

# **Einfluss der Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 auf die Hepatokarzinogenese**

*Inaugural-Dissertation*

*zur*

*Erlangung des Doktorgrades*

*Dr. rer. nat.*

*der Fakultät für*

*Biologie*

*an der*

*Universität Duisburg-Essen*

*vorgelegt von*

*Natalie Vogel*

*aus Pawlodar, Kasachstan*

*Mai 2021*

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub

universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/74846

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230726-080413-0

Alle Rechte vorbehalten.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden an der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie sowie in enger Kooperation mit dem Institut für Anatomie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Kerstin Herzer
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2021

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese .....	3
1.1.3	Diagnose, Therapieoptionen und Prognose.....	5
1.1.4	Molekulare Hepatokarzinogenese.....	9
1.2	Tumorsuppressorproteine .....	13
1.2.1	PML .....	13
1.2.2	RASSF6.....	15
1.2.3	NLRP12 .....	16
1.2.4	Zielsetzung der Arbeit .....	18
2	Material .....	19
2.1	Geräte .....	19
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3	Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien .....	23
2.4	Puffer und Lösungen .....	24
2.5	Enzyme .....	25
2.6	Antikörper .....	25
2.7	Kompetente Zellen .....	25
2.8	Vektoren .....	26
2.9	Zelllinien .....	26
2.10	Kits .....	26
2.11	Assays.....	27
3	Methoden .....	28
3.1	Zellkulturmodell .....	28

3.1.1	Verwendete Hepatomzelllinien und deren Kultivierung.....	28
3.1.2	Die Zellzahlbestimmung der Hepatomzelllinien .....	28
3.2	CRISPR/Cas9 .....	29
3.2.1	Oligodimerisierung und Phosphorylierung .....	30
3.2.2	Klonierung.....	31
3.2.3	Transformation in <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	32
3.2.4	Plasmidisolierung.....	32
3.2.5	Sequenzen des Exon 1 in PML, RASSF6 und NLRP12 .....	33
3.3	Stabile Transfektion von Hepatomzelllinien mit sgRNA: heterozygoter PML, RASSF6, NLRP12 <i>knockout</i> .....	38
3.3.1	Isolierung einzelner transfizierter Klone .....	38
3.3.2	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	39
3.4	DNA Isolation aus der Zellkultur .....	39
3.5	Genotypisierung .....	40
3.6	Gesamt-Protein-Isolation und Analyse aus der Zellkultur.....	41
3.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
3.6.2	SDS-PAGE und Western Blot.....	42
3.7	Isolation und Analyse von Nukleinsäuren.....	44
3.7.1	RNA Isolation aus der Zellkultur.....	44
3.7.2	Quantitative Real-time PCR.....	44
3.8	Einfluss eines heterozygoten <i>knockouts</i> von PML, RASSF6 oder NLRP12 auf Zellproliferation und Apoptose.....	47
3.8.1	Zellproliferation via BrdU Assay .....	47
3.8.2	Apoptose der Zellen via Caspase-3/7 Assay .....	48
3.9	CAM Assay.....	48
3.9.1	Vorbereitung der Zellen .....	49
3.9.2	Hühnchen Graft am Embryonaltag 10.....	50
3.9.3	Präparation der Tumore am Embryonaltag 17 .....	50

3.9.4	Bestimmung des Einflusses von PML, RASSF6 und NLRP12 auf TumorgroÙe und Gewicht .....	51
3.9.5	Bestimmung der RNA Expression von PML, RASSF6 und NLRP12 in den Tumoren im CAM Modell .....	51
3.10	Statistische Auswertung .....	52
3.10.1	Statistische Auswertung von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Analysen.....	52
4	Ergebnisse .....	53
4.1	Heterozygoter <i>knockout</i> .....	53
4.1.1	Relative RNA Expression von PML.....	53
4.1.2	Relative RNA Expression von RASSF6.....	55
4.1.3	Relative RNA Expression von NLRP12 .....	56
4.1.4	Proteinexpression von PML .....	57
4.1.5	Proteinexpression von RASSF6.....	58
4.1.6	Proteinexpression von NLRP12 .....	59
4.2	Die Rolle von PML in der Hepatokarzinogenese .....	60
4.2.1	Der Einfluss von PML auf die Proliferation von Hepatomzellen .....	60
4.2.2	Der Einfluss von PML auf die Apoptose von Hepatomzellen .....	61
4.2.3	Der Einfluss von PML auf das Tumorwachstum des HCCs im CAM Modell	64
4.3	Die Rolle von RASSF6 in der Hepatokarzinogenese.....	71
4.3.1	Der Einfluss von RASSF6 auf die Proliferation von Hepatomzellen.....	71
4.3.2	Der Einfluss von RASSF6 auf die Apoptose von Hepatomzellen .....	72
4.3.3	Der Einfluss von RASSF6 auf das Tumorwachstum des HCC's im CAM Modell	75
4.4	Die Rolle von NLRP12 in der Hepatokarzinogenese .....	82
4.4.1	Der Einfluss von NLRP12 auf die Proliferation von Hepatomzellen .....	82
4.4.2	Der Einfluss von NLRP12 auf die Apoptose von Hepatomzellen .....	83
4.4.3	Der Einfluss von NLRP12 auf das Tumorwachstum des HCC's im CAM Modell	86

5	Diskussion.....	94
5.1	Positiver Einfluss von PML auf die HCC Tumorentwicklung.....	95
5.2	Die HCC Tumorentwicklung wird von einem heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> bei p53 Dysfunktion positiv beeinflusst .....	97
5.3	Positiver Einfluss eines heterozygoten NLRP12 <i>knockouts</i> auf die HCC Tumorentwicklung bei p53 Dysfunktion.....	99
5.4	Unterschiede in den Ergebnissen in den Hepatomzelllinien Huh7 und HepG2 101	
5.5	Die PML, RASSF6 und NLRP12 Expression in den im CAM Modell entstandenen Tumoren .....	101
6	Ausblick.....	103
7	Zusammenfassung.....	104
8	Summary.....	105
9	Literaturverzeichnis .....	106
10	Anhang .....	119
10.1	Plasmidkarten der synthetischen pX461_nuc und pSPgRNA Vektoren ....	119
10.2	sgRNAs für CRISPR/Cas9 .....	120
10.3	Abkürzungsverzeichnis.....	123
10.4	Abbildungsverzeichnis.....	126
10.5	Tabellenverzeichnis.....	129
10.6	Formeln .....	130
11	Wissenschaftliche Veröffentlichungen .....	131
11.1	Publikationen.....	131
11.2	Poster und Abstracts .....	131
11.3	Vorträge.....	132
12	Lebenslauf .....	134
13	Danksagung.....	136
14	Erklärungen .....	137
	Erklärungen .....	137



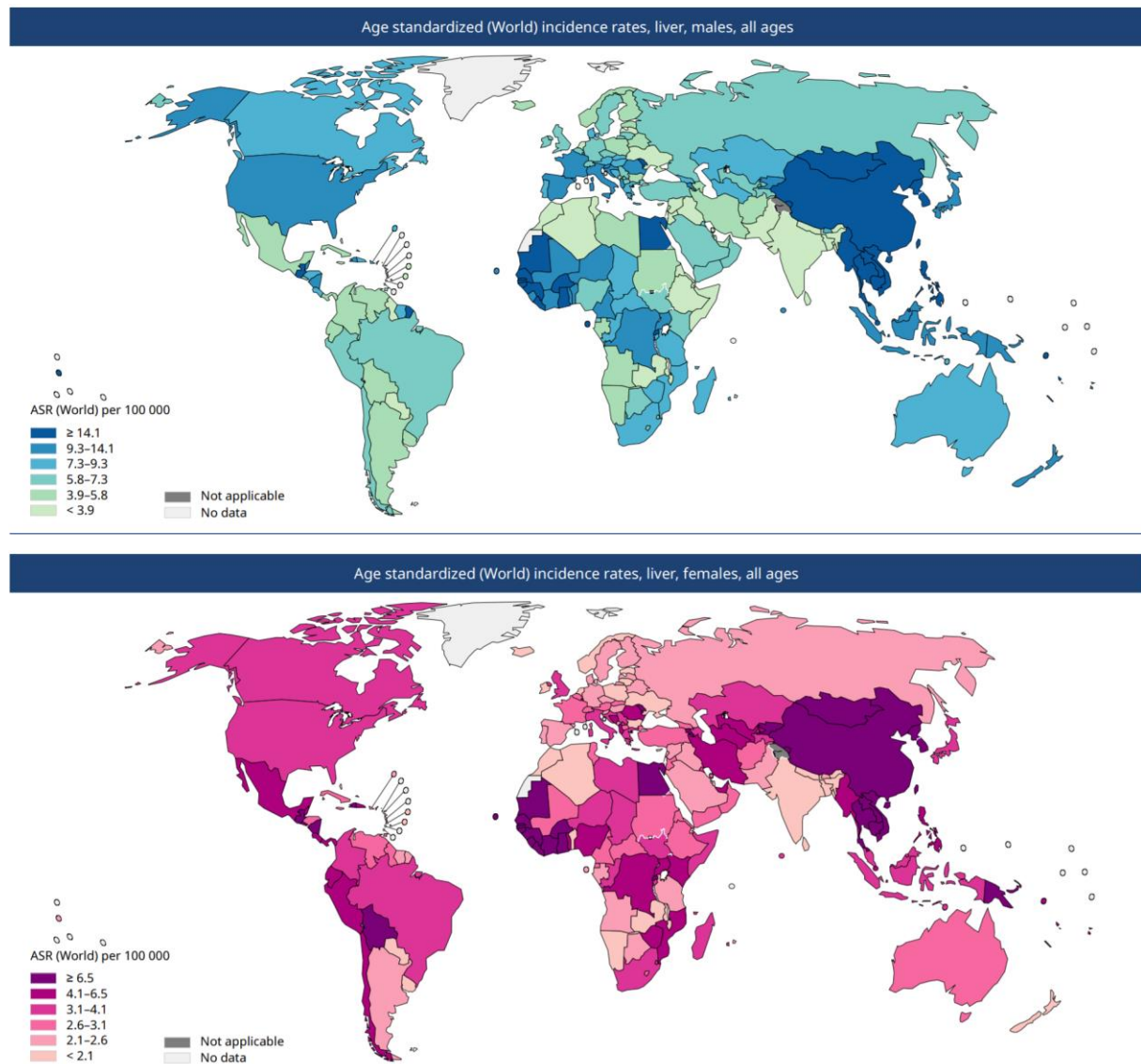


## **1 Einleitung**

### **1.1 Das hepatozelluläre Karzinom**

#### **1.1.1 Epidemiologie**

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit die häufigste primäre Lebermalignität und die zweithäufigste Ursache onkologisch-bedingter Mortalität (Ferrin *et al.*, 2020; Refolo *et al.*, 2020). Weltweit ist es eine der sechs häufigsten Tumorerkrankungen und tritt am häufigsten bei Männern auf (siehe Abbildung 1). Hinsichtlich der Inzidenz sind geografische Unterschiede zu beobachten, am häufigsten ist das HCC in Ostasien und Ostafrika, weniger häufig kommt es in Süd-, Mittel- und Westasien vor. Zudem war ein Anstieg der HCC Inzidenz zu beobachten (Pinato *et al.*, 2020) und die Anzahl der Neuerkrankungen betrug im Jahr 2018 841.080 Fälle (Globocan 2018).



