

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Gekle)

**Funktion und zellspezifisches Vorkommen einer neuen  
langen nichtkodierenden Ribonukleinsäure,  
WISP1-OT2**

Dissertation  
zur Erlangung des  
akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sandro Dittmar

geboren am 18.08.1990 in Gardelegen

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt

2. Prof. med. Dr. rer. nat. Barbara Seliger

3. Prof. Dr. rer. nat. Christian Stock (Hannover)

20.09.2016

22.03.2017

## Referat

Lange nichtkodierende RNAs (lncRNAs) sind Ribonukleinsäuren, welche nicht für Proteine kodieren und mehr als 200 Nukleotide enthalten. Dank moderner Methoden nimmt die Anzahl bekannter lncRNAs beständig zu. Für einige Wenige sind bereits physiologische bzw. pathophysiologische Funktionen nachgewiesen worden. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass einige lncRNAs an der Regulation der Genexpression beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine neue lange nichtkodierende RNA untersucht werden – WISP1-OT2. WISP1-OT2 wurde im Jahr 2012 erstmals beschrieben und bisher war sehr wenig über dieses Transkript bekannt. WISP1-OT2 ist ein Transkript, das Teile des 4. Introns und 5. Exons des regulären WISP1-Transkripts umfasst und 2.922 Nukleotide lang ist. Nach Inkubation mit dem Mykotoxin Ochratoxin A konnte es in einigen Nierenzelllinien verstärkt exprimiert vorgefunden werden. Um mögliche Funktionen von WISP1-OT2 zu untersuchen, war ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit die Überexpression von WISP1-OT2 in HEK-293T-Zellen. Hierbei sollte mittels RT-PCR ermittelt werden, ob in den WISP1-OT2-überexprimierenden Zellen eine veränderte Genexpression vorliegt. Tatsächlich konnten nach 24 Stunden WISP1-OT2-Überexpression statistisch signifikante aber geringfügige Änderungen der mRNA-Gehalte der Gene COL3A1 (+ 1,29-fach), HRAS (- 1,25-fach) und TGF $\beta$  (- 1,2-fach) detektiert werden. Nach 48-stündiger WISP1-OT2-Überexpression konnten die mRNAs der Gene COL1A1 (- 1,4-fach), FOS (- 1,26-fach), SERPINE1 (- 1,99-fach) und TNF (- 1,64-fach) in veränderter Menge detektiert werden. Weiterhin wurde mittels Caspase- und LDH-Aktivitätsmessung überprüft, ob die WISP1-OT2-Überexpression in HEK-293T-Zellen einen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Hierbei konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden.

Mittels ELISA-Untersuchungen sollte der Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression in den HEK-293T-Zellen auf den Kollagen-Gehalt im Medium als Maß für eventuelle Fibrose überprüft werden. Es zeigte sich, dass im Medium der überexprimierenden Zellen ein geringerer Gehalt der Kollagene I (- 10,58 %) und III (- 42,1 %) vorlag. Da einige lange nichtkodierende RNAs bekannt sind, deren Vorkommen in Korrelation zum Auftreten maligne veränderter Zellen steht, sollte die Expression von WISP1-OT2 mittels RT-PCR und *droplet digital* PCR in Nierenzellkarzinomen bestimmt werden. In 19 von 21 untersuchten Zelllinien klarzelliger Nierenzellkarzinome konnte ein gesteigertes Vorkommen der lncRNA WISP1-OT2 detektiert werden. Weiterhin war der Gehalt des WISP1-OT2-Transkripts in 6 von 8 untersuchten Nierentumorgewebe im Vergleich zum nichttumorösen Gewebe (jeweils vom selben Patienten) erhöht.

Dittmar, Sandro: Funktion und zellspezifisches Vorkommen einer neuen langen nichtkodierenden Ribonukleinsäure, WISP1-OT2, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2016

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1-20</b>
1.1.	Ribonukleinsäuren – ein kurzer Überblick.....	1-3
1.2.	Lange nichtkodierende RNA und ihre zunehmende Bedeutung.....	4-5
1.3.	Lange nichtkodierende RNA und deren mögliche Funktionen.....	6-9
1.3.1.	Einfluss von lncRNA auf epigenetische Modifikationen.....	6
1.3.2.	Einfluss von lncRNA auf Transkription und Transkriptionsrate.....	7-8
1.3.3.	Einfluss von lncRNA auf die posttranskriptionelle Genregulation.....	8-9
1.4.	Lange nichtkodierende RNA und ihre Bedeutung in pathophysiologischen Vorgängen und der malignen Zellentartung.....	9-11
1.5.	WISP1-OT2 – eine neue lange nichtkodierende RNA.....	12
1.6.	Das Gen WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP1).....	13
1.7.	Genexpressionsanalyse zur Zuordnung physiologischer und pathophysiologischer Funktionen von WISP1-OT2.....	14-16
1.8.	Mögliche Pathomechanismen von WISP1-OT2.....	17-20
1.8.1.	Fibrose und WISP1-OT2.....	18
1.8.2.	Entzündungsvorgänge, Zelltod und WISP1-OT2.....	19
1.8.3.	Nierenzellkarzinome und WISP1-OT2.....	20
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>21</b>

---

<b>3.</b>	<b>Material und Methodik.....</b>	<b>22-40</b>
3.1.	Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	22-24
3.2.	Zellkulturen.....	25-27
3.2.1.	Verwendete Zellen.....	25
3.2.2.	Kultivierung der Zellen.....	25-26
3.2.3.	Transfektion der Zellen.....	26-27
3.3.	Molekularbiologische Methoden.....	28-35
3.3.1.	RNA-Isolation.....	28-29
3.3.2.	Umschreiben von RNA in cDNA.....	30-31
3.3.3.	Real-Time PCR.....	31-32
3.3.4.	Droplet Digital PCR.....	33
3.3.5.	Primer und Primeretablierung.....	34-35
3.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	36-39
3.4.1.	Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz.....	36
3.4.2.	Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA).....	36-37
3.4.3.	Caspase-3 – Aktivitätsbestimmung.....	38
3.4.4.	LDH – Messung.....	39
3.5.	Bioinformatik und Statistik.....	40

---

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41-54</b>
4.1.	Überexpressionsversuche mit WISP1-OT2.....	41-45
4.1.1.	Überexpression – Erstellung einer Konzentrationsreihe.....	41
4.1.2.	Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf die Genexpression.....	42-43
4.1.3.	Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den intrazellulären Proteingehalt, die Apoptose- und Nekroserate.....	44
4.1.4.	Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den Gehalt von Proteinen der extrazellulären Matrix in HEK-293T-Zellen.....	45
4.2.	Detektion der WISP1-OT2-RNA in Tumoren.....	46-54
4.2.1.	Detektion der WISP1-OT2-RNA in der RNA von Tumorzelllinien.....	46-50
4.2.2.	Detektion der WISP1-OT2-RNA in Tumor- und Normalgewebeproben.....	51-54
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55-69</b>
5.1.	Überexpressionsversuche mit WISP1-OT2.....	55-62
5.1.1.	Überexpression – Erstellung einer Konzentrationsreihe.....	55
5.1.2.	Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf die Genexpression.....	56-60
5.1.3.	Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den intrazellulären Proteingehalt, die Apoptose- und Nekroserate.....	60
5.1.4.	Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den Gehalt von Proteinen der extrazellulären Matrix.....	61-62
5.1.5.	WISP1-OT2, ein antifibrotischer Schutzfaktor?.....	62

---

5.2.	WISP1-OT2, lncRNAs und Malignome.....	63-67
5.2.1.	Detektion von WISP1-OT2 in Nierenzellkarzinomen.....	63-66
5.2.2.	LncRNA als Biomarker oder möglicher Teil der gezielten Krebstherapie?.....	66-67
5.3.	Korrelation der Expression von WISP1 und WISP1-OT2.....	68
5.4.	Zusammenfassende Diskussion.....	69
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71-79</b>
<b>8.</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>80</b>

**Abkürzungen**

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AGT	Angiotensinogen
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Adenomatous polyposis coli
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCN	Cysteinreiche Proteinfamilie
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COL	Kollagen
Ct	<i>Quantification cycle</i> (Quantifizierungs-Zyklus)
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DVED-AFC	Asp-glu-val-asp-7-amino- trifluoromethylcoumarin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>

et al.	Und andere (lat.: et alii)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FOS	<i>FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTPase	Enzym zur Hydrolysierung von Guanosintriphosphaten
h	Stunde
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HEK-Zellen	<i>Human Embryonic Kidney</i> -Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HK-Zellen	<i>Human Kidney</i> -Zellen
HRAS	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LJ	Lebensjahr
lncRNA	<i>Long noncoding</i> (Lange nichtkodierende) Ribonukleinsäure
MEK	MAP Kinase Kinase
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
Min	Minute
miRNA	Micro- (Mikro-) Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MLH1	MutL Homolog 1



mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metallopeptidase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger-</i> (Boten-) Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Ncbi	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	<i>Nucleotid</i> (Nukleotid)
OT	<i>Overlapping Transcript</i> (überlappendes Transkript)
OTA	Ochratoxin A
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepuffertes Salz)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Pondus hydrogenii
pmol	Pikomol
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPTEC	Humane renale proximale Tubulusepithelzellen
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SERPINE1	Serpinpeptidase-Inhibitor, clade E, member1

siRNA	<i>Small interfering</i> (kleine eingreifende) Ribonukleinsäure
snRNA	<i>Small nuclear</i> (kleine nukleäre) Ribonukleinsäure
STK	Serin/Threonin-Kinase
Tab.	Tabelle
TERRA	<i>Telomeric repeat-containing</i> -Ribonukleinsäure
TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TRNA	<i>Transfer</i> -Ribonukleinsäure
UTR	Untranslatierter Bereich
WISP1	<i>Wnt1 inducible signaling pathway protein</i>
WNT1	<i>Wingless + Int-1</i>
XIST	<i>X inactive specific transcript</i>

## 1. Einleitung

### 1.1. Ribonukleinsäuren – ein kurzer Überblick

„Ich wusste einfach nicht, was Dogma bedeutete. Und ich hätte es ebenso gut Zentrale Hypothese nennen können ... Dogma war nur ein Schlagwort.“ (Thieffry und Sarkar, 1998)

Dies gestand Francis Crick 1976 über die Bezeichnung seiner Hypothese ein. Etwa 18 Jahre zuvor (1958) formulierte Crick das „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“. Die klassische Interpretation von Cricks Hypothese stellt die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als eine sequenzielle Informationsquelle, die Ribonukleinsäuren (RNA) als Informationsüberträger und das Protein als Endprodukt dar. Jedoch konnte im Verlauf der letzten Jahrzehnte, etwa von 1970 bis heute (2016), gezeigt werden, dass Ribonukleinsäuren weit mehr Funktionen zukommen als die eines reinen Informationsüberträgers – sie selbst stellen auch ein Endprodukt dar (Kung et al., 2013). Zur Aufrechterhaltung der zellulären Funktionen sind Ribonukleinsäuren (RNA) unabdingbar. Ribonukleinsäuren sind Ketten aus Nukleotiden. Nukleotide wiederum setzen sich aus Zucker, Phosphat und einer Base zusammen. Anders als die zumeist zweisträngig vorliegenden Desoxyribonukleinsäuren (DNA) sind RNAs in der Regel einsträngig bzw. liegen in jeweiligen Sekundärstrukturen vor. Im Rahmen des ENCODE-Projektes (2012) konnte herausgefunden werden, dass etwa 76 % des humanen Genoms in RNA transkribiert werden, wovon jedoch nur etwa 2 % für Proteine kodieren (Pennisi, 2012; Derrien et al., 2012). Diese RNAs dienen im Sinne des "Zentralen Dogma der Molekularbiologie" als Bote der Erbinformation. Sie werden als mRNA (*messenger RNA*) – nach heutigem Kenntnisstand zunächst über Bildung einer prä-mRNA – von der DNA abgeschrieben (Transkription) und anschließend in ein Protein übersetzt (Translation) – dies sind somit proteinkodierende RNAs.

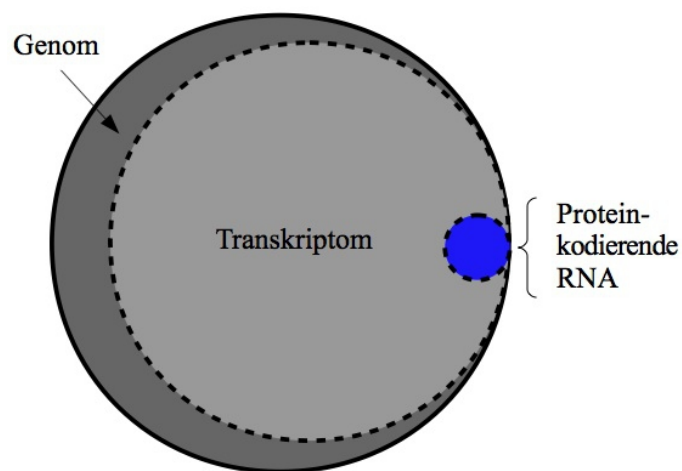


Abb. 1: Humanes Genom/Transkriptom: 76 % des Genoms werden in RNA (Transkriptom) abgeschrieben, 1-2 % des Genoms sind für Proteine kodierend (modifiziert nach Germ. Cancer Res. Center, 24.07.2016).

Der mit 98 % deutlich größere Anteil des Transkriptoms besteht aus nicht für Proteine kodierender RNA. Dabei scheint es einen Zusammenhang zwischen der evolutionären Entwicklungsstufe einer Gattung und dem Anteil nicht-proteinkodierender Sequenzen an deren Genom zu geben (siehe Abb.: 2). Je komplexer eine Gattung entwickelt ist, desto höher ist der Anteil nichtkodierender DNA-Sequenzen in ihrem Genom (Mattick, 2001, 2004a).

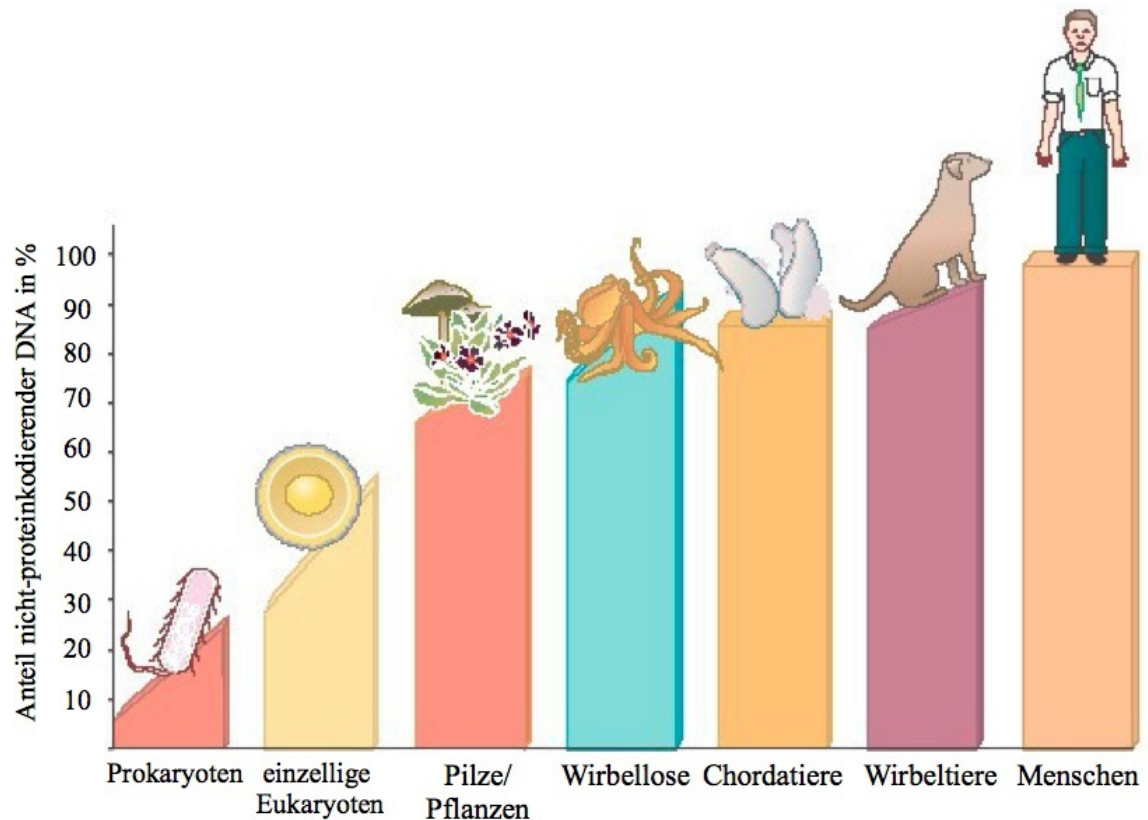


Abb. 2: In Prokaryoten machen nicht-proteinkodierende DNA-Sequenzen einen geringen Anteil an deren gesamten Genom aus, während dieser Anteil bei Eukaryoten mit zunehmender Komplexität der Organismen ansteigt (modifiziert nach Mattick, 2004b).

Zu den nicht-proteinkodierenden Transkripten zählen infrastrukturelle RNAs (tRNAs, rRNAs, snRNAs) und regulatorische RNAs (miRNA, lncRNA). Tab. 1 gibt einen Überblick über sämtliche zur Zeit bekannten RNAs.

Tab. 1: Ribonukleinsäuren und ihre Funktionen im Überblick (nach Carell et al., 2012)

Abkürzung	Bezeichnung	Funktion
mRNA	Boten-RNA	für Protein kodierend
tRNA	Transfer-RNA	Aminosäure-Überträger, mRNA dekodierend
rRNA	ribosomale RNA	Nukleinsäure-Anteil des Ribosoms
sncRNA	kleine nichtkodierende RNA	
- miRNA	micro RNA	Regulation der Genexpression
- piRNA	piwi-interacting RNA	Regulation der Genexpression
- siRNA	short interfering RNA	Regulation der Genexpression
- snRNA	small nuclear RNA	Beteiligung z.B. am Intron-Splicing
- snoRNA	small nucleolar RNA	Beteiligung an der RNA-Modifikation
lncRNA	long non-coding RNA	regulatorische Funktion bzw. unbekannt

Während die Rolle vieler nichtkodierender Transkripte, wie rRNAs und tRNAs, für die Expression von Genen bekannt ist, sind die Kenntnisse über lange nichtkodierende RNAs noch sehr rudimentär. Sie stellen eine neue, schnell wachsende Untergruppe der nichtkodierenden RNAs dar.

## 1.2. Lange nichtkodierende RNA und ihre zunehmende Bedeutung

Lange nichtkodierende RNAs: ein Werkzeug der Genregulation, ein Produkt der Zellentartung oder schlicht Zellabfall?

Lange nichtkodierende RNAs sind definiert als nicht für Proteine kodierende, einsträngige Transkripte, die mindestens aus 200 Nukleotiden bestehen (Rinn und Chang, 2012). Erst vor wenigen Jahren, nach systematischer Sequenzierung des Transkriptoms, konnten sie entdeckt werden. Mit zunehmendem Erkenntnisgewinn erhärtete sich der Verdacht, dass ihnen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Expression von Genen und möglicherweise auch bei deren Fehlregulation in pathophysiologischen Vorgängen zukommt. Bekräftigt wird diese Annahme zum einen dadurch, dass die Expression von lncRNAs sehr selektiv über deren Promotorregionen reguliert wird und ein gewebespezifisches Muster aufweist (Derrien et al., 2012; Ravasi et al., 2006; Mercer et al., 2008). Zum anderen konnten in einer Vielzahl pathologisch veränderter Gewebe (bspw. Tumorgewebe) spezifische Expressionsmuster zahlreicher lncRNAs gefunden werden. Dies könnte in naher Zukunft nicht zuletzt für die Diagnostiken und Therapien verschiedener Krankheiten insbesondere in Bezug auf Tumorerkrankungen relevant sein (Cheatham et al., 2013; Yang et al., 2015; Li und Chen, 2013). Weiterhin ist der Anteil langer nichtkodierender RNA am menschlichen Genom sehr hoch. Derzeit lässt er sich noch nicht genau quantifizieren, da regelmäßig neue Transkripte entdeckt werden, deren Funktion aber in den meisten Fällen unbekannt ist. Aktuell (2016) sind etwa 118.000 lncRNAs identifiziert worden ([www.lncipedia.org](http://www.lncipedia.org), Stand 25.05.2016; Derrien et al., 2012). Hauptsächlich sind lncRNAs im Nukleus angereichert und üben dort möglicherweise auch den Großteil ihrer Funktionen aus. Ihre Einteilung basiert auf ihrer Lokalisation innerhalb des Genoms (Derrien et al., 2012; Djebali, 2012). Folgende Klassifikationen werden unterschieden:

- 1) **antisense**: lncRNAs, die vom Gegenstrang proteinkodierender Gene abgelesen werden;
- 2) **intergenisch** (*intergenic*): Transkripte, die von Bereichen zwischen proteinkodierenden Genen abgelesen werden;
- 3) **überlappend** (*overlapping*): Transkripte, die von Bereichen abgelesen werden, welche die Exons kodierender Gene und angrenzende Introns überschneiden;
- 4) **intronisch** (*intronic*): lncRNAs, welche ausschließlich in Introns proteinkodierender Gene abgelesen werden;
- 5) **andere** (*others*): prozessierte Transkripte, welche in keine der o.g. Kategorien passen.

Tab. 2: Verteilung der lncRNAs nach ihrer Lokalisation (Derrien et al., 2012, GENCODE v7)

Lange nicht-kodierende RNA-Transkripte (gesamt 14.880 nach Gencode)								
intergenisch (9.518)				intragenisch (5.362)				
gleicher Strang	konvergent	divergent	exonisch (2.411)		intronisch (2.784)		überlappend (167)	
4.165	1.937	3.416	S	AS	S	AS	S	AS
			NA	2.411	563	2.221	52	115

Aus Tab. 2 wird ersichtlich, dass ein Großteil der hier klassifizierten langen nichtkodierenden RNAs außerhalb kodierender Sequenzen (intergenisch) liegt. Diese können orientierend an benachbarten proteinkodierenden Sequenzen weiter subklassifiziert werden. Dabei werden jene lncRNAs, welche sich auf dem gleichen Strang wie die Nachbarsequenz befinden, von denen, die auf dem Gegenstrang lokalisiert sind, unterschieden. Intergenische lncRNAs, welche auf dem Gegenstrang lokalisiert sind, können durch ihre Orientierung zur proteinkodierenden Sequenz weiter unterschieden werden. Zum einen sind lange nichtkodierende RNAs beschrieben, deren Startregion in Nachbarschaft zur Startregion der kodierenden Sequenz liegt und die Ableserichtungen folglich auseinandergehen (divergent). Zum anderen können die Ableserichtungen aufeinander zu orientiert sein (konvergent), wobei die Endregionen der proteinkodierenden und der nichtkodierenden Sequenz sich in Nachbarschaft befinden. Bei Betrachtung der intragenischen lncRNAs fällt auf, dass der Anteil überlappender Transkripte am geringsten ist, während exonische und intronische Transkripte etwa gleichhäufig gefunden werden konnten.

### 1.3. Lange nichtkodierende RNA und deren mögliche Funktionen

Es zeichnet sich ab, dass vor allem in phylogenetisch höher entwickelten Lebewesen - wie dem Menschen - eine RNA-involvierende Genregulation ausgeprägt ist. Verschiedene Mechanismen kommen dafür in Betracht, wobei diese bisher nur für einen geringen Anteil der bekannten lncRNAs nachgewiesen wurden. Die Funktion des größeren Anteils der lncRNAs ist noch nicht hinreichend untersucht. Grundsätzlich konnten Interaktionen von lncRNA mit DNA, RNA und Proteinen nachgewiesen werden. Demzufolge können sie mehrere Stufen der Genexpression beeinflussen (Mattick, 2001). Vermutlich regulieren nichtkodierende RNAs die Expression von Genen über einen sequenziellen oder kombinatorischen Kode. Sie unterstützen damit eine gewebespezifische Genexpression und stellen ein Werkzeug der Epigenetik dar (Maass, 2014).

#### 1.3.1. Einfluss von lncRNA auf epigenetische Modifikationen

Die Epigenetik befasst sich mit Einflussfaktoren auf die Genaktivität. Ob und in welcher Intensität ein Gen abgelesen wird, wird dabei über die Schaffung struktureller Voraussetzungen für die Transkription reguliert. Dabei dienen Strukturveränderungen wie Histon- und Chromatinmodifizierungen (z.B. DNA-Methylierungen) als Werkzeug der epigenetischen Genregulation. Während diese Mechanismen Einfluss auf die Zellentwicklung und damit Auswirkungen auf den Phänotyp haben, bleibt die DNA-Sequenz unbeeinflusst. Zunehmend wird den lncRNAs eine Bedeutung für die Epigenetik beigemessen. Sie können durch ihre Protein-bindende Eigenschaft zum Beispiel als eine Art "molekulares Stützgerüst" fungieren. Dies ermöglicht die Verbindung von Proteinen und Proteinkomplexen, wodurch beispielsweise Histonmodifizierungen erfolgen ("*scaffold*") (Rinn und Chang, 2012).

lncRNA ist auch am Zustandekommen so genannter Chromatinschleifen beteiligt. Dabei werden Regulatorproteine und Promotoreregionen in physikalische Nähe gebracht, was eine quantitative Beeinflussung der Genexpression ermöglicht. Es werden Verbindungen zwischen chromatinmodifizierenden Proteinen, Histonmodifikationen, Koaktivatoren oder Repressoren und Transkriptionsfaktoren hergestellt (Maass, 2014).

Ein bedeutender Teil der epigenetischen Modifikation ist die genomische Prägung – das *Genomic Imprinting*. Über das Imprinting wird reguliert, ob das mütterliche oder das väterliche Allel eines Gens exprimiert wird. Einige lncRNAs sind an dieser Prägung maßgeblich beteiligt. Ein prominentes Beispiel ist die lncRNA Xist (*X inactive specific transcript*), welche für die Inaktivierung eines X-Chromosoms durch Histonmethylierung in eukaryotischen Zellen verantwortlich ist (Rinn und Chang, 2012).



