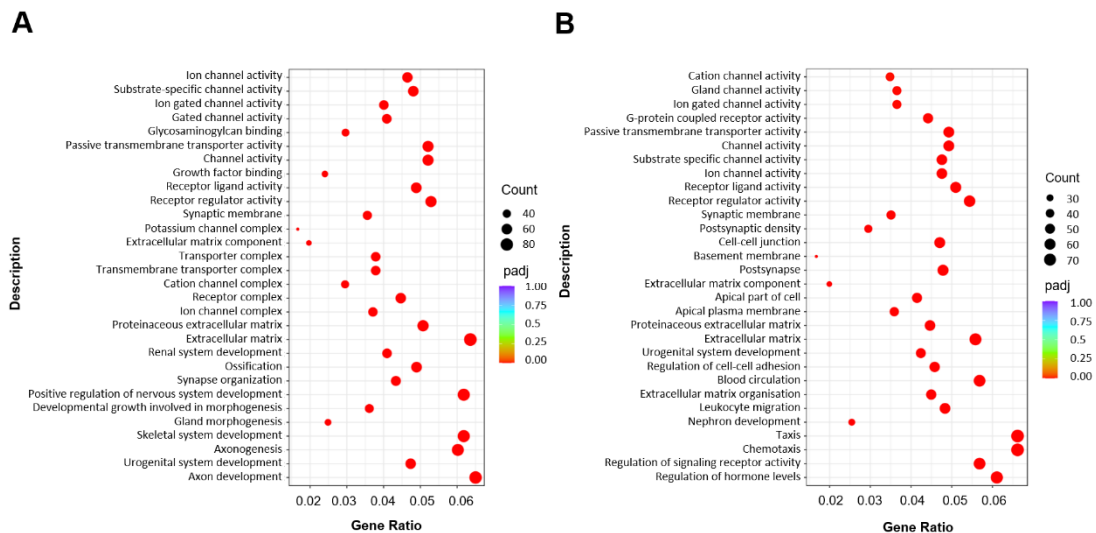
Um ableiten zu können, ob die durch den *ELAVL1*-KO differentiell exprimierte Gene (DEG) spezifischen Signalwegen im Tumor zuzuordnen sind, wurde eine funktionelle Analyse mit den Genen der Datenbank Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) vorgenommen. Hierbei zeigte sich, dass durch die *ELAVL1*-Defizienz in Caki-Zellen vor allem Gene dereguliert sind, die signifikant mit den Signalwegen Zytokin-Zytokin-Rezeptor-Interaktion (Cytokine-cytokine receptor interaction), Neuroaktive-Liganden-Rezeptor-Interaktion (Neuroactive ligand-receptor-interaction) und Zell-Adhäsionsmoleküle (Cell adhesion molecules) assoziiert sind. In Caki-1-Zellen sind zudem mit dem TGF- $\beta$ -Signalweg (TGF- $\beta$ -signaling pathway) assoziierte Gene, in Caki-2-Zellen mit dem Rap1- und Ras-Signalweg (Rap1-, Ras signaling pathway) assoziierte Gene differentiell exprimiert (Abb. 22).



**Abb. 22: Top 20 der unter *ELAVL1*-KO in Caki-Zellen deregulierten Signalwege.** Signalwege mit den meisten signifikant differentiell exprimierten Genen (DEG) nach einem *ELAVL1*-KO in **A** Caki-1-Zellen und **B** Caki-2-Zellen, wobei die Anzahl der jeweils DEG über die Punktgröße (Count) und das Signifikanzniveau über die Punktfarbe dargestellt ist. Enthalten sind die Daten aus 4 unabhängigen Messreihen (n=4). Die Abb. wurde bereitgestellt von Novogene Ltd.

#### 4.3.1.3 GO (Gene Ontology) - Analyse

Um neben deregulierten Signalwegen auch Veränderungen in molekularer Funktion, zellulären Komponenten und biologischen Prozessen nachvollziehen zu können, die möglicherweise durch einen *ELAVL1*-KO hervorgerufen wurden, wurden die DEG mit den Gene Ontology-Klassifikationen verglichen (Abb. 23).



**Abb. 23: Top 30 der unter *ELAVL1*-KO in Caki-Zellen deregulierten GO-Klassifikationen.** GO-Klassifikationen mit den meisten signifikant differentiell exprimierten Genen (DEG) nach einem *ELAVL1*-KO in **A** Caki-1-Zellen und **B** Caki-2-Zellen, wobei die Anzahl der jeweils DEG über die Punktgröße (Count) und das Signifikanzniveau über die Punktfarbe dargestellt ist. Enthalten sind die Daten aus 4 unabhängigen Messreihen (n=4). Die Abb. wurde bereitgestellt von Novogene Ltd.

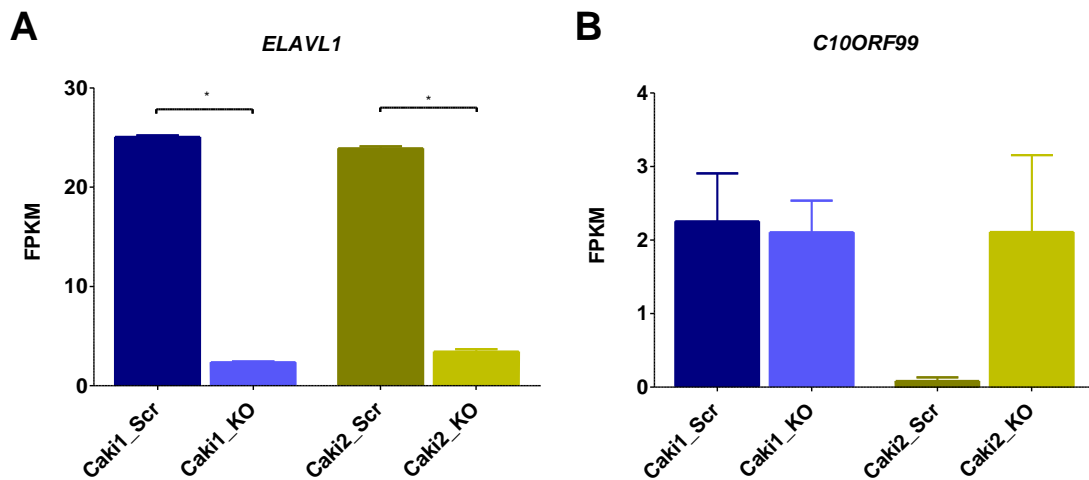
Unerwarteterweise sind in beiden Zelllinien vor allem Gene verändert reguliert, die überwiegend an neuronalen Prozessen beteiligt sind, wie bspw. Axonentwicklung (axon development), Postsynapse (postsynapse) oder positive Regulation der Nervensystementwicklung (positive regulation of nervous system development). Darüber hinaus werden in beiden Zelllinien Gene differentiell exprimiert, die mit Ionenkanal-Aktivität (ion channel activity), Rezeptor-Liganden-Aktivität (receptor ligand activity) und Extrazellulärer Matrix (extra cellular matrix) assoziiert sind. In Caki-2- Zellen werden zudem beteiligte Gene der Klassifikationen G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Aktivität (G-Protein coupled receptor activity), Chemotaxis (chemotaxis) und Lymphozyten-Migration (lymphocyte migration) differentiell exprimiert.

#### 4.3.2 Einfluss auf die Genexpression von *ELAVL1* und *C10ORF99*

##### 4.3.2.1 Next Generation Sequencing (NGS)

Um einen potenziellen Zusammenhang zwischen der Genexpression von *ELAVL1* und *C10ORF99* herstellen zu können, wurden die Expressionslevel beider Gene in den NGS-Daten verglichen. Abb. 24A verdeutlicht, dass beide Zelllinien *ELAVL1* gleich stark exprimieren und der funktionelle KO des Gens sowohl in Caki-1- als auch in Caki-2-Zellen zu einer Destabilisierung seiner eigenen mRNA geführt hat. Die Genexpressionslevel von *C10ORF99* in Caki-Zellen sind hingegen deutlich niedriger (Abb. 24B). Das Protein wird in Caki-1-Zellen nur schwach und in Caki-2-Zellen gar nicht

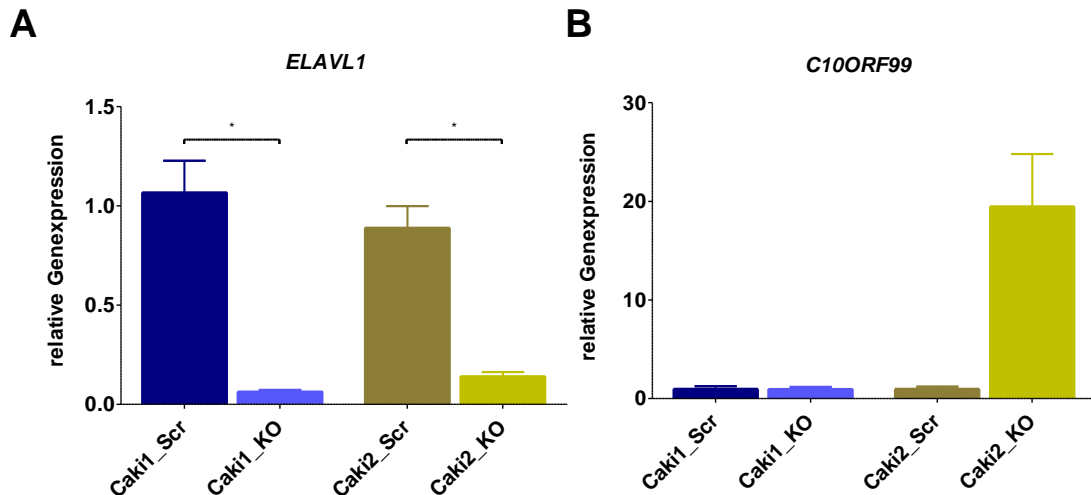
exprimiert. Abb. 24B veranschaulicht, dass der KO von *ELAVL1* die Genexpression von *C10ORF99* in Caki-Zellen nicht beeinflusst.



**Abb. 24: Relative Genexpression von *ELAVL1* und *C10ORF99* in Caki-Zellen im NGS.** FPKM-Werte (fragments per kilobase of exon per million reads) von *ELAVL1* und *C10ORF99* in Caki-1- und Caki-2-Zellen. **A** Expression von *ELAVL1* in Scr- und *ELAVL1*-KO-Zellen **B** Expression von *C10ORF99* in Scr- und *ELAVL1*-KO-Zellen. Es wurden RNA-Proben aus 4 unabhängigen Messreihen an Novogene Ltd. zur Sequenzierung verschickt und die ermittelten FPKM-Werte über GraphPad Prism 5 dargestellt (n=4, \* =  $\log_2FC \leq -1, \geq +1$ ). Der  $\log_2FC$  gibt die relative Änderung des FPKM-Wertes an.