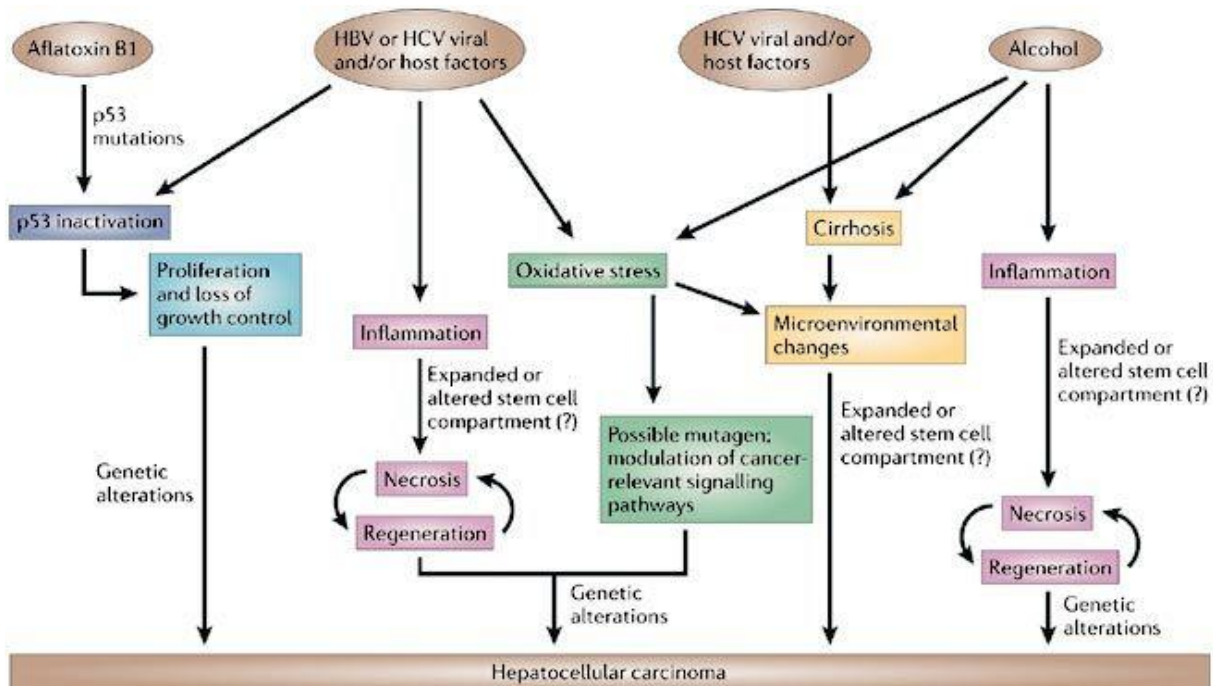
**Abbildung 1: Weltweite Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms pro 100.000 Einwohner.**

Abbildung wurde übernommen aus GLOBOCAN 2018- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2018.

Risikofaktoren, die zu einer Hepatokarzinogenese führen, sind unter anderem eine chronische Infektion mit einem Hepatitis B Virus (HBV) oder Hepatitis C Virus (HCV), eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) oder eine autoimmune Lebererkrankung (z. B. Autoimmunhepatitis (AIH), primär sklerosierende Cholangitis (PSC), primär biliäre Cholangitis (PBC) (Pinato *et al.*, 2020). Zusätzlich begünstigen Alkoholabusus, Insulinresistenz und Übergewicht die Hepatokarzinogenese (Ferrin *et al.*, 2020).

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Das HCC entsteht am häufigsten (Abbildung 2) auf dem Boden einer Zirrhose (Ferrin *et al.*, 2020) und ist entzündungstriggert (Pinato *et al.*, 2020). Die chronische Entzündung führt zur Entstehung einer Fibrose der Leber und im weiteren Verlauf kommt es zur Entwicklung einer Leberzirrhose (Ferrin *et al.*, 2020). Chronische Virus-Hepatitis spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Leberzirrhose (Ferrin *et al.*, 2020; Refolo *et al.*, 2020). Aflatoxinbelastung und HBV Infektion sind die primären Risikofaktoren in Afrika südlich der Sahara und Ostasien. Dahingegen war im Jahr 2018 in Europa, Japan und den USA HCV der primäre Risikofaktor für die Entstehung einer Leberzirrhose (Rawla *et al.*, 2018). Auf globaler Ebene gab es einen *shift* der Risikofaktoren (Tsoulfas, 2019). Im Zuge der Entwicklung neuer direkt antiviral wirkender Therapiemöglichkeiten (*direct acting antivirals*, DAA) wurde die HCV Infektion als primäre Ursache der HCC Entstehung abgelöst (Tsoulfas, 2019). Heutzutage trägt ein Anstieg metabolischer Erkrankungen wie Übergewicht, Diabetes, NASH, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) oder das metabolische Syndrom wesentlich zur Inzidenz des HCCs bei (Tsoulfas, 2019). Weltweit ist NAFLD die Lebererkrankung mit der höchsten Prävalenz (Lefere and Tacke, 2019).



**Abbildung 2: Ätiologie und Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms.**

Mitwirkende Faktoren und Signalwege für die HCC Entwicklung. Abbildung übernommen von Farazi and DePinho, 2006

Aus einer chronischen Leberentzündung, bei der das Leberparenchym zunehmend fibrosiert, kann sich aufgrund der regenerativen Fähigkeiten der Leber über Jahrzehnte eine Zirrhose entwickeln (Lee and Friedman, 2011). Die Faktoren, welche die Hepatokarzinogenese und die Progression des HCCs begünstigen, sind chronische Entzündung, genetische Veränderungen, Veränderungen zellulärer Signalwege und Gewebeumstrukturierung (Refolo *et al.*, 2020). Während einer chronischen Entzündung sind entzündungsfördernde Signalwege aktiviert. Eine Dysregulation der Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine, pro-Angiogenesefaktoren und Produktion der Immunzellen fördert die Transformation der Hepatozyten. Auch die Hemmung der Immunkontrolle und die Aktivierung anti-apoptotischer Faktoren, welche das Überleben der Zellen fördern, sind dysreguliert (Refolo *et al.*, 2020).

Die Aktivierung von hepatischen Sternzellen (HSC) führt zu einem Austausch und Syntheseanstieg von Kollagen und Fibronectin und resultiert in einer Fibroseentstehung. Bei anhaltender Progression kommt es im Verlauf zur Entwicklung einer Leberzirrhose (Lee and Friedman, 2011). Die Struktur der Leber versteift und unkontrolliertes Wachstum der Hepatozyten resultiert in der Entstehung dysplastischer Läsionen (Hernandez-Gea *et al.*, 2013). Hepatozyten unterziehen sich maligner Transformation und fördern die HCC Entstehung und Progression (Hernandez-Gea *et al.*, 2013).

### 1.1.3 Diagnose, Therapieoptionen und Prognose

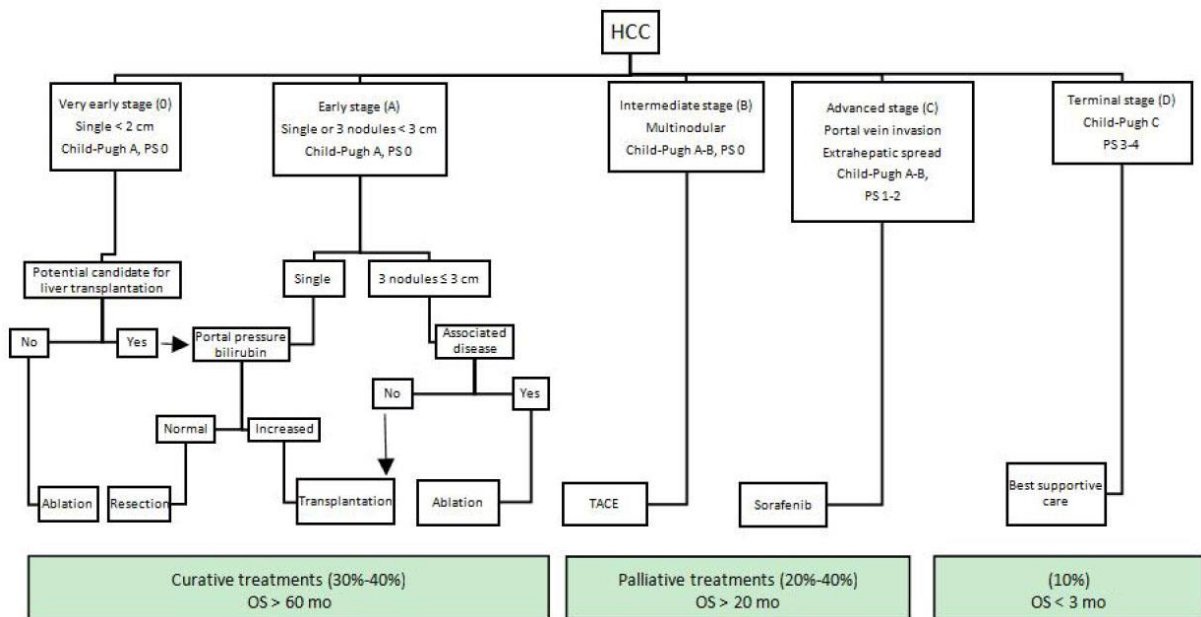
#### Diagnose

Diagnostiziert wird das HCC mittels konventioneller Histologie sowie mittels Leberbiopsie und für die Bildgebung werden kontrastmittelverstärkte Verfahren eingesetzt (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Die Typisierung erfolgt auch mittels Histologie (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Ein HCC wird meist durch nicht-invasive Methoden wie Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) (Wakabayashi *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2020), Positronen-Emissions-Tomographie-CT (PET-CT) (Wakabayashi *et al.*, 2019) und Sonographie (US) des Abdomens nachgewiesen (Vietti Violi *et al.*, 2019). Das HCC sollte nach der WHO-Klassifikation in Sonderformen wie fibrolamelläres HCC und mischdifferenzierte Tumore sowie das frühe HCC und progrediente HCC differenziert werden (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Bei ca. 20 % der Patienten kann das HCC im Frühstadium diagnostiziert werden, wohingegen es bei mehr als 70 % der Fälle erst im fortgeschrittenen Stadium mit unspezifischen Beschwerden diagnostiziert wird. Hier ist das HCC meist bereits soweit fortgeschritten, dass für die Patienten eine noch schlechtere Prognose aufgrund der limitierten Therapieoptionen vorliegt (Wang *et al.*, 2017).

#### Therapieoptionen

Aufgrund der Heterogenität des HCC gibt es kein global einheitliches Staging bzw. Scoring System (Karademir, 2018). Die verschiedenen vorgeschlagenen Systeme haben für sich genommen ihre Vorteile, aber auch Einschränkungen (Karademir, 2018). Für das histologische Staging des HCC in Deutschland wird die TNM Klassifikation eingesetzt welche die Anzahl und Größe sowie eventuellen Gefäßeinbruch und Tumorherde berücksichtigt (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Um die Prognose bzw. die Rezidivrate eines HCCs beurteilen zu können, wird zusätzlich zum Staging- System die Leberfunktion, die Tumorlast und der Allgemeinzustand des Patienten berücksichtigt (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Für die Behandlung des HCC spielen verschiedene Faktoren wie die Anzahl der Tumoren, Größe und Lokalisation der Läsionen eine kritische Rolle (Karademir, 2018). Die Behandlung des HCC hängt darüber hinaus von der Schwere der zugrunde

liegenden Erkrankung und des Wohlergehens des Patienten ab (Karademir, 2018). Tumorbelastung, vaskuläre Beteiligung und Serum  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) Level gelten hierbei als entscheidende prognostische Marker (Wang *et al.*, 2017). Die Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging Klassifikation (siehe Abbildung 3) erlaubt jedoch die Selektion der *first-line* geeigneten Therapieoptionen, entweder kurativ oder nicht-kurativ, für Patienten in den vier Stadien. (Llovet *et al.*, 1999, Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021).