### 1.3.2. Einfluss von lncRNA auf Transkription und Transkriptionsrate

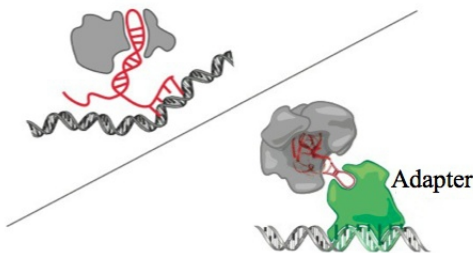
Für die Regulation der Transkription in eukaryotischen Zellen sind ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren erforderlich. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, welche durch Bindung an den Promotor eines Gens dessen Transkription initiieren (Aktivator) oder hemmen (Repressor) können. Ob ein Transkriptionsfaktor als Aktivator oder Repressor wirkt, hängt von dessen Bindungsaffinität zur RNA-Polymerase II ab. Aktivatoren fördern die RNA-Polymerase II – Bindung, Repressoren hemmen diese. LncRNA kann Transkriptionsfaktoren binden und sie von ihrem Wirkort (Promotor) fernhalten ("*decoy*"). Umgekehrt ist es möglich, dass Regulatorproteine, wie z.B. chromatinmodifizierende Proteine, durch lncRNAs an ihren Wirkort rekrutiert werden ("*guide*") und dadurch die Transkription bestimmter Gene begünstigen. (Mattick und Gagen, 2001) Weiterhin wurden lncRNAs gefunden, die durch direkte Bindung der RNA-Polymerase II deren Aktivität und damit die Bildung der mRNA beeinflussen (Geisler und Collier, 2013; Mariner et al., 2013). Lange nichtkodierende RNAs können sich auch in die Struktur eines DNA-Abschnittes durch Bildung von Purin-Purin-Pyrimidin-Verbindungen einfügen und damit eine lncRNA-DNA-Triplex-Struktur bilden. Über diesen Mechanismus kann die Anlagerung des Initiationskomplexes verhindert werden und die Transkription findet nicht statt (Martianov et al., 2007).

Desweiteren ist die Interaktion von lncRNAs mit Enhancerelementen beschrieben. Dabei handelt es sich um Sequenzen, welche in Verbindung mit Transkriptionsfaktoren die Transkriptionsrate entsprechender Gene um ein Vielfaches erhöhen können. LncRNAs können ein Bindeglied zwischen entsprechenden Enhancersequenzen und Transkriptionsfaktoren darstellen und damit die Transkription des jeweiligen Gens steigern. Die Abschnitte der Enhancerelemente können sowohl intra- als auch interchromosomal lokalisiert sein (Maass, 2014).

### Weglocken von Transkriptionsfaktoren    Ausbildung eines molekularen Stützgerüsts



### Rekrutierung von Regulatorproteinen



### Verbindung zu Verstärkersequenzen

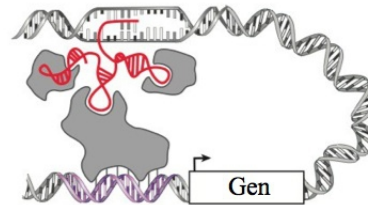


Abb. 3: *LncRNA* kann durch Bindung an regulatorisch wirkende Proteine deren Lokalisation und Aktivität beeinflussen (modifiziert nach Rinn und Chang, 2012).

### 1.3.3. Einfluss von *lncRNA* auf die posttranskriptionelle Genregulation

Nach der Transkription wird die prä-mRNA eukaryotischer Zellen modifiziert. Diese Modifizierung beinhaltet die Polyadenylierung, das so genannte *Capping* und das Spleißen der prä-mRNA. Da *lncRNAs* an komplementäre Sequenzen binden können, ist ihnen eine hochspezifische Regulation der posttranskriptionellen Modifikation – der Prozessierung – möglich. Es konnten *lncRNAs* gefunden werden, welche die Prozessierung von prä-mRNAs zu mRNAs beeinflussen können. Beispielsweise können *lncRNAs* mit Gegenstrang-Sequenz (*antisense*) direkt an komplementäre prä-mRNAs binden und deren Prozessierung verhindern. Möglicherweise geschieht dies über die Verdeckung der Spleißstelle und somit der Blockade der Spleißosomen-Anlagerung (Munroe und Mitchell, 1991; Geisler und Coller, 2013).

Die Interaktion langer nichtkodierender RNA mit *microRNAs* stellt einen weiteren Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation dar. *MicroRNAs* sind kurze nichtkodierende Transkripte, welche an komplementäre Regionen (z.B. in der 3'-UTR) von mRNAs binden. Je nachdem, ob eine *microRNA* partiell oder vollständig komplementär zur Zielsequenz ist, wird entweder die Translation des Zieltranskripts gehemmt (partielle Komplementarität) oder das Zieltranskript wird abgebaut (vollständige Komplementarität) (Wienholds und Plasterk, 2005). Bindet eine *lncRNA* an eine komplementäre *microRNA*, ist diese *microRNA* nicht mehr in der Lage, an das entsprechende Ziel-Transkript zu binden und

damit dessen Translation zu beeinflussen. Die lncRNA fungiert dabei als eine Art "Schwamm", welcher durch Bindung von microRNAs eine Enthemmung – Disinhibition – des entsprechenden Zieltranskripts vornimmt. Diesen Mechanismus bezeichnet man auch als *Competing Endogenous RNA* – Hypothese (kurz: ceRNA-Hypothese) (Pilyugin und Irminger-Finger, 2014).

#### **1.4. Lange nichtkodierende RNA und ihre Bedeutung in pathophysiologischen Vorgängen der malignen Zellentartung**

Unter Berücksichtigung der zahlreichen möglichen Wirk- und Regulationsmechanismen von lncRNAs in allen Stufen der Genexpression erscheint es plausibel, dass Fehlsteuerungen dieser nichtkodierenden Transkripte Bedeutung für verschiedene pathophysiologische Vorgänge haben. Das Interesse an diesen Mechanismen ist nichtzuletzt durch die potenziellen Möglichkeiten, welche sich für Diagnostik und Therapie in der Praxis ergeben könnten, begründet.

Fehlregulationen im Genom, verursacht durch eine Anhäufung genetischer Veränderungen, treten unter anderem bei Krebserkrankungen auf. Hier ist die Homöostase der Zellen geschädigt. Es besteht ein Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum (Proliferation) und Zelltod (Apoptose) zugunsten des Zellwachstums. Zusätzlich treten häufig Fehlregulationen der Zelldifferenzierung auf. Das Spektrum an Folgen reicht von relativ harmlosen Wucherungen (entsprechen benignen Tumoren) bis hin zu Krebsgeschwulsten (entsprechen malignen Tumoren) (Petrides, 2007). Tumore, die von Epithelzellen ausgehen, sind Karzinome und Tumore, welche mesenchymaler Herkunft sind, werden als Sarkome bezeichnet.

Die Gene, die für die Tumorentstehung verantwortlich sind, werden in Onkogene und Anti-Onkogene eingeteilt. Onkogene entstehen durch Mutationen in Genen, die das Zellwachstum, die Zellteilung und die Differenzierung von Zellen regulieren. Ihre Vorstufen werden als Protoonkogene bezeichnet. Anti-Onkogene oder Tumorsuppressorgene wirken im unveränderten Zustand der Tumorentstehung entgegen. Mutiert ein Anti-Onkogen, so wird eine Tumorentstehung begünstigt. Sowohl Onkogene als auch Anti-Onkogene können in ihrer Expression, Aktivität und Wirkung durch bestimmte lncRNAs reguliert werden. Im Folgenden sind einige Beispiele aufgeführt, in denen eine Assoziation zwischen Tumoren und lncRNAs nachgewiesen wurde.

- PTENP1: Wie schon bei den posttranskriptionellen Funktionen beschrieben, können lncRNAs microRNAs (alt. miRNA) binden und damit die Translation beeinflussen, was zur Entthemmung anderer Gene führen kann. Die lncRNA PTENP1 z.B. reguliert über diesen Mechanismus das Tumorsuppressorgen PTEN. In vielen menschlichen Tumoren fehlt diese lncRNA. Durch deren Fehlen wird das Transkript des Tumorsuppressorgens verstärkt von microRNAs gebunden und damit die Translation gehemmt, was die Tumorentstehung begünstigt (Poliseno et al., 2010).

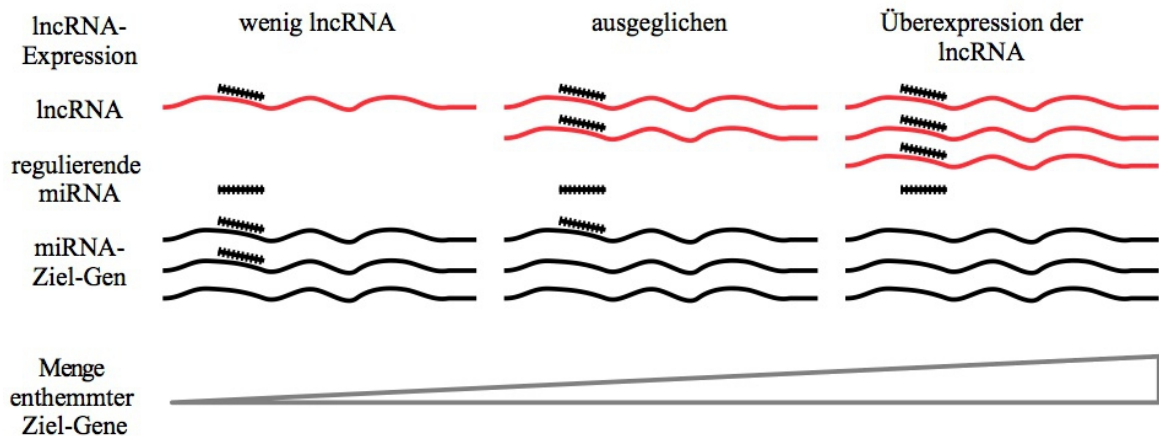


Abb. 4: lncRNA PTENP1 konkurriert mit dem Tumorsuppressor PTEN um microRNA-Bindestellen (Grafik modifiziert nach Cheetham et al., 2013; Poliseno et al., 2010),

- TERRA: Bis auf Stammzellen, Zellen des Knochenmarks, Keimzellen und einigen Immunzellen erreichen die meisten eukaryotischen Zellen nach einer gewissen Anzahl von Teilungen eine Ruhephase. In dieser Phase haben die Telomere eine kritische Länge erreicht, sodass keine weitere Replikation mehr möglich ist. Der Zelltod oder der permanente Wachstumsstopp sind die Folge. Denn in den meisten Zellen ist die Telomerase gehemmt bzw. gar nicht nachweisbar. Dieses Enzym sorgt z.B. in Stammzellen für die Wiederherstellung der Telomere. Die lncRNA TERRA bindet das Enzym Telomerase und ist somit an dessen Hemmung beteiligt. In vielen Krebszellen ist TERRA verringert exprimiert, was zur Entthemmung der Telomerase führt und so möglicherweise die Langlebigkeit von Tumorzellen mitbedingt (Cheetham et al., 2013; Redon et al., 2010).

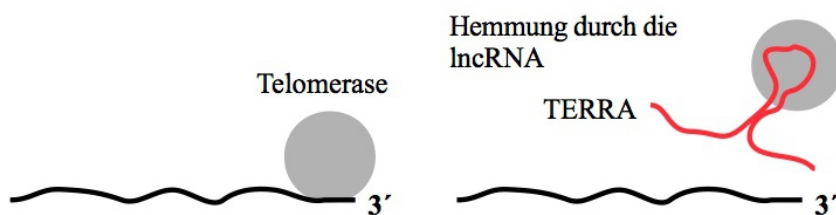


Abb. 5: lncRNA TERRA inhibiert Telomerase durch direkte Bindung (Grafik modifiziert nach Cheetham et al., 2013).

Bei MALAT 1 handelt es sich um eine lncRNA, welche in verschiedenen Tumoren in erhöhter Konzentration vorliegt. MALAT 1 kann die Verteilung und den Gehalt von aktiven Serin/Arginin – Spleißfaktoren beeinflussen und ist somit ein Regulator des alternativen Spleißens. Hierdurch wird die Aktivität einiger Gene auf einer posttranskriptionellen Ebene beeinflusst, was im Falle einer erhöhten MALAT 1 – Expression vor allem die Zellmotilität und das Zellwachstum fördert. Eine erhöhte Expression der lncRNA MALAT 1 in Malignomen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Schmidt et al., 2011; Tripathi et al., 2010).

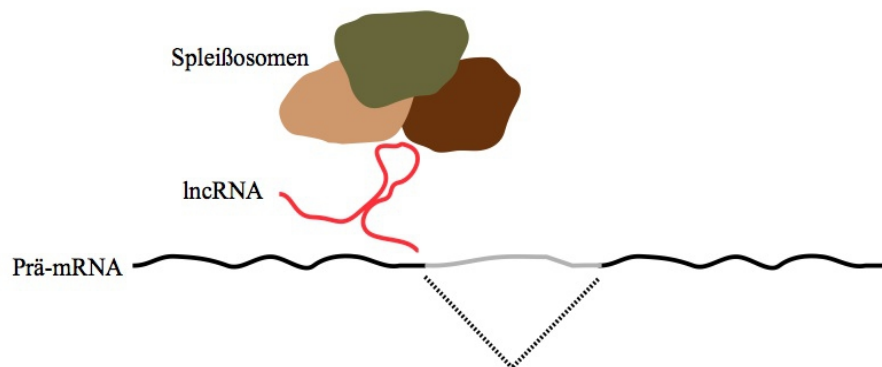


Abb. 6: lncRNA MALAT 1 bindet am Serin/Arginin Spleißfaktor und reguliert somit das alternative Spleißen (Grafik modifiziert nach Cheetham et al., 2013).

Die lncRNA H19 ist vor allem in Magenkarzinomen verstärkt exprimiert. Ihr erhöhtes Vorliegen fördert, vermutlich über die Bindung von Transkriptionsfaktoren, das Zellwachstum und bewirkt eine verringerte Apoptoserate der Tumorzellen (Yang et al., 2012).

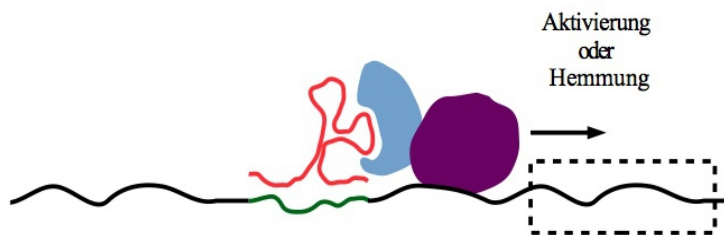


Abb. 7: lncRNA H19 bindet Transkriptionsfaktoren und reguliert so die Expression einiger Gene (Grafik modifiziert nach Cheetham et al., 2013).

### 1.5. WISP1-OT2 – eine neue lange nichtkodierende RNA

Bei WISP1-OT2 handelt es sich um ein 2922 Nukleotide umfassendes Transkript (Hennemeier, 2014). Da es nicht proteinkodierend ist und mehr als 200 Nukleotide enthält, zählt es definitionsgemäß zur Gruppe der langen nichtkodierenden RNAs (Kapranov, 2007; Dinger, 2008). Es ist auf Chromosom 8 im Sequenzabschnitt des Introns 4 und Exons 5 des WISP1-Gens lokalisiert (Abb. 8). Aufgrund der Lokalisation innerhalb eines kodierenden Gens, gehört diese lncRNA zur Gruppe der überlappenden Transkripte. Der Name setzt sich aus dem proteinkodierenden Gen und dem Suffix OT (*overlapping transcript*) zusammen. Da bereits eine lange nichtkodierende RNA innerhalb des Sequenzabschnitts von WISP1 postuliert wurde, und das hier beschriebene Transkript erst später benannt wurde, erhielt es den Namen WISP1-OT2 (abgeleitet aus Nomenklatur von Wright, 2014). Ein deutlich gesteigertes Vorkommen von WISP1-OT2 wurde in humanen primären proximalen Tubuluszellen (RPTEC) sowie in anderen renalen humanen Zellen (HEK-293T-Zellen, HK2-Zellen) nach Exposition zu Ochratoxin A (OTA) nachgewiesen. In nicht mit OTA inkubierten Zellen ist WISP1-OT2 praktisch nicht nachweisbar. Reguliert wird die Expression über den MEK/ERK-Signalweg über einen eigenen Promotor und nicht wie das reguläre Vollängen-Transkript über den Wnt-Signalweg. Die Anreicherung von WISP1-OT2 erfolgt vorwiegend nukleär, was für die meisten bekannten lncRNAs charakteristisch ist (Hennemeier, 2014; Derrien et al., 2012).

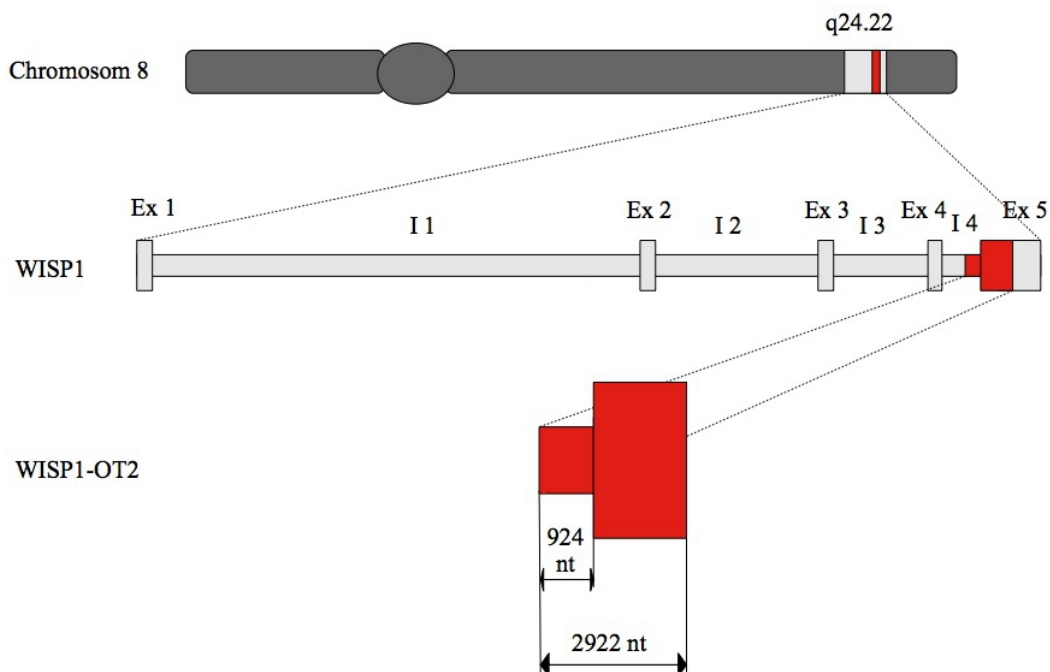


Abb. 8: Lokalisation von WISP1-OT2 (hier rot), Chromosom 8 q24.22

### 1.6. Das Gen WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP1)

Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende lncRNA WISP1-OT2 ist innerhalb des Sequenzabschnittes des WISP1-Gens zu finden. Das WISP1-Gen als solches ist ein Mitglied der CCN-Familie und gehört zur Gruppe der Bindegewebsfaktoren (CTGF). Diverse Entwicklungsprozesse werden durch WISP1 vermittelt. Hauptsächlich wird WISP1 während der Organentwicklung, insbesondere im Knochen und in der Lunge, und während einiger pathophysiologischer Vorgänge, wie Fibrose oder Krebserkrankungen exprimiert. Es wird üblicherweise über den WNT1 – Signalweg reguliert (Berschneider und Königshoff, 2011). Derzeit sind fünf Spleißvarianten von WISP1 bekannt. Vier davon sind für Proteine kodierend. Im adulten menschlichen Gewebe kann die WISP1-mRNA in verschiedenen Organen detektiert werden. Dazu gehören das Herz, die Nieren, die Lungen, das Pankreas, die Plazenta, die Ovarien, der Dünndarm und die Milz. Nur geringe oder keine Expressionen dieses Transkripts lassen sich im Gehirn, in der Leber, der Skelettmuskulatur, dem Dickdarm, den Leukozyten im peripheren Blut, der Prostata, dem Hoden, der Brust und dem Thymus finden. Hohe Expression der WISP1-mRNA fanden sich in Kolonkarzinomen (Pennica et al., 1998). Allerdings ist vorstellbar, dass die WISP1-OT2-lncRNA in keinem funktionellen Zusammenhang mit dem Wirtsgen ("hostgene") steht. In der vorliegenden Arbeit sollte WISP1-OT2 auf seine Funktionen, u.a. den Einfluss auf die Genexpression untersucht werden.

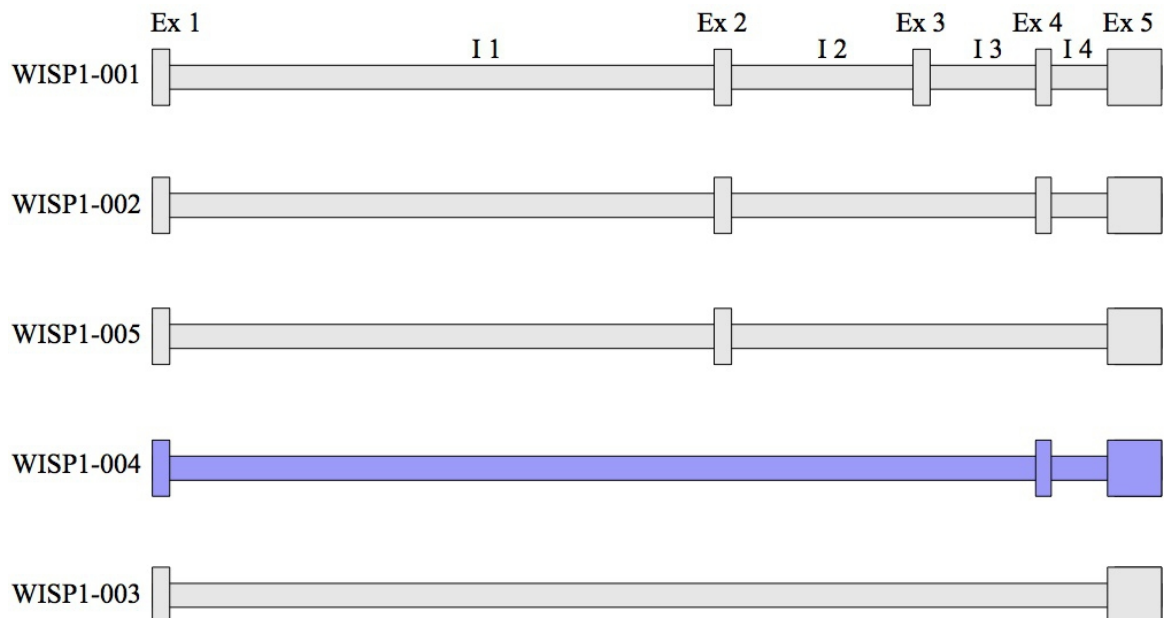


Abb. 9: WISP1-Gen und Spleißvarianten, bis auf Variante WISP1-004 sind alle für Proteine kodierend (Abb. nach Ensembl, letzter Abruf: 25.08.2016).

### **1.7. Genexpressionsanalyse zur Zuordnung physiologischer und pathophysiologischer Funktionen von WISP1-OT2**

Um die Bedeutung einer langen nichtkodierenden RNA für physiologische und pathophysiologische Prozesse zu ermitteln, kann deren Einfluss auf die Genregulation untersucht werden. Die zu untersuchenden Gene sind in ihrem speziellen funktionellen Kontext zu betrachten. Im Falle von WISP1-OT2 wurde auf der Basis bereits vorliegender PCR-Array-Untersuchungen eine Auswahl einiger Gene getroffen, deren eventuelle WISP1-OT2-abhängige Expression genauer untersucht werden sollte. Deren Funktionen sind im Folgenden anhand von Datenbanken wie Genecards® und NCBI® (*National Center for Biotechnology Information*) etwas näher beschrieben:

#### **TNF**

Der Tumornekrosefaktor ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches die Akute-Phase-Proteine aktiviert. Er wird hauptsächlich von Makrophagen sezerniert und ist an einem weiten Spektrum biologischer Prozesse, wie der Zellproliferation und -differenzierung, der Apoptose, dem Fettstoffwechsel und der Koagulation beteiligt. Weiterhin ist er mitverantwortlich für das Auftreten von Sepsis, Kachexie und Autoimmunerkrankungen. (NCBI, TNF; Hehlgans und Pfeffer, 2005)

#### **COL1A1**

COL1A1 wird in den meisten Bindegeweben exprimiert. Es kodiert für das COL1A1-Protein, welches die Hauptkomponente von Kollagen 1 darstellt. Ein besonders hoher Gehalt dieses Proteins ist in Knochen, in der Kornea, der Dermis und in den Sehnen enthalten. COL1A1 ist aber auch mit einigen Krankheiten, wie dem Dermatofibrosarkom assoziiert. In Fibrosen ist die Expression von COL1A1 nach der epithelialen-mesenchymalen Transition stark erhöht. (GeneCards, COL1A1; Hesper et al.)