#### 4.3.2.2 Verifizierung der Ergebnisse mittels quantitativer PCR

Die Ergebnisse des NGS sollten in der qPCR bestätigt werden (3.2.2.5). Hierzu wurde RNA aus 5 unabhängigen Isolationen (3.2.2.3) in cDNA umgeschrieben (3.2.2.4) und die normalisierten relativen Genexpressionsunterschiede von *ELAVL1* und *C10ORF99* zwischen Kontrollen und KO-Klonen ermittelt (Abb. 25). Caki-1- und Caki-2-Scr-Zellen weisen mit 1,1 und 0,8 ähnliche relative Expressionslevel für *ELAVL1* auf, was den Ergebnissen des NGS entspricht. *C10ORF99* hingegen ist in den Caki-2-Scr-Zellen mit einer Expression von 0,03 signifikant geringer vorhanden. Es wird in Caki-2-Zellen, wie auch aus den NGS-Daten ersichtlich, scheinbar nicht exprimiert. Eine Besonderheit von *ELAVL1* ist seine Fähigkeit zur Autoregulation [32,121]. Diese Eigenschaft lässt sich über die NGS-Daten hinaus auch in den qPCR-Analysen, dargestellt in Abb. 25A, nachvollziehen. Der KO von *ELAVL1* hat in beiden Zelllinien zu einer Destabilisierung seiner eigenen mRNA geführt. Dass durch die *ELAVL1*-Defizienz in Caki-Zellen die Expression von *C10ORF99* nicht beeinflusst wird, zeigt sich auch in der qPCR-Messung (Abb. 25B).



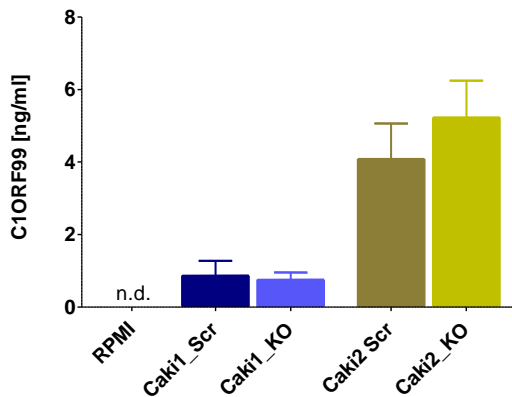
**Abb. 25: Relative Genexpression von *ELAVL1* und *C10ORF99* in Caki-Zellen nach *ELAVL1*-KO in der qPCR.** RNA aus 5 Isolationen von Caki-1- und Caki-2-Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und in einer qPCR in Doppelbestimmung eingesetzt. Die relativen Genexpressionsunterschiede in den Zielgenen wurden auf die Expression des Housekeeping-Gens *GAPDH* normalisiert und anschließend die einzelnen Messreihen auf die Scr-Zellen normalisiert. Enthalten sind die Daten aus 5 unabhängigen Experimenten (n=5, t-Test, \* = p < 0,01). **A** Ein *ELAVL1*-KO bewirkt die Destabilisierung der eigenen RNA in Caki-Zellen. **B** Die *C10ORF99*-Expression wird in Caki-Zellen durch einen *ELAVL1*-KO nicht beeinflusst.

#### 4.4 *C10ORF99* als potenzieller Biomarker

##### 4.4.1 Detektion von *C10ORF99* in Zellüberständen von Caki-Zellen

Eine Arbeitsgruppe um Harlander konnte *2610528A11Rik*, *C10ORF99* im Mausorganismus, als das am stärksten induzierte Gen in Mäusen mit ccRCC detektieren [85]. Davon ausgehend sollte in der vorliegenden Arbeit verfolgt werden, ob *C10ORF99* und sein Protein (*C10ORF99*) auch in humanen ccRCC-Zelllinien nachweisbar sei.

Um *C10ORF99* im Zellmodell messen zu können, wurden Zellüberstände der isolierten *ELAVL1*-KO-Klone und Scr-Kontrollen von Caki-Zellen auf das Vorhandensein von *C10ORF99* überprüft. Dieses Vorgehen stützt sich auf die Ergebnisse mehrerer Arbeiten, die *C10ORF99* als löslichen Faktor beschreiben, der sezerniert werde [88,90,99]. Das Protein sollte schließlich mittels ELISA im Zellüberstand von *ELAVL1*-KO-Zellen gemessen werden, um eine mögliche Korrelation mit dem *ELAVL1*-Status ableiten zu können. Es wurden Zellüberstände von *ELAVL1*-KO-Klonen sowie Scr-Zellen nach 2 und 3 Tagen Kultivierung gesammelt (3.2.6), diese Konzentrationswerte gemittelt und über ein Säulendiagramm dargestellt (Abb. 26). Dabei wurden alle KO-Klone einer Zelllinie in einer KO-Gruppe zusammengefasst.



**Abb. 26: Detektion von C10ORF99 im Zellüberstand von Caki-Zellen.** C10ORF99-Konzentration in *ELAVL1*-KO-Klonen gegenüber ihrer Scr-Kontrolle. Als Negativkontrolle (n.d.=not detectable) wurde pures Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FKS, 1% P/S) eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung (n=2), wobei in Caki1\_KO 2 KO-Klone, in Caki2\_KO 4 KO-Klone enthalten sind.

Während im RPMI-Medium kein C10ORF99 detektierbar war, konnte sowohl im Zellüberstand von Scr- als auch *ELAVL1*-KO-Klonen C10ORF99 gemessen werden. Somit wurde gezeigt, dass das Protein von Caki-Zellen in das Kulturmedium sezerniert wird. Darüber hinaus wurde die Konzentration zwischen KO-Klonen und Scr-Zellen verglichen. Hierbei ergab sich für keine der beiden Zelllinien ein signifikanter Unterschied. Die C10ORF99-Konzentration im Zellüberstand ist für die betrachteten Caki-Zellen somit nicht abhängig vom *ELAVL1*-Status.

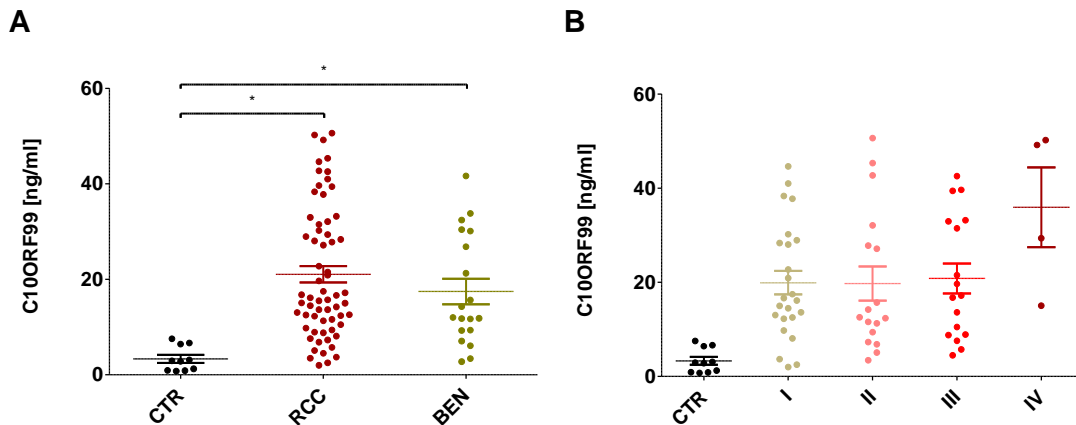
#### 4.4.2 Detektion von C10ORF99 in humanen Serumproben

Nachdem im Zellmodell bestätigt werden konnte, dass C10ORF99 von Caki-Zellen sezerniert wird, sollte die Nachweisbarkeit des Proteins auch in humanen Serumproben überprüft werden, um anhand potenzieller Konzentrationsunterschiede eine Eignung als Serum-Biomarker zur Diagnose eines RCC ableiten zu können. Hierzu wurde mittels ELISA die C10ORF99-Konzentration in prä-operativen Serumproben von Patienten mit der Diagnose eines RCC gemessen (3.2.8). Insgesamt mussten 7 Messwerte ausgeschlossen werden, da sie ober- oder unterhalb des Messbereiches lagen. Dies betraf unter den RCC-Proben 2 Messwerte oberhalb des maximalen Messbereiches sowie 5 Messwerte unterhalb des minimalen Messbereiches.

Abb. 27A verdeutlicht, dass in den untersuchten Proben ein signifikanter Unterschied in der C10ORF99-Serum-Konzentration zwischen RCC-Patienten und Nierengesunden besteht. Während die RCC-Patienten im Mittel eine C10ORF99-Serum-Konzentration von 21,05 ng/ml aufwiesen, betrug sie in den Seren gesunder Kontrollen im Mittel nur



3,31 ng/ml. Patienten mit benignen Tumoren wiesen mit 17,44 ng/ml im Mittel ebenfalls signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen auf. Im Zuge der Spezifizierung eines potenziellen Biomarkers hinsichtlich seiner Eignung als prognostischer Marker wurde eine Einteilung der Serumproben der RCC-Gruppe nach UICC-Stadien vorgenommen. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied der Serum-C10ORF99-Konzentration zwischen den Subgruppen (Abb. 27B).



**Abb. 27: C10ORF99-Serum-Konzentration in RCC-Patienten gegenüber Nierengesunden und in Abhängigkeit vom UICC-Stadium. A** ELISA zur Konzentrationsbestimmung von C10ORF99 im Serum von Patienten mit RCC (RCC, n=70) und benignem Tumor (BEN, n=20) gegenüber nierengesunden Kontrollen (CTR, n=10). Die RCC-Gruppe enthält Individuen mit RCC verschiedener Histologie sowie der UICC-Stadien I-IV. **B** Gegenüberstellung der C10ORF99-Konzentration im Serum von Patienten mit RCC nach Stadium. Dargestellt sind die Daten von Patienten mit UICC-Stadium I (n=29), Stadium II (n=18), Stadium III (n=18), Stadium IV (n=4) gegenüber Nierengesunden (n=10, One-Way-ANOVA, \* =  $p < 0,01$ ). Ausgeschlossen wurden 7 Messwerte außerhalb des Messbereiches.

## 5 Diskussion

### **Ein *ELAVL1*-KO scheint die Zellproliferation von Caki-2-Zellen zu verlangsamen**

Eines der Hauptcharakteristika von Krebszellen ist ihr gesteigertes Proliferationsverhalten [122]. Aus Vorarbeiten zur Bedeutung von *ELAVL1* im Nierenzellkarzinom ging bereits hervor, dass eine *ELAVL1*-Defizienz mit einer Abnahme der Proliferationsrate von ccRCC-Zelllinien einhergeht [79]. Jedoch wurden bisher keine Proliferationsanalysen von Caki-Zellen mit *ELAVL1*-KO publiziert. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Einzelklone beider Zelllinien gegenüber ihren Kontrollen keine signifikanten Wachstumsunterschiede (Abb. 12A). Jedoch proliferierte in Caki-2-Zellen jeder Klon langsamer als die Scr-Kontrolle und im Mittel ergab sich ein signifikanter Unterschied aller KO-Klone gegenüber ihrer Kontrolle (Abb. 12B). Die Mittelung der KO-Klone in einer Gruppe wurde aufgrund der Inhomogenität der Einzelklone hinsichtlich ihrer Proliferationsrate vorgenommen. Die im Mittel 6 h langsamere Proliferation von Caki-2-KO-Klonen deckt sich mit den Ergebnissen der Gruppe um Danilin [79]. Die Forschenden sahen in 786-0-Zellen 96 h nach Transfektion eine um 60% geringere Zelldichte als in Kontrollzellen. Dieser Vergleich kann jedoch nicht uneingeschränkt angestellt werden, da 786-0-Zellen im Gegensatz zu Caki-Zellen eine Mutation im *VHL*-Gen besitzen [102], welches molekularbiologisch bedeutend in der Signalkaskade der Hypoxie-induzierbare Faktoren und damit möglicherweise auch für die Genexpression der Zellen ist. Zudem bestehen methodische Unterschiede zu dieser Arbeit. Danilin et al. nutzten si-RNA statt CRISPR/Cas9-Vektoren und die Proliferation wurde anhand eines Bromodeoxyuridin-Assays statt mittels Lebendzellanalyse untersucht. Wie einleitend erwähnt, wird *ELAVL1* erst unter dem Einfluss von Zellstress wie hypoxischen oder zytotoxischen Bedingungen aktiviert [34,123]. Möglicherweise waren die vorherrschenden Zellkulturbedingungen in dieser Arbeit zu optimal, um einen signifikanten Effekt auf die Wachstumseigenschaften der Einzelklone ausüben zu können. An dieser Stelle würde sich eine Wiederholung des Assays unter hypoxischen Bedingungen wie sie im Tumormikromilieu vorherrschen oder unter Zytotoxizitätsexposition lohnen.