**Abbildung 3: Das BCLC Staging System.**

Beschreibung der Stadien A-D. Abbildung übernommen von Karademir, 2018

Die Chemotherapie allein ist nicht kurativ (Zhu *et al.*, 2020) und lokale ablativ Therapien sind nur bei 30 % - 40 % der Patienten durchführbar (Yamakodo *et al.*, 2014). Als *first-line* Behandlungsverfahren werden kurative Optionen wie Ablation, Resektion und Lebertransplantation (LT) für Patienten im Frühstadium in Betracht gezogen (Zhu *et al.*, 2020). Auch wenn der Patient ein HCC ohne Leberzirrhose aufweist sollte, wenn möglich, eine Resektion erfolgen sofern eine komplette Resektion möglich ist (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Die Leberresektion hat jedoch eine hohe Rezidivrate von 20 % im ersten Jahr, 50 % innerhalb von 3 Jahren und 75 % innerhalb von 5 Jahren für das HCC im Frühstadium (Tabrizian *et al.*, 2014). Das Standard Ablationsverfahren für das HCC war die Radiofrequenzablation (RFA), mittlerweile ist die Mikrowellen Ablation (MWA) äquivalent (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021), aber auch die „high-intensity

focused ultrasound“ Ablation (HIFUS), Laserablation (LA) und Kryoablation sind mögliche Alternativen (Facciorusso *et al.*, 2016). Für das HCC im sehr frühen Stadium ist die RFA möglicherweise kosteneffektiver als die Leberresektion (Facciorusso *et al.*, 2016). Ein Patient mit nicht-resektablen HCC und Leberzirrhose sollte nach Möglichkeit transplantiert werden, wenn das HCC innerhalb der MILAN Kriterien liegt (einzelne Läsion  $\leq 5$  cm oder bis zu 3 separate Läsionen  $\leq 3$  cm) (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Für Patienten mit Leberzirrhose wird die Lebertransplantation (LT) als beste Therapiemöglichkeit angesehen, da sie die Leberzirrhose selbst therapiert und sowohl detektierbares HCC und nicht-detektierbares HCC entfernt (Tabrizian *et al.*, 2014). Allerdings gilt bei der LT immer noch der limitierende Faktor des Organmangels (Jadlowiec and Taner, 2016), sodass die MILAN Kriterien strikt einzuhalten sind (Pavel and Fuster, 2018). Allerdings kann die Befolgung der MILAN Kriterien kein rezurrenzfreies Überleben und eine gute Prognose garantieren (Pavel and Fuster, 2018). Eine Lebertransplantation kann auch erwogen werden, wenn das HCC außerhalb der MILAN Kriterien liegt (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Allerdings darf in diesen Fällen kein extrahepatischer Befall oder Makroinvasion von Lebergefäßen vorliegen (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Darüber hinaus kommen ablative Behandlungen wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) zum Downstaging zur Anwendung um die Tumorgröße und Tumorbelastung zu reduzieren (Facciorusso *et al.*, 2016). Somit wird die Wartezeit bis zur LT überbrückt bzw. eine LT innerhalb MILAN ermöglicht (Facciorusso *et al.*, 2016). Die Lokalablation, Resektion und transarterielle Radioembolisation (TARE) werden auch für das Downstaging und Bridging eingesetzt (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Zur konventionellen TACE stellt die Drug-eluting-TACE mittlerweile ein gleichwertiges Verfahren in Deutschland dar (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Auch wird eine TACE mehrfach durchgeführt solange ein Ansprechen auf die Therapie gegeben ist und behandelbarer Tumoranteil vorhanden ist (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Bei eingeschränkter Leberfunktion und hoher Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens kann auch SBRT (Stereotactic Body Radiotherapy) eingesetzt werden (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Eine Bridging Therapie wird innerhalb MILAN und adäquater Leberfunktion durchgeführt (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Es kann eine LT erfolgen, wenn der Patient innerhalb der UCSF-Kriterien (einzelne Läsion  $\leq 6,5$  cm, bis zu 3 separate Läsionen  $\leq 4,5$  cm oder maximale Summe der addierten Tumordurchmesser  $\leq 8$  cm) ist und insbesondere,

wenn ein Downstaging bis innerhalb der MILAN Kriterien gelang (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021).

Eine palliative Option ist die TACE im Zwischenstadium (Zhu *et al.*, 2020) mit kompensierter Leberzirrhose (Piscaglia and Ogasawara, 2018), mit relativ erhaltener Leberfunktion und ohne vaskuläre Invasion oder hepatische Ausbreitung (Lencioni *et al.*, 2013). Hier ist TACE die Behandlungsoption welche sich mittlerweile zu segmental/sub-segmental TACE, ultra-selektive TACE und drug-eluting bead TACE (DEB-TACE) für kontrollierte Zuführung von chemotherapeutischen Stoffen weiterentwickelt hat (Wang *et al.*, 2017). Für die Mehrheit der Patienten, welche im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wurden, sind LT oder chirurgische Resektion keine Therapieoption mehr (Wang *et al.*, 2017).

Thyrosin-Kinase-Inhibitoren sind die Behandlungsoption für Patienten im fortgeschrittenen Stadium mit erhaltener Leberfunktion und für Patienten im Endstadium mit beeinträchtigter Leberfunktion, hier gilt der Multikinase-Inhibitor Sorafenib als Goldstandard (Graziadei, 2020). In Deutschland wird abgesehen von Sorafenib mittlerweile vorzugsweise die Kombination von Atezolizumab und Bevacizumab (A+B) im Child-Pugh Stadium A oder BCLC B oder C eingesetzt (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Das Child-Pugh Stadium ist ein Modell um die Leberfunktion zu beurteilen und setzt sich aus Serum Albumin, Bilirubin, Prothrombinzeit, hepatischer Enzephalopathie und Aszites zusammen und wird nach Punktvorgabe in Stadien unterteilt (Wang *et al.*, 2018). Bei Unverträglichkeit von A+B kann der Thyrosinkinase-Inhibitor Lenvatinib verordnet werden (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Um den Therapieerfolg bei größeren Tumoren potentiell zu erhöhen, kann auch eine Kombination aus RFA und TACE verordnet werden (Facciorusso *et al.*, 2016). Sorafenib blockt unterschiedliche Tyrosinkinase, welche mit der Angiogenese und Progression des HCC assoziiert sind (Marisi *et al.*, 2018) und erhöht die Überlebensrate (Lurje *et al.*, 2019). Bei Patienten, die intolerant für TACE oder Sorafenib sind, wird die Behandlung mit selektiver interner Radiotherapie (SIRT) oder Radioembolisation erwogen (Wang *et al.*, 2017). Bei Patienten im Child-Pugh Stadium B kann eine Systemtherapie mit Sorafenib oder Immuntherapie mit anti-PD1 Antikörper erfolgen (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021). Im Child-Pugh Stadium C erfolgt keine Systemtherapie mehr (Konsultationsfassung S3-Leitlinie, 2021).



Gegenwärtig ist auch die Immuntherapie für das HCC eine vielversprechende Behandlungsmethode um die Progression des HCCs einzudämmen und besteht aus unterschiedlichen Strategien wie der Zytokin Therapie, Zell Transfer Immuntherapie und Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (Wu et al., 2018).

## Prognose

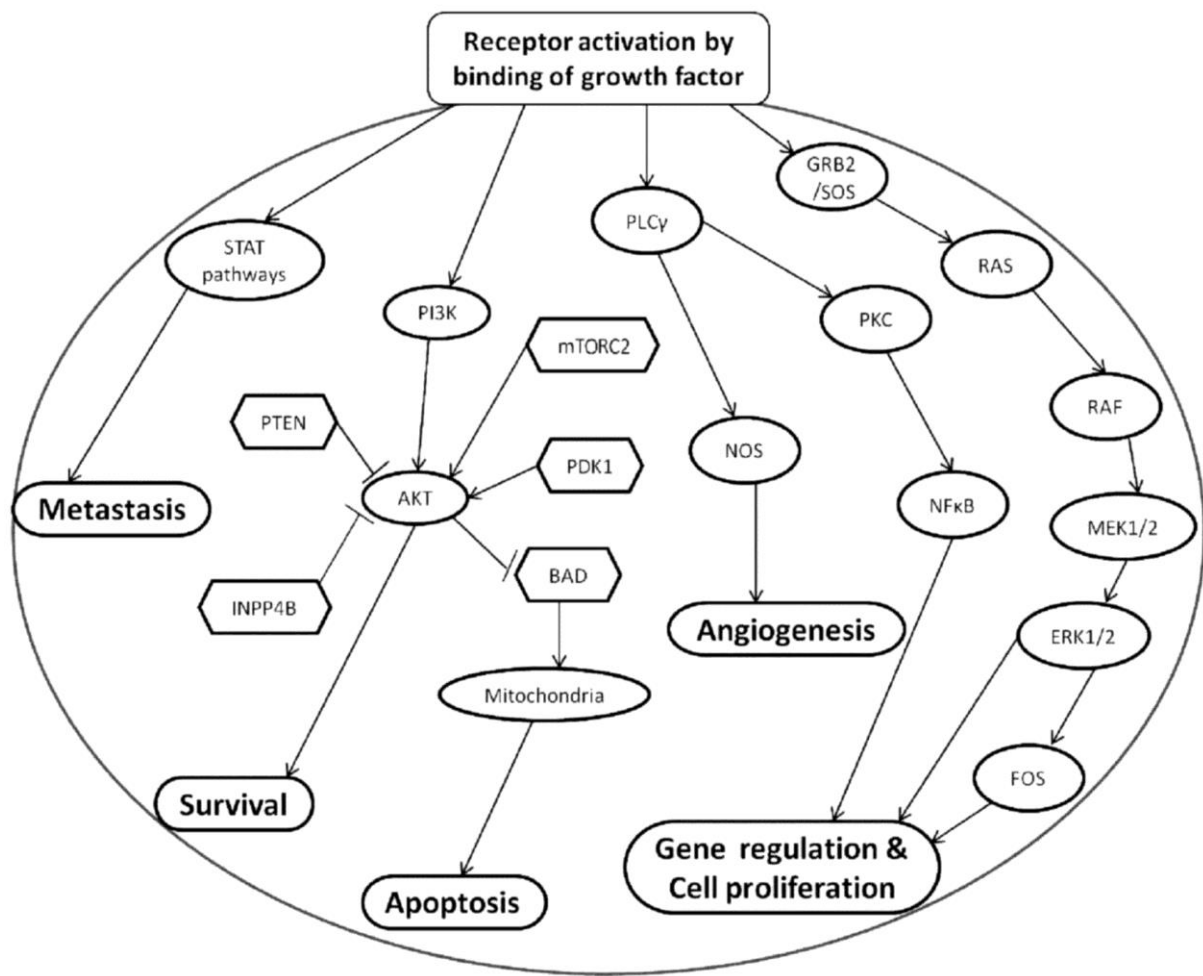
Die 5-Jahres Überlebensrate für Patienten im Frühstadium beträgt 75 %, die 2-Jahres Überlebensrate für Patienten im Zwischenstadium ist auf 20-25 % geschätzt und Patienten im Endstadium haben eine schlechte Prognose (Ho *et al.*, 2020).