#### **COL3A1**

Dieses Gen kodiert die Pro-alpha1-Kette des Kollagen 3, ein fibrilläres Kollagen, welches in verschiedenen dehnbaren Bindegeweben vorkommt. Unter anderem ist es Bestandteil der Haut, der Lungen, des Unterus, des Darmes und des Gefäßsystems. Die Expression von COL3A1 ist in Fibrosen nach der epithelialen-mesenchymalen Transition erhöht. (GeneCards, COL3A1; Hesper et al., 2013)



### SERPINE1

SERPINE1 kodiert für ein Mitglied der Serinproteaseinhibitor-Gruppe. Die Proteine dieser Gruppe hemmen spezifisch und irreversibel Serinproteasen. SERPINE1 kodiert für das Protein PAI (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor). PAI ist der hauptsächliche Inhibitor des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (tPA) und der Urokinase und somit auch der Fibrinolyse. Hohe Konzentrationen von PAI werden mit Thrombophilie assoziiert. (GeneCards, SERPINE1)

### FOS

Die Proteine der FOS-Genfamilie enthalten Leucin-Zipper-Domänen. Über diese Domänen dimerisieren sie mit Proteinen der JUN-Familie zu Aktivator Protein-1 – Komplexen (AP-1). Über den Aktivator Protein-1 – Komplex ist eine sequenzspezifische Bindung von Enhancer- und Promotorregionen bestimmter Zielgene möglich. Über diese Bindung wird die Expression der Zielgene beeinflusst. FOS-Proteine sind also Regulatoren der Genexpression. Sie regulieren unter anderem die Zellproliferation, Differenzierung und Transformation. Weiterhin sind sie mit Apoptose assoziiert. Das Protein c-Fos liegt in Tumoren häufig hoch exprimiert vor. (Chiu, 1988; Milde-Langosch, 2005; GeneCards, FOS)

### TGFβ

Bei TGFβ handelt es sich um ein Zytokin, welches an der Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Adhäsion, Migration und anderen vielfältigen Prozessen beteiligt ist. Seine Wirkung entfaltet TGFβ über einen membranständigen Rezeptor mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität. In Fibrosen induziert TGFβ die epitheliale-mesenchymale Transition mit. (GeneCards, TGFB1)

### MMP

Matrix-Metalloproteasen sind Endopeptidasen, die dem Abbau extrazellulärer Matrix dienen. Sie sind damit Teil physiologischer Prozesse, wie der Embryonalentwicklung, der Reproduktion, dem Umbau von Gewebe. Aber auch an pathophysiologischen Vorgängen, wie der Metastasierung von Tumorzellen und Arthritis sind sie beteiligt. Das Gen MMP1 kodiert für ein Enzym, welches die interstitiellen Kollagene vom Typ I, II und III abbaut. In einigen Tumorgeweben wurde eine Überexpression von MMP1 beobachtet (Sauter et al., 2008). Das Protein MMP13 spaltet bevorzugt das Kollagen vom Typ II und in etwas geringerem Ausmaß auch die Kollagene vom Typ I und III. Es gibt Hinweise darauf, dass es am Knorpelumbau und

an Osteoarthritis mitbeteiligt ist. Es konnte eine Bedeutung von MMP13 in der Angiogenese von Tumorzellen nachgewiesen werden. (GeneCards, MMP13; Kudo et al., 2012)

#### HRAS

HRAS ist ein Gen der RAS-Onkogene, welches für eine GTPase kodiert. Es unterliegt einem permanenten Zyklus von De- und Repalmitolierungen, was seinen schnellen Wechsel zwischen der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat reguliert. Defekte dieses Gens sind mit dem Vorliegen einer Vielzahl von Krebserkrankungen assoziiert. (GeneCards, HRAS)

#### MGMT

Das MGMT Gen kodiert für ein Protein mit einer zellulären Schutzfunktion gegen biologische Effekte von O6-Methylguaninen in der DNA. Es macht DNA-Schädigungen durch Alkylierungen an der O6-Position des Guaninrestes rückgängig und ist somit an der DNA-Reparatur beteiligt. (GeneCards, MGMT)

#### MLH1

MLH1 ist ein Gen, welches in hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinomen häufig mutiert vorliegt. Das menschliche MLH1 bildet eine Homologie zum Reparaturgen mutL, welches in Ecoli DNA-Fehlpaarungen entgegenwirkt. (GeneCards, MLH1)

#### STK11

STK11 kodiert für eine Serin-/Threoninkinase, welche die Zellpolarität reguliert und als Tumorsupressor wirkt. Mutationen in diesem Gen sind mit dem Peutz-Jeghers-Syndrom assoziiert. (GeneCards, STK11)

#### AGT1

AGT1 ist ein weit verbreitetes DNA-Reparaturgen, welches die DNA vor endogenen und exogenen Alkylierungsschäden bewahrt. (Kanugula und Pegg, 2001)

#### CDKN2A (Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A)

Das Protein, für das CDKN2A kodiert, ist mit Krankheiten wie der Anthrakose (Kohlenstaublunge), Melanomen und Pankreaskarzinomen assoziiert. (GeneCards, CDKN2A)

### 1.8. Mögliche Pathomechanismen von WISP1-OT2

Die Expression von WISP1-OT2 wird durch das nierenschädigende Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) induziert (Hennemeier, 2014). Je nach Konzentration und Expositionsdauer führt diese Substanz zu einigen pathologischen Veränderungen von Zellen und Zellverbänden. Beispielsweise treten Entzündungsreaktionen, Fibrosen und Apoptosen auf. Weiterhin steigt nach chronischer Exposition das Risiko für maligne Zellentartungen. Im Falle von OTA gilt vor allem die Niere als Zielorgan der toxischen Wirkung (Gekle et al., 2005). Es stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Expression der lncRNA WISP1-OT2 und dem pathogenen Wirken dieses Toxins existiert. In diesem Fall bleibt zu klären, ob WISP1-OT2 der Pathogenität des Toxins entgegenwirkt oder Teil einer toxischen, evtl. kanzerogenen Signalkaskade ist.

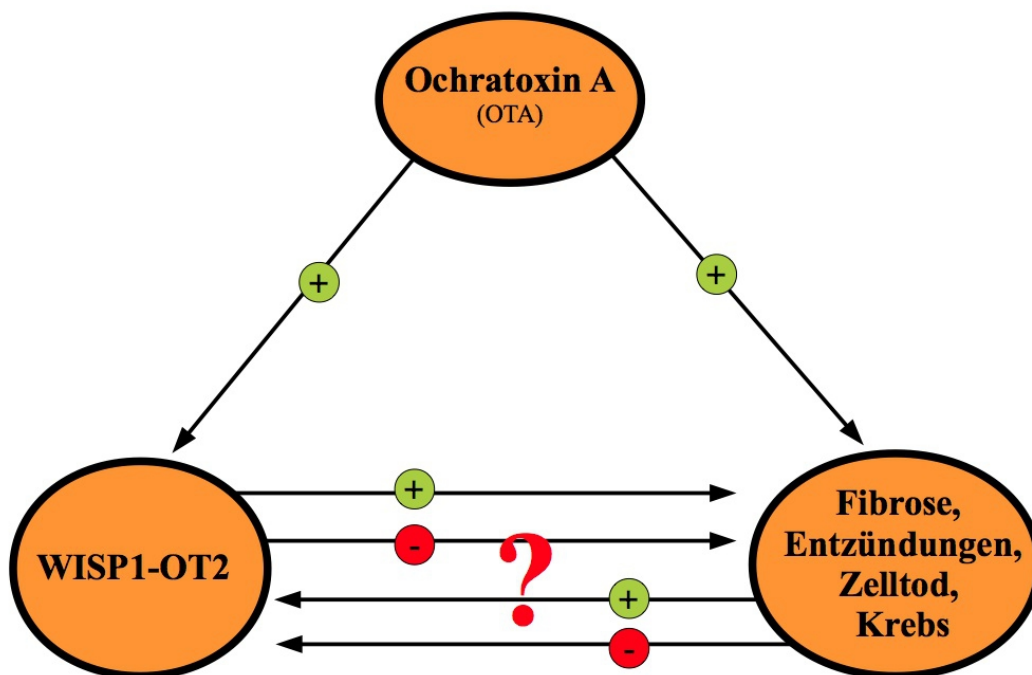


Abb. 10: Die Exposition gegenüber Ochratoxin A hat zum einen eine Expressionserhöhung der lncRNA WISP1-OT2 und zum anderen pathologische Veränderungen zur Folge. Unbekannt ist, ob es einen Zusammenhang zwischen beiden Folgen gibt.

### **1.8.1. Fibrose und WISP1-OT2**

Grundsätzlich ist denkbar, dass WISP1-OT2 den fibrotischen Umbau mit unterstützt oder dass die Fibrose zu einer gesteigerten Expression dieser lncRNA führt. Nach isolierter Überexpression dieser lncRNA wurden in PCR-Array-Untersuchungen einige mRNAs verändert exprimiert vorgefunden, deren Genprodukte im Pathomechanismus von Fibrosen eine Bedeutung haben. Dabei handelt es sich um die Gene TGF $\beta$ , MMP1, MMP13, COL1A1 und COL3A1.

Als Fibrose bezeichnet man im Allgemeinen einen bindegewebigen Umbau von Zellverbänden oder Organen. Ein Hauptbestandteil des Bindegewebes sind Kollagenfasern. Die betroffenen Zellverbände bzw. Organe verlieren ihre ursprüngliche Funktion und werden narbig verändert. Ein Mechanismus der Fibrose ist die epitheliale-mesenchymale Transition Typ II (EMT II). Während die EMT I ein physiologischer Mechanismus der Embryonalentwicklung ist, trägt die EMT II entscheidend zur Pathologie von Fibrosen bei. Hierbei verlieren Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften und ihre Zell-Zell-Kontakte lösen sich auf. Sie gehen in Mesenchymzellen über. Nach dieser Transition liegt vor allem die Kollagen 1 – Expression und in etwas geringerem Ausmaß auch die Kollagen 3 – Expression gesteigert vor (Hosper et al., 2013; Kalluri und Weinberg, 2009). Es wurde beobachtet, dass die Wirkung von Ochratoxin A den fibrotischen Umbau von Nierengewebe begünstigt. Beispielsweise in dem es die Sekretion verschiedener Kollagene erhöht (Sauvant et al., 2005; Gagliano et al., 2005). Daher stellt sich die Frage nach einem Zusammenhang zur WISP1-OT2-Expression. Wie in Abb. 10 dargestellt könnte eine Ursachen – Wirkungs – Beziehung bestehen.

### **1.8.2. Entzündungsvorgänge, Zelltod und WISP1-OT2**

Da die WISP1-OT2-Transkription durch Ochratoxin A induziert wird, ist denkbar, dass dieses Transkript Anteil am pathogenen Wirken des Toxins hat. Dabei wäre die Expression der mRNA des proinflammatorisch und proapoptotisch wirkenden Zytokins TNF $\alpha$  (kurz: TNF) verändert. Denn es wurde beschrieben, dass durch Ochratoxin A die Expression von TNF $\alpha$  in renalen proximalen Tubulusepithel-Zellen und HEK-293T-Zellen gesteigert und die proapoptotische Wirkung dieses Zytokins potenziert wird (Gekle et al., 2005; Hennemeier et al., 2012).

Weiterhin könnte die WISP1-OT2-RNA einen Einfluss auf den Zelltod haben. Dabei ist der nekrotische Zelluntergang vom kontrollierten, apoptotischen Zelltod zu unterscheiden. Bei erhöhter Apoptoserate kann eine verstärkte Aktivität einiger Enzyme, wie bspw. der Caspasen, gefunden werden. Im Falle von Nekrosen gelangen zytoplasmatische Enzyme (bspw. Lactatdehydrogenase) aus dem Zellinneren in die Extrazellulärmatrix und sind dort verstärkt nachweisbar.

### **1.8.3. Nierenzellkarzinome und WISP1-OT2**

Weiterhin ist es denkbar, dass WISP1-OT2, wie auch einige andere lncRNAs, eine Rolle in der Pathologie der Tumorentstehung spielt. Möglicherweise ist es involviert in der Auslösung der Zellentartung oder es ist ein Produkt der Zellentartung. Damit wäre es vorstellbar, dass WISP1-OT2 für die Diagnostik oder sogar Therapie maligner Tumoren von Bedeutung sein kann. Da das WISP1-OT2 induzierende OTA v.a. nephrotoxisch wirkt (Gekle, 2005), sind für die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Vorkommen von WISP1-OT2 und dem Auftreten von malignen Tumoren zunächst Nierenzellkarzinome von besonderem Interesse. Speziell in klarzelligen Nierenzellkarzinomen wurden bereits einige lncRNAs gefunden, die verändert exprimiert werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um potenzielle Biomarker (Blondeau et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Expression von WISP1-OT2 in Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu gesunden Nierenzellen ebenfalls verändert vorliegt. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über diese Tumorart gegeben werden.

Das Nierenzellkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor, welcher sowohl aus dem Tubulussystem der Niere als auch aus den Sammelrohren hervorgehen kann. Laut Lehrbuch (Nizze et al., 2004) ist es "in der Niere eines Erwachsenen der häufigste maligne Tumor." In Bezug auf die Gesamtheit aller malignen Tumoren ist das Nierenzellkarzinom mit einem Anteil von 1-3 % eher selten. Dabei lassen sich die häufigeren sporadischen Formen der Nierenkarzinome von den selteneren familiären Formen unterscheiden. Während sporadische Nierenkarzinome eher in einem relativ hohen Lebensalter (50-69. LJ) auftreten, werden familiäre Formen häufig bei jüngeren Menschen beobachtet (vor dem 40. LJ).

Ätiopathogenese:

Auch in der Pathogenese unterscheiden sich diese beiden Formen voneinander. Bei familiären Formen ist die Karzinomenstehung durch die Inaktivierung einzelner Tumorsuppressorgene bzw. die Aktivierung bestimmter Onkogene bedingt. Sporadische Nierenkarzinome wiederum treten durch komplexe genomische Veränderungen auf.

Pathologie:

Eine weitere Einteilung der Nierenkarzinome ist durch Berücksichtigung ihrer Zytoplasmamorphologie möglich. Sie werden in klarzellige, chromophile (papilläre) und chromophobe Tumoren, sowie Sammelrohrkarzinome unterteilt.

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit einem Anteil von über 80 % der häufigste Nierenkarzinomtyp (Nizze et al., 2004).

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, das Transkript WISP1-OT2 in seiner Funktion in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zu charakterisieren. Zunächst sollte die Expression von WISP1-OT2 in Abhängigkeit von der Menge eines Plasmids, das zur Überexpression von WISP1-OT2 führt, in HEK-293T-Zellen untersucht werden. Anhand der damit ermittelten optimalen Plasmidmenge sollte dann der Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf die Genexpression in HEK-293T-Zellen mittels *Real-Time* PCR untersucht werden. Hierbei sollte vor allem die Expression der Gene überprüft werden, die in vorangegangenen PCR-Arrays eine geänderte Expression als Reaktion einer Überexpression von WISP1-OT2 gezeigt hatten. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die WISP1-OT2- exprimierenden Zellen eine veränderte Apoptose-Neigung bzw. Nekroserate aufweisen.

Mittels ELISA-Untersuchungen sollte der Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression in den HEK-293T-Zellen auf den Kollagen-Gehalt im Medium als Maß für eventuelle Fibrose überprüft werden.

Da von einigen lncRNAs bekannt ist, dass ihre Expression mit dem Vorliegen von Zellentartungen assoziiert ist, sollte auch mittels *Real-Time* und *Droplet Digital* PCR das Vorkommen von WISP1-OT2 in Tumorzellen untersucht werden. Dazu standen 25 Zelllinien und 8 Gewebeproben, überwiegend von Nierenzellkarzinomen, zur Verfügung.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Tab. 3: Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & CoKG, Wangen
Brutschrank HERACell 150	Thermo Scientific, Waltham, USA
Elektrophoresekammer Compact XS/S	Biometra GmbH, Göttingen
Feinwaage FA 110-4i	Faust, Köln
Geldokumentationssystem BioDoc-It Imaging System	UVP, LLC, Upland, USA
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mehrkanalpipette Transferpette-8	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Mikroliterpipetten Research (diverse Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroplattenlesegeräte Sunrise Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Multipette plus mit Combitips (diverse Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Geräte: CFX96 Real-Time PCR Detection System UNO QX100 Droplet Digital PCR QX200 Droplet Generator QX200 Droplet Reader C.1000 Touch Thermal Cycler Thermocycler Tprofessional Thermocycler basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München  Biometra GmbH, Göttingen Biometra GmbH, Göttingen
PCR-Plattenzentrifuge PerfectSpin P	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Spektralphotometer NanoVue	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Sterile Werkbank BIOWIZARD Standard	KOJAIR TECH OY, Vilppula, Finland
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, Darmstadt
Tissuelyser LT	Qiagen, Hilden
Vortexer MS2 Schüttler Vortex-Genie 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Waage BL 1500 S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad GFL 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel



Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Vertrieb
24-well Platten BD PureCoat amine	BD Bioscience, Heidelberg
Mikrotiterplatten Mikrottestplatten 96-well, F-Form F96 Maxisorp NuncImmunoPlate Multiplate PCR Plates Low 96-well white	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg Nunc A/S, Roskilde, Dänemark Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße 1,5 ml Standard 2 ml, 0,5 ml, 0,2 ml Standard 0,5 ml, 1,5 ml Safe Lock	Sarstedt, Nürnberg A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg Eppendorf AG, Hamburg
Sterilfilter Minisart	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Versiegelungsfolie PCR Sealers Microseal ,B'Film	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkulturschalen BD Falcon Easy Grip (100 mm; 35 mm)	BD Biosciences, Heidelberg

Tab. 5: Chemikalien und Enzyme 1/2

Chemikalien und Enzyme	Hersteller/Vertrieb
Agarose peqGold Universal Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
7-Amino-4-trifluoromethylcumarin (AFC)	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin Albumin (BSA) bovine Frac-tion V pH 7,0	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
3-[ (3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-Propansulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate dNTP-Set dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100 nmol/l	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase I (2 U/µl)	New England Biolabs, Ipswich, USA
10 x -DNase-I-Reaktionspuffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EvaGreen Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Tab. 6: Chemikalien und Enzyme 2/2

Chemikalien und Enzyme	Hersteller/Vertrieb
Fetales Kälberserum FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Lysis-Solution	STRATEC Molecular GmbH, Berlin
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
o-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce BCA Protein Assay Reagent A	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Piperazin N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Random Primer (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Reinstwasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNAseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Schwefelsäure 99,99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SYBR-Green Supermix	Qiagen, Hilden
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	Qiagen, Hilden
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin (14000 U/mg Protein)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/Ham's F12)	Biochrom AG, Berlin

### 3.2. Zellkulturen

#### 3.2.1. Verwendete Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK-293T-Zellen verwendet. HEK-293T-Zellen sind humane embryonale Nierenepithelzellen. Sie sind mit einem Antigen (Simian Virus 40 – large T) versehen, welches die Transfektion dieser Zellen erleichtert.

Tab. 7: verwendete Zellkultur

Name	Bezeichnung	Herkunft	Kultivierung
HEK-293T-Zellen	Humane ebryonale Nierenzellen	ATCC, Manassas, USA	DMEM/Ham's F-12 Medium + 10% FCS

#### 3.2.2. Kultivierung der HEK-293T-Zellen

Die Zellen wurden in Petrischalen ( $\varnothing = 10$  cm und  $\varnothing = 3,5$  cm) oder in 24-well-Platten ( $\varnothing = 1,6$  cm / Kavität) angesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank unter standardisierten Bedingungen ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 90 % relative Luftfeuchte). Alle Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Als Nährmedium diente DMEM/Ham's (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), dem 10% fetales Kälberserum (FCS) zugefügt wurden. Der Mediumwechsel erfolgte nach zwei bis drei Tagen. Bevor das Medium auf die Zellen gegeben wurde, wurde es auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Da die Zelldichte nach einer Woche in serumreichem Medium sehr hoch war, wurden die Zellkulturen einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und EDTA-Lösung auf die Zellkulturen gegeben (6 ml in Petrischale  $\varnothing = 10$  cm). Diese destabilisierte die Zell-Zellkontakte. Zum vollständigen Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde nach dem Absaugen der EDTA-Lösung Trypsin-Lösung (Konz. = 0,1 %) auf die Zellen gegeben (0,5 ml in Petrischale  $\varnothing = 10$  cm). Nach maximal 3-minütiger Einwirkzeit des Trypsins wurde dessen Wirkung durch Zugabe von serumreichem Medium gestoppt und die Zellen dadurch resuspendiert. Anschließend wurde im Verhältnis 1 : 15 – 1 : 20 in eine neue Kulturschale passagiert (0,5 ml Zellsuspension auf 10 ml Medium in Petrischale  $\varnothing = 10$  cm, 2 Tropfen Zellsuspension auf 3 ml Medium in Petrischale  $\varnothing = 3,5$  cm, 1 Tropfen Zellsuspension auf 7 Tropfen Medium in Kavität  $\varnothing = 1,6$  cm). Für die Versuche wurden die Passagen 11 – 43 verwendet.

Tab. 8: Zusammensetzung verwendeter Reagenzien

EDTA-Puffer:	Trypsin-Lösung:
Natriumchlorid 137 mM	Natriumchlorid 137 mM
Kaliumchlorid 2,7 mM	Kaliumchlorid 2,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 6,5 mM	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 6,5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat 1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat 1,5 mM
EDTA 0,54 mM	EDTA 0,54 mM
	Trypsin 0,1 %

### 3.2.3. Transfektion der Zellen

Bei der Transfektion wird Fremd - DNA in eine lebende Zelle eingebracht. Dafür werden Plasmide als Vektoren verwendet. Die Transfektion erfolgte entweder in einer Mikrotiterplatte (24 Kavitäten, eine Kavität  $\varnothing = 1,6$  cm) oder in einer kleinen Petrischale ( $\varnothing = 3,5$  cm). Die verwendeten Plasmide waren pcDNA3.1 (Invitrogen) als Leervektor und das WISP1-OT2-Plasmid (zur Verfügung gestellt von I. Hennemeier) für die Überexpression des WISP1-OT2-Genabschnitts. Um die entsprechende Transfektions-Konzentration des jeweiligen Plasmids zu erreichen, wurde die benötigte Plasmidmenge errechnet und mit serumfreiem Medium auf 10  $\mu$ l / Kavität einer Mikrotiterplatte oder auf 50  $\mu$ l / Petrischale ( $\varnothing = 3,5$  cm) aufgefüllt. Dem Ansatz wurde das Transfektionsreagenz Polyfect (Qiagen) mit 1,5  $\mu$ l (Mikrotiterplatte, eine Kavität  $\varnothing = 1,6$  cm) bzw. 10  $\mu$ l (kleine Petrischale,  $\varnothing = 3,5$  cm) hinzugefügt, welches die Aufnahme der Plasmide in die Zellen erleichtern sollte. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das serumreiche Medium von den Zellen abgesaugt und 250  $\mu$ l (je Kavität einer Mikrotiterplatte) bzw. 1,5 ml (je Petrischale) serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurden dem Ansatz 100  $\mu$ l (je Kavität einer Mikrotiterplatte) bzw. 450  $\mu$ l (kleine Petrischale,  $\varnothing = 3,5$  cm) serumfreies Medium hinzugegeben. Nach mehrmaligem Mischen wurde der Ansatz zur Inkubation auf die Zellen gegeben und 24 oder 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

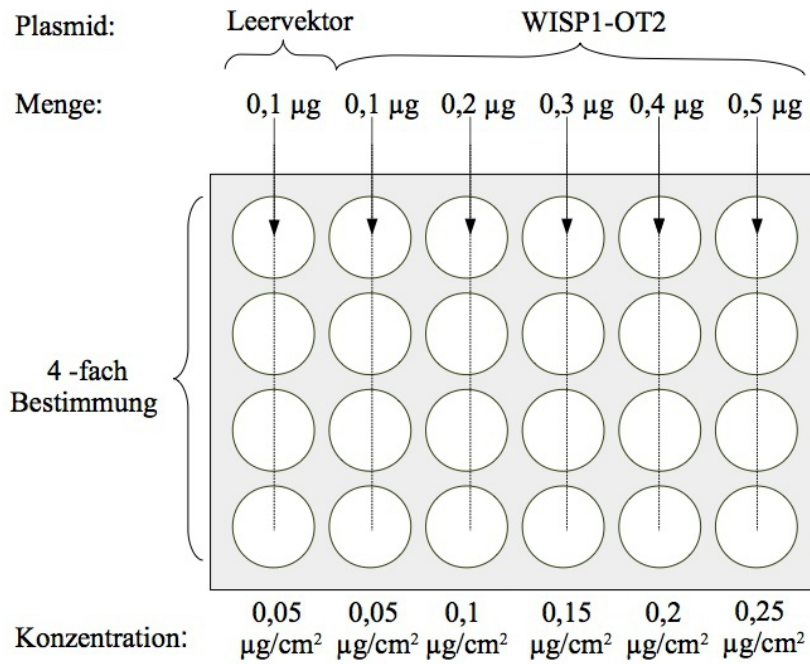


Abb. 11: Transfektion in Mikrotiterplatte ( $\varnothing = 1,6 \text{ cm}$ ; Fläche =  $2 \text{ cm}^2$  je Kavität) für die Erstellung einer Konzentrationsreihe (48 h Inkubation) und für proteinbiochemische Verfahren (Plasmidkonzentration =  $0,1 \text{ µg/cm}^2$ )

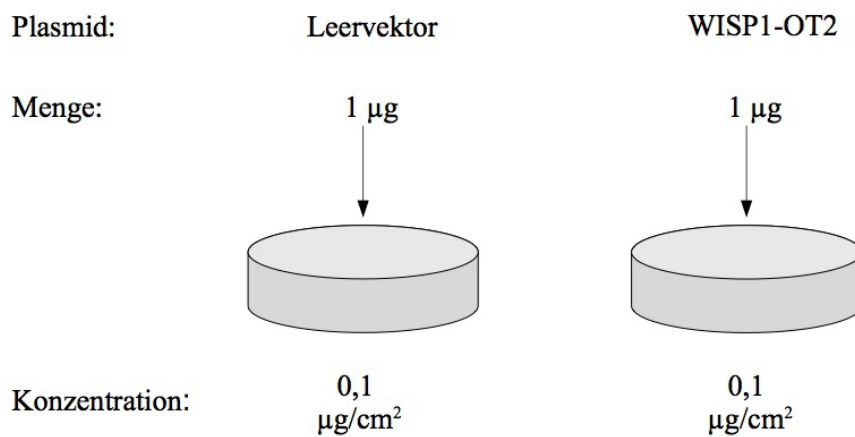


Abb. 12: Transfektion in kleiner Petrischale ( $\varnothing = 3,5 \text{ cm}$ ; Fläche =  $9,6 \text{ cm}^2$ ) für Genexpressionsanalyse und proteinbiochemische Bestimmungen

### **3.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1. RNA-Isolation**

Die Isolation von Ribonukleinsäuren erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem InviTrap® Spin Tissue RNA-Minikit der Firma STRATEC zum einen aus Zellkulturen und zum anderen aus Zellgewebe. Die ersten Schritte der RNA-Isolation sind im Folgenden für Zellkultur und -gewebe separat beschrieben, da sie sich etwas voneinander unterscheiden.

##### RNA-Isolation aus Zellkulturen:

Nach der Transfektion (in den Überexpressionsversuchen) wurden die Zellen (HEK-293T-Zellen) je 24 oder 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit TR Lysis-Solution / 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (150  $\mu$ l / Kavität,  $\emptyset$  = 1,6 cm; 600  $\mu$ l / kleine Petrischale,  $\emptyset$  = 3,5 cm). Nach 5 Minuten Inkubation mit dem Lysepuffer wurden die Lysate in ein Reaktionsgefäß (Eppendorfgefäß, V = 2 ml) gegeben. Anschließend wurden die Lysate eine Minute mittels Vortexmischer durchmischt und dann zwei Minuten bei 13.000 rpm / 16.200 g zentrifugiert. Danach wurde der gesamte Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß (V = 2 ml) überführt. Mit dem Überstand wurde dann wie im übernächsten Absatz beschrieben verfahren.