### **Ein *ELAVL1*-KO hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Caki-Zellen**

Die Fähigkeit zur Zellmigration erlaubt es Tumorzellen, sich aus dem Zellverband zu lösen und über das Blut- und Lymphsystem in ferne Organe zu metastasieren [67]. Ob *ELAVL1* diese Eigenschaft in Caki-Zellen fördert, sollte in Scratch-Wound-Assays untersucht werden. Überraschenderweise zeigten wenige *ELAVL1*-defiziente Klone ein gesteigertes Migrationsverhalten gegenüber ihren Kontrollen (Abb. 12A). Dieser Vorsprung war jedoch nur in jeweils einem Klon je Zellreihe statistisch signifikant. Im

Mittel zeigte die KO-Gruppe gegenüber den Scr-Kontrollen keinen Unterschied (Abb. 12B). An dieser Stelle wäre die Untersuchung einer größeren Zahl von Einzelklonen nötig, um mögliche wahre Effekte reliabler ableiten zu können. Kontaktinhibition ist eine Eigenschaft nicht-maligner Zellen, ihren Zellzyklus und damit ihre Proliferation bei Kontakt zu Nachbarzellen einzustellen [124]. Diese Hemmung ist in Tumorzellen meist aufgehoben [125], wobei *ELAVL1* die Zellmigration sogar fördert, indem es Faktoren wie TGF- $\beta$  oder Snail stabilisiert [38,70]. Migrationsstudien an *ELAVL1*-defizienten Tumorzellen sind bisher v.a. im Rahmen anderer Krebsmodelle publiziert worden. Lediglich Wang et. al. beschrieben anhand von 786-0 Zellen, dass ein Knockdown der lncRNA EGFR-AS1 mittels si-RNA eine verminderte *ELAVL1*-Bindung an die EGFR-mRNA zur Folge hat und damit die Migration von 786-0-Zellen verringert [126]. Liu et. al. supprimierten *ELAVL1* mit der miR-22 in der kolorektalen Karzinomzelllinie SW480 und beobachteten eine Abnahme der Migration [127]. In Ovarialkarzinom-Zelllinien SK-OV-3 und OVCAR-3-Zellen führte die Überexpression der *ELAVL1*-inhibierenden miR-139-3p ebenfalls zu einem Rückgang der Migration [128]. Selbst ein *ELAVL1*-Knockdown in Ca9.22-Zellen des Mundhöhlenkarzinoms mittels si-RNA resultierte in verlangsamtem Wundverschluss durch Migration [49]. Aufgrund der Verschiedenheit der Zelllinien und Gene-Editing-Methoden sind diese Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt mit dem Verhalten der Caki-Zellen dieser Arbeit vergleichbar. Analog zu den Proliferationsversuchen würde sich eine Wiederholung des Migrationsassays unter Stressbedingungen wie Zytostatika- oder Hypoxieexposition anbieten, um wahre Effekte deutlicher zu machen. Jedoch deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass ein *ELAVL1*-KO das Migrationsverhalten von Caki-Zellen nicht beeinflusst.

### **Ein *ELAVL1*-KO führt zu einer verminderten Koloniegröße von Caki-1-Zellen**

Um Fernmetastasen ausbilden zu können, sind Tumorzellen auf die Fähigkeit zur Kolonieformation ausgehend von einer Einzelzelle angewiesen [129]. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass Caki-Zellen generell Kolonien ausbilden. Während sich deren Größe in Caki-1-Zellen unter einem *ELAVL1*-KO um 26% im Vergleich zu den Kontrollen vermindert, zeigte sich in Caki-2-Zellen lediglich in der Hälfte der *ELAVL1*-defizienten Klone eine signifikante Verminderung (Abb. 17A), sodass dieser Unterschied im Mittel der KO-Klone nicht mehr signifikant war (Abb. 17B). Dass dieser Effekt lediglich in Caki-1-Zellen besteht, könnte auf den metastatischen Ursprung dieser Zelllinie zurückzuführen sein. Khan et. al. beschreiben eine stärkere Kolonieformation metastatischer ccRCC-Zelllinien gegenüber Primärtumor-Zelllinien [130]. Auch andere Arbeitsgruppen sahen unter einem *ELAVL1*-KO einen Rückgang der Kolonieformation. Lal et. al. beobachteten unter einem CRISPR/Cas9-vermittelten

*ELAVL1*-KO in der Pankreaszelllinie MIA PaCa-2 eine Abnahme der Koloniebildung um das Fünffache [131]. Ebenso konnten Kakuguchi et. al nach einem *ELAVL1*-Knockdown in Mundbodenkarzinomzellen eine verminderte Koloniegröße nachweisen [49]. Eine Überexpression der *ELAVL1*-supprimierenden miR-139-3p in Ovarialkarzinomzelllinien löste ebenfalls einen Rückgang der Koloniebildung aus [128]. Eine Veränderung im Sinne einer Abnahme der Koloniezahl, wie sie bei Kakuguchi und Xue ebenfalls zu verzeichnen war, konnte in dieser Arbeit hingegen nicht bestätigt werden (Abb. 19).

### **Interklonale Heterogenität in Gene-Editing-Experimenten**

In dieser Arbeit wurde zur Etablierung eines funktionellen *ELAVL1*-KOs das CRISPR/Cas9-System verwendet. Im Gegensatz zum Knockdown mittels interferierender RNA (RNAi) lassen sich mit dieser Gene-Editing-Methode komplette Loss of function-Mutationen erzielen, die dauerhaft bestehen. Sogenannte Off-Target-Effekte fallen durch CRISPR/Cas9 geringer aus als durch RNAi [132]. Dennoch besteht in dieser Arbeit eine Heterogenität der Zellklone, die für Einzelzell-Klonierung mit CRISPR/Cas9 bereits bekannt ist [111]. Obwohl Sanger-Sequenzierung und Western Blot in dieser Arbeit den erfolgreichen Knockout in allen Einzelklone bestätigen, besteht in den funktionellen Analysen ein heterogenes Verhalten. Während der Generierung immortalisierter Zelllinien besteht immer eine gewisse biologische Varianz, die in spontanen Mutationen resultieren kann [133]. So kann sich in einzelnen Klonen kurz nach Selektion eine frühe weitere Mutation ereignet haben, die letztlich den gesamten Klon betrifft und trotz Einzelklon-Charakters phänotypische Unterschiede hervorbringt. Einige etablierte Zelllinien weisen eine ausgeprägte interklonale Heterogenität auf, weshalb die Selektion multipler Klone anzustreben ist, um klonale Artefakte zu reduzieren [134]. In dieser Arbeit wurden daher je Zelllinie mindestens 2 Klone isoliert. Die Selektion der Einzelklone erfolgte durch Verdünnung. Ohne Verwendung eines Fluoreszenzmarkers zur Visualisierung Konstrukt-tragender Zellen oder Einzelzellsortierung mittels FACS kann nie vollkommen ausgeschlossen werden, dass doch mehr als eine Zelle selektiert wurde bzw. Zellen vereinzelt wurden, welche für das Konstrukt negativ sind [111]. Der Klon Caki2\_E8 ist vermutlich aus 2 Zellen hervorgegangen, wie die TIDE-Analyse zeigt (Abb. 7). Um klonale Effekte einordnen zu können, bietet sich außerdem die Durchführung von Mischkultur-Experimenten an, insofern die Transfektionseffizienz ausreichend hoch ist [111,134]. Die durch CRISPR/Cas9 erzielte Mutation kann jedoch ebenso einen unvollständigen Genverlust bewirken, indem durch alternative Spleißvarianten, Exon-Skipping und Downstream-Translationsinitiation letztlich veränderte, möglicherweise fragmentierte, aber dennoch funktionsfähigen Proteine entstehen [135–137]. Kleinere Proteinfragmente werden im

Western Blot jedoch nicht detektiert, da diese nicht erwartet werden und ergeben falsch-negative Protein-Analysen. Diese Effekte können durch die Verwendung mehrerer Antikörper minimiert werden. Zudem kann die Klonierung mehrerer unabhängiger gRNAs in einen Vektor den Erfolg eines kompletten KO begünstigen, erhöht jedoch zugleich die Wahrscheinlichkeit für Off-Target-Effekte [111]. In dieser Arbeit wurden daher verschiedene gRNAs designt, um die Chance auf effizientere Konstrukte zu erhöhen. Letztlich bedeutet die Reproduktion einer Einzelklon-Zelllinie aus einer einzigen Zelle einen starken genetischen Selektionsdruck und die Ausprägung verschiedener genetischer und epigenetischer Mutationen, die bspw. eine schnellere Proliferation bewirken. Solche epigenetischen Effekte versucht man über das Mitführen von Scr- (Leervektor-) Zellen abzubauen zu können [111], wie in dieser Arbeit umgesetzt.

### **Ein *ELAVL1*-KO beeinflusst das Genexpressionsprofil von Caki-Zellen**

Über den gezielten KO eines Gens können mithilfe des NGS weitere Gene identifiziert werden, die durch den Genverlust differentiell exprimiert werden. Besonders für mRNA-stabilisierende Proteine wie *ELAVL1* können somit potenzielle Zielgene identifiziert werden. Der in dieser Arbeit etablierte *ELAVL1*-KO führt zu Veränderungen im Genprofil der Caki-Zellen. Demnach gleichen sich beide Zelllinien unter dem KO in weniger als einem Viertel der DEG (Abb. 20), was im differentiellen zellulären Ursprung von Caki-1- und Caki-2-Zellen begründet sein kann [102,138]. Zudem existieren 79 Gene, welche unter der *ELAVL1*-Defizienz in beiden Zelllinien invers reguliert werden (Tab. 5), darunter Gene mit Assoziation zur Tumorgenese wie Transkriptionsfaktoren (*STAT5A*, [139]) oder deren Aktivatoren (*BMP2*, [140]). Darüber hinaus werden Gene zur Organisation der extrazellulären Matrix (*ADAMTSL3*, [141]) sowie des Aktinfilamentgerüsts (*PLEKHH2*, [142]) und mit antiinflammatorischem Effekt, insbesondere in proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (*SPNS2* [143]), gegensätzlich reguliert. Weitere invers regulierte Gene haben eine prognostische Bedeutung in verschiedenen Tumoren (Tab. 4). Hierbei ist *LHX1* hervorzuheben, welches für das Lim1-Onkogen kodiert und als neues therapeutisches Markerprotein für das metastasierte Nierenzellkarzinom beschrieben wird [144]. Unter den gemeinsam deregulierten Genen werden mehr Gene herab- als heraufreguliert (Abb. 21), was mit dem Verlust der mRNA-stabilisierenden Funktion einhergehen könnte. Anhand des Vergleichs mit im RCC prognostisch einflussreichen Genen aus dem Human Protein Atlas [120] konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass eine *ELAVL1*-Defizienz einen günstigen oder ungünstigen Genotyp fördert (Tab. 4). Denn unter den 10 durch einen *ELAVL1*-KO am stärksten deregulierten Genen befinden sich vorteilhafte Gene, die sowohl herauf- (*RNF18* [145]) als auch herabreguliert werden (*JCA1* [146], *CTTNBP2* [147] oder *EPHA4* [148]). Ebenso werden

unvorteilhafte Gene herauf- und herabreguliert. Auffällig ist, dass eine Vielzahl von Genen, die in Vorarbeiten negativ mit der Prognose von RCC-Patienten assoziiert wurden, durch den *ELAVL1*-KO in Caki-Zellen hochreguliert sind. Damit könnte ein maligner Genotyp induziert werden, der sich in den funktionellen Analysen dieser Arbeit jedoch nicht bestätigen lässt. Hierzu zählen bspw. Chitinase 3-like 1 (*CHI3L1*, [149]), der Stammzellmarker CD24 [150], das Glykoprotein Fibronectin 1 (*FN1*, [151]), *TSPAN-8* [152] oder der Toll like-Rezeptor 4 [153]. Letztlich spiegeln die vergleichbaren Expressionslevel prognostisch günstiger und ungünstiger Gene in *ELAVL1*-defizienten Caki-Zellen (Tab. 4) die kaum vorhandenen phänotypischen Effekte in den funktionellen Analysen dieser Arbeit wider.