### **1.1.4 Molekulare Hepatokarzinogenese**

Die HCC Entstehung ist ein mehrstufiger Prozess (Hernandez-Gea *et al.*, 2013). Durch chronisch schädigenden Einfluss (z. B. durch eine Hepatitis Infektion oder ungesunde Lebensweise) wird eine Leberschädigung durch die Produktion von Sauerstoffspezies (ROS), durch Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER), durch zelluläre DNA-Schädigung und Nekrose geschädigter Hepatozyten induziert (Hernandez-Gea *et al.*, 2013). Die HCC Progression und Therapie werden durch eine fortlaufende Entzündung und eine Mikroumgebung des Tumors, welche immunsuppressiv wirkt, charakterisiert und beeinflusst (Hou *et al.*, 2020). Die immunsuppressive Mikroumgebung wird hierbei durch chronische Entzündungen, Veränderungen in Signalwegen und genetische Veränderungen begünstigt (Refolo *et al.*, 2020). Die zu Grunde liegenden Lebererkrankungen und genetischen Veränderungen rufen eine hohe Heterogenität des HCCs hervor und erschweren Diagnose und Behandlung (Siracusano *et al.*, 2020). Wenn genetische Veränderungen akkumulieren, lenken unterschiedliche Signalwege die progressive Transformation der gesunden Hepatozyten in maligne (Niu *et al.*, 2016). Veränderungen der DNA Kopienzahl (Aneuploidie) entstehen durch Zuwachs oder Verlust von ganzen Chromosomen (Niu *et al.*, 2016). Die sogenannte chromosomale Instabilität ist durch Abnormalitäten wie numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen charakterisiert und kann auch nur Teilstücke von Chromosomen betreffen. Dadurch kann es zu einem Zuwachs

oder Verlust von Chromosomenfragmenten, Translokationen, Inversionen, Amplifikationen, Deletionen und Allelverlust (Heterozygotie) kommen (Niu *et al.*, 2016). Chromosomale Instabilitäten sind auch bezüglich des HCCs eine der häufigsten Anomalien: die chromosomale Instabilität an Chromosom 1q21 korreliert mit der Progression des HCC und die chromosomale Instabilität auf Chromosom 7q21.3 mit der Hepatokarzinogenese (Niu *et al.*, 2016).

Wachstumsfaktoren führen durch unterschiedliche Signalwege zu einer krebserzeugenden Aktivität, wodurch die Proliferation und Invasion stimuliert werden (Wang *et al.*, 2017). Diese Wachstumsfaktoren sind der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF), Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF) und transformierender Wachstumsfaktor (TGF)-  $\alpha$  und TGF-  $\beta$  (Wang *et al.*, 2017). Die Produktion vieler dieser Wachstumsfaktoren lässt in der gesunden Erwachsenenleber nach oder schwindet vollständig (Wang *et al.*, 2017). Andererseits kann die Produktion bestimmter Wachstumsfaktoren, wie z. B. EGF, IGF, VEGF, nach einer Schädigung des Lebergewebes für die Leberregeneration durch adulte Hepatozyten hochreguliert werden (Wang *et al.*, 2017). Wenn der Wachstumsfaktor an seinen Liganden bindet, können sämtliche Signalkaskaden aktiviert werden (siehe Abbildung 4) (Wang *et al.*, 2017).



**Abbildung 4: HCC Entstehung durch Einfluss von Wachstumsfaktoren.**

Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Signalwegen, die zur Tumorprogression beitragen. Abbildung übernommen von Wang *et al.*, 2017

Die Aktivierung des ubiquitären Signal Transduktion Signalweges ERK/MAPK durch VEGF und PDGF führt zu Proteinexpressionen, die bei der Zellproliferation, Differenzierung, Angiogenese und dem Überleben der Zellen involviert sind (Whittaker *et al.*, 2010; Gollob *et al.*, 2006). Aktivierung oder Überexpression dieses Signalwegs beeinflusst die Tumorprogression (Whittaker *et al.*, 2010). Da die Expression von VEGF in lymphatischer Metastasierung und HCC Progression erhöht ist und die Tumorentstehung auch von der Angiogenese abhängt, kann Serum VEGF in Kombination mit Serum AFP als prognostischer Marker verwendet werden (Wu *et al.*, 2018).

Der PI3K/Akt/mTor Signalweg, aktiviert durch IGF und EGF, spielt eine große Rolle für das Zellüberleben, Tumorzellproliferation und Wachstum (Whittaker *et al.*, 2010). mTor (mammalian target of Rapamycin) ist die Kinase, welche die beschriebenen

biologischen Effekte reguliert (Wu *et al.*, 2018). In gesundem Gewebe ist die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) der negative Regulator (Whittaker *et al.*, 2010). Jedoch ist in der Hälfte der HCCs die PTEN Expression reduziert (Xu *et al.*, 2018).

Die  $\beta$ -Catenin-Konzentration ist in 50 - 70 % der HCCs erhöht aber die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin allein scheint nicht die maligne Transformation zu verursachen (Whittaker *et al.*, 2010). Bei  $\beta$ -Catenin handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs, welcher im HCC dysreguliert ist (Whittaker *et al.*, 2010). Dieser Faktor ist in die Aktivierung der Gentranskription von Proteinen involviert, welche die Zellproliferation und Angiogenese fördern, pro-apoptotisch sind und sich an der Entstehung der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligen (Avila *et al.*, 2006). Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg ist in 20 - 90 % der HCCs fehl aktiviert (Wu *et al.*, 2018).

Der NF $\kappa$ B Signalweg (*nuclear factor kappa B*) ist auch in die Hepatokarzinogenese involviert und inhibiert unter anderem das Tumorsuppressorprotein p53, wodurch die Tumorzellen vor Apoptose geschützt werden und die Zellproliferation, Entstehung und Ausbreitung des HCCs positiv beeinflusst wird (Wu *et al.*, 2018). Dieser Signalweg wird hauptsächlich durch die Zytokine TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-  $\alpha$ ) und Interleukin (IL)-6 aktiviert (Marquardt and Edlich, 2019). Die Aktivierung löst die Freisetzung von Chemokinen aus, was wiederum Immunzellen anzieht und somit den Entzündungszustand und das HCC fördert (Wu *et al.*, 2018). Die Expression von NF $\kappa$ B unterscheidet sich signifikant, wenn gesundes und malignes Lebergewebe miteinander verglichen wird (70 %). Dies zeigt, dass NF $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der Progression von Leberkrebs spielt (Wu *et al.*, 2018).

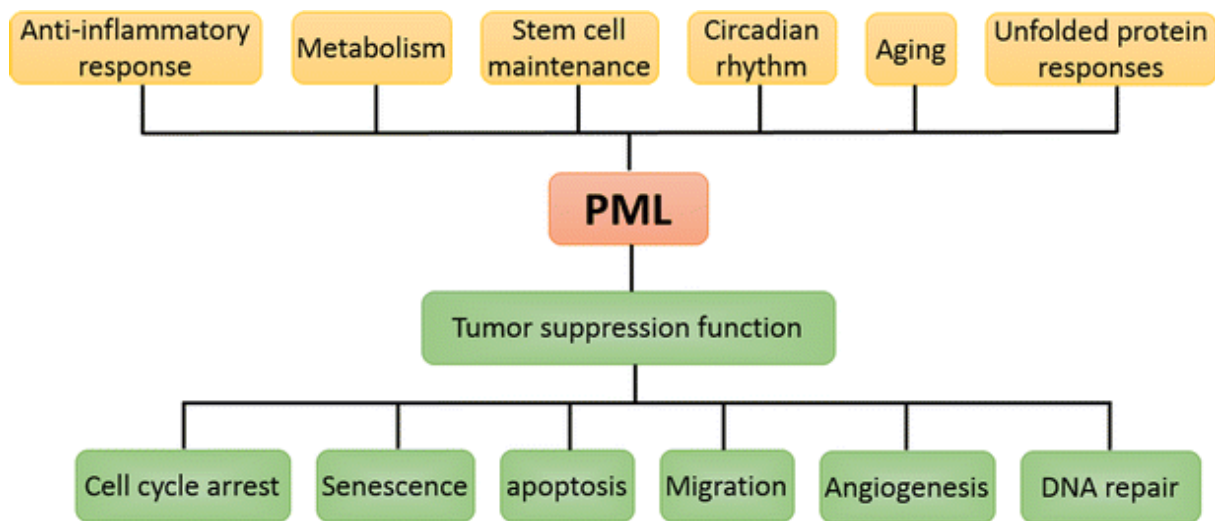
Im yes-associated protein (YAP)- Hippo Signalweg ist YAP der Kerneffektor, für die intrazelluläre Signalübertragung und die intrazelluläre Transkriptionsregulation. Der Faktor ist im HCC überexprimiert (Wu *et al.*, 2018). Hier beeinflusst er die Zellproliferation, Apoptose, Invasion und Metastasierung maligner Zellen, kann also durch Überexpression die HCC Progression fördern (Wu *et al.*, 2018). Zusätzlich findet sich im HCC, abgesehen von der häufigsten Mutation im p53 Gen, eine Dysregulation apoptotischer Signalwege (Fabregat, 2009). Dabei wird oftmals die Sensitivität der Todesrezeptorliganden (Fas L, TRAIL, TGF- $\beta$ ) abgeschwächt und die Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod gestört (Fabregat, 2009).

## 1.2 Tumorsuppressorproteine

Die Tumorsuppressorproteine promyelocytic leukemia (PML), RAS associated domain family 6 (RASSF6) und NOD-like receptor family pyrin domain containing 12 (NLRP12) sind im Tumorgewebe von HCC Patienten stark vermindert exprimiert (Straub *et al.*, 2019). Die verminderte Expression von PML in Kombination mit HCV geht mit einer reduzierten Expression von RASSF6 und NLRP12 einher. Zudem besteht ein Zusammenhang mit gesteigerter Zellproliferation von Hepatozyten *in vitro* (Straub *et al.*, 2019). Diese Tumorsuppressorproteine spielen eine große Rolle in der Entwicklung des HCCs (Straub *et al.*, 2019).

### 1.2.1 PML

Das PML Gen wurde zuerst in Patienten mit akuter promyelozytärer Leukämie (APL) nachgewiesen und wies in 95 % der Fälle chromosomale Translokationen auf (Lang *et al.*, 2019). Das PML Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 15 (Lang *et al.*, 2019). Die PML Expression erfolgt in allen Geweben von Säugetieren (Borden, 2008). Das PML Gen enthält 9 Exons, was 7 PML Isoformen ermöglicht, welche durch alternatives Spleißen in der variablen C-terminalen Sequenz zu Stande kommen und sich alle eine gemeinsame dreigliedrige N-terminale (TRIM) Domäne teilen (Lang *et al.*, 2019). Das Protein ist an zellulären Prozessen und tumorsupprimierenden Mechanismen wie der Aufrechterhaltung der Genomstabilität, Zelldifferenzierung, Seneszenz, Angiogenese und der viralen Abwehr beteiligt (siehe Abbildung 6) (Lang *et al.*, 2019).