##### RNA-Isolation aus Gewebeproben:

Zunächst wurde ein Stück vom Gewebe (maximal 20 mg) abgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß (Eppendorfgefäß, V = 2 ml) gegeben. Danach wurden zwei Stahlkugeln (Durchmesser = 5 mm, der Firma Qiagen) hinzugegeben und die Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff gelegt. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen. Dazu wurden die Reaktionsgefäße aus dem Stickstoff genommen und mit 600  $\mu$ l TR Lysis-Solution / 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Danach wurden die Proben in den *Tissuelyser LT* (Firma: Qiagen) gestellt und für fünf Minuten bei 50 Hz geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm / 16.200 g für zwei Minuten. Danach wurden 500  $\mu$ l des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorfgefäß, V = 2 ml) überführt und daraus die RNA wie im nächsten Absatz beschrieben gewonnen.

Die bei den RNA-Isolationen aus Zellkulturen und -gewebe entstandenen Sedimente wurden verworfen. Zu dem Überstand wurde Ethanol (96-100 %, 330  $\mu$ l bei den Zellkulturen, 500  $\mu$ l bei den Gewebeproben) gegeben und durchmischt. Anschließend wurde das Gemisch in RTA-

Spin-Filter Reaktionsgefäße gegeben und eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute lang bei 10.500 rpm / 10.600 g zentrifugiert. Die Filtrate wurden verworfen und die Filter wieder in das Reaktionsgefäß eingesetzt. Als nächstes erfolgten drei Waschschritte. Dazu wurden zunächst 500 µl Waschpuffer R1 auf die Filter gegeben und anschließend erfolgte die Zentrifugation für eine Minute bei 10.500 rpm / 10.600 g. Das entstandene Filtrat wurde verworfen. Der zweite Waschschritt erfolgte unter Zugabe von 700 µl Waschpuffer R2 auf die Filter und einer erneuten Zentrifugation von (eine Minute, 10.500 rpm / 10.600 g ). Auch die hier entstandenen Filtrate wurden verworfen. Dieser zweite Waschschritt wurde noch einmal wiederholt und danach wurden die Filter wieder in die leeren Reaktionsgefäße eingesetzt. Hiernach fand eine weitere Zentrifugation über fünf Minuten bei 12.000 rpm / 13.800 g statt. Die Filter wurden in neue RNase-freie Elutionsgefäße gestellt. Um die RNA vom Filter zu lösen, wurden je Ansatz 30 µl Elution-Buffer auf die Filter gegeben. Der Elution-Buffer wurde zwei Minuten bei Raumtemperatur auf den Filtern inkubiert und anschließend wurde mittels einer einminütigen Zentrifugation bei 10.500 rpm / 10.600 g die RNA aus den Filtern in ein Reaktionsgefäß getrieben.

Nach der RNA-Isolation erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Nano Vue Spektralphotometer. Als Referenz wurde steriles Wasser verwendet.

Die RNA wurde bei – 80 °C gelagert.

### 3.3.2. Umschreibung von RNA in cDNA

Nach der Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die gewonnene RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde dazu ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg RNA mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Den Proben wurden nun 1 µl 10 x DNase-Reaktionspuffer und 1 µl DNase I (New England Biolabs) zugefügt. Zur Durchführung des DNase-Verdau durchliefen die Ansätze folgendes Programm in einem Thermoblock:

- 10 Minuten bei 37°C,
- 10 Minuten bei 75°C.

Zu den Ansätzen wurden 4 µl steriles Wasser hinzugefügt und mit den Proben vermischt. Als nächstes wurden 4 µl aus den Ansätzen entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, so dass aus jeder Probe zwei Ansätze entstanden (10 µl und 4 µl). Zur Umschreibung wurden zwei Reaktionsansätze vorbereitet (siehe Tab. 9 und 10, Angaben entsprechen je einem Ansatz).

Tab. 9: Reaktionsansatz für 10 µl – Ansätze (+ RT)

	+ RT [µl]
Wasser	15,47
5x first strand buffer	5,71
DTT (100 mM)	0,36
DNTP ( je 10 mM)	1,43
RnaseOut (40 U/µl)	0,71
RandomPrimer (1:10; 0,3 µg/µl)	0,96
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,36
Gesamt	25
<b>RNA (10/14 µg) + H<sub>2</sub>O</b>	10
<b>Gesamtvolumen</b>	35

Tab. 10: Reaktionsansatz für 4 µl – Ansätze (- RT)

	- RT [µl]
Wasser	7,33
5x first strand buffer	2,29
DTT (100mM)	0,14
DNTP ( je10mM)	0,57
RnaseOut (40 U/µl)	0,29
RandomPrimer (1:10; 0,3 µg/µl)	0,38
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0
Gesamt	11
<b>RNA (4/14 µg) + H<sub>2</sub>O</b>	4
<b>Gesamtvolumen</b>	15



Danach wurden die Proben wie folgt inkubiert:

- 5 Minuten bei 25 °C
- 30 Minuten bei 42°C
- 5 Minuten bei 95°C
- 4°C.

Abschließend wurden die Ansätze mit sterilem Wasser versetzt, um für die PCR größere Volumina einsetzen zu können. Den + RT-Ansätzen (durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben) wurden 35 µl Wasser und den – RT-Ansätzen 15 µl Wasser hinzugefügt.

### 3.3.3. Real-Time PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Real-Time* PCR angewendet, um die Genexpression in unterschiedlichen Zellen bzw. unterschiedlich behandelten Zellen zu ermitteln. Mit dieser Methode ist es möglich, ausgehend von sehr geringen Mengen DNA ihr relatives Vorkommen zu bestimmen. Mit jedem PCR-Zyklus findet idealerweise die Verdopplung des durch die Wahl der Primer festgelegten Sequenzabschnitts statt. Mit Hilfe geeigneter fluoreszierender Farbstoffe kann der Fortschritt der Amplifikation verfolgt werden. Für die Auswertung entscheidend ist, im wievielten PCR-Zyklus eine festgelegte Fluoreszenzintensität (Schwellenwert = Ct-Wert) überschritten wird. Diese Zykluszahl dient der späteren Ermittlung der ursprünglich vorhandenen relativen Menge der jeweils untersuchten cDNA. Das heißt, je früher der Schwellenwert überschritten wird, desto höher war die ursprüngliche Menge cDNA in der Probe.

Es gilt:  $x\text{-fache Regulation} = 2^{\Delta\Delta Ct}$

Dazu wurde zunächst für jedes zu untersuchende Gen/Fragment ein sogenannter Mastermix angefertigt. Von diesem wurden jeweils 10 µl in die Kavität einer 96-well-Platte pipettiert. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 11: Reaktionsansatz für die PCR

	Reaktionsansatz [ $\mu$ l]
2 x SuperMix (SYBR-Green, QIAGEN)	6,25
Sense Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
Antisense Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
Wasser	3,25

Anschließend wurden 2  $\mu$ l cDNA dazugegeben. Für ein zu untersuchenden Sequenzabschnitt wurde zusätzlich jeweils eine sogenannte Negativkontrolle (- RT-Probe) angefertigt. Außerdem wurde eine sogenannte Wasserkontrolle (*no template control*) mitgeführt. Die PCR verlief mit 45 Zyklen unter Verwendung des in Tab. 12 aufgeführten Temperaturprotokolls.

Tab. 12: Temperaturprotokoll für die PCR

Phase	Temperatur in $^{\circ}$ C	Dauer
Aktivierung der Hot-Start-Polymerase	95	5 min
Denaturierung	95	15 s
Anlagerung	56-64*	30 s
Zweitstrang-Synthese	72	30 s
Finale Synthese	95	10 s
Schmelzkurve	65-95	5 s

\*= Primer-abhängige Anlagerungstemperatur

Im Folgenden sind die Rechenschritte angegeben, die durchgeführt wurden, um Expressionsunterschiede zwischen Leervektor-transfizierten und WISP1-OT2-transfizierten Zellen zu detektieren.

mit Leervektor transfizierte Zellen:

$$\text{Ct (Primer X)}_{\text{Leervektor}} - \text{Ct (GAPDH)}_{\text{Leervektor}} = \Delta \text{Ct}_{\text{Leervektor}}$$

mit WISP1-OT2 transfizierte Zellen:

$$\text{Ct (Primer X)}_{\text{WISP1-OT2}} - \text{Ct (GAPDH)}_{\text{WISP1-OT2}} = \Delta \text{Ct}_{\text{WISP1-OT2}}$$

$$\Delta \text{Ct}_{\text{Leervektor}} - \Delta \text{Ct}_{\text{WISP1-OT2}} = \Delta \Delta \text{Ct}$$

### 3.3.4. Droplet Digital PCR

Bei der *Droplet Digital PCR* wird der Reaktionsansatz in eine Wasser-Öl-Emulsion idealerweise bestehend aus 20.000 Öltröpfchen aufgesplittet. Jeder dieser Tropfen stellt eine eigene Reaktions-Partition dar, in der entweder eine oder mehrere (positiv) oder keine (negativ) amplifizierbare Sequenz statistisch zufällig verteilt vorhanden ist. Aufgrund des proportionalen Zusammenhangs zwischen der Anzahl der positiv und der negativ gewerteten Tropfen lässt sich mittels Poisson-Verteilung die absolute Anzahl des ursprünglich vorhandenen gesuchten Genabschnitts/Sequenzabschnitts ermitteln.

Zunächst wurde ein Gemisch aus Primern, EvaGreen-Supermix und Wasser angefertigt (Tab. 13). Je Ansatz wurden 20 µl dieses Gemisches und 2 µl cDNA-Probe gemischt und anschließend 20 µl davon auf eine spezielle Platte (sog. *Droplet Generator Cartridge*) pipettiert. Weiterhin wurden je Probe 70 µl Öl in die dafür vorgesehenen Kavitäten pipettiert. Die Platte wurde in eine Tropfen-Generier-Maschine (*QX200 Droplet Generator*) gestellt, welche jede Probe in eine Öl-Wasser-Emulsion mit idealerweise 20.000 Öltröpfchen aufteilte. Diese Öl-Wasser-Emulsion (40 µl) wurde anschließend in eine Mikrotiterplatte pipettiert und danach erfolgte die PCR-Amplifikation (siehe Tab. 14; *C1.000 Touch Thermal Cycler*). Abschließend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Tröpfchen in einem Durchflusszytometer (*QX200 Droplet Reader*) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Software QuantaSoft.

Tab. 13: Volumina der einzelnen Substanzen zur Anfertigung des Supermixes

	Volumen in µl
2 x EvaGreen Supermix	11
Sense Primer (10 pmol/µl)	0,22
Antisense Primer (10 pmol/µl)	0,22
Wasser	8,56
Gesamtvolumen	20

Tab. 14: Temperaturprotokoll für die ddPCR (40 Zyklen)

Phase	Temperatur in °C	Dauer
Aktivierung der Hot-Start-Polymerase	95	10 min
Denaturierung	95	30 s
Anlagerung und Zweitstrang-Synthese	60	60 s

### 3.3.5. Primer und Primeretablierung

Tab. 15: verwendete Primer (5' - 3')

Gen-/ Sequenz- abschnitt	Sense-Primer	Antisense-Primer	Länge des Amplifikates	Anlagerungs- Temperatur
AGT1	AAGGTGGAATG CTCCACAT	GGCCATAAGGGC TGACTGCTTC	197 bp	60°C
CDKN2A	CCCCACTACC GTAAATGTCCA T	CTGCCATTTGCT AGCAGTGTGACT	246 bp	58°C
COL1	TCTGGCGCTCC CATGGCTCT	GCCCTGCGGCAC AAGGGATT	166 bp	60°C
COL3	AGGGGAGCTG GCTACTTCTC	AGGACTGACCA AGATGGGAA	95 bp	60°C
FOS	CCGGGGATAGC CTCTCTTAC	TGGTCGAGATGG CAGTGAC	60 bp	62°C
HRAS	GCTCTCCTGAC GCAGCAC	CTTGCTTCCGTC CTTCCTT	94 bp	60°C
MGMT	unbekannt*	unbekannt*		60°C
MLH1	unbekannt*	unbekannt*		60°C
MMP1	unbekannt*	unbekannt*		60°C
MMP13	unbekannt*	unbekannt*		60°C
SERPINE1	CAGACCAAGA GCCTCTCC	ATCACTTGGCCC ATGAAAAG	202 bp	56°C
STK11	CGGTGGCACCC TCAAAT	GACCCCAGCCG ACCAGAT	247 bp	62°C
TGFB1	unbekannt*	unbekannt*		60°C
TNF	unbekannt*	unbekannt*		60°C
Exon 1 - Exon 2 (WISP1)	AGAGGTGGTTCG GATCCTCTG	CCAGTGGAGCT GGGGTAAAG	176 bp	60°C
Intron 4 - Exon 5 (WISP1)	TGCTTCTGTAA CCTGAGCTGTA	GGCCATAAGGGC TGACTGCTTC	475 bp	60°C
Exon 5 - Exon 5 (WISP1)	AAGGTGGAATG CTCCACAT	GGCCATAAGGGC TGACTGCTTC	152 bp	60°C
GAPDH	AAGGTGAAGGT CGGAGTCAA	AATGAAGGGGT CATTGATGG	107 bp	60°C
18s rRNA	GCATATGCTTGT CTCAAAGA	CCAAAGGAACC ATAACTGAT	101 bp	55°C

\* Diese Primer wurden kommerziell erworben, ihre Sequenz bzw. Fragmentlänge jedoch von Seiten des Herstellers nicht bekannt gegeben wird.

Primeretablierung

Bevor die Primer (Tab. 15) erstmals für Versuche verwendet werden konnten, musste zunächst die jeweilige optimale Anlagerungstemperatur ermittelt werden. Dafür wurden Temperatur-Gradienten-PCRs (fünf verschiedene Temperaturen je Primer) mit dem PCR-Gerät Thermocycler TProfessional (qualitative PCR) durchgeführt. Dazu wurde das Taq PCR Kit von Qiagen nach dem in Tab. 16 abgebildeten Schema verwendet. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Mithilfe der Gelelektrophorese konnte anhand der entstandenen Banden die optimale Anlagerungstemperatur gefunden werden. Die verwendete cDNA entstammte HEK-293T-Zellen.

Tab. 16: Volumina für die Temperatur-Gradienten-PCR (Angaben für einen Reaktionsansatz)

	Volumen in $\mu\text{l}$
10 x PCR-Puffer	2,5
dNTP-Mix (je 10 mM)	1
Taq-Polymerase	0,25
cDNA	1
Mg <sup>2+</sup>	1
Sense Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1
Antisense Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1
Wasser	add 25

Tab. 17: Temperaturprotokoll für die die Temperatur-Gradienten-PCR (40 Zyklen)

Phase	Temperatur in °C	Dauer
Aktivierung der Hot-Start-Polymerase	95	3 min
Denaturierung	95	30 s
Anlagerung	56-64	1 min
Zweitstrang-Synthese	72	30 s
Finale Synthese	95	10 min

### **3.4. Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.4.1. Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz**

Die Proteinkonzentration wurde mittels einer Färbereaktion bestimmt. Dazu wurden 3 µl Zelllysate mit 200 µl BCA-Reagenz (50 Teile Reagenz + 1 Teil 4 %iges Kupfersulfat, Firma: Thermo Scientific, Waltham, USA) in einer Kavität einer Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) vermischt und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Das BCA - Reagenz bildet zusammen mit Cu<sup>+</sup> - Ionen violette Farbkomplexe, deren Farbintensität photometrisch (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 560 nm gemessen werden kann. Diese Intensität korreliert direkt mit der Proteinkonzentration in den Proben. Zur Ermittlung dieser Konzentration wurde eine Eichkurve mit bekannten Rinderserumalbumin (BSA) – Konzentrationen (0, 100, 300, 500, 700 mg/l) erstellt.

#### **3.4.2. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA)**

Immunassays basieren auf einer spezifischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Zu diesen Verfahren zählt auch der ELISA, bei dem die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindungen auf einer Enzymreaktion beruht.

Hier wurde der ELISA zur Bestimmung des Kollagen I-, Kollagen III-, Kollagen IV- und Fibronectin-Gehalts im Medium der Zellkulturen eingesetzt.

Nachdem das Medium von den Zellen abgenommen wurde, wurde es in Immunosorb-96-well – Platten pipettiert. Dabei wurden für die Kollagen I – Bestimmung 40 µl, für die Bestimmung von Kollagen III 100 µl, für Kollagen IV 20 µl und für die Fibronectin-Bestimmung 2 µl Medium verwendet. Zur späteren Quantifizierung der jeweiligen Kollagen- bzw. Fibronectinmenge wurde eine Standardreihe mit den entsprechenden Proteinen erstellt. Diese wurde – ebenso wie die Proben – mit Vollers Puffer (200 µl / Kavität) versetzt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Kavitäten wurden anschließend dreimal mit 200 µl PBS/0,05 % Tween-20 gewaschen.

Um unspezifische Antikörper-Bindestellen abzusättigen, wurden 2 % BSA in PBS/0,05 % Tween-20 gelöst und für 2 h (Inkubation im Kühlschrank) in die Kavitäten gegeben (200 µl / Kavität). Anschließend wurde mit den Kollagen- bzw. Fibronectin- (1:1000) Antikörpern in 2 % BSA/PBS/0,05 % Tween-20 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (50 µl / Kavität). Danach wurden die Proben erneut dreimal mit 200 µl PBS/0,05 % Tween-20 gewaschen und anschließend wurden 50 µl Anti-Rabbit-Peroxidase-AK (HRP (*mouse*)) 1:5000 verdünnt in 2 %

BSA/PBS/0,05 % Tween-20 zugesetzt und 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten (200  $\mu$ l PBS/0,05 % Tween-20) wurden die Proben für ca. 15 Min. mit 100  $\mu$ l HRP-Substrat-Lösung im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25  $\mu$ l 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beendet und danach erneut die Absorption bestimmt. In der Tab. 18 sind die verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tab. 18: Übersicht über verwendete Antikörper

Erst-AK	Verdünnung	Hersteller	Zweit-AK	Verdünnung	Hersteller
Kollagen I	1 : 1000	Rockland	Anti-rabbit	1 : 5000	Rockland
Kollagen III	1 : 1000	Rockland	Anti-rabbit	1 : 5000	Rockland
Kollagen IV	1 : 1000	Rockland	Anti-rabbit	1 : 5000	Rockland
Fibronektin	1 : 1000	Rockland	Anti-rabbit	1 : 5000	Rockland

Lösungen:

- PBS
  - 137 mmol/l NaCl
  - 8,1 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O
  - 2,7 mmol/l KCl
  - 1,5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  
- HRP-Substrat:
  - 4,6 mmol/l o-Phenylendiamin
  - 66 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O
  - 38 mmol/l Zitronensäure
  - 0,015 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Reinstwasser
  
- Vollers Puffer:
  - 1,50 mmol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
  - 350 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>

### 3.4.3. Caspase-3 – Aktivitätsbestimmung

Die Zellen (auf einer kleinen Petrischale,  $\varnothing = 3,5$  cm) wurden mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 Min. bei 13.000 rpm / 16.200 g). Im Anschluss wurden 60  $\mu\text{l}$  des Überstandes mit 60  $\mu\text{l}$  2 x Reaktionspuffer und 5  $\mu\text{l}$  Caspase-Substrat (DEVD-AFC) vermischt und bei 37 °C bis zu 90 Min. im Wasserbad inkubiert. Caspase 3 spaltet vom Substrat DEVD-AFC das fluoreszierende Molekül AFC ab. Die Zunahme der Fluoreszenz spiegelt damit die Enzymaktivität wieder. Gemessen wurde die Fluoreszenz bei 400 nm Anregung und 505 nm Emission. Um aus den später gemessenen Fluoreszenzintensitäten die Caspase-Aktivität im Lysat ableiten zu können, wurde eine Eichkurve mit bekannten Konzentrationen des Produkts (AFC) nach folgendem Schema (Tab. 19) erstellt.

Tab. 19: Shema zur Erstellung einer Eichkurve

	0 $\mu\text{M}$ AFC	1 $\mu\text{M}$ AFC	2 $\mu\text{M}$ AFC	4 $\mu\text{M}$ AFC	8 $\mu\text{M}$ AFC
AFC (80 $\mu\text{M}$ )	0 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
Puffer (500 $\mu\text{l}$ Lyse, 500 $\mu\text{l}$ Reaktionspuffer)	200 $\mu\text{l}$	197,5 $\mu\text{l}$	195 $\mu\text{l}$	190 $\mu\text{l}$	180 $\mu\text{l}$
nmol AFC in 125 $\mu\text{l}$	0	0,125	0,25	0,5	1

#### Lösungen:

Lysepuffer: 20 mmol/l MOPS  
0,1 % Triton-X-100

2 x Reaktionspuffer: 400  $\mu\text{l}$  5 x Reaktionspuffer,  
10  $\mu\text{l}$  1 M DTT,  
590  $\mu\text{l}$  Wasser

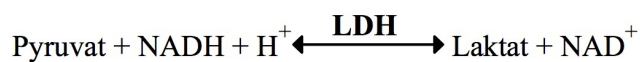
5 x Reaktionspuffer: 50 mmol/l PIPES,  
10 mmol/l EDTA,  
0,5 % CHAPS,  
pH 7,4

Caspase-3-Substrat: 1 mmol/l DEVD-AFC in DMSO



### 3.4.4. LDH – Messung

Eine Zunahme der extrazellulären Laktatdehydrogenase (LDH) – Aktivität stellt einen Indikator für eine gesteigerte Nekroserate dar. Die LDH ist ein Enzym, welches die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat katalysiert und in allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt. Zellen, deren äußere Zellmembran geschädigt ist oder sich auflöst, setzen dieses Enzym frei. Aufgrund seiner hohen Stabilität verbleibt es zunächst im Extrazellulärraum. Für die Bestimmung der LDH-Konzentration macht man sich dessen physiologische Funktion zunutze.



Die LDH-Messung fand in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten statt. Zur Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität wurden 40 µl des Zellkulturmediums mit 160 µl HEPES-Puffer vermischt. Für die Messung der intrazellulären LDH-Aktivität wurden 5 µl Zellysate und 195 µl HEPES-Puffer verwendet. Weiterhin wurde ein Leerwert mit 200 µl HEPES-Puffer in eine Kavität pipettiert. Unmittelbar vor der Messung wurde dem hinzu zugebenden HEPES-Puffer Pyruvat (1,25 mmol/l) und NADH (0,21 mmol/l) zugesetzt. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm über 30 Minuten (alle 60 Sekunden) die Absorption gemessen (bei Zimmertemperatur).

Tab. 20: Zusammensetzung HEPES-Puffer

Substanz	Konzentration in mmol/l
Natriumchlorid	122,5
Kaliumchlorid	5,4
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,8
Calciumchlorid-Dihydrat	1,2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	1
Glucose-Monohydrat	5,5
HEPES	100

### 3.5. Bioinformatik und Statistik

Im Folgenden sind die verwendeten Online-Datenbanken tabellarisch aufgeführt.

Tab. 21: Übersicht über verwendete Online-Datenbanken

Datenbank	Verwendung	URL
BLAST	Suche und Vergleich von Sequenzen	<a href="http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Ensembl	Genanalysen, Sequenzanalysen	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
Genecards	Gendatenbank	<a href="http://www.genecards.org/">http://www.genecards.org/</a>
Primer-BLAST	Primersuche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Pubmed	Literatursuche, Genanalysen, Sequenzanalysen	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Revseq	Sequenzumkehr	<a href="http://www.emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/revseq">http://www.emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/revseq</a>

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurden verschiedene Programme verwendet. Diese sind in der folgenden Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22: Übersicht über verwendete Programme

Programm	Beschreibung/Verwendung
CFX Manager	Auswertung Real-Time PCR
LibreOffice Impress, Writer	Anfertigung von Abbildungen und Texten
Microsoft Excel	Tabellenkalkulationsprogramm, statistische Auswertung der Ergebnissen
QuantaSoft	Auswertung Droplet Digital PCR
SigmaPlot 12.5	Grafikprogramm

Die Daten der Überexpressionsversuche sind als Mittelwert im zugehörigen 95 % - Konfidenzintervall dargestellt. Ein Ergebnis gilt dann als signifikante Veränderung, wenn das Konfidenzintervall nicht die Nullmarke überschneidet.

#### 4. Ergebnisse

##### 4.1. Überexpressionversuche mit WISP1-OT2

##### 4.1.1. Überexpression – Erstellung einer Konzentrationsreihe

Um die Funktionen von WISP1-OT2 zu ermitteln, sollte diese lncRNA in der vorliegenden Arbeit in HEK-293T-Zellen überexprimiert werden. Zunächst sollte gezeigt werden, dass die Überexpression von WISP1-OT2 in Abhängigkeit von der Plasmidmenge in den verwendeten Zellen möglich ist. Weiterhin sollte die optimale Plasmidmenge für die nachfolgenden Überexpressionsversuche ermittelt werden. Es wurden fünf unterschiedliche Konzentrationen des WISP1-OT2-Plasmids in die Zellen eingebracht. Die Expression des WISP1-OT2-Transkripts wurde unter Verwendung des Primerpaares Exon 5 – Exon 5 mittels Real-Time PCR bestimmt. In Abb. 13 ist die Expression der WISP1-OT2-RNA in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmidmenge dargestellt. Bezogen wurde die Expression von WISP1-OT2 auf Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1 (Invitrogen) transfiziert wurden.