### **Ein *ELAVL1*-KO beeinflusst Signalwege in Caki-Zellen**

Die DEG wurden hinsichtlich ihrer Assoziation zu verschiedenen Signalwegen der KEGG-Datenbank untersucht. In beiden Zelllinien sind durch *ELAVL1*-Defizienz signifikant viele Gene dereguliert, die mit den Signalwegen „neuroaktive Ligandeninteraktion“ und „Zelladhäsionsmoleküle“ assoziiert sind (Abb. 22). Ersterer wird auch durch Liu et. al. in humanen RCC-Geweben als differenziell exprimiert beschrieben [154]. Darüber hinaus sind in Caki-Zellen mit *ELAVL1*-KO auffallend viele Gene im Zusammenhang mit GO-Klassifikationen überwiegend herabreguliert, die mit dem Nervensystem assoziiert sind (Abb. 23). Außerdem sah die Arbeitsgruppe um Liu Gene des KEGG-Signalweges „Zytokin-Zytokin-Rezeptor-Interaktion“ als differenziell exprimiert in RCC-Tumoren [154]. Caki-1-Zellen wiesen unter einem *ELAVL1*-KO ebenfalls signifikant herabregulierte Gene in diesem Signalweg auf, was damit einhergehen könnte, dass *ELAVL1* einen inflammatorischen Phänotyp vermittelt [155]. Zudem zeigen Caki-1-Zellen signifikante Veränderungen im *TGF- $\beta$* -Signalweg (Abb. 22A) im Sinne einer überwiegenden Herabregulierung assoziierter Gene. Dies entspricht einer Arbeit über Hirntumore, nach der *TGF- $\beta$*  durch *ELAVL1* stabilisiert wird [38]. Im ccRCC fördere *TGF- $\beta$*  Tumorprogression und Invasivität [156]. Davon ausgehend könnte eine Herabregulation von *TGF- $\beta$*  unter einem *ELAVL1*-KO in Caki-1-Zellen mit einer verminderten Malignität der Zellen einhergehen – korrelierend mit einer verminderten Koloniegröße in der vorliegenden Arbeit (Abb. 17). In Caki-2-Zellen ist unter anderem der *Rap-1*-Signalweg differenziert reguliert (Abb. 22B). Damit beeinflusst eine *ELAVL1*-Defizienz einen zentralen Signalweg zur Regulation von Migration und Metastasierung in Tumoren [157]. Tatsächlich ist *Rap-1-GAP* in Caki-2-Zellen heraufreguliert [130]. Dies könnte mit einer Milderung des zellulären Phänotyps im Sinne einer Abnahme der Invasivität einhergehen, obgleich diese Tendenz in den funktionellen Assays nicht bestätigt werden konnte. Liu et al. zeigten in RCC zudem eine differentielle



Expression von assoziierten Genen der GO-Klassifikation „Zelladhäsion“ [154], die auch in den KEGG-Analysen dieser Arbeit besteht. Der Verlust der Zellverankerung untereinander und an der extrazellulären Matrix ist ein wesentliches Merkmal von Tumorzellen und Voraussetzung zur Metastasierung [158]. Unter einem *ELAVL1*-KO sind in Caki-Zellen signifikant viele Gene mit Bedeutung für die extrazelluläre Matrix und ihre Organisation dereguliert (Abb. 23).

#### ***ELAVL1*-Defizienz in Caki-Zellen führt zu einer Destabilisierung der eigenen mRNA**

Neben der Stabilisierung und damit gesteigerten Translation seiner Ziel-mRNA vermag *ELAVL1* auch seine eigene mRNA zu stabilisieren [32]. Wie einleitend ausgeführt, bewirken niedrige Proteinlevel im Zellkern durch einen negativen Feedbackmechanismus die Anreicherung von *ELAVL1*. Bei einem vollständigen funktionellen KO ist hingegen kein funktionelles Protein mehr vorhanden, um die Feedbackschleife einzuleiten und *ELAVL1*-mRNA zu stabilisieren. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mittels qPCR bestätigt werden, wonach es zu einer signifikanten Abnahme der Genexpressionslevel zwischen Scr- und KO-Zellen beider Caki-Zelllinien gekommen ist (Abb. 25).

#### ***C10ORF99* scheint in Caki-Zellen nicht durch *ELAVL1* reguliert zu werden**

Die Genexpression von *C10ORF99*, dessen Maus-Ortholog *2610528A11Rik* in murinen ccRCC das am stärksten heraufregulierte Gen darstellt [85], sollte in humanen ccRCC-Zelllinien auf eine mögliche Modulation durch *ELAVL1* hin untersucht werden. Eine Vorarbeit an gesunden murinen Zellen des Sammelrohres der Niere ergab nach einem *ELAVL1*-KO ebenfalls eine massive Veränderung im Genexpressionsprofil, wobei *2610528A11Rik* signifikant herabreguliert wurde ( $\log_2FC = -4,6$ ) [86]. In Caki-Zellen konnte dieser gleichgerichtete Zusammenhang in der Genexpression beider Gene hingegen nicht nachgewiesen werden. Die NGS-Analyse ergab weder für Caki-1- noch für Caki-2-Zellen eine signifikante Veränderung der *C10ORF99*-Expression nach einem *ELAVL1*-KO (Abb. 24B). Diese Resultate konnten mittels qPCR validiert werden (Abb. 25B). Somit ist nicht von einem stabilisierenden Einfluss von *ELAVL1* auf *C10ORF99* in Caki-Zellen auszugehen. Die Detektion von *C10ORF99* im Gesamtprotein von Caki-Zellen mit dem verfügbaren Antikörper im Western Blot war nicht erfolgreich. Ebenso beschreibt der Humane Proteinatlas bisher nur unsichere *C10ORF99*-Detektionen im Western Blot [159].

### **Caki-Zellen sezernieren C10ORF99**

Angesichts der hohen Genexpression von *2610528A11Rik* in murinen ccRCC [85] und der sekretorischen Eigenschaften im murinen und humanen Kolon [88] sollte die Eignung des Proteins C10ORF99 als löslicher Marker für das humane RCC evaluiert werden. Sezerniertes C10ORF99 konnte im Zellüberstand von Caki-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23). Die sekretorische Eigenschaft wurde bereits durch Pan et al. für HEK293-T-Zellen mittels Western Blot-Analyse von Zellüberständen postuliert [88]. Die Übertragbarkeit vom renalen Zellmodell auf den humanen Organismus sollte im Weiteren untersucht werden.

### **Patienten mit Nierentumoren weisen erhöhte C10ORF99-Proteinlevel im Serum auf**

Ein valider Biomarker ist ein lösliches Protein, welches ausschließlich vom Tumorgewebe sezerniert wird. Er kann minimal- bis non-invasiv im Blutserum oder Urin detektiert werden und ist zugleich kostengünstig bestimmbar [160]. In der Routine-Diagnostik ist für das RCC bis heute noch kein Tumormarker etabliert, um Diagnose, Prognose oder Therapieeffizienz verlässlich abbilden zu können. Dies liegt u.a. in der großen intratumoralen Heterogenität des RCC begründet [161]. Die Spezifität molekularer Marker ist abhängig von vielzähligen Variablen wie verwendetem Antikörper, seiner Konzentration, der Anfärbetechnik und Interpretation, weshalb sich der Erfolg vielversprechender Marker-Proteine bisher auf kleinere retrospektive Studien beschränkte [162]. Hierzu zählen u.a. *VHL*-Mutationsstatus [163], *HIF-1 $\alpha$*  [164] oder *VEGF*-Expression [165]. Größere Aussicht auf klinische Anwendbarkeit bieten dagegen „Liquid Biopsies“ - flüssige Gewebeproben wie Blut, Urin oder Sputum [162]. Für TRAF-1 [166], Hitzeschock Protein-27 [167] als auch Serum-Amyloid A [168,169] existieren vielversprechende Studien. Besondere Aufmerksamkeit galt einigen Urin-Markern. Die Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) ist in RCC-Patienten erhöht, korreliert jedoch nicht mit Tumorgöße oder -stadium [170,171]. KIM-1 hingegen zeigt diese Korrelation, ist jedoch auch bei Vorliegen anderer Nierenpathologien im Urin erhöht [171]. Aquaporin-1 und Perilipin 2 zeigen reliabel Tumorgöße und -stadium an, jedoch fehlen auch hier Langzeitstudien [172]. Angesichts dieser Limitationen in der Etablierung spezifischer Biomarker sollte C10ORF99 auf seine Eignung als diagnostisches oder prognostisches Target geprüft werden. In der vorliegenden Arbeit konnten im Serum von RCC-Patienten im Mittel sechsfach erhöhte C10ORF99-Proteinkonzentrationen gegenüber Kontrollserumproben gemessen werden (Abb. 27A). Dass auch die Kontrollen geringe C10ORF99-Serumlevel aufweisen, ist möglicherweise durch die Sekretion von C10ORF99 aus dem gesunden Kolon zu erklären [88]. Es bestehen jedoch signifikante Unterschiede zwischen Tumorpatienten und gesunden