**Abbildung 5: Die zellulären Funktionen von PML.**

Zelluläre Prozesse und tumorsupprimierende Mechanismen von PML. Übernommen von Guan and Kao, 2015

PML Proteine bilden PML nuclear bodies (NBs), die hauptsächlich aus Protein gebildet und zu intrazellulären dynamischen Strukturen kondensiert sind (Lallemand-Breitenbach and de The, 2018). PML-NBs werden durch das PML Protein definiert, da dies die erste Komponente war die identifiziert wurde (Borden, 2008). PML-NBs wurden erstmals in den frühen 1960er Jahren entdeckt und werden durch posttranslationale Modifikationen und Sumoylierung reguliert (Lallemand-Breitenbach and de The, 2010). Während der Reaktion auf Stress, DNA Schädigung und Fortschreiten des Zellzyklus rekrutieren und setzen PML-NBs verschiedene Proteine frei (Lang *et al.*, 2019). Diese Proteine sind in die posttranslationale Kontrolle implementiert, steuern die p53-Reaktion auf oxidativen Stress (Lallemand-Breitenbach and de The, 2018) und spielen eine Rolle bei der zellulären Seneszenz (Sahin *et al.*, 2014). In Reaktion auf verschiedene Stressreize können sie ihre Morphologie und Proteinzusammensetzung ändern (Lang *et al.*, 2019) und sich hinsichtlich Größe, Position und Anzahl unterscheiden (Borden, 2008).

In verschiedenen Krebsarten sowie auch im HCC geht die tumorsuppressive Funktion des PML-Proteins häufig verloren, was im HCC zu einer erhöhten Proliferation von

Hepatozyten führt, die zur Entwicklung dysplastischer Läsionen des HCC neigen (Herzer *et al.*, 2012).

Zusätzlich wurde festgestellt, dass das HCV-Kernprotein eine inaktivierende Wirkung auf PML-NBs ausübt und somit die durch PML Isoform IV herbeigeführte Apoptose negativ beeinflusst (Herzer *et al.*, 2012). Wenn die PML Expression vermindert ist, wurde eine erhöhte Anfälligkeit für virale Pathogene dokumentiert (Herzer *et al.*, 2012).

### 1.2.2 RASSF6

Ein weiteres Tumorsuppressorprotein ist RASSF6, eines der 6 Familienangehörigen beim Menschen (Xu *et al.*, 2018). Es besitzt die Ras association (RA) Domäne (RalGDS/AF-6) (Volodko *et al.* 2014) in der mittleren Region und eine SARAH (Salvador/RASSF/Hippo) Domäne mit *coiled-coil* Struktur (Xu *et al.*, 2018). Die RA Domäne ist direkt mit K-Ras verbunden (Volodko *et al.* 2014). Es wurde festgestellt, dass aktiviertes K-Ras Apoptose und Zellüberleben in einigen Krebszelllinien induziert (Allen *et al.*, 2007). K-Ras Mutationen blockieren Interaktionen mit RASSF6 (Allen *et al.*, 2007). In mehreren Tumoren geht die K-Ras Expression aufgrund der Promotormethylierung verloren (Volodko *et al.* 2014).

In gesundem Gewebe übernehmen diese Proteine Funktionen wie die Zellstabilität, Zellproliferation, Apoptose, Migration, Zelladhäsion und NFκB Aktivität während einer Entzündungsreaktion (Volodko *et al.* 2014). Aufgrund der SARAH Domäne spielt RASSF6 eine Rolle im Hippo Signalweg, indem es zum einen den Hippo Signalweg hemmt, der Zellwachstum, Zellproliferation und Organgröße steuert und zum anderen via der Bindung an MST2 (mammalian Ste-20-like kinase) Apoptose vermittelt (Ikeda *et al.*, 2009).

Das RASSF6 ist insbesondere an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose, der Unterdrückung des NFκB Signalweges und der Stabilisierung von p53 beteiligt (Volodko *et al.*, 2014). Dies sind alles wichtige Funktionen, wenn es um die Tumorentstehung geht (Volodko *et al.*, 2014). Bei mehr als 30 % der menschlichen Tumoren wurde festgestellt, dass Ras-Proteine aufgrund von Mutationen eine entscheidende Rolle spielen (Allen *et al.*, 2007). Während RASSF6, wenn es nicht in einer mutierten Form vorliegt, in der Lage wäre zelluläre Seneszenz, Apoptose und

Zellzyklusstillstand zu induzieren und so die Tumorentwicklung und Progression zu hemmen (Allen *et al.*, 2007). Beim HCC und anderen Krebsarten wurde festgestellt, dass die RASSF6-Expression 30 - 60 % vermindert ist (Allen *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2017), wie dies auch in Hepatomzelllinien *in vitro* der Fall war (Zhu *et al.*, 2017). Es wurde herausgefunden, dass bei Überexpression von RASSF6 in Hepatomzelllinien die Zellproliferation, Invasion und die epitheliale- mesenchymale Transition (EMT) durch FAK (Focal adhesion kinase) Phosphorylierung und daher durch die Verminderung der Matrix-Metalloprotease (MMP) - 2/9 Expression unterdrückt wurde (Zhu *et al.*, 2017).

Es kann Apoptose, über eine p53-Stabilisierung durch Interaktion mit MDM2 (E3 Ligase, reguliert p53 Stabilität), induzieren (Xu *et al.*, 2017). Aufgrund seiner Auswirkungen auf die Tumorentstehung vom HCC kann RASSF6 als potenzielles therapeutisches Ziel angesehen werden (Zhu *et al.*, 2017).

### 1.2.3 NLRP12

NOD-like Rezeptoren (NLRs) und Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), die eine angeborene Immunantwort auf Pathogene induzieren (Khan and Zaki, 2020). NLRs enthalten eine zentrale Nukleotidbindungsdomäne (NBD), eine C-terminale leucinreiche Wiederholung (LRR) Domäne und eine N-terminale Effektor Domäne, die zwischen 4 Unterfamilien (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP), mit 22 NLR-Mitgliedern beim Menschen variiert (Khan and Zaki, 2020). NLRP12 kommt in myeloischen Zelllinien vor und spielt mehrere Rollen in der Immunantwort sowie im HCC (Khan and Zaki, 2020). Abgesehen davon, dass es der negative Regulator der T-Zell-Antwort ist (Lukens *et al.*, 2015), ist NLRP12 in den JNK/MAPK Signalweg involviert (Khan and Zaki, 2020). Darüber hinaus ist NLRP12 am NFκB Signalweg beteiligt, welcher die Zytokin- und Chemokinproduktion einleitet, welchen NLRP12 auch negativ reguliert (Zaki *et al.*, 2011).

Die angeborene Immunantwort wird durch TLRs an der Epithelzelloberfläche ausgelöst, was eine Entzündungsreaktion via NFκB Aktivierung hervorruft (Zaki *et al.*, 2011). Auch wenn Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) von TLRs erkannt werden wird JNK (c-Jun N-terminal kinase, Mitglied des MAPK Signalwegs) aktiviert (Khan and Zaki, 2020). JNK spielt eine zentrale Rolle bei der



Hepatokarzinogenese, die NLRP12 durch negative Regulierung von JNK unterdrücken kann (Khan and Zaki, 2020).

NLRP12 ist ein negativer Regulator des nichtkanonischen Signalwegs, da es NFκB durch proteosomalen Abbau von NIK (NFκB inducing kinase) herunterregelt und die kanonische NFκB Aktivierung durch Hemmung von IRAK1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1) inhibiert (Zaki *et al.*, 2011). Wenn NLRP12 vermindert ist, ist die Funktion des NFκB Signalwegs unkontrolliert, was zu erhöhter Entzündung und Tumorgenese führt (Chen, 2014).

### 1.2.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Hintergrundmechanismen zu erforschen, die an der Entwicklung und der HCC Rekurrenz beteiligt sind. Insbesondere sollen die molekularen Mechanismen der Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 im Hinblick auf die Tumorentwicklung und -progression weiter untersucht werden.

1. Zunächst soll der Einfluss von einem, mittels CRISPR/Cas9 generierten, heterozygoten *knockout* in PML, RASSF6 und NLRP12 auf die Proliferation und Apoptose von Hepatomzellen untersucht werden.
2. Weiterhin sollen die Regulationsmechanismen und Signalwege, über die PML, RASSF6 und NLRP12 ihre Funktionen in Apoptose oder Proliferation ausüben, weiter charakterisiert werden.
3. Anschließend soll untersucht werden, ob der heterozygote *knockout* in PML, RASSF6 und NLRP12 in Hepatomzelllinien bei Applikation im CAM Modell zu größeren und schwereren Tumoren führt.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav VX-150	Systemec GmbH, Wettenberg, Deutschland
BD FACS Aria III	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Binokular für Fotodokumentation Nikon SMZ 1000	Nikon
BioPhotometer BioSpectrometer basic	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank BSS 300 MP	GTES Brutgerät, Grumbach, Deutschland
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München, Deutschland
CO2 Inkubatoren HERAEUS BB15	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Dremel Modell 3000 mit Rotationsschleifgerät	Dremel Europe Bosch Powertools B.V., Breda, Niederlande
Dremel	Quiagen, Hilden, Deutschland
E-BOX VX2 Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
ECL Chemostar	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland
Flockeneisbereiter Scotsman, AF 100	Kälte-Berlin, Berlin, Deutschland
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Heraeus Kelvitron® t	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Heraeus Megafuge 8R	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
HYBAID OmniGene Heizblock	Thermo HYBAID GmbH, München
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Kern 120-5DM Feinwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoPhotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (research plus): 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, elektrisch	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Primo Vert Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungssystem Milli-Q	MERCK Millipore, Darmstadt, Deutschland
Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Schüttler Certomat TC3	B.Braun BiotechInternational, Melsungen
Schüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co KG; Schwabach, Deutschland
Stickstoff Transportbehälter	KGW Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Stromquelle PowerPac 300 und PowerPac HD	Bio-Rad, München, Deutschland
Sunlab Rollenmischer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
Thermoblock Dri-Block DB-2A	Techne, Stone, Staffordshire, UK
Thermoblock Dri-Block DB-2A	Techne, Stone, Staffordshire, UK
TissueRuptor	Quiagen, Hilden, Deutschland
Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Blot System	Bio-Rad, München, Deutschland
Vortexer RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Waage EW 4200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wasserbad	Oehmen Labortechnik, Essen, Deutschland
Zentrifuge 5424, 5424 R, 5810 R, 5910R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge HERAEUS® Megafuge 40R	Thero Scientific, Bonn, Deutschland
----------------------------------	-------------------------------------

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
15 ml Falcon™ Röhren Polystyrene	Beckton Dickinson/ BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
15 ml und 50ml Spitzbodenröhren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
BRANDplates®, 96-Well Luminometerplatte, pureGrade™	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Combitips advanced® Biopure (0,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einwegskalpelle	Servoprax® GmbH, Wesel, Deutschland
Einwegspritze (10 ml)	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Filterpipettenspitzen (0,1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Filterpipettenspitzen (200 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Kryogefäße 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mini-Protean TGX Gels 12 % für Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Parafilm™	American National Can, Greenwich, CT, USA
PCR Platten Hard-Shell® 96-Well	Bio-Rad, München, Deutschland
Petrischale (Zellpräparationen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Petrischalen, Größe? Groß und klein	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (0,1 - 10 µl; 1 - 20 µl; 10 - 100 µl; 100 - 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen (20 µl; 200 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Material und Methoden

Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>3</sup> und 175cm <sup>3</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (24-Well und 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6-Well)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten, Flachboden, 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Tissue Ruptor disposable Probes	Quiagen, Hilden, Deutschland
Zellschaber, gelb	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Wattestäbchen	
Hard-Shell Low-Profil Thin-wall 96-well skirted PCR Plates mit Microseal 'B' Adhesive Seals	Bio-Rad, München, Deutschland
Trans-Blot Turbo PVDF-Membranen midi Format	Bio-Rad, München, Deutschland