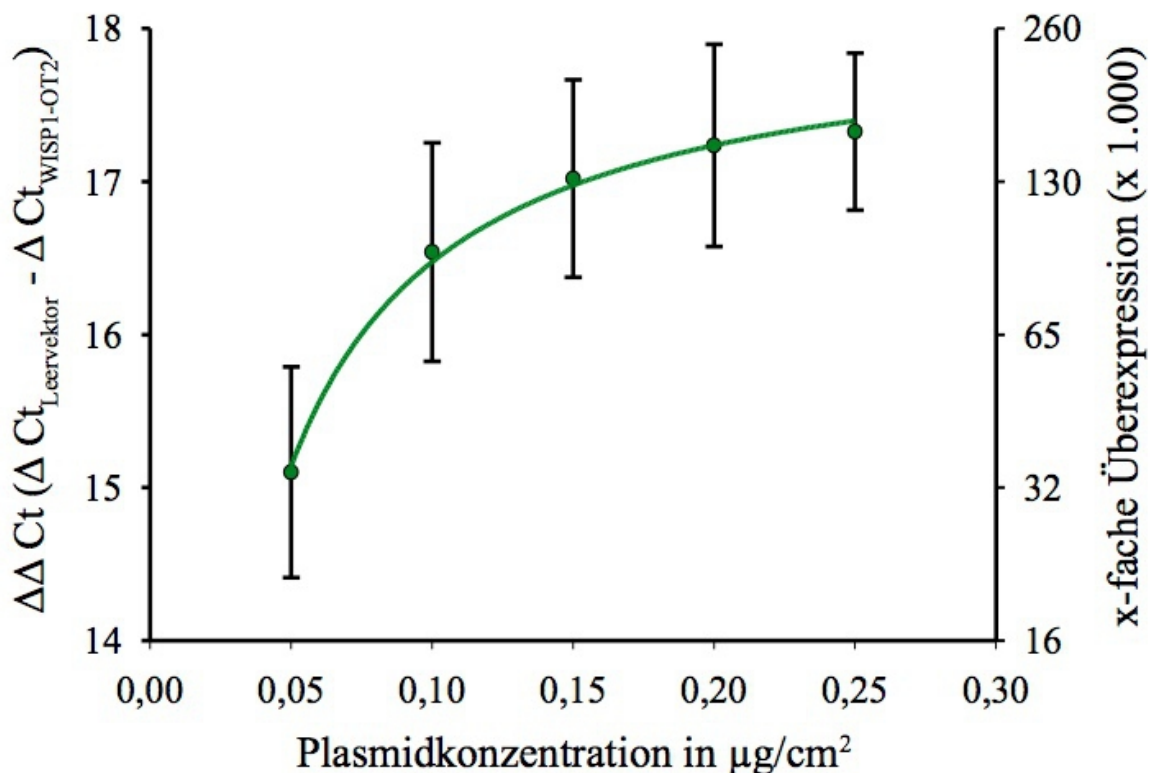


Abb. 13: Abhängigkeit der WISP1-OT2-Expression (in HEK-293T-Zellen) von der Transfektionskonzentration nach 48 Stunden Inkubation,  $N = 3$ ,  $n = 12$

Es zeigte sich, dass mit zunehmender Konzentration des WISP1-OT2-Plasmids die Menge des WISP1-OT2-Transkripts in den Zellen anstieg, wobei ab einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Kulturfäche annähernd die maximale Expressionsrate erreicht wurde.

#### 4.1.2. Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf die Genexpression

Da lange nichtkodierende RNAs bekannt sind, welche die Genexpression beeinflussen, sollte dies auch für WISP1-OT2 untersucht werden. Richtungsweisend für die Wahl der zu untersuchenden Gene waren Befunde aus vorausgehenden PCR-Array-Untersuchungen, bei denen WISP1-OT2 in HEK-Zellen überexprimiert worden war. In Abb. 14 ist die Genexpression der HEK-293T-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit dem WISP1-OT2-Plasmid ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dargestellt.

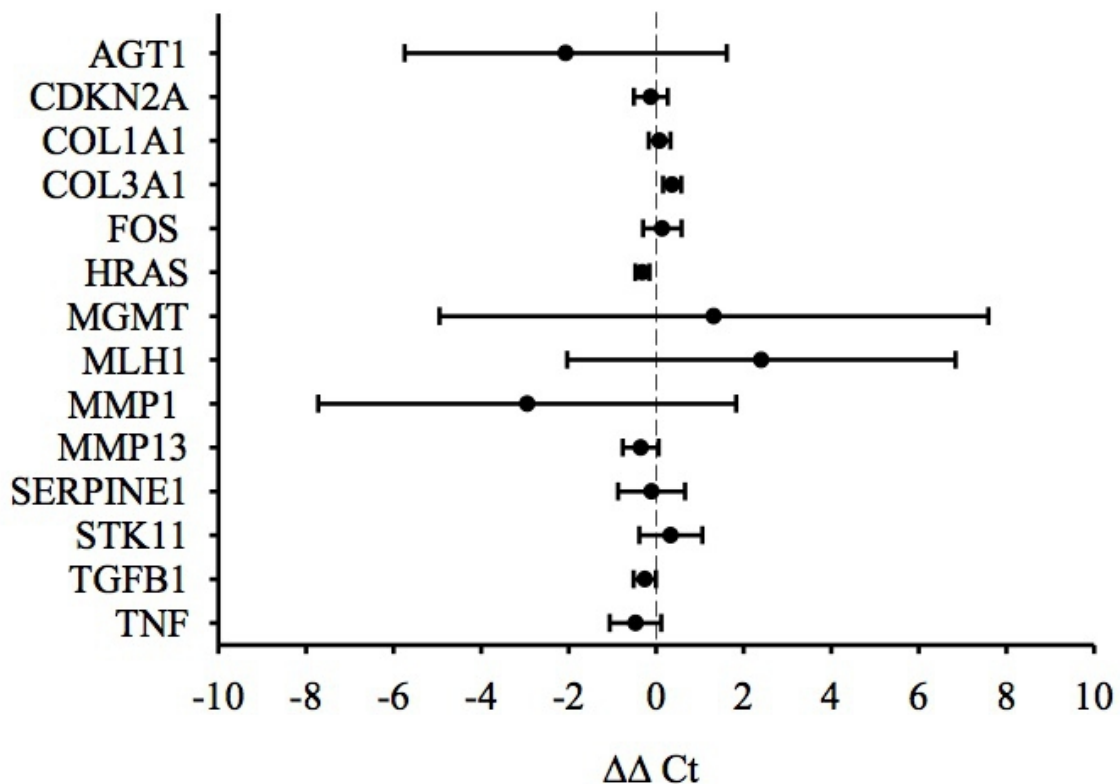


Abb. 14: Expression verschiedener Gene in HEK-293T-Zellen – nach 24 Stunden WISP1-OT2-Überexpression ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $N = 6$ ,  $n = 18$  (MW  $\pm$  95 % - Konfidenzintervall)

Nach 24-stündiger Überexpression von WISP1-OT2 ergaben sich gegenüber den mit Leervektor behandelten Kontrollzellen für 3 von 13 der untersuchten Gene Expressionsänderungen, die signifikant von 0 verschieden waren. Die Konfidenzintervalle überschreiten in diesen Fällen nicht die Nullmarke. COL3A1 wurde in den WISP1-OT2 überexprimierenden Zellen 1,29-fach ( $\Delta\Delta Ct = 0,37$ ) höher exprimiert als in den Kontrollzellen. Die Expression von HRAS und TGFB $\beta$  war dagegen 1,25-fach ( $\Delta\Delta Ct = -0,32$ ) bzw. 1,2-fach ( $\Delta\Delta Ct = -0,26$ ) geringer als in den Kontrollzellen. Für alle anderen untersuchten Gene konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

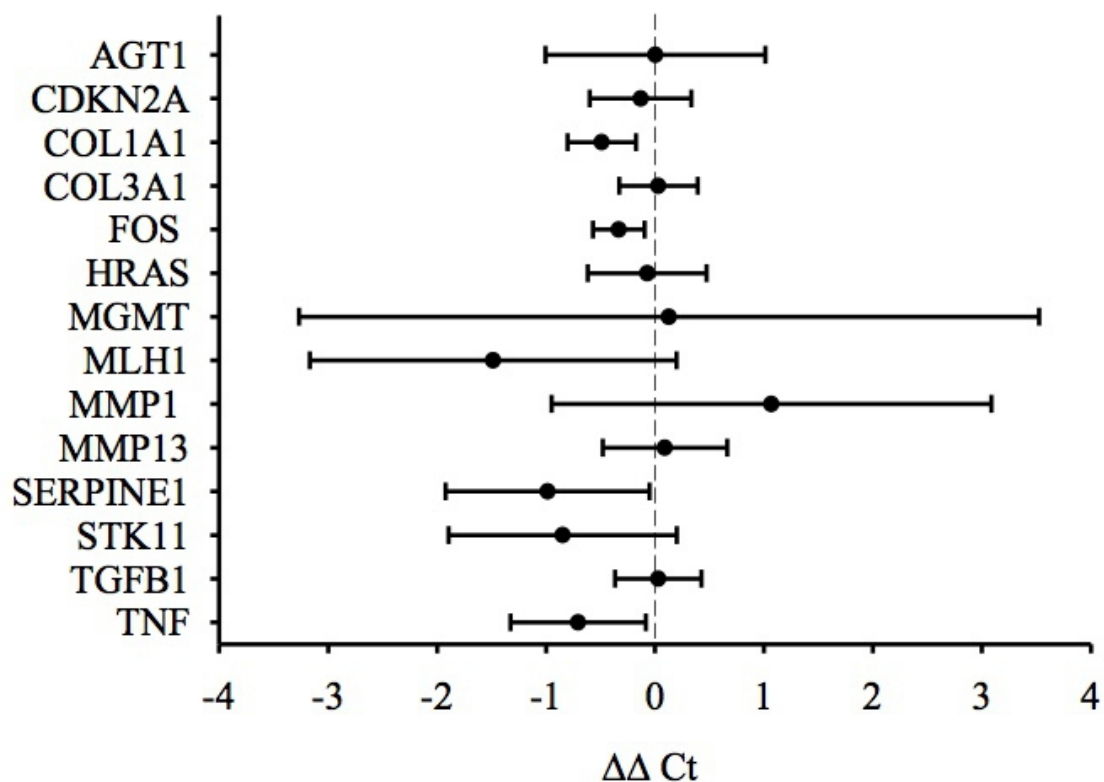


Abb. 15: Expression verschiedener Gene in HEK-293T-Zellen – nach 48 Stunden WISP1-OT2-Überexpression ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $N = 6$ ,  $n = 18$  (MW  $\pm$  95 % - Konfidenzintervall)

Nach 48-stündiger Überexpression von WISP1-OT2 zeigten sich signifikante Expressionsveränderungen zwischen WISP1-OT2 exponierten Zellen und den Kontrollzellen bei 4 von 13 untersuchten Genen. COL1A1 wurde in den überexprimierenden Zellen im Durchschnitt 1,4-fach ( $\Delta\Delta Ct = -0,49$ ), FOS 1,26-fach ( $\Delta\Delta Ct = -0,33$ ), SERPINE1 1,99-fach ( $\Delta\Delta Ct = -0,99$ ) und TNF 1,64-fach ( $\Delta\Delta Ct = -0,71$ ) verringert exprimiert als in den Kontrollzellen. Für alle anderen untersuchten Gene konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Zusammenfassend konnte mithilfe der Genexpressionsanalyse herausgestellt werden, dass die WISP1-OT2-Überexpression die Expression einiger Gene beeinflusst. Allerdings waren die Expressionsveränderungen durch diese lncRNA eher gering ausgeprägt.

#### 4.1.3. Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den intrazellulären Proteingehalt, die Apoptose- und Nekroserate

Um die pathophysiologische Bedeutung von WISP1-OT2 genauer charakterisieren zu können, wurde der Einfluss der Überexpression dieses Transkripts auf die Apoptose- und Nekroserate ermittelt. Weiterhin wurde der Proteingehalt in WISP1-OT2 überexprimierenden Zellen mit dem in Kontrollzellen verglichen.

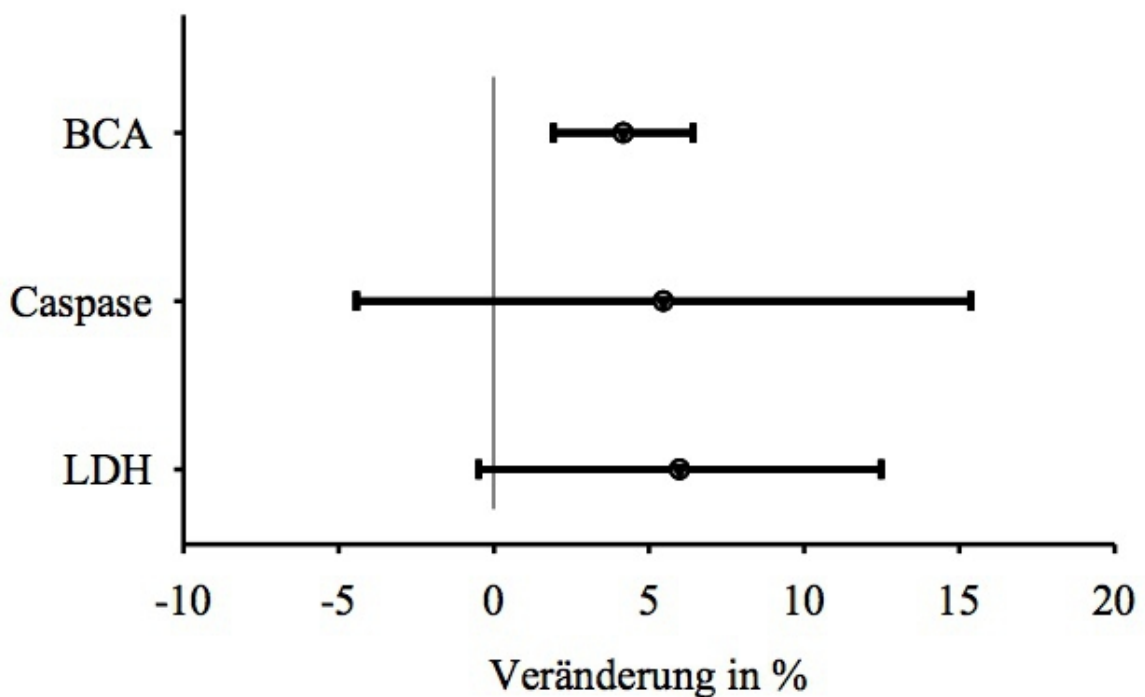


Abb. 16: Änderung des Proteingehalts, der Apoptose- (Caspase-Aktivität) und Nekroserate (Lactatdehydrogenase-Aktivität) (von HEK-293T-Zellen) nach 48 Stunden Überexpression von WISP1-OT2 ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $N_{BCA, LDH} = 5$ ,  $n_{BCA, LDH} = 20$ ,  $N_{Caspase} = 3$ ,  $n_{Caspase} = 12$  ( $MW \pm 95\%$  - Konfidenzintervall)

Es konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der WISP1-OT2 – Überexpression auf die Apoptose- und Nekroserate detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Vitalität der Zellen von der Überexpression nicht beeinflusst wurde. Lediglich der Proteingehalt war geringfügig erhöht.

#### 4.1.4. Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den Gehalt von Proteinen der extrazellulären Matrix in HEK-293T-Zellen

Das Toxin, welches eine erhöhte Expression von WISP1-OT2 induziert, verursacht im Nierengewebe fibrotische Veränderungen. Dabei könnte die Expression von WISP1-OT2 eine Rolle spielen. Deshalb sollte mithilfe von ELISA-Untersuchungen ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der WISP1-OT2-Expression und dem Vorkommen von Proteinen der extrazellulären Matrix besteht.

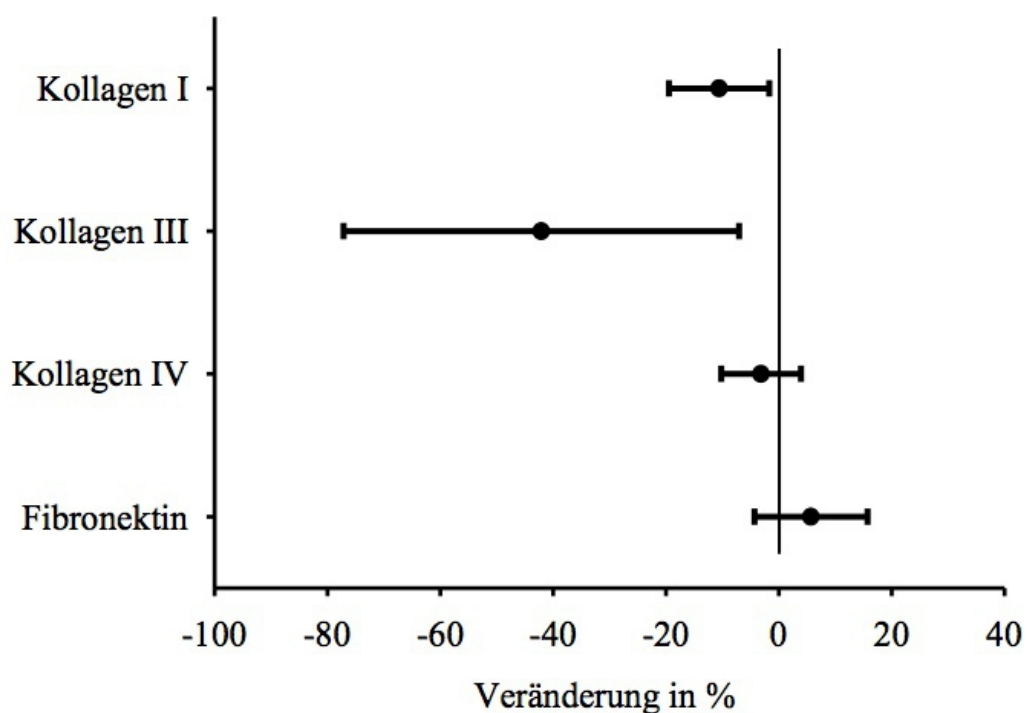


Abb. 17: Änderung des Gehalts verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix im Medium (von HEK-293T-Zellen) nach 48 Stunden Überexpression von WISP1-OT2 ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $N=3$ ,  $n=12$  ( $MW \pm 95\%$  - Konfidenzintervall)

Die Abb. 17 zeigt, dass die Mengen der Proteine Fibronectin und Kollagen IV sich im Medium der exponierten Zellen nicht signifikant von denen im Medium der nicht exponierten Kontrollzellen unterschieden.

Für die Kollagene I und III hingegen zeigten sich signifikante Abnahmen der Mengen in den WISP1-OT2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Kollagen I wurde im Durchschnitt in 10,58 % und Kollagen III in 42,1 % geringerer Konzentration vorgefunden.

## 4.2. Detektion der WISP1-OT2-RNA in Tumoren

### 4.2.1. Detektion der WISP1-OT2-RNA in der RNA von Tumorzelllinien

Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Tumorzellen und der Expression von lncRNAs. Mit folgenden Versuchen sollte eine mögliche Assoziation zwischen dem Auftreten der nichtkodierenden RNA WISP1-OT2 und dem Auftreten einiger Nierentumoren überprüft werden. Dazu wurde die Expression verschiedener möglicher Fragmente der WISP1-mRNA – einschließlich WISP1-OT2 – in 25 verschiedenen Nierentumorzelllinien genauer untersucht (Abb. 18).

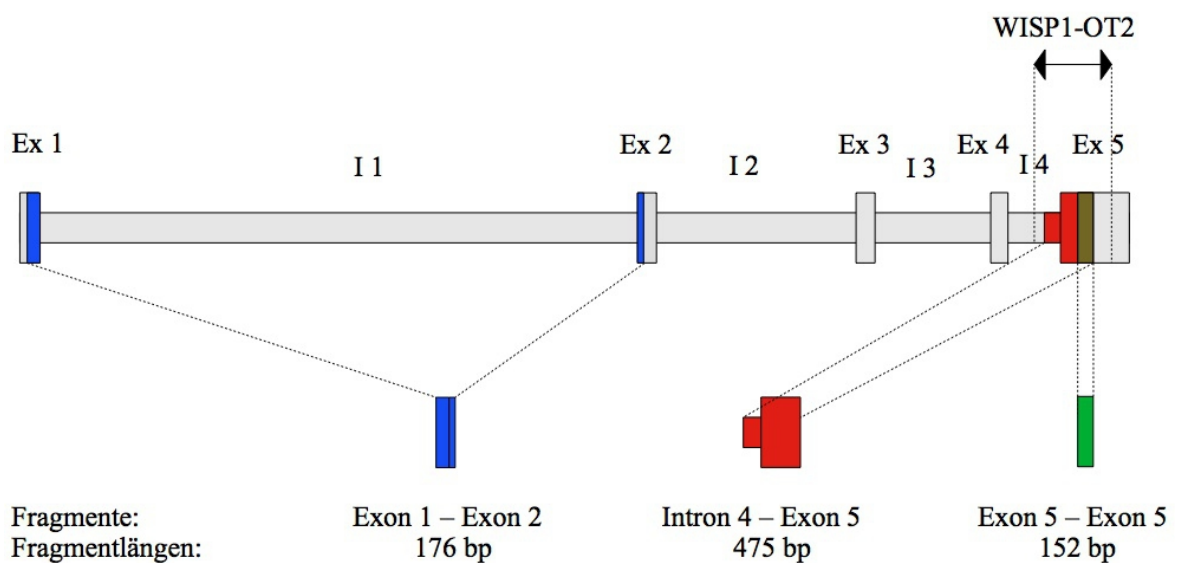


Abb. 18: Darstellung eines Teils des WISP1-Primärtranskripts und der verschiedenen Fragmente, deren Expression mittels entsprechender Primer in der RT-PCR und ddPCR untersucht wurden.



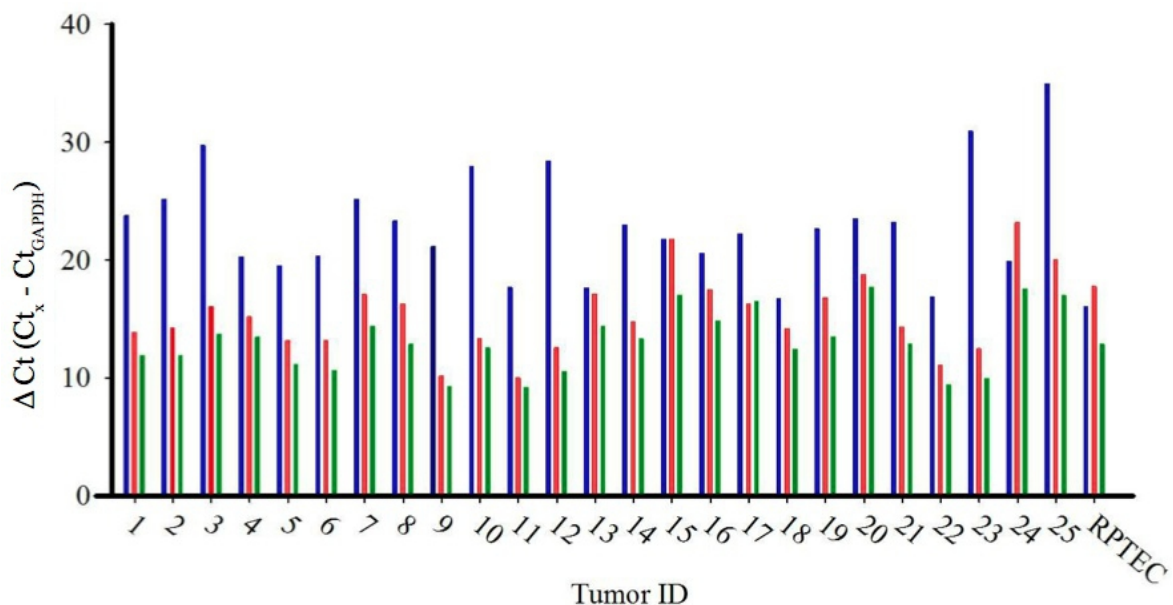


Abb. 19: Darstellung der Expression verschiedener WISP1-Fragmente in Zelllinien von Nierenzellkarzinomen und RPTEC-Zellen. Dargestellt sind die PCR-Zykluszahlen dreier verschiedener WISP1-Primer abzüglich der jeweiligen Zykluszahlen für den GAPDH-Primer (Housekeeping-Gen), je größer  $\Delta Ct$ , desto geringer der Gehalt des Fragmentes, blau entspricht Exon 1 – Exon 2, rot entspricht Intron 4 – Exon 5, grün entspricht Exon 5 – Exon 5. (RNA der Zelllinien wurde freundlich zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. B. Seliger)

Das PCR-Produkt, das bei Verwendung der Intron-1-überspannenden Primer gefunden werden kann, repräsentiert sowohl das reguläre WISP1-Transkript wie auch einige Spleißvarianten. Dieses Produkt war insgesamt nur wenig vorhanden ( $\bar{\Delta Ct}$  reguläres WISP1 in klarzelligen NZK = 22,54; in chromophilen NZK = 27,42). Das PCR-Produkt, das bei Verwendung der im Intron 4 und Exon 5 liegenden Primer gefunden werden kann, repräsentiert WISP1-OT2 und konnte weder im regulären WISP1-Transkript noch in einer der bekannten Spleißvarianten gefunden werden. Dieses Produkt und damit WISP1-OT2 konnte in den meisten Tumorzelllinien detektiert werden. Es war in deutlich höherer Anzahl vorhanden, als das unter Verwendung der in Exon 1 – Exon 2 liegenden Primer gefundene Produkt ( $\bar{\Delta Ct}$  WISP1-OT2 in klarzelligen NZK = 15,06; in chromophilen NZK = 21,58).

Als Drittes wurde auch nach dem Vorhandensein einer RNA gesucht, die mittels Primern gefunden werden konnte, die Abschnitte des fünften Exons detektierten. Dieser RNA-Abschnitt kann sowohl im regulären WISP1-Transkript des WISP1-Gens wie auch in einigen Spleißvarianten und im WISP1-OT2 enthalten sein. Deshalb ist es plausibel, dass dieser Abschnitt im Vergleich zu den beiden anderen Fragmenten in allen Tumorzellen mit dem höchsten Gehalt detektiert wurde ( $\bar{\Delta Ct}$  Exon 5 in klarzelligen NZK = 13,03; in chromophilen NZK = 17,27). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass in den meisten Tumorzelllinien ein höherer Gehalt der WISP1-OT2-RNA als der WISP1-RNA detektiert wurde.



In 19 von 21 untersuchten klarzelligem Nierenzellkarzinomen zeigte sich eine höhere Expression von WISP1-OT2 (Intron 4 – Exon 5) im Vergleich zu dessen Expression in RPTEC-Zellen. Während die Expression des regulären WISP1-Transkripts (Exon 1 – Exon 2) in diesen Tumorzelllinien verringert war. In zwei untersuchten chromophilen Nierenzellkarzinomen hingegen war die Expression des WISP1-OT2 – Transkripts geringer als in den RPTEC-Zellen.

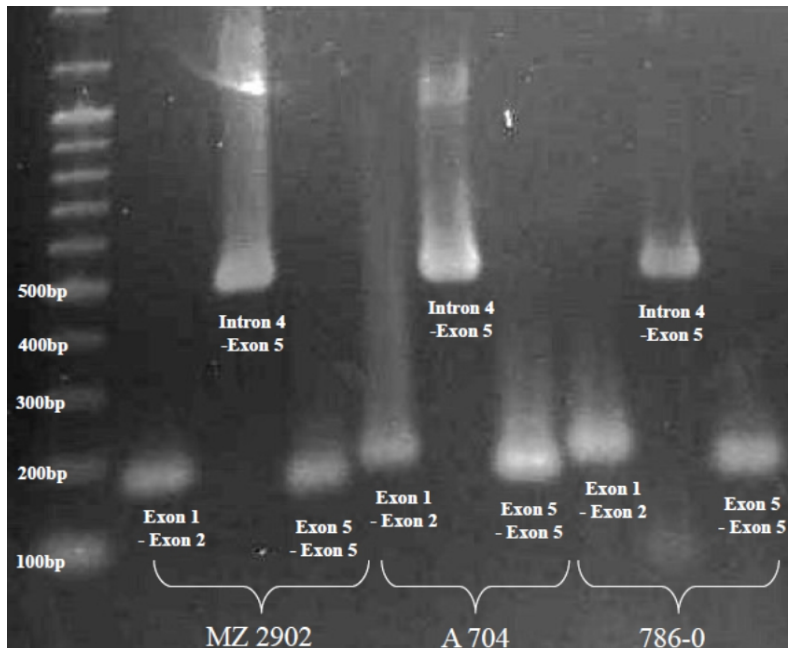


Abb. 21: Nachweis der Fragmentlängen der entstandenen PCR-Produkte, Exon 1 – Exon 2 = 176 bp, Intron 4 – Exon 5 = 475 bp, Exon 5 – Exon 5 = 152 bp (Tumor-ID: MZ 2902 = 4; A 704 = 22; 786-0 = 18).