Probanden. Daher könnte das Protein als möglicher diagnostischer Marker für das Vorliegen eines RCC diskutiert werden, obgleich die Nachweisbarkeit eines Markers im gesunden Organismus eher ungünstig ist [160]. An dieser Stelle sind weitere grundlegende Experimente zur Spezifizierung nötig, beispielsweise die Quantifizierung einer möglichen basalen Sekretion aus dem humanen Darm. Trotz geringer Standardabweichung besteht eine Schwankung der gemessenen Proteinkonzentrationen von C10ORF99 in der RCC-Gruppe dieser Arbeit. Im untersuchten Patientenkollektiv bestehen interindividuelle Unterschiede bezüglich Alter und Geschlecht sowie mutmaßlich bezüglich Grunderkrankungen und Dauermedikation. Das mittlere Patientenalter der hier untersuchten RCC-Kohorte beträgt 64,6 Jahre und ist damit vergleichbar mit dem mittleren Erkrankungsalter an einem RCC in Deutschland im Jahr 2018, welches laut Robert-Koch-Institut für Männer bei 68 und für Frauen bei 72 Jahren lag [173]. In den USA wurde das mittlere Erkrankungsalter von RCC-Patienten durch die Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER)-Datenbank mit 64 Jahren angegeben [174]. Die Geschlechterverteilung mit 1,5-fach so vielen männlichen wie weiblichen Individuen in diesem Patientenkollektiv entspricht dem in Europa gemessenen Verhältnis, nachdem Männer 1,6x häufiger an einem RCC erkranken als Frauen [2]. Die Grunderkrankungen der hier gemessenen Patienten sind nicht bekannt, davon abgesehen bildet das untersuchte Kollektiv die allgemeine Grundgesamtheit von Nierenzellkarzinom-Patienten realistisch ab. Einzelne C10ORF99-Messwerte von RCC-Proben liegen sogar im Kontrollbereich. Im Hinblick auf eine klinische Anwendbarkeit des Markers ist daher die Bestimmung von C10ORF99 in einer vergleichbar großen Kontrollgruppe notwendig, um Schwankungen der Protein-Serum-Konzentration auch unter gesunden Probanden erfassen zu können. Hierbei sind die Grunderkrankungen der Patienten, insbesondere entzündlicher Genese, welche die C10ORF99-Konzentration ebenfalls beeinflussen könnten, zu berücksichtigen. Im Zuge einer ersten Spezifitätsprüfung des potenziellen Markers wurde C10ORF99 in Seren von Patienten mit benignen Nierentumoren bestimmt. Auch diese Patientengruppe wies erhöhte C10ORF99-Proteinkonzentrationen auf (Abb. 27A). Demnach ist C10ORF99 vielmehr als Marker für eine renale Raumforderung zu diskutieren. Hierzu sollte das Protein jedoch direkt im Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe detektiert werden, bspw. mithilfe von Immunhistochemie [175] oder Western Blot. Darüber hinaus ist die Erstellung von Proteinexpressionsprofilen mittels Massenspektrometrie [176] oder der Nachweis über Microarray sinnvoll [177]. Diese Schritte sind zentraler Bestandteil der präklinischen Validierung von Biomarkern [178] und sollten Ziel nachfolgender Experimente sein. Die vorliegende Arbeit lässt keine Aussage über den tatsächlichen Syntheseort des gemessenen Serum-C10ORF99 zu. Aufgrund fehlender Studien zur

Funktion von C10ORF99 in der Niere ist derzeit noch unbekannt, ob das Protein überhaupt in diesem Organ synthetisiert wird und welche Sekretionsmechanismen zugrunde liegen, obgleich eine Arbeit existiert, die das urogenitale Epithel als Ursprungsgewebe beschreibt [90]. An dieser Stelle wäre die C10ORF99-Bestimmung im Urin von Karzinom-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden vielversprechend, denn es konnten bereits RCC-spezifische Peptide in humanen Urinproben detektiert werden [179]. Neben dem Vorteil der non-invasiven Gewinnung von Urin stellt der Harntrakt ein abgeschlossenes System dar. In diesem wären Veränderungen der renalen C10ORF99-Sekretion unabhängig von der möglicherweise bestehenden basalen C10ORF99-Sekretion aus dem Gastrointestinaltrakt messbar. Zudem würde der Einfluss störender Serumproteine hinfällig [180]. Die Bestimmung im Urin könnte die Spezifität des Markers für eine renale Raumforderung erhöhen, setzt jedoch die Berücksichtigung einer möglicherweise eingeschränkten Nierenfunktion und damit veränderten Proteinfilterfunktion voraus. Ebenso ist die Bestimmung des Markers in Patientenserum weiterer Tumorentitäten unerlässlich, um dessen Spezifität zu prüfen.

#### **C10ORF99 als inflammatorischer Marker**

Möglicherweise ist die erhöhte Proteinkonzentration von C10ORF99 in Patienten mit RCC gegenüber gesunden Probanden auf das inflammatorische Tumormilieu im Nierenkrebs zurückzuführen. Das maligne Nierenzellkarzinom wird als immunogener Tumor beschrieben, wobei das Ansprechen dieser Tumore auf Immuntherapien wie Checkpoint-Inhibitoren oder Cytokin- und Interferon-Therapie diese Theorie stützt [181]. Dem widerspricht jedoch ein Teilergebnis der vorliegenden Arbeit, wonach das Protein auch im Serum benigner Tumorpatienten erhöht ist (Abb. 27). *2610528A11Rik/C10ORF99* wird im Mausmodell und klinischen Studien zur Psoriasis als Cytokin und Chemokin beschrieben, dessen Genexpressionslevel im erwachsenen Individuum unter entzündlichen Bedingungen wieder ansteigt [90,95–97]. Während *C10ORF99* in Kolonkarzinom-Zelllinien herunterreguliert ist [88], ist die Rolle des Gens in weiteren Tumorentitäten bislang noch unerforscht. Für die Prostata als Manifestationsorgan eines weiteren urogenitalen Tumors gilt, dass in benignen Hyperplasien die Immunzellinfiltration sogar höher ist als in fortgeschrittenen malignen Prostatakarcinomen. Ursächlich ist die noch intakte zell-vermittelte Immunreaktion in gutartigen Tumoren. Maligne Tumoren hingegen entwickeln zunehmend ein immunsuppressives Verhalten und entgehen so dem Immunsystem [182]. Diese Eigenschaft stellt ein wesentliches Charakteristikum von Krebszellen dar [122]. Vielmehr ist eine erhöhte Inflammation gutartiger Prostatatumore sogar mit einem niedrigeren Entartungsrisiko assoziiert [183,184]. Eine inflammatorische Komponente besteht also

auch in benignen Tumorentitäten. Ein weiteres Beispiel hierfür stellt der Speicheldrüsenkrebs dar. Hier wurden in malignen als auch benignen Tumoren erhöhte Infiltrationen mit regulatorischen und zytotoxischem Lymphozyten-Antigen 4 (*CTLA4*) – exprimierenden T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen gemessen [185]. Für Nierenkrebs existiert eine Arbeit, die die entzündliche Infiltration in Onkozytomen verneint [186]. Geissler et. al hingegen beschreiben ein vielfältiges Immunzellenspektrum sowohl in ccRCC als auch Onkozytomen, unter anderem aus T-Zellen, NK-Zellen und CTLA4+-Zellen [187]. Da C10ORF99 in Haut und Kolon regulatorische T-Zellen anlockt [90,91], könnte es auch in Nierentumoren eine immunmodulierende Funktion haben. Zwei weitere Arbeiten am Mausmodell verdeutlichen die Rolle von *2610528A11Rik* als Immunzellregulator. Dainichi beschreibt in *2610528A11Rik*<sup>-</sup>-Psoriasis-Mäusen eine Zunahme der Inflammation im Zusammenhang mit einer erhöhten Genexpression von Zytokin *Ccl20* und  $\beta$ -Defensin *Defb4* gegenüber *2610528A11Rik*-KO-Tieren [188]. Damit vermittelt *2610528A11Rik* in der Psoriasis das Zytokin-gesteuerte Entzündungsgeschehen, was durch die Arbeitsgruppe auch für C10ORF99 in der humanen Psoriasis beschrieben wird. Die Arbeit von Suply et. al. ergab eine *2610528A11Rik*-vermittelte Chemotaxis von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in murine Allotransplantate der Haut, die mit einer erhöhten Abstoßungsrate gegenüber *2610528A11Rik* - Mäusen einherging [91]. Angesichts der Präsenz von *2610528A11Rik/C10ORF99* in multiplen Entzündungsgeschehen erscheint die Beteiligung des Proteins C10ORF99 an einer tumorösen Inflammation der Nieren ebenfalls realistisch. In diesem Kontext wären immunhistochemische Analysen von Tumorgewebe auf C10ORF99 und gleichzeitige Immunzellinfiltration hin aufschlussreich. Klinisch ist die Bestimmung von Entzündungsmarkern, wie bspw. C-reaktivem Protein oder der Leukozytenzahl im Blutserum, sinnvoll. Die Korrelation dieser Parameter mit der C10ORF99-Serumkonzentration könnte es ermöglichen, eine Erhöhung des Proteins im Rahmen einer Tumor-assoziierten Entzündungsreaktion erfassen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Eine erhöhte Expression des mRNA-bindenden Proteins ELAVL1 ist im humanen ccRCC mit einem geringeren Überleben assoziiert. Interessanterweise führt ein KO von *Elavl1* in murinen Tubuluszellen des proximalen Sammelrohrs der Niere zu einer Herabregulation von *2610528A11Rik*, dem am stärksten induzierten Gen im murinen ccRCC. In dieser Arbeit sollte die Rolle von *ELAVL1* in der Genexpression des humanen RCC, insbesondere des Gens *C10ORF99*, dem humanen Ortholog von *2610528A11Rik*, untersucht werden. Hierzu wurde ein CRISPR/Cas9-vermittelter funktioneller KO des *ELAVL1*-Gens in den ccRCC Zelllinien Caki-1 und Caki-2 realisiert und *ELAVL1*-defiziente Einzelzellklone isoliert. Funktionelle Analysen ergaben, dass der erzielte KO keinen Einfluss auf Migrationsverhalten oder Koloniezahl beider Zelllinien hat. Eine scheinbar verlangsamte Proliferation in Caki-2-Zellen und verminderte Koloniegröße in Caki-1-Zellen unter einem *ELAVL1*-KO entspricht jedoch den Ergebnissen weiterer Arbeitsgruppen, die *ELAVL1* an anderen Krebszelllinien ausknockten. Insgesamt ist der Effekt des KOs in den funktionellen Analysen der Einzelklone eher gering. Als limitierend sind die vergleichsweise geringe Zahl an Einzelklonen je Zelllinie sowie die optimalen Zellkulturbedingungen anzusehen. Da *ELAVL1* durch Zellstress aktiviert wird, könnten die Effekte bei Wiederholung unter hypoxischen oder toxischen Zellkulturbedingungen eindeutiger ausfallen. Deutlichere Effekte erbrachten die NGS-Analysen, wonach ein *ELAVL1*-KO ausgeprägte Veränderungen im Genexpressionsprofil von Caki-Zellen bewirkt. Hierbei werden mehr Gene herab- als heraufreguliert, was mit dem Wegfall der stabilisierenden Funktion von *ELAVL1* einhergehen könnte. Zudem werden Signalwege der Tumorgenese und Inflammation wie „Zytokin-Zytokin-Rezeptor-Interaktion“, die Signalwege *TGF-β* und *Rap-1* sowie Gene mit Assoziation zu „Zelladhäsion“ und „extrazelluläre Matrix“ differentiell exprimiert. Entgegen den murinen Sammelrohrzellen besteht in humanen Caki-Zelllinien kein Effekt eines *ELAVL1*-Verlustes auf die Genexpression von *C10ORF99*. Aufbauend auf dem hohen Expressionslevel von *2610528A11Rik* im murinen ccRCC sollten schließlich *C10ORF99*-Proteinlevel im humanen RCC gemessen werden, um die Eignung des Proteins als möglicher Biomarker zu evaluieren. Mittels ELISA konnte auf Zellebene bestätigt werden, dass *C10ORF99* in den Zellüberstand von Caki-Zellen sezerniert wird. Schließlich wurde die *C10ORF99*-Konzentration in humanen Serumproben von Patienten mit RCC (n=70) und benignen Nierentumoren (n=20) mittels ELISA gemessen. Dabei wiesen RCC-Patienten gegenüber gesunden Probanden im Mittel eine sechsfach erhöhte *C10ORF99*-Serumkonzentration auf. Jedoch war auch in Patienten mit benignen Nierentumoren eine erhöhte *C10ORF99*-Serumkonzentration messbar. Demnach lässt sich *C10ORF99* als