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien.**

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
Albumin Fraktion V > 98 % für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMEM (high glucose)	Gibco, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA
DMSO (Dimethyl sulfoxid)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DPBS	Gibco, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA
Ethanol (99,9 % p. a.)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	PAA, Pasching, Österreich
FuGene HD Transfection Reagent	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
GenePilot 1 kb Plus Ladder	Qiagen, Venlo, Niederlande
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Glo Lysis Buffer	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
Halt Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail (100x)	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
HEPES	Biochrom GmbH, Berlin, Germany
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
LB-Agar (Pulver)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
LB-Medium (Pulver)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
L-Glutamin	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Britain
MEM NEAA (100x)	Gibco, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA
Milchpulver blotting grade pilv. fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	GERBU Biotechnik, Heidelberg, Deutschland
Non-fat dried milk powder (Magermilchpulver)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
OPTI- MEM (1x)	Gibco, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x), ohne MgCl <sub>2</sub> , ohne CaCl <sub>2</sub> )	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Phosphataseinhibitor (100x)	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Qiazol	Qiagen, Venlo, Niederlande
SDS	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
TopVision Agarose	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

TRIS	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer	Bio-Rad, München, Deutschland
TRIS-HCl	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
TWEEN 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
UltraPure Distilled water	Gibco, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA
UltraPure 10X Buffer	Gibco, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA

## 2.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Puffer/ Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe/ Konzentration</b>
8x Probenpuffer (Lämlibuffer)	375 mM, pH 6,8 Tris, 34,4 % Glycerol, 16,4 &, 164 mg/ml SDS, 800 ug/ml Bromphenol, 80 µl β-Mercapto- Ethanol
RIPA	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Sodium Deoxycholate, 1 % NP-40, Protease-Inhibitor, Phosphatase-Inhibitor
Stripping buffer	200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 1 % Tween-20®, pH 2,2
TBE (10x) Ultra Pure™	Gibco, Invitrogen/Life technologies, Carlsbad, California, USA
TBS	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6
TBST	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20®, pH 7,6
TGX (10x)	Biorad, München, Deutschland



## 2.5 Enzyme

**Tabelle 5: Verwendete Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
FastAP Thermosensitive Alkaline phosphatase	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
FastDigest BamHI	Thermo Scientific Fermentas™, St. Leon-Roth, Deutschland
FastDigest Bpil	Thermo Scientific Fermentas™, St. Leon-Roth, Deutschland
FastDigest HindIII	Thermo Scientific Fermentas™, St. Leon-Roth, Deutschland
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

## 2.6 Antikörper

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper.**

<b>Bezeichnung/ Herstellernachweis</b>	<b>Herstellernachweis</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung im Western Blot</b>
<b>Primäre Antikörper</b>			
PML	PML (H-238) Rabbit pAb	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
RASSF6	RASSF6 (ab220111) Rabbit pAb	Abcam	1:500
NLRP12	NALP-12 (ab93113) Rabbit pAb	Abcam	1: 500
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
anti-rabbit	Anti- Rabbit IgG, HRP- linked Ab (#7074)	Cell Signaling	1:5000
<b>Ladungskontrolle</b>			
GAPDH	GAPDH Anti-Rabbit mAb (#2118)	Cell Signaling	1:5000

## 2.7 Kompetente Zellen

**Tabelle 7: Verwendete kompetente Zellen.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
E. coli Stbl3 chemically Competent Cells	Invitrogen

2.8 Vektoren

Für die detaillierte Ansicht der Vektoren und deren Plasmidkarten, siehe Anhang 10.1

**Tabelle 8: Verwendete Vektoren.**

<b>Forward</b>	pSpCas9n(BB)-2A-GFP(PX461) nuclease
<b>Reverse</b>	pSPgRNA

2.9 Zelllinien**Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.**

<b>Zelllinie</b>	<b>Kulturbedingungen</b>
Huh7	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/ Strep., 1 % HEPES Puffer, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % L-Glutamin;37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>
HepG2	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/ Strep., 1 % HEPES Puffer, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % L-Glutamin;37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>
Hep3B	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/ Strep., 1 % HEPES Puffer, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % L-Glutamin;37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>

2.10 Kits**Tabelle 10: Verwendete Kits.**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham ECL Primer Western Blotting detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Britain
Cell proliferation ELISA, BrdU	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Apo-ONE Homogenous Caspase- 3/7	Promega, Medison, WI, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase A (100 mg/ml; 7000 Units/ml)	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande

2.11 Assays**Tabelle 11: Verwendete Assays**

<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
PML TaqMan® Gene Expression Assays , Hs00972079_m1	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
RASSF6 TaqMan® Gene Expression Assays , Hs01099665_m1	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
TaqMan™ Master-Mix für Genexpression	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
NLRP12 TaqMan® Gene Expression Assays, Hs00376282_m1	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Hs99999901_s1 the 18S gene	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellkulturmodell

##### 3.1.1 Verwendete Hepatomzelllinien und deren Kultivierung

Die Hepatomzelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum, 1 % Antibiotika (100 U/ml Penicillin/ 100 µM/ml Streptomycin), 1 % (v/v) HEPES Puffer, 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren und 1 % 2mM L-Glutamin bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> Begasung kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Hierbei wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 10 ml DPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA Lösung und 5-10-minütiger Inkubation bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub> Begasung abgelöst. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurden diese mit 3 ml Zellkulturmedium verdünnt und in einem Verhältnis von 1:10 (Huh 7, HepG2) oder 1:5 (Hep3B) in neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 20 ml Zellkulturmedium überführt.

##### 3.1.2 Die Zellzahlbestimmung der Hepatomzelllinien

Für den Versuchsansatz der *in vitro* Analysen wurden die Zellen zuerst gewaschen und wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben passagiert. Die Zellen wurden mit 3 ml Zellkulturmedium verdünnt und anschließend die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden die Zellen in angemessenem Verhältnis mit 25 % Trypanblau (Sigma) verdünnt, vermischt und aufgetragen. Die Zellzahl wurde nach Formel 1 bestimmt und in Abhängigkeit der Zellkulturplattengröße (siehe Tabelle 12) aufgetragen.

#### **Formel 1: Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer**

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl gezählte Quadrate}} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}}$$

**Tabelle 12: Verwendete Zellzahlen und Volumina der in vitro Experimente, wenn nicht anders angegeben**

Format Kulturplatte	Zellzahl	Gesamtvolumen
6er-Lochplatte	$1 \times 10^6$	2 ml
12er-Lochplatte	$2,5 \times 10^5$	1 ml
24er-Lochplatte	$1 \times 10^5$	500 $\mu$ l
96er Lochplatte	$2 \times 10^4$	100 $\mu$ l

### 3.2 CRISPR/Cas9

Um den heterozygoten *knockout* zu generieren, wurden mittels der Webseite <http://crispor.tefor.net/> zwei single guide RNAs (sgRNA) designt, wobei eine sgRNA upstream des Exon 1 und eine sgRNA downstream des Exon 1 designt wurde. Es folgte die Selektion von zwei sgRNAs (forward und reverse) für den upstream Bereich und zwei sgRNAs (forward und reverse) für den downstream Bereich des Exon 1.

sgRNA	Beschreibung	Sequenz (5'-3')
39f fw	Upstream des Exon 1	CACCcccgcctttaccgtaagtcagCGG
39f rev	Upstream des Exon 1	AAACccgctgacttacggtaaagcggg
43f fw	Upstream des Exon 1	CACCgctttaccgtaagtcagcgggTAGG
43f rev	Upstream des Exon 1	AAACcctaccgctgacttacggtaaagc
508f fw	Downstream des Exon 1	CACCagaggggtctaacggaggattTGG
508f rev	Downstream des Exon 1	AAACccaaatacctccgtagaccctct
576f fw	Downstream des Exon 1	CACCgggtcctgaccgtctcgggtGGG
576f rev	Downstream des Exon 1	AAACcccacccgagacgggtcaggaccc

Daraufhin wurden die Leervektoren pSPgRNA und pX461\_nuc (pSPCas9n(BB)-2A-GFP(PX461) nuclease in *E. coli* Stbl Zellen auf Amp-Platten transformiert (siehe Kapitel 3.2.3).

Hierfür wurde das Protokoll der One Shot Stbl3 chemically competent *E. coli* (Thermo fisher) nach Herstellerangaben befolgt.

### 3.2.1 Oligodimerisierung und Phosphorylierung

Die Oligodimerisierung und Phosphorylierung der einzelnen sgRNAs wurde mittels PCR durchgeführt. Die Zusammenstellung der Reaktion kann den folgenden Tabellen 14 und 15 entnommen werden.

#### **Tabelle 13: Verwendete sgRNAs für die Oligodimerisierung**

Für die detaillierte Ansicht siehe Anhang 10.2

<b>sgRNA fw</b>	<b>sgRNA rev</b>	<b>Konzentration</b>
PML sgRNA5 fw	PML sgRNA5 rev	100 µM
PML sgRNA6 fw	PML sgRNA6 rev	100 µM
PML sgRNA7 fw	PML sgRNA7 rev	100 µM
PML sgRNA8 fw	PML sgRNA8 rev	100 µM
Rassf6 sgRNA5 fw	Rassf6 sgRNA5 rev	100 µM
Rassf6 sgRNA6 fw	Rassf6 sgRNA6 rev	100 µM
Rassf6 sgRNA7 fw	Rassf6 sgRNA7 rev	100 µM
Rassf6 sgRNA8 fw	Rassf6 sgRNA8 rev	100 µM
NLRP12 sgRNA5 fw	NLRP12 sgRNA5 rev	100 µM
NLRP12 sgRNA6 fw	NLRP12 sgRNA6 rev	100 µM
NLRP12 sgRNA7 fw	NLRP12 sgRNA7 rev	100 µM

#### **Tabelle 14: PCR Ansatz für die Oligodimerisierung und Phosphorylierung**

	<b>Volumen [µL]</b>
sgRNA fw	1
sgRNA rev	1
T4 ligation buffer (10x) (#B0201S, Biolabs)	1
T4 PNK (#M0201S, Biolabs)	1
ddH <sub>2</sub> O	6
Endvolumen der Reaktion	10

Nachfolgend wurde die PCR mit dem in Tabelle 18 aufgeführtem Protokoll durchgeführt.

**Tabelle 15: PCR Protokoll für die Oligodimerisierung und Phosphorylierung**

Zeitintervall	Temperatur
30 Minuten	37°C
5 Minuten	95°C
Runterkühlen bis 25°C	5°C/min

### 3.2.2 Klonierung

Die Linearisierung der sgRNAs in pX461\_nuc und pSPgRNA erfolgte durch die in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgeführten Reaktionen.

**Tabelle 16: Reaktion für die Klonierung der sgRNAs in pX461\_nuc**

Substanz		Menge
pX461_nuc	100 ng	1
Oligoduplex		2
Tango buffer	10x	2
DTT	10 mM	1
ATP	10 mM	1
FastDigest		1
Ligase		1
ddH <sub>2</sub> O		11
Gesamtvolumen		20

**Tabelle 17: Reaktion für die Klonierung der sgRNAs in pSPgRNA**

Substanz		Menge
pSPgRNA	100 ng	1
Oligoduplex		2
Tango buffer (+BSA)	10x	2
DTT (Invitrogen)	10 mM	1
ATP (Biolabs)	10 mM	1
FastDigest		1
Ligase		1
ddH <sub>2</sub> O		11
Gesamtvolumen		20

Die Reaktionen erfolgten nach dem in Tabelle 18 aufgeführten PCR Protokoll.