Die Abb. 21 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese. Sie wurde zur Überprüfung der Fragmentlängen entsprechender PCR-Produkte angefertigt. Drei PCR-Produkte mit hoher Expression des Intron 4 – Exon 5 - Abschnitts, der das WISP1-OT2-Transkript repräsentiert, wurden ausgewählt und ihre Fragmentlängen ermittelt. Die Fragmentlängen der PCR-Produkte entsprechen den erwarteten Größen. Die Gelelektrophorese belegt, dass in der PCR die richtigen Produkte entstanden sind.

Als weiterer Nachweis, dass es sich um das gesuchte Produkt handelt, wurde der Intron 4 – Exon 5 - Abschnitt der Probe 786-0 (Tumor-ID: 18) sequenziert. Die Sequenz des PCR-Produkts stimmte mit der Sequenz des WISP1-OT2 Abschnitts überein.

Tab. 23: Übersicht über die Tumorzelllinien (zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. Barbara Seliger, Institut für Medizinische Immunologie, 06112 Halle (Saale) )

ID	Patient	Tumorart	TNM	Grading	$\Delta\Delta$ Ct* WISP1-OT2	$\Delta\Delta$ Ct* reg. WISP1
1	MZ 2789	Klarzellkarzinom	pT1, Nx, Mx	G 1-2	3,88	-7,71
2	MZ 2877	Klarzellkarzinom	pT3a, Nx, Mx	G 2	3,54	-9,12
3	MZ 1851	Klarzellkarzinom	pT2, N0, M0	G 2	1,69	-13,66
4	MZ 2902	Klarzellkarzinom	pT1, Nx, M1	G 2	2,59	-4,22
5	MZ 1973	Klarzellkarzinom	unbekannt	G 3	4,59	-3,45
6	MZ 2885	Klarzellkarzinom	pT3a, Nx, Mx	G 3	4,56	-4,24
7	MZ 2861	Klarzellkarzinom	pT3b	G 3	0,69	-9,11
8	MZ 1879	Klarzellkarzinom	pT3b, N0, M0	G 3	1,50	-7,26
9	MZ 2862	Klarzellkarzinom	pT3b, N2	G 3	7,62	-5,08
10	MZ 1790	Klarzellkarzinom	pT2, N0, M0	G 3	4,44	-11,86
11	MZ 1774	Klarzellkarzinom	pT2, N0, M0	G 3	7,77	-1,62
12	MZ 1940	Klarzellkarzinom	unbek.	G 3	5,21	-12,35
13	MZ 2733	Klarzellkarzinom	pT3b, N0, Mx	G 3	0,63	-1,60
14	MZ 2904	Klarzellkarzinom	pT1, Nx, Mx	G 3	3,00	-6,93
15	MZ 1257	Klarzellkarzinom	unbek.	G 3	-4,02	-5,72
16	MZ 1795	Klarzellkarzinom	pT3a, N2, M0	G 3	0,27	-4,49
17	MZ 2865	Klarzellkarzinom	pT4, N2, R1	G 3	1,49	-6,18
18	786-0	Klarzellkarzinom	unbek.	unbek.	3,58	-0,63
19	Caki I	Klarzellkarzinom	unbek.	unbek.	0,95	-6,57
20	Caki II	Klarzellkarzinom	unbek.	unbek.	-1,02	-7,43
21	A 498	Klarzellkarzinom	unbek.	unbek.	3,42	-7,15
22	A 704	unbek.	unbek.	unbek.	6,71	-0,79
23	MZ 2175	unbek.	unbek.	unbek.	5,30	-14,86
24	MZ 2858	chromophiles NZK	pT3a	G 2	-5,41	-3,82
25	MZ 2905	chromophiles NZK	pT4, Nx, Mx	G 3-4	-2,25	-18,91

\*  $\Delta\Delta$  Ct =  $\Delta$  Ct (RPTEC) –  $\Delta$  Ct (Tumorzellen)

#### 4.2.2. Detektion der WISP1-OT2-RNA in Tumor- und Normalgewebeproben

Nicht nur in Zelllinien, sondern auch in Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen und zwei Tumoren der Nebenniere konnte das WISP1-OT2-Transkript gefunden werden. Im Folgenden sind die Expression des WISP1-OT2-Transkripts und des regulären WISP1-Transkripts in verschiedenen Tumorgeweben und Normalgeweben (jeweils vom selben Patienten) dargestellt und miteinander verglichen.

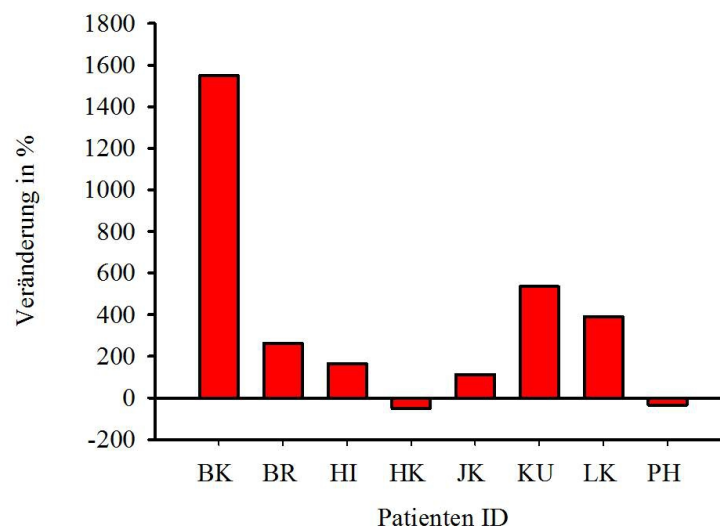


Abb. 22: Veränderung des WISP1-OT2-RNA-Gehalts (Intron 4 – Exon 5) im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe (ddPCR)

In der Abb. 22 ist zu erkennen, dass der WISP1-OT2-Gehalt im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe im Durchschnitt um 366 % anstieg. In 6 von 8 Proben war im Tumor eine erhöhte Konzentration dieser lncRNA nachweisbar. Während in 2 von 8 Tumoren die WISP1-OT2-Konzentration verringert war.

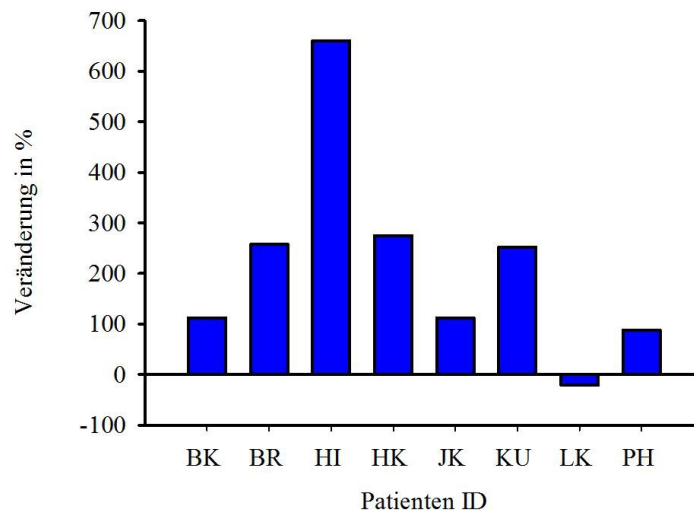


Abb. 23: Veränderung des regulären WISP1-mRNA-Gehalts (Exon 1 – Exon 2) im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe (ddPCR)

Auch die mRNA des regulären WISP1-Transkripts lag im Tumorgewebe in erhöhter Konzentration vor (Abb. 23). Im Durchschnitt war dieses Transkript im Tumor um 217 % gesteigert detektierbar.

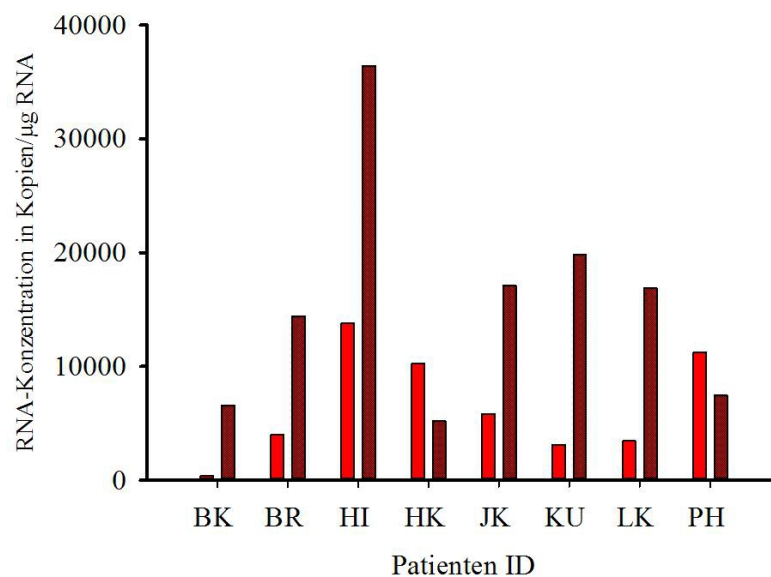


Abb. 24: Vergleich der Konzentrationen von WISP1-OT2 im Normalgewebe (hellrot) und im Tumorgewebe (dunkelrot)

Es wird ersichtlich, dass zum Beispiel bei Patient BK im Normalgewebe die WISP1-OT2-RNA nur sehr gering detektierbar war. Dies erklärt die sehr hohe prozentuale Veränderung im Tumorgewebe bei diesem Patienten. Ähnlich verhält es sich bei Patient HI mit der Expression der WISP1-RNA.

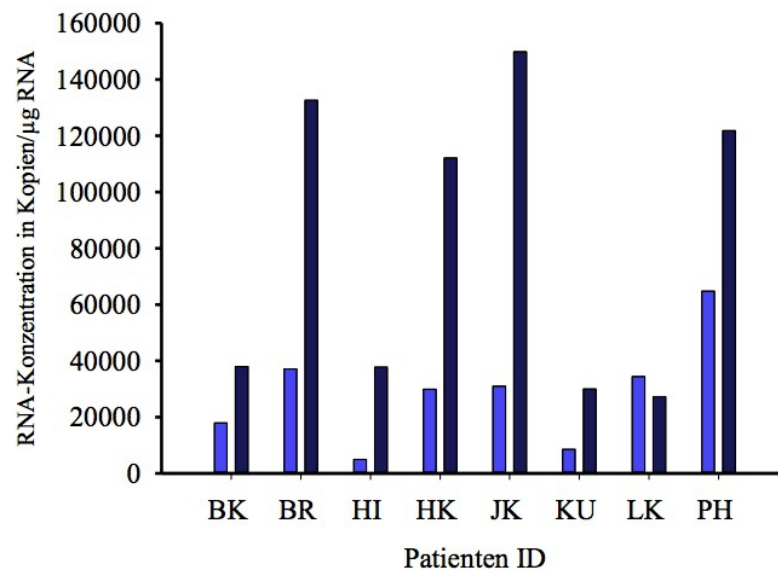


Abb. 25: Vergleich der Konzentrationen von WISP1 im Normalgewebe (hellblau) und im Tumorgewebe (dunkelblau)

Weiterhin ist zu beachten, dass in nahezu allen Gewebeproben ein deutlich höherer Gehalt der regulären WISP1-RNA im Vergleich zur WISP1-OT2-lncRNA gefunden werden konnte (Abb. 24 und 25). Ähnlich wie in den zuvor untersuchten Tumorzelllinien konnte in den meisten der wenigen bisher untersuchten Gewebeproben ebenfalls eine vermehrte Expression von WISP1-OT2 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe gefunden werden. Allerdings stieg im Unterschied zu den Tumorzelllinien auch die Expression des regulären WISP1-Transkripts im Tumorgewebe deutlich an.

Tab. 24: Übersicht über die verschiedenen Tumorgewebe mit Staging (zur Verfügung gestellt von der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Halle (Saale), ein positives Ethikvotum vom 03.05.2013 liegt vor)

Patienten ID	Art der Gewebeprobe	TNM	UICC	Grading
BK	klarzelliges NZK	pT1bpNxM0L0V0 Pn0	Stadium 1	G 2
BR	klarzelliges NZK	pT3apNxM0L0V1 Pn0	Stadium 3	G 3
HI	Nebennierenrinden-Adenom	pT3apN0M0L0V2 Pn0	Stadium 3	G 3
HK	klarzelliges NZK	pT3apNxM0L0V1 Pn0	Stadium 3	G 1
JK	klarzelliges NZK	pT3aN0M0V1 Pn0	Stadium 3	G 2
KU	klarzelliges NZK	pT1bpNxM0L0V1 Pn	Stadium 1	G 2
LK	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt
PH	Nebenniere	unbekannt	unbekannt	unbekannt



## 5. Diskussion

Lange nichtkodierende Ribonukleinsäuren (lncRNAs) sind Transkripte, die mehr als 200 Nukleotide umfassen und deren Sequenzen nicht für Proteine kodierend sind. Diese Definition erscheint zunächst etwas willkürlich und umfasst eine sehr große Anzahl von Transkripten. Wieviele lncRNAs das menschliche Genom besitzt, lässt sich derzeit noch nicht abschätzen. Stetig wächst die Zahl neu identifizierter Transkripte an. Vom Großteil dieser nichtkodierenden RNAs sind keine Funktionen bekannt. Jedoch konnte für einige lncRNAs eine Bedeutung für physiologische und pathophysiologische Vorgänge nachgewiesen werden. Zum Teil wirken sie als Regulatoren der Genexpression (Mattick, 2001; Rinn und Chang, 2012).

WISP1-OT2 ist ein Transkript, welches die Kriterien für lange nichtkodierende RNAs erfüllt. Die Sequenz von WISP1-OT2 überschneidet sich mit einem Abschnitt des vierten Introns und des fünften Exons der Sequenz von WISP1 (Hennemeier, 2014). Wie bei den meisten der bisher, oft lediglich durch rechnerische Verfahren ermittelten langen nichtkodierenden RNAs, ist ihre Funktion und ihr – evtl. zellspezifisches – Vorkommen unbekannt. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, ob die Überexpression von WISP1-OT2 in HEK-293T-Zellen Einflüsse auf die Expression einiger (durch PCR-Arrays ausgewählter) Gene, auf die Zellvitalität und auf den Gehalt einiger Proteine der extrazellulären Matrix hat. Zum anderen wurden mittels PCR-Verfahren Detektionen des Transkripts in menschlichen Tumorzelllinien und Tumorgewebeproben durchgeführt. Bei den Tumoren handelte es sich hauptsächlich um Nierenzellkarzinome (überwiegend vom klarzelligen Typ).

### 5.1. Überexpressionsversuche mit WISP1-OT2

#### 5.1.1. Überexpression – Erstellung einer Konzentrationsreihe

Der Vorversuch diente der Ermittlung der optimalen Plasmidkonzentration für die geplanten Überexpressionsversuche mit dem WISP1-OT2-Plasmid. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieser lncRNA mit dem verwendeten Plasmid möglich war. Die Expression nahm mit zunehmender Plasmidkonzentration zu, bis bei einer Konzentration von etwa 0,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  keine weitere Steigerung der WISP1-OT2-Expression möglich war.

Für die nachfolgenden Überexpressionsversuche wurde deshalb eine Plasmidkonzentration von 0,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eingesetzt. Dies führte zu einer etwa 100.000-fach höheren WISP1-OT2-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen. Welche Effekte diese hohe Konzentration des Transkripts in den HEK-293T-Zellen hatte, wird im Folgenden zunächst in Bezug auf die Genexpression diskutiert.

### 5.1.2. Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf die Genexpression

Lange nichtkodierende Ribonukleinsäuren (lncRNAs) können über verschiedene Mechanismen die Expression von Genen beeinflussen (Wang et al., 2008; Geisler und Coller, 2013). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die WISP1-OT2-Exposition in HEK-293T-Zellen ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von Genen hat. Aus Beobachtungen, die mittels PCR-Arrays bereits in vorausgehenden Arbeiten gemacht wurden, konnte eine Auswahl einiger zu untersuchender Gene getroffen werden (Hennemeier, 2014). Die über die Arrays identifizierten, verändert exprimierten mRNAs wurden mittels RT-PCR weiter untersucht. Dazu wurde WISP1-OT2 24 oder 48 Stunden in den Zellen überexprimiert.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass auch WISP1-OT2 einen Einfluss auf die Genexpression hat. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Dauer der Überexpression dieses Transkripts und der Expression einiger mRNAs festgestellt werden. Zum einen wurden nach 24 Stunden WISP1-OT2-Überexpression andere mRNAs in ihrer Expression beeinflusst als nach 48 Stunden und zum anderen war das Ausmaß der Expressionsänderung nach 48 Stunden stärker als nach 24 Stunden. Nach 24-stündiger Überexpression des WISP1-OT2-Transkripts ergaben sich statistisch signifikante Expressionsveränderungen um das 1,2 – 1,29-fache der mRNAs der Gene HRAS ( $\Delta\Delta Ct = -0,32$ ; -1,25-fach), TGF $\beta$  ( $\Delta\Delta Ct = -0,26$ ; -1,2-fach) im Sinne einer verringerten und für COL3A1 ( $\Delta\Delta Ct = 0,37$ ; +1,29-fach) einer vermehrten Expression. Allerdings ist zu beachten, dass die veränderte Expression zwar statistisch signifikant war (95%-Konfidenzintervall ohne Überschneidung der Nullmarke), da aber maximal eine 1,29-fache Expressionsänderung vorlag, ist ein biologischer Effekt dieser nur minimal veränderten mRNA-Gehalte eher fraglich.

Wohingegen nach 48-stündiger WISP1-OT2-Überexpression statistisch signifikant verringerte Expressionen um das 1,26 – 1,99-fache der mRNAs der Gene COL1A1 ( $\Delta\Delta Ct = -0,49$ ; -1,4-fach), FOS ( $\Delta\Delta Ct = -0,33$ ; -1,26-fach), SERPINE1 ( $\Delta\Delta Ct = -0,99$ ; -1,99-fach) und TNF ( $\Delta\Delta Ct = -0,71$ ; -1,64-fach) vorlagen.

In den WISP1-OT2-überexprimierenden Zellen wurde nach 48 Stunden im Vergleich zu den nicht überexprimierenden eine verringerte Expression der TNF-mRNA gefunden. TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin und Teil der unspezifischen humoralen Abwehr. Dessen verringerte Expression zeigt zum einen, dass die WISP1-OT2 - exprimierenden Zellen nicht mit einer gesteigerten TNF – abhängigen Abwehrreaktion auf die Überexpression der lncRNA reagieren. Zum anderen ist bekannt, dass eine verringerte Konzentration von TNF v.a. in chronischen Entzündungen, etwa durch Blockade der TNF-Synthese, einen

antiinflammatorischen Effekt hat (Popa et al., 2007). Somit ist auch ein entzündungshemmender Effekt der lncRNA WISP1-OT2 zu erwägen. Allerdings war der Effekt nach 24 Stunden Überexpression nicht signifikant und nach 48 Stunden nur schwach ausgeprägt.

Das Protein c-FOS hat eine antiinflammatorische Wirkung und dessen mRNA konnte nach 48 Stunden Überexpression der WISP1-OT2-RNA in signifikant verringerter Konzentration nachgewiesen werden. Was wiederum einen Anhalt für eine proinflammatorische Wirkkomponente des Transkripts liefert. Weiterhin kommt dem Protein c-FOS eine Bedeutung in der Krebsentstehung zu. Es ist ein Onkogen, welches in verschiedenen Tumoren vermehrt exprimiert vorliegt (Milde-Langosch, 2005). Die verringerte Konzentration der c-FOS-mRNA in den WISP1-OT2 – überexprimierenden Zellen liefert demnach keinen Hinweis auf eine proonkogene Wirkung der WISP1-OT2-lncRNA. Im Gegensatz dazu wäre bei isolierter Betrachtung der c-FOS-mRNA eine antionkogene Wirkung des Transkripts zu erwägen.

Weiterhin ist zu bedenken, dass c-FOS ebenso wie HRAS Teil von MEK/ERK-Signalwegen sind bzw. deren Expression über diese reguliert wird (Chang et al., 2003; Babu et al., 2000; McCain, 2013). Da sowohl die HRAS-mRNA (nach 24 Stunden) als auch die c-FOS-mRNA (nach 48 Stunden) nach Überexpression von WISP1-OT2 verringert detektierbar waren, lässt sich ein negativer Feedback-Mechanismus vermuten. Denn die Expression der WISP1-OT2-RNA wird über den MEK/ERK-Signalweg reguliert. Eine Überexpression dieser lncRNA führt möglicherweise zu einer Hemmung von Teilen dieses Signalweges. Beispielsweise konnte eine Inaktivierung des MEK/ERK-Signalweges durch die lncRNA MALAT1 nachgewiesen werden (Han et al., 2016).

Desweiteren wurde der Einfluss einer WISP1-OT2 Überexpression auf die Expression der TGFβ-mRNA untersucht. TGFβ ist ein profibrotisches Zytokin, welches von Makrophagen und Fibroblasten aktiviert wird. Es induziert die epitheliale-mesenchymale Transition und hemmt die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), wodurch der Kollagenumsatz dieser Enzyme verringert ist (Wang et al., 2005; Wynn, 2008).

Die TGFβ-mRNA wurde nach 24 Stunden WISP1-OT2-Überexpression geringfügig vermindert detektiert und nach 48 Stunden konnte kein Effekt auf die Expression nachgewiesen werden. Es war eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, einen möglichen Effekt der lncRNA auf die Entstehung von Fibrosen zu untersuchen. Die verminderte Expression der TGFβ-mRNA zeigt, dass keine TGFβ-vermittelte profibrotische Wirkung der WISP1-OT2-RNA vorliegt, wozu eine vermehrte Expression von TGFβ notwendig wäre. Möglicherweise liegt sogar eine antifibrotische Wirkung durch das verminderte Vorkommen dieser mRNA vor. Dieser protektive

Effekt konnte nach Inhibition von TGF $\beta$  im Nierengewebe in Kombination mit Angiotensin II-Blockade gezeigt werden (Yu et al., 2004; Petersen et al., 2008). Allerdings war in der vorliegenden Arbeit die verringerte Expression der TGF $\beta$ -mRNA nur in einem geringen Ausmaß zu beobachten.

Die Annahme der antifibrotischen Wirkung wird dadurch gestützt, dass nach 48 stündiger Überexpression der lncRNA ein signifikant verringerter Gehalt der SERPINE1-mRNA gefunden werden konnte. Diese kodiert für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I (PAI-I), dessen Gehalt in fibrotischem Gewebe erhöht vorliegt (Eddy, 2000). Wie aus Abb. 26 (S. 60) ersichtlich wird, gibt es einen Zusammenhang zwischen dem TGF $\beta$ -Gehalt, der PAI-I-Aktivität und dem Kollagen-Abbau. Liegt ein hoher Gehalt an TGF $\beta$  vor, wird die Aktivität und die Expression von PAI-I gesteigert (Kutz et al., 2006; Laiho et al., 1987). Dadurch wird das Gewebe vor proteolytischer Aktivität bewahrt und infolgedessen der Kollagen-Abbau verringert, wodurch Gewebsfibrosen begünstigt werden (Ghosh und Vaughan, 2012). Da nach WISP1-OT2-Überexpression die Gehalte der mRNAs von TGF $\beta$  und SERPINE1 (PAI-I) vermindert vorlagen, war hier eher ein gesteigerter Kollagen-Abbau durch Disinhibition (Enthemmung) der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) anzunehmen. Diese Annahme wird durch die verringerten Gehalte der Kollagene I und III nach ELISA-Untersuchung bestärkt (siehe 4.1.1.).

Allerdings konnte keine veränderte Expression der mRNAs der Matrix-Metalloproteasen (MMP-mRNAs) nachgewiesen werden. Untersucht wurden die Expression der MMP1- und der MMP13-mRNA. Für die MMP1-mRNA ergaben sich sehr große Schwankungen nach WISP1-OT2-Überexpression. Dies kann darin begründet sein, dass der Grundgehalt dieser mRNA in der verwendeten Zelllinie (HEK-293T-Zellen) eher gering war. Dieser Versuch könnte unter Verwendung von Zelllinien mit höherem Gehalt der MMP1-mRNA wiederholt werden. Weiterhin ist der geringe Gehalt dieser mRNA dadurch zu erklären, dass MMPs normalerweise nur in Vorgängen der Gewebsremodulierung exprimiert werden. Beispielsweise können sie verstärkt in der Embryonalentwicklung, der Wundheilung, während der Ossifikation aber auch in invasiv wachsenden Tumoren nachgewiesen werden (Woessner, 1991; Rundhaug, 2003).

Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, eine mögliche Bedeutung der WISP1-OT2-RNA für die Pathophysiologie von Malignomen zu untersuchen. Der soeben diskutierte Mechanismus (siehe Abb. 26) ist nicht zuletzt für die Invasivität maligner Vorgänge von Bedeutung. Denn invasives Wachstum und Metastasierung wird auch durch ein Ungleichgewicht zwischen Proteinasen und deren Inhibitoren gefördert. Anders als in Fibrosen liegt bei invasiv wachsenden Tumoren eine verstärkte Aktivität der Matrix-abbauenden Enzyme vor. Dabei kommt es zu einer Auflockerung der Zellverbände, was die Invasivität der

Krebszellen begünstigt. Im Speziellen für die im Schema (Abb. 26) dargestellten Matrix-Metalloproteasen (MMP) konnte eine Bedeutung in diesen Prozessen nachgewiesen werden (Stamenkovic, 2000). In nahezu allen menschlichen und tierischen Tumoren sowie in den meisten Tumorzelllinien können erhöhte Gehalte der MMPs gefunden werden (Coussens et al., 2002). Dass nach WISP1-OT2-Überexpression kein Effekt auf den mRNA-Gehalt von MMP1 und MMP13 detektiert wurde, schließt jedoch eine gesteigerte Aktivität dieser Matrix-abbauenden Enzyme nicht aus. Eine Enthemmung der MMPs und damit eine gesteigerte Aktivität dieser Enzyme wäre denkbar, da verminderte Gehalte der TGF- $\beta$ -mRNA und der SERPINE1-mRNA gefunden wurden (Abb. 14 und 15). Es ist zu bedenken, dass ein funktioneller Test die mögliche Induktion von MMPs und den damit verbundenen gesteigerten enzymatischen Kollagen-Abbau eher erfassen würde als die Messung des mRNA Gehalts. Beispielsweise könnte zur Messung der Aktivität der Matrixmetalloproteasen (MMP) die Zymographie verwendet werden. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, welches die Bestimmung der MMP-Aktivität über den Abbau ihrer bevorzugten Substrate ermöglicht (Hu und Beeton, 2010; Snoek-van Beurden und von den Hoff, 2005).