potenzieller Biomarker für eine renale Raumforderung oder ein Inflammationsgeschehen diskutieren, da es bereits in vorausgehenden Studien zur Psoriasis oder Colitis als Zytokin beschrieben wurde. Als limitierend ist die ungleiche Probenverteilung in den einzelnen histologischen Subgruppen dieser Arbeit sowie die kleine Kontrollgruppe aus lediglich 10 männlichen Probanden anzusehen. Darüber hinaus ist eine Sekretion von C10ORF99 aus dem gesunden Kolon bekannt, was ein eher ungünstiges Kriterium für ein diagnostisches Markerprotein darstellt. Zur Validierung von C10ORF99 als Marker für Inflammation oder eine renale Raumforderung bedarf es daher der Untersuchung größerer Patientengruppen sowie weiterer Tumorentitäten zur Spezifizierung. Die Detektion des Proteins im Urin könnte hilfreich sein, C10ORF99 in Abgrenzung zu anderen Serumproteinen eindeutiger einer Nierenpathologie zuzuordnen. Zudem wären die immunhistochemische Detektion von C10ORF99 und von Entzündungszellen im Tumorgewebe sowie Inflammationsassays aufschlussreich, um eine direkte Beteiligung am Entzündungsgeschehen nachvollziehen zu können. Letztlich besteht noch großer Bedarf an der grundlegenden Untersuchung des genauen Synthesortes und des Sekretionsmechanismus von C10ORF99 in der Niere und in weiteren Organen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S et al. (2017) Renal cell carcinoma. Nature reviews.Disease primers 3: 17009
2. Dyba T, Randi G, Bray F et al. (2021) The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. Eur J Cancer 157: 308–347
3. Padala SA, Kallam A (2022) Clear Cell Renal Carcinoma, Treasure Island (FL)
4. Haas NB, Nathanson KL (2014) Hereditary kidney cancer syndromes. Advances in Chronic Kidney Disease 21(1): 81–90
5. Capitanio U, Bensalah K, Bex A et al. (2019) Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. European urology 75(1): 74–84
6. SEER (07.09.2022) Cancer of the Kidney and Renal Pelvis - Cancer Stat Facts. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>. Zugriff am 4.4.2023
7. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (2023) S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 4.0, 2023, AWMF-Registernummer: 043-017OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/>; Zugriff am [24.04.2023]
8. Fiebig J, Kraywinkel K (2019) Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms in Deutschland. Onkologie 25(6): 483–487
9. Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J (2002) Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. Reviews in urology 4(4): 163–170
10. Brierley JD (2017) TNM Classification of Malignant Tumours, 8. Aufl. John Wiley & Sons Incorporated, Chicester
11. Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N et al. (2022) Kidney Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network 20(1): 71–90
12. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. Nature reviews. Molecular cell biology 3(3): 195–205
13. Mitchell SF, Parker R (2014) Principles and properties of eukaryotic mRNPs. Molecular Cell 54(4): 547–558
14. Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. Science 309(5740): 1514–1518
15. Antic D, Keene JD (1997) Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. The American Journal of Human Genetics 61(2): 273–278
16. Good PJ (1995) A conserved family of elav-like genes in vertebrates. Proc Natl Acad Sci U S A 92(10): 4557–4561
17. Hinman MN, Lou H (2008) Diverse molecular functions of Hu proteins. Cellular and molecular life sciences : CMLS 65(20): 3168–3181
18. Ma WJ, Furneaux H (1997) Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13.2. Human genetics 99(1): 32–33
19. Izquierdo JM (2008) Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. J Biol Chem 283(27): 19077–19084

20. Fan XC, Steitz JA (1998) HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15293–15298
21. Okano HJ, Darnell RB (1997) A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(9): 3024–3037
22. Fan XC, Steitz JA (1998) Overexpression of HuR, a nuclear–cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *The EMBO Journal* 17(12): 3448–3460
23. Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46(5): 659–667
24. Wilson T, Treisman R (1988) Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* 336(6197): 396–399
25. Ma WJ, Chung S, Furneaux H (1997) The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Res* 25(18): 3564–3569
26. Brennan CM, Steitz\* JA (2001) HuR and mRNA stability. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58(2): 266–277
27. Jacobson A, Peltz SW (1996) INTERRELATIONSHIPS OF THE PATHWAYS OF mRNA DECAY AND TRANSLATION IN EUKARYOTIC CELLS. *Annu. Rev. Biochem.* 65(1): 693–739
28. Durie D, Lewis SM, Liwak U et al. (2011) RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation. *Oncogene* 30(12): 1460–1469
29. Wurth L (2012) Versatility of RNA-Binding Proteins in Cancer. *Comparative and Functional Genomics* 2012: 178525
30. Keene JD (1999) Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 5–7
31. Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T et al. (2004) Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO Journal* 23(15): 3092–3102
32. Dai W, Zhang G, Makeyev EV (2012) RNA-binding protein HuR autoregulates its expression by promoting alternative polyadenylation site usage. *Nucleic Acids Res* 40(2): 787–800
33. Peng SS, Chen CY, Xu N et al. (1998) RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *The EMBO Journal* 17(12): 3461–3470
34. Blanco FF, Jimbo M, Wulfkühle J et al. (2016) The mRNA-binding protein HuR promotes hypoxia-induced chemoresistance through posttranscriptional regulation of the proto-oncogene PIM1 in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 35(19): 2529–2541
35. Wang W, Furneaux H, Cheng H et al. (2000) HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Molecular and cellular biology* 20(3): 760–769
36. Burkhart RA, Pineda DM, Chand SN et al. (2013) HuR is a post-transcriptional regulator of core metabolic enzymes in pancreatic cancer. *RNA biology* 10(8): 1312–1323
37. Gurgis FMS, Yeung YT, Tang MXM et al. (2015) The p38-MK2-HuR pathway potentiates EGFRvIII-IL-1 $\beta$ -driven IL-6 secretion in glioblastoma cells. *Oncogene* 34(22): 2934–2942

38. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L et al. (2001) HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer research* 61(5): 2154–2161
39. Wang JG, Collinge M, Ramgolam V et al. (2006) LFA-1-dependent HuR nuclear export and cytokine mRNA stabilization in T cell activation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 176(4): 2105–2113
40. Kim Y, Noren Hooten N, Dluzen DF et al. (2015) Posttranscriptional Regulation of the Inflammatory Marker C-Reactive Protein by the RNA-Binding Protein HuR and MicroRNA 637. *Molecular and cellular biology* 35(24): 4212–4221
41. Lin F-Y, Chen Y-H, Lin Y-W et al. (2006) The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26(12): 2622–2629
42. Suzuki E, Tsutsumi A, Sugihara M et al. (2006) Expression of TNF-alpha, tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *International journal of molecular medicine* 18(2): 273–278
43. Peng W, Furuuchi N, Aslanukova L et al. (2018) Elevated HuR in Pancreas Promotes a Pancreatitis-Like Inflammatory Microenvironment That Facilitates Tumor Development. *Molecular and cellular biology* 38(3)
44. Woo H-H, Yi X, Lamb T et al. (2011) Posttranscriptional suppression of proto-oncogene c-fms expression by vigilin in breast cancer. *Molecular and cellular biology* 31(1): 215–225
45. Saunus JM, French JD, Edwards SL et al. (2008) Posttranscriptional regulation of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 by the RNA binding protein HuR. *Cancer research* 68(22): 9469–9478
46. Bergalet J, Fawal M, Lopez C et al. (2011) HuR-mediated control of C/EBPbeta mRNA stability and translation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas. *Mol Cancer Res* 9(4): 485–496
47. Heinonen M, Fagerholm R, Aaltonen K et al. (2007) Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(23): 6959–6963
48. Yoo PS, Mulkeen AL, Cha CH (2006) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor: implications for tumor angiogenesis. *World journal of gastroenterology* 12(31): 4937–4942
49. Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T et al. (2010) HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Mol Cancer Res* 8(4): 520–528
50. Niesporek S, Kristiansen G, Thoma A et al. (2008) Expression of the ELAV-like protein HuR in human prostate carcinoma is an indicator of disease relapse and linked to COX-2 expression. *International journal of oncology* 32(2): 341–347
51. Filippova N, Yang X, Wang Y et al. (2011) The RNA-binding protein HuR promotes glioma growth and treatment resistance. *Mol Cancer Res* 9(5): 648–659
52. Wang J, Wang B, Bi J et al. (2011) Cytoplasmic HuR expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor outcome in lung cancer. *Medical oncology* (Northwood, London, England) 28 Suppl 1: S577-85



53. Yi X, Zhou Y, Zheng W et al. (2009) HuR expression in the nucleus correlates with high histological grade and poor disease-free survival in ovarian cancer. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 49(1): 93–98
54. Mrena J, Wiksten J-P, Thiel A et al. (2005) Cyclooxygenase-2 is an independent prognostic factor in gastric cancer and its expression is regulated by the messenger RNA stability factor HuR. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(20): 7362–7368
55. Serini S, Fasano E, Piccioni E et al. (2012) DHA induces apoptosis and differentiation in human melanoma cells in vitro: involvement of HuR-mediated COX-2 mRNA stabilization and  $\beta$ -catenin nuclear translocation. *Carcinogenesis* 33(1): 164–173
56. Richards NG, Rittenhouse DW, Freydin B et al. (2010) HuR status is a powerful marker for prognosis and response to gemcitabine-based chemotherapy for resected pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Annals of surgery* 252(3): 499-505; discussion 505-6
57. Dixon DA, Tolley ND, King PH et al. (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *The Journal of clinical investigation* 108(11): 1657–1665
58. Yoo PS, Sullivan CAW, Kiang S et al. (2009) Tissue microarray analysis of 560 patients with colorectal adenocarcinoma: high expression of HuR predicts poor survival. *Annals of surgical oncology* 16(1): 200–207
59. Heinonen M, Fagerholm R, Aaltonen K et al. (2007) Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(23): 6959–6963
60. Denkert C, Weichert W, Winzer K-J et al. (2004) Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10(16): 5580–5586
61. Abdelmohsen K, Gorospe M (2010) Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1(2): 214–229
62. Wang W, Caldwell MC, Lin S et al. (2000) HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *The EMBO Journal* 19(10): 2340–2350
63. Abdelmohsen K, Pullmann R, Lal A et al. (2007) Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Molecular Cell* 25(4): 543–557
64. Lafarga V, Cuadrado A, Lopez de Silanes I et al. (2009) p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Molecular and cellular biology* 29(16): 4341–4351
65. Levy NS, Chung S, Furneaux H et al. (1998) Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273(11): 6417–6423
66. Galbán S, Kuwano Y, Pullmann R et al. (2008) RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular and cellular biology* 28(1): 93–107
67. Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3(5): 362–374
68. Akool -S, Kleinert H, Hamada FMA et al. (2003) Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Molecular and cellular biology* 23(14): 4901–4916