**Tabelle 18: PCR für die Klonierung der sgRNA in pX461\_nuc und pSPgRNA**

Zeitintervall	Temperatur	
5 min	37 °C	6 Zyklen
5 min	21 °C	

Anschließend wurde die Ligationsreaktion via Plasmid-Safe ATP-dependant DNase (epicentre) aufgereinigt, indem 11 µl der Ligase Reaktion, 1,5 µl PlasmidSafe Puffer (10x), 1,5 µl ATP (10 mM) und 1 µl PlasmidSafe Exonuclease miteinander vermengt wurden. Dann wurde eine PCR bei 37 °C für 30 min und darauf bei 70 °C für 30 min durchgeführt.

### 3.2.3 Transformation in *Escherichia coli* (*E. coli*)

Nach der Ligationsreaktion fand die Transformation in den Laborstamm Stbl 3 chemisch kompetente *E. coli* (Invitrogen) statt. Hierbei wurden 25 µl der Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2,5 µl der Ligationsreaktion vermengt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis folgte der Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert und mit 100 µl S.O.C. Medium vermengt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µl/ml Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 3.2.4 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Einzelne Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin) im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen bei 4000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl P1 Puffer (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 250 µl P2 Puffer (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) lysiert. Dabei wurde das Reaktionsgefäß mehrere Male invertiert. Anschließend wurden 350 µl N3 Puffer (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) hinzugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert, bevor es für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Vom Überstand wurden 800 µl abgenommen und auf eine QIAprep 2.0



Zentrifugationssäule (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) pipettiert und kurz zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde die QIAprep 2.0 Zentrifugationssäule (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) mit 500 µl PB Puffer (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) gewaschen, kurz zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Waschschrift wurde wiederholt, jedoch mit Zugabe von 750 µl PE Puffer (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). Zusätzlich wurde das Reaktionsgefäß für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Rückstände des Waschpuffers zu entfernen. Danach wurde die QIAprep 2.0 Zentrifugationssäule (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 50 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor es anschließend für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Das isolierte Plasmid befindet sich im Durchfluss.

Die isolierten Plasmide wurden durch Sequenzierung im DNA-Sequenzierservice des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen überprüft.

### 3.2.5 Sequenzen des Exon 1 in PML, RASSF6 und NLRP12

Zur besseren Veranschaulichung und Verständnis ist die Sequenz des Exon 1 fett gedruckt und die Primer Sequenz fett mit grauem Hintergrund hervorgehoben.

#### PML

Primer fw: **TGTCCTAGCACACTCCTTGG**

Primer rev: **AGGCCCTTTTACTCCCCTTC**

#### PML Exon 1:

CTCTCCAGAGGGCGGGCCCTGAGCCGGCACCTCCCCTTTTCGGACAGCTCAAGG  
GACTCAGCCAACTGGCTCACGCCTCCCCTTCAGCTTCTCTTCACGCACTCCAAG  
ATCTAAACCGAGAATCGAACTAAGCTGGGGTCCATGGAGCCTGCACCCGCC  
GATCTCCGAGGCCCCAGCAGGACCCCGCCCGGCCCCAGGAGCCCACCATGCC  
TCCCCCGAGACCCCCTCTGAAGGCCGCCAGCCCAGCCCCAGCCCCAGCCCT  
ACAGAG

PML mit Exon 1:

tcggtgttccctggttccaaatccttcagcaactcccatcactcacagaactggttcaatctcctcagctaggatctt**gt**  
**cctagcacactccttgg**gtatcatttctcatgaattccctcttaaacttgaaaatggccaaaattagttcccaaacagggc  
ttttgcaagagctatcttttctgtttcaagtgtccccgtaccccaccacctacaaccctaaatccctggtgaatttccactg  
cttttgcaaggctccagctgtgggctctcctttccagaatgtctccggttgcaaggctgctcttccattacatctacggctcttag  
aaagcaggggctgctgtgtggctcatctttgtacgccagctcccgccagggacgtggcacgaagcagtgccagtgatga  
acggatgaatggatcaaagccgggagcagggctgccccctgcagctctgccctacctctcccgtttaccgtaagtc  
agcggtaggtctgcagctctccgctctacctctccccgctctgggctgtctttaaaccacagtcggcctctctgcc  
ccctagaaccgccccagcttctgtctcacttc**CTCTCCAGAGGGCGGGCCCTGAGCCGGCACCT**  
**CCCCTTTCGGACAGCTCAAGGACTCAGCCAACTGGCTCACGCCTCCCCTTCA**  
**GCTTCTCTTCACGCACTCCAAGATCTAAACCGAGAATCGAAACTAAGCTGGGG**  
**TCCATGGAGCCTGCACCCGCCGATCTCCGAGGCCCCAGCAGGACCCCGCCC**  
**GGCCCCAGGAGCCCACCATGCCTCCCCCGAGACCCCTCTGAAGGCCGCCA**  
**GCCCAGCCCCAGCCCCAGCCCTACAGAG**gtactattggggttaggggatgatggggttaagctttgt  
tggttgctgtggtggggagaggcgggaagagaggggtctaacggaggatttggtaagttaccctagagagtgacac  
aaagcgggaagtccagacaccagggctctgaccgtctcgggtggggcaggggaagggagggtaggatagagtag  
aaaagaggacacggaggagttggggcggcctcgctgggctgcgggttctccactgagcagttgggcaaggtgaga  
agggtcagtggcctccgggctgggcccctccgcccaccctcgagccctgcctcaactttgcctcagatgcaggacttc  
agattagggaggatggaggtagtagtaccctgttgcgctggcctggagccaggggcatgtcccaggcacggcaaaact  
aaaaccaactcccagatccgaggtgagaaactggctcagactgaagaggtatctttgccaaggcctcccagctcat  
gtggttctgcttaaggaagcctcccaacgaacccttctcttgccacacctttcctgcccacctcccacctccccgaca  
aaggaactacttgggttcttctgctctgctgcctttc**agggccttttactcccctt**catgaaagtacagaggacaccgtatt  
acagtaactttataaacattattacaactaagaataacattacttaacaatactaggtaacatttatgagcacttca

RASSF6

Primer fw: **CTGGCGTTTGAACACGAAAGA**

Primer rev: **GGTAGGTTCAAAGCTCGGCT**



attgtgcctggcaaaaatcgtgccttacaagatactagacttctggatggcatactccttctctgagatccttatggta  
gaatattgtgtgaatcatcgactggaaagaactaattgaggggtcagctcaacttttattgtttctgcaaagtgacaga  
aagcatgccccccaccaaaaaaaaaaatgaatttcaatataagcgctcaccaacaatgaataataaacataaat  
aattaaatgggagtgatgagtaaggatatgaattctgaagcagaagagt**ggtaggttcaagctcggct**ttgcc  
cttattagtttccccctctcaagtttctaacctaagccccaacgttgtctgtaaaacaagcatcatcaaaggatctgc  
cacataaggctttctttgatgggaactgaacagtcagcaagtggtctgtaagtatacctactgttagcattaagaataag  
ctgctctgccaagggggccgttatcagggagggcaagctgaactagggagaccagacagtggtattaggtatgctg  
gaattgaactggttccggagactggatccaggacaggcaagcaggtgacaggtgtgctaggatcatctctctgggta  
gcaacgaaatgacctggcttcttccattttcagatagagtatgtggtggcaaattcagacataattgctactcaatcagttt  
tctttgaaaaattcacatttacattaatctgttattcctaaaagaaaatagaatttagagtaagagagttacacacaatc  
tcatatttggaattcatgccatttgggttta

## NLRP12

**Primer fw: CAGGGCCACAGAGTAAGACT**

**Primer rev: GAGGGCAGATCACTTGAGGT**

## NLRP12 **Exon 1:**

ATTGGTGAGTGGGGCAGGGCAGGAGGGAACTGAAGAGTGAGAAAGCATTATTT  
CAGCAAAGGTCTTTCCCTCCCTTGCTCTCTCCTCCAACCACTGGCTCAGCCTCT  
CCGCCCCGCTGCCTGTGAATGATGCAATGGAAGGTGTGCTGGGGTCCGCCCTGTG  
TCCCGTGCATAGGAGCATCTCAGCCTCCAGGTCCTCTCCTTTGGGGCTCACGG  
CACCCCATGCTACGAACCGCAGGCAGGGACGGCCTCTGTGCGCCTGTCCACCT  
ACTTGGAAGAACTCGAGGCTGTGGAAGTGAAGAAGTTCAAGTTATACCTGGGGA  
CCGCGACAGAGCTGGGAGAAGGCAAGATCCCCTGGGGAAGCATGGAGAAGGC  
CGGTCCCCTGGAAATGGCCCAGCTGCTCATCACCACTTCGGGCCAGAGGAGG  
CCTGGAGGTTGGCTCTCAGCACCTTTGAGCGGATAAACAGGAAGGACCTGTGG  
GAGAGAGGACAGAGAGAGGACCTGGTGAGGG

NLRP12 mit Exon 1:

ctgggaggcggagggtgcagtgagctgagatcacgccagtgaactctagcctgggtggcagagtgagactctgactc  
aaagaaaaaaaaaaaaaaaaaagccagggacggtggctcacacctgtaatcctagcactttggaaggctgaggc  
gggtgatcacctgaggtcaggagttcgagaccagcctgaccaacatggtgaaaccctgtctctctaaaaccacaa  
aaattagctgggtgtggtgtccggcgcctgtaatcccagctactcaagggaaagctgaggtgggagaatcgctgaacc  
tgggaggcagaggttgcggtgagccaagatcgagagc**cagggccacagagtaagact**ctgtctcaaaaaaa  
aaaaattctccctggaagaggcgcagtcgcagtttgataatacactctaccacacacactagtgaatgaggaaaa  
caagaggaaagcggaaagagagtgactgtttgtcaagagatccaggaagagacagcagaagtgaaaatcttttc  
atcagccaagtggctcctcggatttctaactccccccgaactcctctctccaccagaacagcc**ATTGGTGA**  
**GTGGGGCAGGGCAGGAGGGA**ACTGAAGAGTGAGAAAGCATTATTT**CAGCAA**  
**AGGTCTTTCCTCCCTTGCTCTCTCCTCCA**ACTGGCTCAGCCTCTCC**GCCCG**  
**CTGCCTGTGAATGATGCAATGGA**AGGTGTGCTGGGGTCGCCCTGTGTCCCGT  
**GCATAGGAGCATCTCAGCCTCCAGGTCCTCTCCTTTGGGGCTCACGGCACCCC**  
**CATGCTACGAACCGCAGGCAGGGACGGCCTCTGTCGCCTGTCCACCTACTTG**  
**GAAGAACTCGAGGCTGTGGA**ACTGAAGAAGTTCAAGTTATACCTGGGGACCG  
**CGACAGAGCTGGGAGAAGGCAAGATCCCCTGGGGAAGCATGGAGAAGGCCG**  
**GTCCCCTGGAAATGGCCCAGCTGCTCATCACCCACTTCGGGCCAGAGGAGGC**  
**CTGGAGGTTGGCTCTCAGCACCTTTGAGCGGATAAACAGGAAGGACCTGTGG**  
**GAGAGAGGACAGAGAGAGGACCTGGTGAGGG**gtaaggaggtggcgggacaggcaaggct  
agaatgccagccgggtccagtgactcatacctgtaatctcagcactttgggaggctgaa**gagggcagatcactga**  
**ggt**gaggagtcaagaccagctctggacaacatagtgaggctctgtctctaccaaaaaataaaaaaattagccaggtg  
tgggtgatacgtctgtgatccagctctcaggaggctgaggtgggaggatcacttgagaccagaaggctcgaggctg  
cggtgagctatgatcctgccactgcaccccagcctaggtgacagaacgagacctgcctcaaataatttaaataatatttt  
ttaaataatataatttaaataatatttttaaataatataatttttaaataatataatttttaaataatataatttttaa  
tataatttaaacaatataatttttaaataatataatttttaaataatataatttttaaataatataatttttaa