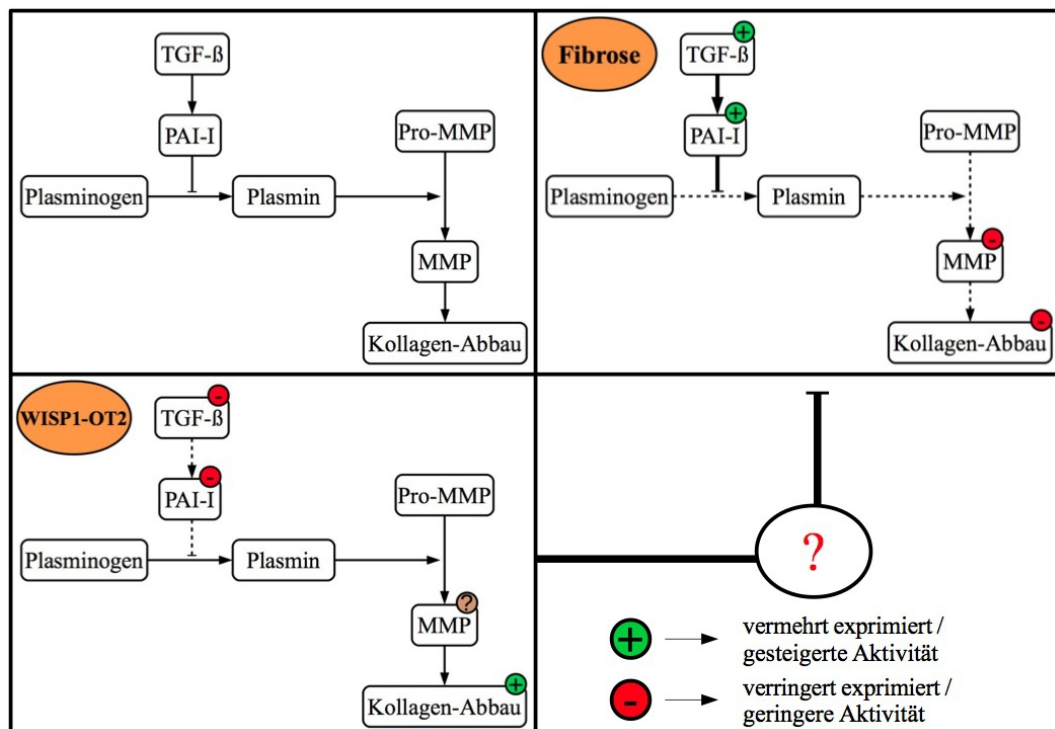


Abb. 26: Regulation des Abbaus der extrazellulären Matrix. Mögliche Wirkweise von WISP1-OT2, die zur Senkung des Kollagen-Gehalts führt (modifiziert nach Petrides, 2007).

Bei der Bestimmung der oben genannten mRNA-Gehalte zeigten sich für einige  $\Delta\Delta Ct$  – Werte sehr große Schwankungen. Das kann darin begründet sein, dass die entsprechenden mRNAs in

der verwendeten Zelllinie unter Normalbedingungen nur in sehr geringen Mengen exprimiert waren. In den Fällen, in denen bis zum 40. Zyklus kein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte, wurde ein Ct – Wert von 40 zur Berechnung des  $\Delta\Delta\text{Ct}$  – Wertes verwendet, was zu einer Unterschätzung des Effektes führt.

Beispielsweise war das Konfidenzintervall für die Expression des MGMT-Gens in den durchgeführten Versuchen sehr groß (sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden WISP1-OT2-Überexpression). Die Ct – Werte lagen sowohl in den Kontrollzellen als auch in den WISP1-OT2-überexprimierenden Zellen in einem sehr hohen Bereich ( $\geq 33$ ), was auf eine sehr geringe Expression hindeutete. In einigen Proben war die Sequenz gar nicht detektierbar. Eine Änderung der MGMT-Expression durch WISP1-OT2 – Überexpression konnte somit nicht zweifelsfrei festgestellt werden.

Insgesamt scheint die hohe WISP1-OT2-Konzentration in den Zellen bei den untersuchten Genen nur zu geringen Expressionsveränderungen geführt zu haben. Um die möglichen Funktionen oder das möglicherweise pathophysiologische Wirken dieser lncRNA innerhalb von Nierenzellen weiter zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch deren Einfluss auf die Zellvitalität ermittelt. Im Folgenden soll u.a. diskutiert werden, ob ein solcher Einfluss nachgewiesen werden konnte.

### **5.1.3. Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den intrazellulären Proteingehalt, die Apoptose- und Nekroserate**

Die Expression des WISP1-OT2-Transkripts wird durch das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) induziert (Hennemeier, 2014). Es ist beschrieben, dass sich unter der Wirkung von OTA die Apoptose- und Nekroserate v.a. in Nierenzellen verändert (Petrik et al., 2005; Schwerdt et al., 1999). Wobei die dabei beobachtete vermehrte Expression von WISP1-OT2 bereits für sich schon zu einer veränderten Vitalität führen könnte. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die Überexpression dieses Transkripts die Apoptose- und die Nekroserate von HEK-293T-Zellen beeinflusst.

Es konnte gezeigt werden, dass die WISP1-OT2-Überexpression in der verwendeten Konzentration über einen Zeitraum von 48 Stunden nicht zu einer signifikant veränderten LDH-Freisetzung oder Caspase-Aktivität führte. Daraus lässt sich schließen, dass das WISP1-OT2-überexprimierende Plasmid im Vergleich zum Leerplasmid keine erhöhte Apoptose- oder Nekroserate in den verwendeten HEK-293T-Zellen bewirkt, die Zellen somit also nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt sind. Der Einfluss auf den Gesamtproteingehalt war mit einer etwa 4-5 % -igen Erhöhung in den WISP1-OT2-überexprimierenden Zellen nur sehr gering ausgeprägt.

#### 5.1.4. Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf den Gehalt von Proteinen der extrazellulären Matrix

Die Proteine der extrazellulären Matrix werden von den Zellen produziert, sezerniert, endozytiert und letztlich abgebaut. Auf- und Abbau dieser Proteine unterliegen einem Fließgleichgewicht. Dieses ist in pathologischen Prozessen wie der Fibrosierung zugunsten des Aufbaus – vor allem von Kollagenen – verschoben. Der absolute Kollagen-Gehalt steigt dabei über längere Zeit an, was letztlich zum narbigen Umbau des Gewebes führt (Wynn, 2008; Hosper et al., 2013). Da bekannt ist, dass das WISP1-OT2 induzierende Mykotoxin Ochratoxin A Nierenfibrosen begünstigt (Gagliano et al., 2005, Schwerdt et al., 2007), sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob WISP1-OT2 Anteil am profibrotischen Wirken dieses Toxins hat. In diesem Fall wären nach Überexpression dieser lncRNA gesteigerte Gehalte einiger Proteine der extrazellulären Matrix zu erwarten.

Für die Gehalte von Kollagen IV und Fibronectin konnte kein Zusammenhang zur Expression von WISP1-OT2 festgestellt werden. Jedoch zeigten sich im Medium der überexprimierenden Zellen verminderte Gehalte von Kollagen I (Abnahme um 10,58 %) und III (Abnahme um 42,1 %). Dies spricht gegen eine Beteiligung der lncRNA WISP1-OT2 am profibrotischen Wirken von Ochratoxin A. Entsprechend den Ergebnissen der Genexpression lässt auch die verringerte Menge der Kollagene eine antifibrotische Wirkung der WISP1-OT2-RNA annehmen. Der Mechanismus, über den die WISP1-OT2-Überexpression zu verringerten Kollagen-Gehalten führt, bleibt zunächst unklar. Denkbar ist, dass es sich, zumindest im Falle von Kollagen I, um eine prätranskriptionelle Wirkung der lncRNA handelt. Denn auch die mRNA COL1A1, die für die Hauptkomponente des Kollagen I – Proteins kodiert, war nach 48 h Überexpression von WISP1-OT2 in den Zellen verringert detektierbar (siehe 4.1.2. Genexpressionsanalyse mittels *Real-Time* PCR).

Weiterhin war nach Betrachtung der Genexpression von einem gesteigerten Kollagen-Abbau entsprechend dem in Abb. 26 dargestellten Schema auszugehen. Denn die Überexpression von WISP1-OT2 hatte einen verringerten Gehalt der mRNAs von TGF $\beta$  und SERPINE1 (PAI-I) zur Folge. Dies wiederum ist mit einem vermehrten Abbau von Kollagenen durch Disinhibition Matrix-abbauender Enzyme verbunden. Einzig der nach 24 Stunden Überexpression gesteigerte mRNA-Gehalt von COL3A1 und der verringerte Kollagen III – Proteingehalt sind widersprüchlich.

Die Abb. 27 fasst schematisch die in dieser Arbeit herausgestellten Wirkungen der WISP1-OT2-RNA zusammen.

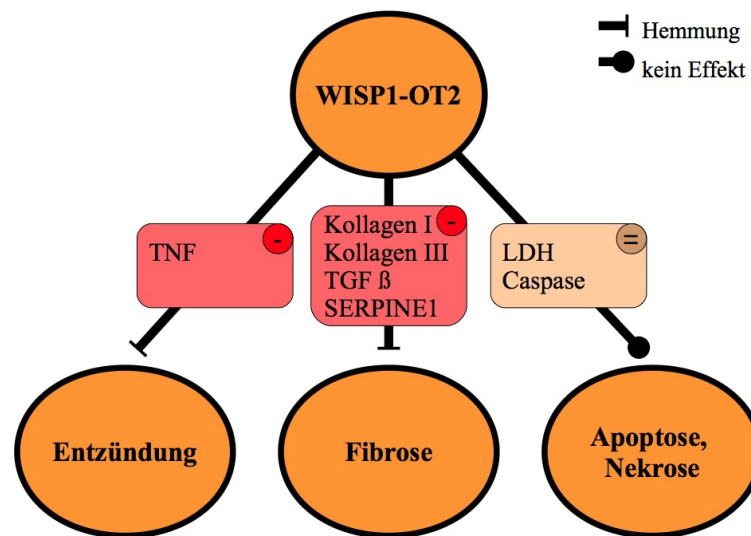


Abb. 27: Schema über die möglichen Funktionen von WISP1-OT2. Bisher konnte kein Hinweis auf eine schädigende Wirkung der WISP1-OT2-mRNA gefunden werden. Der verringerte Gehalt von TNF hätte eine Entzündungshemmende Wirkung. Ebenso würden die verringerten Kollagen I – und III – Gehalte und die Abnahme der TGFβ- und PAI-Expression (SERPINE1) sich eher antifibrotisch auswirken. Veränderungen der LDH-Freisetzung und Caspase-Aktivität wurden nicht detektiert und somit liegt kein Hinweis vor, dass WISP1-OT2 die Vitalität der Zellen beeinflusst.

### 5.1.5. WISP1-OT2, ein antifibrotischer Schutzfaktor?

Für den Fall, dass WISP1-OT2 antifibrotische Wirkungen hat und somit eine Art Schutzmechanismus der Zelle darstellt, wäre auch ein therapeutischer Nutzen dieser lncRNA denkbar. Um allerdings die genaue Bedeutung von WISP1-OT2 in fibrotischen Prozessen herauszufinden, müssten weitere Versuche unternommen werden. Beispielsweise könnte man das Voranschreiten der Fibrose nach Gabe eines profibrotischen Toxins in Zellen nach Hemmung der WISP1-OT2-Transkription mit Zellen ohne WISP1-OT2-Hemmung vergleichen. Im Falle einer antifibrotischen Wirkung dieser lncRNA sollte in den WISP1-OT2-gehemmten Zellen der Umbau schneller ablaufen. Eine Hemmung ist evtl. durch den Mechanismus der RNA-Interferenz möglich (siehe 5.2.2., S. 67 RNA-Interferenz).



## 5.2. WISP1-OT2, lncRNAs und Malignome

### 5.2.1. Detektion von WISP1-OT2 in Nierenzellkarzinomen

Wie schon im Einleitungstext beschrieben, sind einige lange nichtkodierende RNAs bekannt, deren Expression in Tumorzellen verändert vorliegt. Für einige von ihnen konnte der Nachweis erbracht werden, dass sie wesentlich an der Pathologie der Tumorentstehung beteiligt sind (Malek et al., 2014). Dabei gibt es sowohl Transkripte mit gesteigerter, als auch welche mit verringerter Expression in Tumoren.

Auch in Nierenzellkarzinomen wurde die Expression von lncRNAs untersucht. Mit dem Ergebnis, dass einige Transkripte in klarzelligen Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu gesunden Zellen verändert exprimiert sind (Malouf et al., 2014).

In einer Studie aus dem Jahr 2015 wurden 17.512 lncRNAs auf ihr Vorkommen in klarzelligen Nierenzellkarzinomen untersucht und es zeigte sich, dass 1.308 Transkripte im Vergleich zum Normalgewebe verändert exprimiert vorlagen. Dabei waren 568 Transkripte im Tumor vermehrt und 740 verringert detektierbar. Somit ließ sich das Expressionsmuster der lncRNAs im Tumorgewebe deutlich von dem im Normalgewebe unterscheiden (Blondeau et al., 2015). Die Expression von WISP1-OT2 in Tumoren ist bisher noch nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch für die Expression von WISP1-OT2 eine Assoziation zum Vorliegen von Tumorzellen wahrscheinlich ist. Es lagen 21 Zelllinien aus klarzelligen, zwei Zelllinien aus nicht definierten und zwei weitere Zelllinien aus chromophilen Nierenzellkarzinomen vor. In nahezu allen Zelllinien konnte mittels *Real-Time* PCR das Transkript WISP1-OT2 mithilfe des Intron 4 - Exon 5 – Primerpaares (siehe Tab. 23) nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in allen Zelllinien mithilfe des Primerpaares Exon 1 – Exon 2 die Expression der regulären WISP1-mRNA untersucht, die in allen untersuchten Zelllinien eher gering ausgeprägt war. Zum Vergleich wurde die Expression beider Transkripte ebenfalls in gesunden (nicht tumorösen) primären renalen proximalen Tubulusepithelzellen (RPTEC-Zellen) untersucht.

In 19 von 21 untersuchten Zelllinien aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen konnte ein höherer Gehalt der WISP1-OT2-RNA als in RPTEC-Zellen gefunden werden. Die Differenz der  $\Delta$ Ct-Werte zwischen RPTEC-Zellen und klarzelligen Nierenzellkarzinomen betrug für das WISP1-OT2-Transkript im Durchschnitt:  $\Delta\Delta$ Ct  $\bar{\emptyset} = +3$  (Berechnung siehe S. 48). Das bedeutet, dass der Gehalt von WISP1-OT2 in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen etwa 8-fach höher war als in den RPTEC-Zellen.

Der Gehalt der regulären WISP1-mRNA war hingegen in allen Zelllinien klarzelliger Nierenzellkarzinome geringer als in RPTEC-Zellen. Für die reguläre WISP1-mRNA konnte im Vergleich zu RPTEC-Zellen eine Differenz von:  $\Delta\Delta Ct \text{ Ø} = -5$  ermittelt werden. Dies entspricht einem ca. 32-fach geringerem Gehalt der regulären WISP1-RNA in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu den RPTEC-Zellen.

Im Gegensatz dazu konnten in zwei untersuchten Zelllinien aus chromophilen Nierenzellkarzinomen sowohl für die reguläre WISP1- als auch für die WISP1-OT2-RNA geringere Gehalte als in den RPTEC-Zellen detektiert werden (WISP1-OT2-RNA:  $\Delta\Delta Ct \text{ Ø} = -3,46$ ; WISP1-RNA:  $\Delta\Delta Ct \text{ Ø} = -10,4$ ). Sodass der Gehalt der WISP1-OT2-RNA in den chromophilen Nierenzellkarzinomen ca. um den Faktor 11 geringer war als in den RPTEC-Zellen und der Gehalt der regulären WISP1-RNA etwa um den Faktor 1.350.

Zum einen lässt sich somit feststellen, dass die WISP1-OT2-RNA unabhängig von der regulären WISP1-RNA exprimiert wird, was damit zu erklären wäre, dass in vorausgehenden Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die WISP1-OT2-Expression über einen alternativen Promotor erfolgt (Hennemeier, 2014). Zum anderen scheint die Expression dieser langen nichtkodierenden RNA in Nierenzellkarzinomen auch von der Art des Tumors abhängig zu sein. Weiterhin wurden von 5 Patienten mit Nierenzellkarzinomen, 2 Patienten mit Tumoren in der Nebennierenrinde und einem nicht näher klassifizierten Tumor des Nierengewebes jeweils Tumorgewebe und nichttumoröses Nierengewebe auf das Vorkommen von WISP1-OT2 untersucht. Dazu wurden mittels *Droplet Digital* PCR unter Verwendung der o.g. Primerpaare die Gehalte der WISP1-OT2-RNA und der regulären WISP1-RNA bestimmt.

In 6 von 8 Tumorgeweben war die WISP1-OT2-Expression höher als im jeweiligen Referenzgewebe (siehe 4.2.2.; Abb. 22 und 24). Anders als in den zuvor untersuchten Zelllinien (siehe oben), konnten in 7 von 8 untersuchten Tumorgeweben auch erhöhte Gehalte der regulären WISP1-RNA im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt werden. Dass sich die Effekte in den Tumor-Gewebeproben von denen in den Zelllinien unterscheiden, kann darin begründet sein, dass es sich bei Gewebe um einen Verband verschiedener Zellen handelt, während in den Zelllinien nur eine Zellart enthalten ist. So ist es denkbar, dass die erhöhten Gehalte der regulären WISP1-mRNA in den Tumorgeweben im Unterschied zu den verringerten in Tumorzelllinien durch ein erhöhtes Vorkommen von Zellen des Bindegewebes bedingt sind. Fibroblasten sind beispielsweise häufig in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe verstärkt vorhanden (Kalluri und Zeisberg, 2006).

Was die erhöhte Expression der WISP1-OT2-RNA in den Tumorzelllinien klarzelliger Nierenzellkarzinome und in den Tumor-Gewebeproben für den Pathomechanismus dieser Zellenentartungen bedeutet, bleibt zunächst unklar. Ob eine Ursachen-Wirkungs-Beziehung

zwischen dem Auftreten der Zellentartung und der Expression dieser lncRNA besteht, kann hierbei nicht geklärt werden. Geht man davon aus, dass die Expression von WISP1-OT2 mit der Zellentartung im funktionellen Zusammenhang steht, so stellt sich die Frage, welcher Art dieser Zusammenhang ist. Grundlegend kommt in Betracht, dass das Transkript an der Karzinogenese beteiligt ist (ursächlich für die Pathogenese) oder dessen Expression durch die Zellentartung gefördert wird (Produkt der Zellentartung). Bedenkt man, dass die Expression von WISP1-OT2 über den MEK/ERK-Signalweg reguliert wird, erscheint ein erhöhtes Vorkommen dieser lncRNA im Nierenzellkarzinom plausibel (Hennemeier, 2014). Denn der MEK/ERK-Signalweg zeigt in diesen, wie auch in vielen anderen Tumorzellen, eine verstärkte Aktivität. So konnten für Nierenzellkarzinome gesteigerte Aktivitäten der extrazellulär regulierten Kinase 1/2 (ERK 1/2) und der MAP-Kinase bereits nachgewiesen werden. Dadurch kommt es in den jeweiligen Zellen zu einer gesteigerten Proliferation und Zellteilung (Sharma et al., 2014). Dies wiederum spricht dafür, dass der erhöhte WISP1-OT2-Gehalt Folge der Zellentartung ist.

Auffällig war, dass in den Tumorzelllinien stets geringere Gehalte der regulären WISP1-RNA gefunden werden konnten (im Vergleich zu RPTEC-Zellen), während in den Tumorgeweben verglichen mit den Normalgeweben die reguläre WISP1-RNA überwiegend verstärkt detektierbar war, was möglicherweise durch die Zellheterogenität im Gewebe begründbar ist (siehe oben).

Somit würden die untersuchten Zelllinien eine vom regulären WISP1-Transkript unabhängige Expression der lncRNA in klarzelligen Nierenzellkarzinomen vermuten lassen. Betrachtet man hingegen die Ergebnisse aus den untersuchten Gewebeproben, so ist auch ein Zusammenhang zwischen der Expression beider Transkripte nicht auszuschließen. So wäre theoretisch denkbar, dass eine erhöhte Expression des regulären WISP1-Transkripts eine verstärkte Expression des WISP1-OT2-Abschnittes zur Folge hat. Eine erhöhte Expression von WISP1 in Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben konnte bereits in einer Vielzahl von Krebserkrankungen festgestellt werden (Gurbuz und Chiquet-Ehrismann, 2015).

Ziel weiterer Arbeiten könnte die Detektion von WISP1-OT2 und die des regulären Vollängentranskripts WISP1 in unterschiedlichen Tumoren sein. Weiterhin könnte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Malignität und der Expressionsmenge der lncRNA besteht.

Es ist anzumerken, dass für die Untersuchung der Tumorgewebeproben mittels *Droplet Digital* PCR keine geeigneten *Housekeeping*-Gene gefunden werden konnten. Diese werden eingesetzt, um mögliche artifizielle Unterschiede des RNA-Gesamt-Gehalts in den Proben zu berücksichtigen und als eventuellen Störfaktor beim Vergleich zweier Proben, in diesem Fall Tumor- und Normalgewebe, mittels RT-PCR zu eliminieren. Es zeigt sich, dass in allen

Tumorgewebeproben eine eindeutig höhere Expression der GAPDH-mRNA vorlag als in den Normalgewebeproben. Dies wurde sowohl mit der RT-PCR als auch mit der *Droplet Digital* PCR überprüft. Die Ct-Werte für die GAPDH-Primer lagen bei gleicher Menge umgeschriebener RNA (1 µg) in den Tumorgewebeproben im Durchschnitt bei  $\approx 17$  und in den Normalgewebeproben bei  $\approx 20$ . Für die 18S Primer (ribosomale RNA) ergaben sich in den Tumorgeweben Ct-Werte von  $\approx 8$  und in den Normalgeweben  $\approx 10,5$ . Daraus lässt sich ableiten, dass die Expression der hier untersuchten Gene vom Vorliegen einer malignen Zellenartung abhängig ist und sie damit nicht als sogenannte *Housekeeping*-Gene verwendet werden konnten.

### 5.2.2. LncRNA als Biomarker oder möglicher Teil der gezielten Krebstherapie?

Für eine optimale Behandlung von Krebserkrankungen sind eine frühe Diagnose und gezielte Therapie die besten Voraussetzungen. Zur Früherkennung werden für einige Tumorerkrankungen bereits Biomarker gemessen. Sie sollen als Indikatoren dienen, aus denen sich ein diagnostisches oder prognostisches Bild mit entsprechender Behandlungskonsequenz ableiten lässt.

Da lncRNAs ein zellspezifischeres Expressionsmuster aufweisen als etwa mRNAs, können sie ggf. besser zur Identifizierung der Ursprungszelle verwendet werden (Derrien et al., 2012).

Beispielsweise stellt die lncRNA lnc-ZNF180-2 potentiell einen prognostischen Biomarker bei Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen dar. Die Expression dieses Transkripts ist vor allem in fortgeschrittenen Karzinomen signifikant gesteigert. Wodurch es einen Zusammenhang zwischen dessen Expression und der Prognose der Betroffenen zu geben scheint (Ellinger et al., 2015).

Doch ein besseres Verständnis der Rolle von lncRNAs in der Tumorentstehung wäre nicht nur für die diagnostische Medizin bedeutsam, sondern könnte auch neue Ansätze für die gezielte Krebstherapie liefern (Gibb et al., 2011).

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Expression der lncRNA GAS5 in (12 untersuchten) klarzelligen Nierenzellkarzinomen signifikant reduziert vorlag im Vergleich zu angrenzendem gesunden renalen Gewebe. Nach Überexpression von GAS5 in Tumorzelllinien konnte eine Hemmung der Zellproliferation, des Zellzyklus und eine Induzierung der Apoptose nachgewiesen werden. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass die lncRNA GAS5 als Tumorsuppressor wirkt und eine verringerte Expression mit der Genese von Nierenzellkarzinomen assoziiert ist (Qiao et al., 2013).

Weiterhin sind lange nichtkodierende antisense RNAs bekannt, welche eine transkriptionelle Gen-Stillegung (*Gen-Silencing*) bewirken. Der Einfluss dieser lncRNAs auf die Genregulation

kann therapeutisch durch den Einsatz synthetischer Gegenstrang-RNAs (*antisense RNA*) sowohl gefördert als auch gehemmt werden. Einerseits kann antisense RNA verwendet werden, die die entsprechende lncRNA zum Ziel hat und damit deren Wirkung verhindert. Andererseits ist auch die direkte Bindung von nichtkodierender antisense RNA an den Ziel-Promotor möglich. Damit macht man sich den Mechanismus der lncRNA zunutze und es erfolgt eine transkriptionelle Gen-Stillegung über eine epigenetische Remodulierung. Dies ist eine Möglichkeit den epigenetischen Status einzelner Zielgene zu beeinflussen (Morris, 2009; Weinberg und Morris 2013).

Wie bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschrieben, konnten einige lange nichtkodierende RNAs gefunden werden, die in Tumorzellen verstärkt exprimiert vorliegen und den Progress der Tumorentwicklung fördern. Die gezielte Stillegung solcher lncRNAs (*targeting lncRNA*) ist derzeit (2016) ein Bestandteil der Forschung. Neben der oben beschriebenen antisense RNA ist hierfür auch die Verwendung von siRNA (*small interfering RNA*) denkbar. Dabei handelt es sich um etwa 19-30 Nukleotide umfassende ein- oder doppelsträngige Ribonukleinsäuren, welche komplementäre Sequenzen binden und auf diesem Wege hemmen können (RNA-Interferenz) (Li und Chen 2013).