69. Tran H, Maurer F, Nagamine Y (2003) Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Molecular and cellular biology* 23(20): 7177–7188
70. Aparicio LA, Abella V, Valladares M et al. (2013) Posttranscriptional regulation by RNA-binding proteins during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell. Mol. Life Sci.* 70(23): 4463–4477
71. Dong R, Lu J-G, Wang Q et al. (2007) Stabilization of Snail by HuR in the process of hydrogen peroxide induced cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356(1): 318–321
72. Beck C, Schreiber H, Rowley DA (2001) Role of TGF- $\beta$  in immune-evasion of cancer. *Microsc. Res. Tech.* 52(4): 387–395
73. Muralidharan R, Babu A, Amreddy N et al. (2017) Tumor-targeted Nanoparticle Delivery of HuR siRNA Inhibits Lung Tumor Growth In Vitro and In Vivo By Disrupting the Oncogenic Activity of the RNA-binding Protein HuR. *Molecular cancer therapeutics* 16(8): 1470–1486
74. Chand SN, Zarei M, Schiewer MJ et al. (2017) Posttranscriptional Regulation of PARG mRNA by HuR Facilitates DNA Repair and Resistance to PARP Inhibitors. *Cancer research* 77(18): 5011–5025
75. Costantino CL, Witkiewicz AK, Kuwano Y et al. (2009) The role of HuR in gemcitabine efficacy in pancreatic cancer: HuR Up-regulates the expression of the gemcitabine metabolizing enzyme deoxycytidine kinase. *Cancer research* 69(11): 4567–4572
76. Brody JR, Gonye GE (2011) HuR's role in gemcitabine efficacy: an exception or opportunity? *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(3): 435–444
77. López de Silanes I, Fan J, Yang X et al. (2003) Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 22(46): 7146–7154
78. Datta K, Mondal S, Sinha S et al. (2005) Role of elongin-binding domain of von Hippel Lindau gene product on HuR-mediated VPF/VEGF mRNA stability in renal cell carcinoma. *Oncogene* 24(53): 7850–7858
79. Danilin S, Sourbier C, Thomas L et al. (2010) Role of the RNA-binding protein HuR in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31(6): 1018–1026
80. Abdelmohsen K, Lal A, Kim HH et al. (2007) Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6(11): 1288–1292
81. Ronkainen H, Vaarala MH, Hirvikoski P et al. (2011) HuR expression is a marker of poor prognosis in renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 32(3): 481–487
82. Danilin S, Sourbier C, Thomas L et al. (2009) von Hippel-Lindau tumor suppressor gene-dependent mRNA stabilization of the survival factor parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma by the RNA-binding protein HuR. *Carcinogenesis* 30(3): 387–396
83. Iwamura M, Wu W, Muramoto M et al. (1999) Parathyroid hormone-related protein is an independent prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer* 86(6): 1028–1034
84. Goldman MJ, Craft B, Hastie M et al. (2020) Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol* 38(6): 675–678

85. Harlander S, Schönenberger D, Toussaint NC et al. (2017) Combined Vhl, Trp53 and Rb1 mutation causes clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature medicine* 23(7): 869–877
86. Bornkessel NM, Chernyakov D, Groß A et al. (2020) Deletion of Elavl1 in renal collecting duct cells is associated with a specific gene expression pattern resulting in major functional changes. *The FASEB Journal* 34(S1): 1
87. Molinari F, Frattini M (2013) Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology* 3: 326
88. Pan W, Cheng Y, Zhang H et al. (2014) CSBF/C10orf99, a novel potential cytokine, inhibits colon cancer cell growth through inducing G1 arrest. *Scientific Reports* 4: 6812
89. Clark HF, Gurney AL, Abaya E et al. (2003) The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome research* 13(10): 2265–2270
90. Ocón B, Pan J, Dinh TT et al. (2017) A Mucosal and Cutaneous Chemokine Ligand for the Lymphocyte Chemoattractant Receptor GPR15. *Frontiers in Immunology* 8
91. Suply T, Hannedouche S, Carte N et al. (2017) A natural ligand for the orphan receptor GPR15 modulates lymphocyte recruitment to epithelia. *Science Signaling* 10(496): 12
92. Nguyen LP, Pan J, Dinh TT et al. (2015) Role and species-specific expression of colon T cell homing receptor GPR15 in colitis. *Nature immunology* 16(2): 207–213
93. Lahl K, Sweere J, Pan J et al. (2014) Orphan chemoattractant receptor GPR15 mediates dendritic epidermal T-cell recruitment to the skin. *European journal of immunology* 44(9): 2577–2581
94. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S et al. (2011) Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS one* 6(4): e18266
95. Chen C, Wu N, Duan Q et al. (2018) C10orf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes. *Scientific Reports* 8(1): 8590
96. Guo P, Luo Y, Mai G et al. (2014) Gene expression profile based classification models of psoriasis. *Genomics* 103(1): 48–55
97. Gudjonsson JE, Ding J, Johnston A et al. (2010) Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. *The Journal of investigative dermatology* 130(7): 1829–1840
98. Chen Y, Di Gu, Wen Y et al. (2020) Identifying the novel key genes in renal cell carcinoma by bioinformatics analysis and cell experiments. *Cancer Cell International* 20(1): 331
99. Yang M, Tang M, Ma X et al. (2015) AP-57/C10orf99 is a new type of multifunctional antimicrobial peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457(3): 347–352
100. Li X, Fan R, Tong A et al. (2015) In situ gel-forming AP-57 peptide delivery system for cutaneous wound healing
101. Wang J, Guo Y, Chu H et al. (2013) Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *International Journal of Molecular Sciences* 14(5): 10015–10041

102. Brodaczevska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M et al. (2016) Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer* 15(1): 83
103. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11(8): 783–784
104. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E et al. (2014) Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* 343(6166): 84–87
105. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I et al. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134
106. T. Hall (1999) BIOEDIT: A USER-FRIENDLY BIOLOGICAL SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR AND ANALYSIS PROGRAM FOR WINDOWS 95/98/ NT: 95–98
107. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7): 676–682
108. Brinkman EK, Chen T, Amendola M et al. (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42(22): e168
109. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4): 402–408
110. Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213): 1258096
111. Giuliano CJ, Lin A, Girish V et al. (2019) Generating Single Cell-Derived Knockout Clones in Mammalian Cells with CRISPR/Cas9. *Current protocols in molecular biology* 128(1): e100
112. Labuhn M, Adams FF, Ng M et al. (2018) Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Res* 46(3): 1375–1385
113. Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M et al. (2015) CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PloS one* 10(4): e0124633
114. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248–254
115. LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685
116. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350–4354
117. Grant M. Williams, David T. Lynch (2021) Renal Oncocytoma. In: Williams GM, Lynch DT (Hrsg.) *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing
118. Lienert AR, Nicol D (2012) Renal angiomyolipoma. *BJU international* 110 Suppl 4: 25–27
119. Wollina U, Langner D, França K et al. (2017) Pyogenic Granuloma - A Common Benign Vascular Tumor with Variable Clinical Presentation: New Findings and Treatment Options. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 5(4): 423–426

120. Uhlen M, Zhang C, Lee S et al. (2017) A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* 357(6352)
121. Al-Ahmadi W, Al-Ghamdi M, Al-Haj L et al. (2009) Alternative polyadenylation variants of the RNA binding protein, HuR: abundance, role of AU-rich elements and auto-Regulation. *Nucleic Acids Res* 37(11): 3612–3624
122. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646–674
123. Chand SN, Zarei M, Schiewer MJ et al. (2017) Posttranscriptional Regulation of PARG mRNA by HuR Facilitates DNA Repair and Resistance to PARP Inhibitors. *Cancer research* 77(18): 5011–5025
124. ABERCROMBIE M, Heaysman JE (1953) Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. *Experimental Cell Research* 5(1): 111–131
125. ABERCROMBIE M, HEAYSMAN JE (1954) Invasiveness of sarcoma cells. *Nature* 174(4432): 697–698
126. Wang A, Bao Y, Wu Z et al. (2019) Long noncoding RNA EGFR-AS1 promotes cell growth and metastasis via affecting HuR mediated mRNA stability of EGFR in renal cancer. *Cell Death & Disease* 10(3)
127. Liu Y, Chen X, Cheng R et al. (2018) The Jun/miR-22/HuR regulatory axis contributes to tumourigenesis in colorectal cancer. *Mol Cancer* 17(1): 11
128. Xue F, Li QR, Xu YH et al. (2019) MicroRNA-139-3p Inhibits The Growth And Metastasis Of Ovarian Cancer By Inhibiting ELAVL1. *OncoTargets and therapy* 12: 8935–8945
129. Du F, Zhao X, Fan D (2017) Soft Agar Colony Formation Assay as a Hallmark of Carcinogenesis. *Bio-protocol* 7(12): e2351
130. Khan MI, Czarnecka AM, Lewicki S et al. (2016) Comparative Gene Expression Profiling of Primary and Metastatic Renal Cell Carcinoma Stem Cell-Like Cancer Cells. *PloS one* 11(11): e0165718
131. Lal S, Cheung EC, Zarei M et al. (2017) CRISPR Knockout of the HuR Gene Causes a Xenograft Lethal Phenotype. *Mol Cancer Res* 15(6): 696–707
132. Boettcher M, McManus MT (2015) Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular Cell* 58(4): 575–585
133. Martincorena I, Campbell PJ (2015) Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science* 349(6255): 1483–1489
134. Hanlon K, Thompson A, Pantano L et al. (2019) Single-cell cloning of human T-cell lines reveals clonal variation in cell death responses to chemotherapeutics. *Cancer genetics* 237: 69–77
135. Mou H, Smith JL, Peng L et al. (2017) CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biology* 18(1): 108
136. Lalonde S, Stone OA, Lessard S et al. (2017) Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PloS one* 12(6): e0178700
137. Sharpe JJ, Cooper TA (2017) Unexpected consequences: exon skipping caused by CRISPR-generated mutations. *Genome Biology* 18(1): 109
138. Brodziak A, Sobczuk P, Bartnik E et al. (2019) Drug resistance in papillary RCC: from putative mechanisms to clinical practicalities. *Nature reviews. Urology* 16(11): 655–673

139. Pak S, Kim W, Kim Y et al. (2019) Dihydrotestosterone promotes kidney cancer cell proliferation by activating the STAT5 pathway via androgen and glucocorticoid receptors. *Journal of cancer research and clinical oncology* 145(9): 2293–2301
140. Li T, Lai Y, Han X et al. (2022) BMP2 as a promising anticancer approach: functions and molecular mechanisms. *Invest New Drugs* 40(6): 1322–1332
141. Hall NG, Klenotic P, Anand-Apte B et al. (2003) ADAMTSL-3/punctin-2, a novel glycoprotein in extracellular matrix related to the ADAMTS family of metalloproteases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 22(6): 501–510
142. Perisic L, Lal M, Hulkko J et al. (2012) Plekhh2, a novel podocyte protein downregulated in human focal segmental glomerulosclerosis, is involved in matrix adhesion and actin dynamics. *Kidney International* 82(10): 1071–1083
143. Blanchard O, Stepanovska B, Starck M et al. (2018) Downregulation of the S1P Transporter Spinster Homology Protein 2 (Spns2) Exerts an Anti-Fibrotic and Anti-Inflammatory Effect in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19(5)
144. Hamaidi I, Coquard C, Danilin S et al. (2019) The Lim1 oncogene as a new therapeutic target for metastatic human renal cell carcinoma. *Oncogene* 38(1): 60–72
145. Yoshikawa T, Seki N, Azuma T et al. (2000) Isolation of a cDNA for a novel human RING finger protein gene, RNF18, by the virtual transcribed sequence (VTS) approach(1). *Biochim Biophys Acta* 1493(3): 349–355
146. Jun HS, Yoon JW (1994) Initiation of autoimmune type 1 diabetes and molecular cloning of a gene encoding for islet cell-specific 37kd autoantigen. *Advances in experimental medicine and biology* 347: 207–220
147. Shih P-Y, Lee S-P, Chen Y-K et al. (2014) Cortactin-binding protein 2 increases microtubule stability and regulates dendritic arborization. *Journal of cell science* 127(Pt 16): 3521–3534
148. Zhou S, Wang L, Guo S et al. (2017) EphA4 protein promotes invasion in clear cell renal cell carcinomas. *International journal of clinical and experimental pathology* 10(12): 11737–11742
149. Zhang J-P, Yuan H-X, Kong W-T et al. (2014) Increased expression of Chitinase 3-like 1 and microvessel density predicts metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35(12): 12131–12137
150. Lee HJ, Kim D-I, Kwak C et al. (2008) Expression of CD24 in clear cell renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Urology* 72(3): 603–607
151. Steffens S, Schrader AJ, Vetter G et al. (2012) Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 3(4): 787–790
152. Tang Y, Xie J, Chen Y et al. (2020) Tspan8 Is Highly Expressed in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Indicates Poor Prognosis. *Annals of clinical and laboratory science* 50(5): 638–644
153. Wang W, Zhao E, Yu Y et al. (2018) MiR-216a exerts tumor-suppressing functions in renal cell carcinoma by targeting TLR4. *American Journal of Cancer Research* 8(3): 476–488
154. Liu X, Wang J, Sun G (2015) Identification of key genes and pathways in renal cell carcinoma through expression profiling data. *Kidney & blood pressure research* 40(3): 288–297

155. Matsye P, Zheng L, Si Y et al. (2017) HuR promotes the molecular signature and phenotype of activated microglia: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases. *Glia* 65(6): 945–963
156. Sitaram RT, Mallikarjuna P, Landström M et al. (2016) Transforming growth factor- $\beta$  promotes aggressiveness and invasion of clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 7(24): 35917–35931
157. Zhang Y-L, Wang R-C, Cheng K et al. (2017) Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. *Cancer Biology & Medicine* 14(1): 90–99
158. Janiszewska M, Primi MC, Izard T (2020) Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of Biological Chemistry* 295(8): 2495–2505
159. (04.04.2023) C10orf99 - Antibodies - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188373-C10orf99/summary/antibody>. Zugriff am 4.4.2023
160. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z et al. (2001) Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 93(14): 1054–1061
161. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* 366(10): 883–892
162. Pastore AL, Palleschi G, Silvestri L et al. (2015) Serum and urine biomarkers for human renal cell carcinoma. *Disease Markers* 2015: 251403
163. Cowey CL, Rathmell WK (2009) VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Current oncology reports* 11(2): 94–101
164. Klatter T, Seligson DB, Riggs SB et al. (2007) Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(24): 7388–7393
165. Liang Y-X, He H-C, Han Z-D et al. (2009) CD147 and VEGF expression in advanced renal cell carcinoma and their prognostic value. *Cancer investigation* 27(7): 788–793
166. Rajandram R, Yap NY, Pailoor J et al. (2014) Tumour necrosis factor receptor-associated factor-1 (TRAF-1) expression is increased in renal cell carcinoma patient serum but decreased in cancer tissue compared with normal: potential biomarker significance. *Pathology* 46(6): 518–522
167. White NMA, Masui O, DeSouza LV et al. (2014) Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma. *Oncotarget* 5(2): 506–518
168. Mittal A, Poudel B, Pandeya DR et al. (2012) Serum amyloid a as an independent prognostic factor for renal cell carcinoma--a hospital based study from the Western region of Nepal. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13(5): 2253–2255
169. Fischer K, Theil G, Hoda R et al. (2012) Serum amyloid A: a biomarker for renal cancer. *Anticancer Res* 32(5): 1801–1804
170. Di Carlo A (2013) Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in sera and urine of patients with kidney tumors. *Oncol Lett* 5(5): 1677–1681
171. Morrissey JJ, London AN, Lambert MC et al. (2011) Sensitivity and specificity of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 for

- the diagnosis of renal cell carcinoma. *American journal of nephrology* 34(5): 391–398
172. Morrissey JJ, Mobley J, Song J et al. (2014) Urinary concentrations of aquaporin-1 and perilipin-2 in patients with renal cell carcinoma correlate with tumor size and stage but not grade. *Urology* 83(1): 256.e9-14
  173. Zentrum für Krebsregisterdaten (22.06.2022) Krebs in Deutschland - Niere. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs_node.html). Zugriff am 22.6.2022
  174. Laguna MP (2014) Re: Defining Early-Onset Kidney Cancer: Implications for Germline and Somatic Mutation Testing and Clinical Management. *Journal of Urology* 192(3): 721–722
  175. Sukswai N, Khoury JD (2019) Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Current hematologic malignancy reports* 14(5): 368–375
  176. Merchant M, Weinberger SR (2000) Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21(6): 1164–1177
  177. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE et al. (1999) Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 238(2): 375–385
  178. Siu KWM, DeSouza LV, Scorilas A et al. (2009) Differential protein expressions in renal cell carcinoma: new biomarker discovery by mass spectrometry. *Journal of proteome research* 8(8): 3797–3807
  179. Frantzi M, Metzger J, Banks RE et al. (2014) Discovery and validation of urinary biomarkers for detection of renal cell carcinoma. *Journal of proteomics* 98: 44–58
  180. Geyer PE, Voytik E, Treit PV et al. (2019) Plasma Proteome Profiling to detect and avoid sample-related biases in biomarker studies. *EMBO molecular medicine* 11(11): e10427
  181. Vivar Chevez AR de, Finke J, Bukowski R (2014) The role of inflammation in kidney cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 816: 197–234
  182. Hussein M-RA, Al-Assiri M, Musalam AO (2009) Phenotypic characterization of the infiltrating immune cells in normal prostate, benign nodular prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma
  183. Kryvenko ON, Jankowski M, Chitale DA et al. (2012) Inflammation and preneoplastic lesions in benign prostate as risk factors for prostate cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 25(7): 1023–1032
  184. Terakawa T, Miyake H, Kanomata N et al. (2008) Inverse association between histologic inflammation in needle biopsy specimens and prostate cancer in men with serum PSA of 10-50 ng/mL. *Urology* 72(6): 1194–1197
  185. Haghshenas MR, Khademi B, Faghieh Z et al. (2015) Immune regulatory cells and IL17-producing lymphocytes in patients with benign and malignant salivary gland tumors. *Immunology Letters* 164(2): 109–116
  186. Soyupek S, Tulunay O, Armağan A et al. (2007) Clinical importance of intratumoral and normal renal parenchymal inflammatory cell infiltration in renal cell carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology* 41(5): 387–391



187. Geissler K, Fornara P, Lautenschläger C et al. (2015) Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *Oncolimmunology* 4(1): e985082
188. Dainichi T, Nakano Y, Doi H et al. (2022) C10orf99/GPR15L Regulates Proinflammatory Response of Keratinocytes and Barrier Formation of the Skin. *Frontiers in Immunology* 13: 825032

## 8 Thesen

1. Ein *ELAVL1*-Knockout scheint die Zellproliferation von Caki-2-Zellen zu verlangsamen.
2. *ELAVL1*-defiziente Caki-1-Zellen scheinen kleinere Kolonien zu bilden.
3. Ein *ELAVL1*-Knockout hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten oder die Koloniezahl von Caki-Zellen.
4. Durch einen *ELAVL1*-Knockout in Caki-Zellen gemeinsam differentiell exprimierte Gene werden vermehrt herunter- als heraufreguliert.
5. Ein *ELAVL1*-Knockout hat keinen Einfluss auf die Expression von *C10ORF99* in Caki-Zellen.
6. Ein *ELAVL1*-Knockout in Caki-Zellen führt zu einer Destabilisierung der eigenen mRNA.
7. Caki-Zellen sezernieren *C10ORF99* in den Zellüberstand.
8. *C10ORF99* ist in humanen Serumproben detektierbar.
9. Patienten mit Nierenzellkarzinom weisen gegenüber gesunden Probanden eine im Mittel sechsfach erhöhte *C10ORF99*-Serum-Konzentration auf.
10. Die *C10ORF99*-Serum-Konzentration beträgt in Patienten mit benignen Nierentumoren gegenüber Nierengesunden im Mittel das Fünffache.

# **Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift

## Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Mascha Binder möchte ich in zweierlei Hinsicht danken – zunächst für die Möglichkeit, in der Universitätsklinik für Hämatologie und Onkologie Halle (Saale) promovieren und das vorliegende Thema bearbeitet haben zu dürfen. Die Vielfalt an Methoden hat mir einen breiten Einblick in wissenschaftliches Arbeiten ermöglicht. Darüber hinaus bin ich dankbar für die unkomplizierte vorübergehende Anstellung in der KIM IV während der Corona-Pandemie, wodurch ich die Zeit der Laborschließung sinnvoll überbrücken konnte, um meine klinische Tätigkeit zu beginnen – die Einarbeitung durch Ihre KollegInnen hat meine weitere ärztliche Tätigkeit positiv geprägt. Großer Dank geht an meinen geduldigen Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bayram Edemir, der jeder Zeit zur Verfügung stand, für seine wertvolle Betreuung, die zielgerichtete Planung und Begleitung meiner Arbeit, durch die es mir möglich war, die Laborzeit besonders effizient zu nutzen. Danke für die Geduld mit einer bisher Laborfremden Medizinerin und die immer gute Stimmung, durch welche Rückschläge praktisch unmöglich waren. Des Weiteren danke ich Dmitry Chernyakov und Katrin Nerger für die geduldige Einarbeitung und Begleitung im Laboralltag sowie Carolin Walkemeyer und Nicola Bornkessel für die warme Empfehlung der Promotionsstelle. Neben Nicola danke ich Max Brandau für den wertvollen Diskurs über ELAVL1.

Überdies gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Pablo Fornara für die zur Verfügung gestellten Proben aus der Universitätsklinik für Urologie Halle (Saale) sowie Frau Dr. rer. nat. Gerit Theil, Frau Dr. rer. nat. Joanna Bialek sowie Frau Kerstin Voigtländer für ihre Begleitung während der ELISA-Messungen und die Möglichkeit, den Magellan™ nutzen zu dürfen. Oberarzt Dr. med. Felix Kawan danke ich für den wertvollen klinischen Diskurs zum Nierenzellkarzinom. Weiterhin möchte ich Herrn apl. Prof. Dr. Andreas Wienke für die hilfreiche biometrische Beratung danken.

Letztlich gilt großer Dank meiner lieben Familie, durch deren emotionale als auch finanzielle Unterstützung ich mich voll und ganz auf die Forschungsarbeit, sowie mein gesamtes Studium mit seinen musikalischen Ausflüchten über Jahre hinweg konzentrieren konnte. Meiner Schwester Rebecca danke ich insbesondere für ihre Offenheit gegenüber spontanen wissenschaftlichen und emotionalen Ergüssen.

Dank Annika und Helen gab es auch ein Leben fernab vom Landeszentrum für Gentherapie und nicht selten einen bereits gedeckten Abendbrottisch.

Doch schließlich war Tobias über dreieinhalb Jahre mein Ruhepol, der mich während Promotion und Berufseinstieg ausnahmslos verständnisvoll unterstützt und geerdet hat – danke dafür!