Die genannten Beispiele zeigen, dass zum einen verschiedene lange nichtkodierende RNAs existieren, die im Zusammenhang mit malignen Prozessen stehen. Zum anderen wird deutlich, dass bei Kenntnis der Wirkung dieser nichtkodierenden Transkripte die technischen Möglichkeiten vorliegen, sie etwa als Biomarker für die Diagnostik und Prognoseermittlung maligner Erkrankungen und desweiteren als Angriffspunkt für gezielte Krebstherapie zu verwenden (*targeted therapy*).

In Bezug auf die lncRNA WISP1-OT2 konnte in der vorliegenden Arbeit zunächst nur gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der WISP1-OT2-Expression und dem Vorliegen klarzelliger Nierenzellkarzinome wahrscheinlich ist. Welcher Art dieser Zusammenhang ist, bleibt vorerst unklar. Die Klärung dieses Zusammenhangs könnte Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

### 5.3. Korrelation der Expression von WISP1 und WISP1-OT2

Einige lncRNAs regulieren die Expression angrenzender oder überlappender kodierender Gene (Ponting et al., 2009; Mercer et al., 2008). Dies geschieht zum Teil über alternative Promotorregionen im Sequenzabschnitt der Wirtsgene ("*hostgenes*") (Ayoubi und van de Ven et al., 1996; Martianov et al., 2007).

Es bleibt zu klären, ob ein solcher Zusammenhang auch zwischen der nichtkodierenden WISP1-OT2-lncRNA und der regulären WISP1-mRNA besteht. Die Sequenzen beider Transkripte sind überlappend. Bei Betrachtung von Abb. 20 (S. 49) ist zu erkennen, dass in nahezu allen Tumorzelllinien der Gehalt von WISP1-OT2 gegenüber RPTEC-Zellen erhöht ist, während der Gehalt des regulären WISP1-Transkripts gegenüber RPTEC-Zellen erniedrigt ist. Denkbar ist also, dass eine entgegengesetzte (indirekte) Proportionalität zwischen der regulären WISP1-Expression und der WISP1-OT2-Expression vorliegt. In diesem Fall würde die lncRNA WISP1-OT2 möglicherweise die Expression ihres Wirtsgens WISP1 inhibieren.

$$\text{WISP1-OT2} \sim \frac{1}{\text{WISP1}} ?$$

#### **5.4. Zusammenfassende Diskussion**

Zusammenfassend konnte mittels Überexpression der WISP1-OT2-RNA in HEK-293T-Zellen zum einen herausgefunden werden, dass die lncRNA in der verwendeten Konzentration (0,1 µg/cm<sup>2</sup>) die Expression einiger Gene beeinflusst. Die Expressionsveränderungen, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene, waren allerdings nicht sehr hoch. Die maximale signifikante durchschnittliche Expressionsveränderung konnte für die mRNA von SERPINE1 um den Faktor 1,99 festgestellt werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass nach WISP1-OT2-Überexpression die Gehalte der Proteine Kollagen I und Kollagen III vermindert vorlagen. Weiterhin lag bei den überexprimierenden Zellen nach 48 Stunden keine veränderte Vitalität vor. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liegt kein Hinweis auf eine Mitwirkung der WISP1-OT2-lncRNA an Pathomechanismen von Fibrosen oder Entzündungen vor.

Durch die Bestimmung der RNA-Expressionsniveaus in Zelllinien von Nierenzellkarzinomen konnten erhöhte Gehalte der WISP1-OT2-lncRNA vor allem in Zelllinien klarzelliger Nierenzellkarzinome im Vergleich zu primären renalen proximalen Tubuluszellen gefunden werden. Welche Bedeutung dieses Transkript in den Tumoren hat, konnte durch die vorliegende Arbeit nicht geklärt werden. Es ist denkbar, dass sie an der Entstehung der Tumoren beteiligt ist oder die erhöhte Expression ein Produkt der malignen Zellenartung ist. Möglicherweise handelt es sich bei WISP1-OT2 um einen potenziellen diagnostischen Biomarker oder gar einen Angriffspunkt für therapeutische Verfahren. Nicht zuletzt dieser Ausblick begründet weitere Untersuchungen zur Funktion von WISP1-OT2.

## 6. Zusammenfassung

In summary it could be shown, that there is some impact of WISP1-OT2-overexpression on gene expression. After 24 hours of WISP1-OT2-overexpression in HEK-293T-cells a 1.29 times higher amount of COL3A1, a 1.25 times lower HRAS and a 1.2 times lower amount of TGFβ could be determined. Furthermore, we detected a reduced expression of COL1A1 (1.4 times), FOS (1.26 times), SERPINE1 (1.99 times) and TNF (1.64 times) after 48 hours WISP1-OT2-overexpression. By measuring the enzyme activity of LDH and Caspase no effect on cell vitality was observed. Overexpression of WISP1-OT2 showed some effects on the amounts of collagen I (10.6 % lower) and collagen III (42.1 % lower).

But the exact mechanisms are still unknown. Furthermore, there seems to be a correlation of cancer and WISP1-OT2 expression. In clear cell renal cell carcinoma an increased expression of these lncRNA was detectable. This begs the question, whether it acts in the onset of carcinogenic events or its expression is promoted by cancer.

WISP1-OT2 – eine neue lange nichtkodierende Ribonukleinsäure. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die WISP1-OT2-Überexpression einige Einflüsse auf die Genexpression hat. Nach 24 stündiger Überexpression konnten in HEK-293T-Zellen eine 1,29-fach höhere COL3A1 Expression, eine 1,25-fach niedrigere HRAS- und eine 1,2-fach niedrigere TGFβ-Expression gefunden werden. Die 48 stündige Überexpression der lncRNA hatte 1,4-fach verringerte COL1A1-, 1,26-fach verringerte FOS-, 1,99-fach verringerte SERPINE1- und 1,64-fach verringerte TNF-Gehalte zur Folge. Mittels Messung der LDH- und Caspase-Aktivitäten konnten kein Einfluss der WISP1-OT2-Überexpression auf die Zellvitalität beobachtet werden. Jedoch konnten nach 48-stündiger Überexpression des Transkripts um 10,58 % verringerte Gehalte von Kollagen I und um 42,1 % verringerte Gehalte von Kollagen III gefunden werden. Weiterhin scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Krebserkrankungen und der Expression von WISP1-OT2 zu geben. In 19 von 21 untersuchten Zelllinien klarzelliger Nierenzellkarzinome konnte eine gesteigerte Expression dieser langen nichtkodierenden RNA nachgewiesen werden. Dieser Effekt lies sich bisher nur in Zelllinien feststellen. In Gewebeproben klarzelliger Nierenzellkarzinome war er nur teilweise reproduzierbar. Es stellt sich die Frage nach einer Ursachen-Wirkungs-Beziehung. Möglicherweise ist die gesteigerte Expression von WISP1-OT2 eine Folge oder sie gehört zu den Ursachen maligner Zellentartungen.



**7. Literaturverzeichnis**

Ayoubi TAY, van de Ven WJM (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J* 10:453–460.

Babu GJ, Lalli MJ, Sussman MA, Sadoshima J, Periasamy M (2000): Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiology* 32 (8):1447–1457.

Berschneider B, Königshoff M (2011) WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1): a novel mediator linking development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 43 (3):306–309.

Blondeau JJ, Deng M, Syring I, Schrödter S, Schmidt D, Perner S, Müller SC, Ellinger J (2015) Identification of novel long non-coding RNAs in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Epigenetics* 7 (1):10.

Carell T, Brandmayr C, Hienzsch A, Müller M, Pearson D, Reiter V, Thoma I, Thumbs P, Wagner M (2012) Struktur und Funktion nicht-kanonischer Nukleobasen. *Angew. Chem.* 124 (29):7220–7242.

Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003) Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17 (3):590–603.

Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, Dinger ME (2013) Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *Br J Cancer* 108 (12):2419–2425.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54(4):541-552

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations. *Science* 295:2387-2393

Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis, Carrie A, Shiekhhattar R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R (2012) The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 22 (9):1775–1789.

Dinger ME, Pang KC, Mercer TR, Mattick JS (2008) Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. *PLoS Comput Biol* 4 (11):1-5.

Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo OJ, Park E, Persaud K, Preall JB, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See LH, Shahab A, Skancke J, Suzuki AM, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang H, Wrobel J, Yu Y, Ruan X, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis SE, Hannon G, Giddings MC, Ruan Y, Wold B, Carninci P, Guigó R, Gingeras TR (2012): Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489:101–108.

Eddy AA (2000) Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15:290–301.

Ellinger J, Alam J, Rothenburg J, Deng M, Schmidt D, Syring I, Herdis M, Perner S, Müller SC (2015) The long non-coding RNA lnc-ZNF180-2 is a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res* 5(9):2799–2807.

Ellis BC, Graham LD, Molloy PL (2014) CRNDE, a long non-coding RNA responsive to insulin/IGF signaling, regulates genes involved in central metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1843(2):372–386.

Ensembl, WISP1, [http://uswest.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000104415;r=8:133191039-133230344](http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000104415;r=8:133191039-133230344), letzter Abruf: 25.08.2016

Gagliano N, Torri C, Donetti E, Grizzi F, Costa F, Bertelli AAE, Migliori M, Filippi C, Bedoni M, Panichi V, Giovannini L, Gioia M (2005) Ochratoxin A-induced renal cortex fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition: molecular mechanisms of ochratoxin A-injury and potential effects of red wine. *Mol Med* 11(1-12):30–38.

Geisler S, Collier J (2013) RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(11):699–712.

Gekle M, Sauvant C, Schwerdt G (2005) Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. *Mol Nutr Food Res* 49(2):118–130.

GeneCards, CDKN2A Gene, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN2A>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, COL1A1 Gene, Collagen Type I Alpha 1, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL1A1>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, COL3A1 Gene, Collagen Type III Alpha 1, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COL3A1>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, FOS Gene, FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOS>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, HRAS Gene, Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HRAS>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, MGMT Gene, O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGMT>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, MLH1 Gene, MutL Homolog 1, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MLH1>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, MMP13 Gene, Matrix Metallopeptidase 13, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP13>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, STK11 Gene, Serine/Threonine Kinase 11, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STK11>, letzter Abruf: 04.07.2016

GeneCards, TGFBI Gene, Transforming Growth Factor Beta 1, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFBI>, letzter Abruf: 04.07.2016

Germ. Cancer Res. Center, Long Non-coding RNA in Cancer, <https://www.dkfz.de/en/molekulare-rna-biologie/projects.html>, letzter Abruf: 24.07.2016

Ghosh AK, Vaughan DE (2012) PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 227(2): 493–507.

Gibb EA, Vucic EA, Enfield KS S, Stewart GL, Lonergan KM, Kennett JY, Becker-Santos DD, MacAulay CE, Lam S, Brown CJ, Lam WL (2011) Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLoS One* 6 (10):1-10 e25915.

Gurbuz I, Chiquet-Ehrismann R (2015) CCN4/WISP1 (WNT1 inducible signaling pathway protein 1): a focus on its role in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 62:142–146.

Han Y, Wu Z, Wu T, Huang Y, Cheng Z, Li X, Sun T, Xie X, Zhou Y, Du Z (2016) Tumor-suppressive function of long noncoding RNA MALAT1 in glioma cells by downregulation of MMP2 and inactivation of ERK/MAPK signaling. *Cell Death Dis* 7:e2123.

- Hehlgans T, Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115(1):1–20.
- Hennemeier, I (2014): Molekulare Grundlagen der nephropathischen Wirkung von Ochratoxin A. Halle, Univ., Naturwissenschaftliche Fakultät I, Diss.
- Hennemeier I, Humpf HU, Gekle M, Schwerdt G (2012) The food contaminant and nephrotoxin ochratoxin A enhances Wnt1 inducible signaling protein 1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in human primary proximal tubule cells. *Mol Nutr Food Res* 56 (9):1375–1384.
- Hosper NA, van den Berg PP, de Rond S, Popa ER, Wilmer MJ, Masereeuw R, Bank RA (2013) Epithelial-to-mesenchymal transition in fibrosis: collagen type I expression is highly upregulated after EMT, but does not contribute to collagen deposition. *Exp Cell Res* 319 (19): 3000–3009.
- Hu X, Beeton C (2010) Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *J Vis Exp* 45:1-4.
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6):1420–1428.
- Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nature* 6:392-401.
- Kanugula S, Pegg AE (2001) Novel DNA repair alkyltransferase from *Caenorhabditis elegans*. *Environ Mol Mutagen* 38(2-3):235–243.
- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR (2007) RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science* 316(5830):1481–1484.
- Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Tsunematsu T, Kondo T, Subarnbhesaj A, Deraz EM, Siriwardena SB, Tahara H, Ishimaru N, Ogawa I, Takata T (2012) Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 287(46):38716–38728.
- Kung JT, Colognori D, Lee JT (2013) Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 193(3):651–669.
- Kutz SM, Higgins CE, Samarakoon R, Higgins SP, Allen RR, Qi L, Higgins PJ (2006) TGF- $\beta$  1-induced PAI-1 expression is E box/USF-dependent and requires EGFR signaling. *Exp Cell Res* 312(7):1093–1105.

Laiho M, Saksela O, Keski-Oja J (1987) Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *J Biol Chem* 262(36):17467–17474.

Li CH, Chen Y (2013) Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. *Int J Biochem Cell Biol* 45(8):1895–1910.

Li JP, Liu LH, Li J, Chen Y, Jiang XW, Ouyang YR, Liu YQ, Zhong H, Li H, Xiao T (2013): Microarray expression profile of long noncoding RNAs in human osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 433(2):200–206.

LNCipedia, <http://www.lncipedia.org>, letzter Abruf: 25.05.2016

Maass PG (2014) Lange nichtkodierende RNA (lncRNA). *Medgen* 26(1):5–10.

Malek E, Jagannathan S, Driscoll JJ (2014) Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer. *Oncotarget* 5(18):8027–8038.

Malouf GG, Zhang J, Yuan Y, Comp erat E, Roupr et M, Cussenot O, Chen Y, Thompson EJ, Tannir NM, Weinstein JN, Valero V, Khayat D, Spano JP, Su X (2015): Characterization of long non-coding RNA transcriptome in clear-cell renal cell carcinoma by next-generation deep sequencing. *Mol Oncol* 9(1):32–43.

Mariner PD, Walters RD, Espinoza CA, Drullinger LF, Wagner SD, Kugel JF, Goodrich JA (2008) Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol Cell* 29(4):499–509.

Martens-Uzunova ES, B ttcher R, Croce CM, Jenster G, Visakorpi T, Calin GA (2014) Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer. *Eur Urol* 65(6):1140–1151.

Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A (2007) Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445(7128):666–670.

Mattick JS (2001) Noncoding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep* 2(11):986–991.

Mattick JS (2004a) RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* 5:316–323.

Mattick JS (2004b) The Hidden Genetic Program of Complex Organisms. *Sci Am* 291(4):60-67.

McCain J (2012) The MAPK (ERK) Pathway Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T* 38(2):96–108.

Mercer TR, Dinger ME, Sunkin SM, Mehler MF, Mattick JS (2008) Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:716–721.

Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* 41(16):2449–2461.

Morris KV (2009) RNA-directed transcriptional gene silencing and activation in human cells. *Oligonucleotides* 19(4):299–306.

Munroe SH, Lazar MA (1991) Inhibition of c-erbA mRNA splicing by naturally occurring antisense RNA. *J Biol Chem* (266):22083–22086.

NCBI, TNF Tumor Necrosis Factor (Homo sapiens), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>, letzter Abruf: 04.07.2016

Nizze H, Kerjaschki D, Moch H: Nierenzellkarzinome. In Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg): *Pathologie*, 3. Auflage, Urban & Fischer, 2004:2060-2924

Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, Brush J, Taneyhill LA, Deuel B, Lew M, Watanabe C, Cohen RL, Melhem MF, Finley GG, Quirke P, Goddard AD, Hillan KJ, Gurney AL, Botstein D, Levine AJ (1998) WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in Wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14717–14722.

Pennisi E (2012) ENCODE Project Writes Eulogy For Junk DNA. *Science* 337:1159–1161.

Petersen M, Thorikay M, Deckers M, van Dinther M, Grygielko ET, Gellibert F, de Gouville AC, Huet S, ten Dijke P, Laping NJ (2008) Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int* 73(6):705–715.

Petrides PE: Tumorgewebe. In Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg): *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer, 2007:1142-1162

Petrik J, Malić A, Barišić K, Rumora L, Kőszegi T, Pepeljnjak S, Žanić-Grubišić T, Čepelak I (2005) Ochratoxin A Induces Apoptotic and Necrotic Renal Cell Death. *Croat Chem Acta* 78:447–453.

- Pilyugin M, Irminger-Finger I (2014) Long non-coding RNA and microRNAs might act in regulating the expression of BARD1 mRNAs. *Int J Biochem Cell Biol* 54:356–367.
- Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP (2010) A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465(7301):1033–1038.
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009) Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* 136:629–641.
- Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF (2007) The role of TNF- in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 48(4):751–762.
- Qiao HP, Gao WS, Huo JX, Yang ZS (2013) Long Non-coding RNA GAS5 Functions as a Tumor Suppressor in Renal Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(2):1077–1082.
- Ravasi T, Suzuki H, Pang KC, Katayama S, Furuno M, Okunishi R, Fukuda S, Ru K, Frith MC, Gongora MM, Grimmond SM, Hume DA, Hayashizaki Y, Mattick JS (2006) Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. *Genome Res* 16(1):11–19.
- Redon S, Reichenbach P, Lingner J (2010) The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 38(17):5797–5806.
- Rinn JL, Chang HY (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 81:145–166.
- Rundhaug JE (2003) Matrix Metalloproteinases, Angiogenesis, and Cancer. *Biol Behind* 9:551–554.
- Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, Kropp S, Mittelstrass K, Timofeeva M, Wölke G, Steinwachs A, Scheiner D, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Dienemann H; LUCY-Consortium, Chang-Claude J, Illig T, Wichmann HE, Bickeböller H, Risch A (2008) Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (5):1127–1135.
- Sauvant C, Holzinger H, Gekle M (2005) The Nephrotoxin Ochratoxin A Induces Key Parameters of Chronic Interstitial Nephropathy in Renal Proximal Tubular Cells. *Cell Physiol Biochem* 15(1-4):125–134.

Schmidt L H, Spieker T, Koschmieder S, Humberg J, Jungen D, Bulk E, Hascher A, Wittmer D, Marra A, Hillejan L, Wiebe K, Berdel WE, Wiewrodt R, Muller-Tidow C (2011) The Long Noncoding MALAT-1 RNA Indicates a Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer and Induces Migration and Tumor Growth. *J Thorac Oncol* 6(12):1984–1992.

Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S, Gekle M (1999) The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol and Toxicol* 15(6):405–415.

Schwerdt G, Holzinger H, Sauvant C, Königs M, Humpf HU, Gekle M (2007) Long-term effects of ochratoxin A on fibrosis and cell death in human proximal tubule or fibroblast cells in primary culture. *Toxicology* 232(1-2):57–67.

Sharma U, Pal D, Prasad R (2014) A novel role of alkaline phosphatase in the ERK1/2 dephosphorylation in renal cell carcinoma cell lines: A new plausible therapeutic target. *Biochimie* 107 Pt B:406-409.

Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 38(1):73–83.

Stamenkovic I (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10(6):415–433.

Thieffry D, Sarkar S (1998) Forty years under the central dogma. *TIBS* 23(8):312-316

Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA, Blencowe BJ, Prasanth SG, Prasanth KV (2010) The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* 39(6):925–938.

Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK, Kurokawa R (2008) Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 454(7200):126–130.

Wang W, Koka V, Lan HY (2005) Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology* 10(1):48–56.

Weinberg MS, Morris KV (2013) Long non-coding RNA targeting and transcriptional repression. *Nucleic Acid Ther* 23(1):9–14.

Wienholds E, Plasterk RH (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579(26):5911–5922.



Woessner JF Jr (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5(8):2145–2154.

Wright MW (2014) A short guide to long non-coding RNA gene nomenclature. *Hum Genomics* 8:7.

Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214(2):199–210.

Yang F, Bi J, Xue X, Zheng L, Zhi K, Hua J, Fang G (2012) Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS J* 279(17):3159–3165.

Yang L, Zhang J, Jiang A, Liu Q, Li C, Yang C, Xiu J (2015) Expression profile of long non-coding RNAs is altered in endometrial cancer. *Int J Clin Exp Med* 8(4):5010–5021.

Yu L, Border W A, Anderson I, Mc Court M, Huang Y (2004) Combining TGF-beta inhibition and angiotensin II blockade results in enhanced antifibrotic effect. *Kidney Int* 66(5):1774–1784.

**8. Thesen**

- 1.) Die lange nichtkodierende Ribonukleinsäure WISP1-OT2 ist in einem geringen Ausmaß an der Regulation der Expression einiger Gene beteiligt.
- 2.) Eine verstärkte Expression der langen nichtkodierenden Ribonukleinsäure WISP1-OT2 in humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK-293T-Zellen) hat keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.
- 3.) Die verstärkte Expression der langen nichtkodierenden Ribonukleinsäure WISP1-OT2 in humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK-293T-Zellen) hat einen verringerten Gehalt einiger Kollagene zur Folge. Anders als das WISP1-OT2 induzierende Ochratoxin A scheint die Expression der lncRNA WISP1-OT2 eher einen antifibrotischen Effekt zu haben.
- 4.) Die verstärkte Expression der langen nichtkodierenden Ribonukleinsäure WISP1-OT2 in humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK-293T-Zellen) hat einen verringerten Gehalt der TNF-mRNA zur Folge. Im Gegensatz zum WISP1-OT2 induzierenden Mykotoxin Ochratoxin A scheint die Expression der lncRNA WISP1-OT2 keine TNF-vermittelte proinflammatorische Wirkung auf die Zellen zu haben.
- 5.) Die lange nichtkodierende Ribonukleinsäure WISP1-OT2 stellt möglicherweise einen potenziellen Biomarker für die Diagnostik von malignen Tumorerkrankungen dar.
- 6.) Die verstärkte Expression der langen nichtkodierenden Ribonukleinsäure WISP1-OT2 begünstigt möglicherweise das invasive Wachstum maligner Tumoren durch Auflockerung der extrazellulären Matrix.

**Eidesstaatliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich gemäß §5 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Zur Durchführung der Arbeit und zur Erstellung der Dissertationsschrift wurden nur die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Aussagen und Gedanken wurden in der Dissertationsschrift als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit auch, dass die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

\_\_\_\_\_  
Sandro Dittmar

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

**Erklärung über vorausgegangene Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

\_\_\_\_\_  
Sandro Dittmar

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

**Sandro Dittmar**

Weidenplan 20

06108 Halle

Tel.: 0162/9425448

E-Mail: s.dittmar.med@gmail.com



**Lebenslauf**

**Persönliche Daten**

geboren am	18.08.1990 in Gardelegen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Wohnort	06108 Halle (Saale)

---

**Schulische Ausbildung und Studium**

1997 - 2001	"Astrid-Lindgren"-Grundschule, Kalbe (Milde)
2001 - 2003	"Johann-Friedrich-Danneil"-Realschule, Kalbe (Milde)
2003 - 2009	"Geschwister-Scholl"-Gymnasium, Gardelegen, Erwerb der Hochschulreife (Abitur)
2010	"Martin-Luther-Universität", Halle (Saale), Studium der Humanmedizin
2012	Bestehen des ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
2015	Bestehen des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

---

**Sprachkenntnisse**

Deutsch Muttersprache  
Englisch in Wort und Schrift  
Russisch Grundkenntnisse

---

**Forschung und Promotion**

seit 2013	Beginn der Promotion am "Julius-Bernstein-Institut für Physiologie" in Halle (Saale) bei Prof. Dr. med. Michael Gekle und PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt
2015	Teilnahme am Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Posterpräsentation: "Function and cell-specific abundance of a new long non-coding RNA, WISP1-OT2"

---

**Wettbewerbe**

2006	Teilnahme am Businessplanwettbewerb (" <i>futurego</i> ") in Halle (Saale)
2007	Teilnahme am "Planspiel Börse" der "Sparkasse Altmark-West" (Abschluss: 3. Platz)
2008	Teilnahme am "Planspiel Börse" der "Sparkasse Altmark-West" (Abschluss: 1. Platz)

---

**Zusätzliche Qualifikationen und Tätigkeiten**

2007	Erwerb des Führerscheins (Klasse B)
2008 - 2009	Tätigkeit als Schwimmaufseher in der "MEDIAN Klinik" in Kalbe (Milde)
7/2009 - 3/2010	Zivildienstleistender im "Altmark-Klinikum" in Gardelegen
4/2010 - 8/2010	Anstellung als Transportpflegekraft im "Altmark-Klinikum" in Gardelegen
2014	Tätigkeit als Tutor für Physiologie am "Julius-Bernstein-Institut für Physiologie" in Halle (Saale)

---

2016	Teilnahme am Studentenkurs Sonographie Abdomen/Retroperitoneum/Schilddrüse der "DEGUM"
------	--

---

**Sonstiges**

Hobbys/Freizeitbeschäftigung	Gitarre spielen, Sport treiben, Lesen
Interessen	Politik, Geschichte, Wirtschaft, Naturwissenschaften

Halle (Saale), den 28.08.2016

Meinem Vater

**Heiko Dittmar**  
(\*12.12.1963 †29.07.2005)

**Danksagung**

Ich danke all denen, die mit ihrer Unterstützung die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt für die stetige professionelle Unterstützung im Bereich der Laborarbeit und für eine besonders hilfreiche und unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Desweiteren gilt Frau Dr. rer. nat. Isabell Hennemeier ein besonderer Dank für die professionelle und unermüdliche Einführung in zahlreiche Methoden der Laborarbeit und der wissenschaftlichen Auswertung erhobener Daten. Sie schuf mit Ihrer Arbeit die Grundlage für die hier vorliegende Dissertation.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die überaus hilfreiche Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Ich bedanke mich bei Frau Sindy Rabe für die Isolation von Ribonukleinsäuren aus Gewebeproben.

Weiterhin gilt ein großer Dank allen Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie. Es herrschte ein überaus großzügiges Arbeitsklima und sämtliche Mitarbeiter standen mir unterstützend zur Seite.

Ich danke Frau Prof. med. habil. Dr. rer. nat. Barbara Seliger und Frau Dipl.-Biol. Sandra Leisz für die Zurverfügungstellung von Ribonukleinsäuren aus Tumorzelllinien.

Ein großer Dank gilt auch der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) für die Zurverfügungstellung verschiedener Nierengewebeproben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meiner Partnerin und meinen Freunden, da sie in allen Lebenslagen für mich da sind.