### 3.3 Stabile Transfektion von Hepatomzelllinien mit sgRNA: heterozygoter PML, RASSF6, NLRP12 knockout

Die Hepatomzelllinien wurden in eine 24er-Lochplatte zu  $5 \times 10^4$  ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei 80 % Konfluenz und 2 Stunden vor Transfektion, wurde das Medium abgenommen und durch das in Tabelle 9 beschriebene Zellkulturmedium, jedoch ohne FCS und Antibiotika, ersetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für die Transfektion, bestehend aus 50 µl OptiMem (Gibco), 500 ng sgRNA (*forward* 350ng and *reverse* 150 ng) und 1,25 µl Fugene HD Transfektionsreagenz (Promega) angesetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz vollständig pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die 24er-Lochplatte wurde für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

#### 3.3.1 Isolierung einzelner transfizierter Klone

Nach Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst, in eine große Petrischale (12 cm Durchmesser) überführt und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen unter dem Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss) nach grüner Fluoreszenz untersucht. Die fluoreszierenden Zellen, welche das Plasmid aufgenommen hatten, wurden auf der Petrischale markiert. Einwegpipetten (Sarstedt) wurden in kleine Ringe geschnitten und von einer Seite in Vaseline getaucht, welche vorher zweimal autoklaviert wurde. Diese wurden um die einzelnen transfizierten Zellen in der Petrischale aufgetragen, um das Ablösen der einzelnen Zellen im entstandenen Ring zu ermöglichen. Im entstandenen Ring wurde die Zelle zuerst einmal mit 20 µl DPBS gewaschen und mit 10 µl Trypsin-EDTA abgelöst. Danach wurde die Zelle zur Koloniebildung in eine 24-er Lochplatte mit 500 µl Zellkulturmedium überführt.

### 3.3.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wurde mittels qrtPCR und Western Blot bestimmt. Hierfür wurden die transfizierten Zellen und unbehandelten Kontrollen mindestens zweimal passagiert und entsprechend des 24-Lochplattenformats ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die RNA wurde wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben isoliert und via qrtPCR (Kapitel 3.7.2) gemessen. Wie im Kapitel 3.6 beschrieben wurde eine Proteinisolation durchgeführt und der Western Blot (Kapitel 3.6.2) gemessen. Die Transfektionseffizienz wurde in Triplikaten überprüft. Die Klone wurden auch mittels Sanger Sequenzierung im MicroSynth Seqlab, Göttingen überprüft. Hierzu wurde eine Genotypisierungs PCR und eine Gel Elektrophorese (siehe Kapitel 3.4 und 3.5) zum aufreinigen durchgeführt. Darauf wurden die Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

### 3.4 DNA Isolation aus der Zellkultur

Zuerst wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin-EDTA gelöst. Danach wurde jeweils 1 ml Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellsuspensionen in Reaktionsgefäße überführt. Nachfolgend wurden diese bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl DPBS resuspendiert. Die Isolation erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Hierbei wurden 20 µl Proteinkinase K und 200 µl AL Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) den Proben beigefügt, welche dann für 15 sek vermischt wurden. Danach wurden die Proben 10 min bei 56 °C inkubiert und kurz anzentrifugiert. Folgend wurden 200 µl 100 % Ethanol beigefügt, die Proben wurden gemischt und erneut kurz zentrifugiert. Es folgte die Überführung auf die QIAamp Zentrifugationssäule (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) und Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. Anschließend wurden 500 µl AW1 Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) hinzugegeben und die Proben bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Darauf folgte die Zugabe von 500 µl AW2 Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) und eine 3-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm sowie das Umsetzen der QIAamp Zentrifugationssäulen (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) in neue Reaktionsgefäße mit einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm. Zuletzt wurden die QIAamp

Zentrifugationssäulen in neue Reaktionsgefäße umgesetzt und je 200 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben bevor die Proben 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert wurden.

### 3.5 Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde mittels PCR und Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Nach der im Schritt 3.4 vermerkten DNA-Isolierung, wurde die DNA Konzentration gemessen und mittels TopTaq Master Mix (Quiagen) die in Tabelle 19 beschriebene Genotypisierungs-PCR angesetzt.

**Tabelle 19: Genotypisierungs-PCR Ansatz**

	<b>1 Reaktion [µl]</b>
TopTaq Master Mix, 2x	12,5
Primer 1 [10 µl]	0,5
Primer 2 [10 µl]	0,5
DNA (max. 100 ng)	1
H <sub>2</sub> O	10,5
Endvolumen der Reaktion	25

**Tabelle 20: PCR-Protokoll für die Genotypisierung der PML, RASSF6 und NLRP12 Klonierung**

	<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [sek]</b>	
<b>1</b>	Primäre Aktivierung der Polymerase	94	180	35- 40 Zyklen
<b>2</b>	Denaturierung	94	30	
<b>3</b>	Primer Annealing	für PML und RASSF6 57,5 °C und für NLRP12 65,5 °C	30	
<b>4</b>	Elongation	72	120	
<b>5</b>	Finale Elongation	72	10 min	



### Tabelle 21: Verwendete PCR-Primer für die Genotypisierung der PML, RASSF6 und NLRP12

Die Primer für die Genotypisierung wurden via Primer3 Software (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar und Remm 2007) erstellt.

Primer	Sequenz	PCR Produkt
PML E1_2 fw	tgctctagcacactccttgg	PML WT: 1420 bp
PML E1_1 rev	gaaggggagtaaaagggcct	Heterozygoter PML <i>knockout</i> : 770 bp
NLRP12 E1_1 fw	cagggccacagagtaagact	NLRP12 WT: 870 bp
NLRP12 E1_2 rev	acctcaagtgatctgccctc	Heterozygoter NLRP12 <i>knockout</i> : 270 bp
RASSF6 E1_1 fw	ctggcgttgaacacgaaaga	RASSF6 WT: 1820bp
RASSF6 E1_2 rev	agccgagcttgaacctacc	Heterozygoter RASSF6 <i>knockout</i> : 650 bp

Es wurden 25 µl der PCR-Reaktion (siehe Tabelle 19) mit 5 µl Probenpuffer (6x loading dye, #R0611, Fermentas) vermischt und sowie der Marker (GeneRuler Express DNA Ladder, #1563, Fermentas) auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Es erfolgte eine ca. 60-minütige Elektrophorese bei 70 V. Die Größen welche aus der Gel-Elektrophorese zu erwarten waren, sind als PCR Produkt in Tabelle 21 angegeben.

### 3.6 Gesamt-Protein-Isolation und Analyse aus der Zellkultur

Nach dem Entfernen des Mediums, wurden die Zellen mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von kaltem 300 µl RIPA Puffer (pro 9,6 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) lysiert und dann für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für weitere 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C eingelagert.

### 3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Zelllysate aus Kapitel 3.6 wurden auf Eis aufgetaut es wurde je 1 ml Zellen in 750  $\mu$ l RIPA Puffer mit halt Protease & Phosphatase Inhibitor (1:100) hinzugegeben und anschließend die Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure- (BCA) Assay gemessen. Hierbei wurde aus einer 10 mg/ml BSA-Stocklösung (in ddH<sub>2</sub>O) eine BSA Konzentrationsreihe (0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml) erstellt.

Das Reaktionsgemisch wurde nach Herstellerangaben aus 50 Teilen Reagenz A zu einem Teil Reagenz B hergestellt. Je Vertiefung der 96er-Lochplatte wurden 200  $\mu$ l des Reaktionsgemischs eingefüllt. Dann wurden entweder jeweils 10  $\mu$ l der BSA Konzentrationsreihe, im Triplikat, oder 8  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O und 2  $\mu$ l Proteinprobe zugegeben und die Lochplatte für 30 min bei 37 °C unter leichtem schütteln. lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 526 nm gemessen und die Standardgeradengleichung anhand der Absorptionen der Konzentrationsreihe berechnet. In die Berechnung der Probenkonzentrationen wurde der Verdünnungsfaktor in die Gleichung mit einbezogen.

### 3.6.2 SDS-PAGE und Western Blot

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine nach Größe aufgetrennt. Dies geschieht in einem Polyacrylamidgel welches in die SDS Kammer eingespannt wird. Die Menge an Natriumdodecylsulfat (SDS), welche an das Protein bindet und es denaturiert, ist annähernd proportional zur Größe des Proteins (Smith, 1994). Dieser negativ geladene Komplex kann dann im Bezug auf Ladung und Größe im elektrischen Feld des Polyacrylamidgels wandern (Smith, 1994).

Zuerst wurden 20  $\mu$ l des Zelllysates mit 2  $\mu$ l 8x Probenpuffer für die Proteindenaturierung bei 95 °C für 3 min inkubiert und kurz zentrifugiert. Danach wurden die Gele (mini-Protein-TGX precast Gels, Biorad) mit Proben und Größenstandards (PageRuler Prestained Protein Ladder, 26616, Thermo Scientific und MagicMark XP Western Standard, Invitrogen) beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem Mini Protein Tetra Cell System (Biorad) in TGS Puffer für zunächst 3-5 min bei 20 V und anschließend für 1 Stunde bei 120 V.

Danach erfolgte die Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf die PVDF Blot Membran, wobei hier das semi-dry Verfahren nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Hierbei wurden TransBlot Turbo Midi-PVDF Transferpacks (Biorad) im TransBlot Turbo System (Biorad) benutzt und bei 2,5 Ampere für 7 min übertragen.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren wurde die Membran anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver (5 % Milchpulver in TBS, AppliChem), für RASSF6 in 5 % BSA Lösung (5 % BSA in TBST) geblockt. Der primäre Antikörper (Verdünnung in Tabelle 6 aufgeführt) wurde in 5 % BSA Lösung (5 % BSA in TBST) vorbereitet, auf die Membran aufgebracht und 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 15 min mit TBST gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (für Verdünnung siehe Tabelle 6) in 5 % Milch Lösung (5% Milchpulver in TBST) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für RASSF6 wurde hier wieder 5 % BSA Lösung (5 % BSA in TBST) verwendet. Darauf wurde der Blot erneut dreimal mit TBST für je 15 min gewaschen. Das Detektionsreagenz (Amersham ECL Westernblotting Detection Reagent, GE- Healthcare) wurde auf die Membran gegeben und mittels (ECL Chemostar, INTAS Science Imaging Instruments) detektiert. Daraufhin wurde der Stripping Puffer für 15 min auf die Membran aufgebracht und dann erneut für 1 Stunde in 5 % Milchpulver (5 % Milchpulver in TBST) oder für RASSF6 Blots in 5 % BSA Lösung (5 % BSA in TBST) geblockt und dreimal für 15 min mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran mit der Beladungskontrolle GAPDH (1:5000, Cell Signaling Technology) in 5 % BSA Lösung (5 % BSA in TBST) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 15 min gewaschen und für 1 Stunde mit den Sekundärantikörper in 5 % Milch Lösung (5% Milchpulver in TBST) bei Raumtemperatur inkubiert. Hier wurde für den RASSF6 Blot wieder 5 % BSA Lösung (5 % BSA in TBST) verwendet. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift für 15 min in TBST und die Detektion mittels Detektionsreagenz nach Herstellerangaben.

### 3.7 Isolation und Analyse von Nukleinsäuren

#### 3.7.1 RNA Isolation aus der Zellkultur

Die Isolation der RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Die in einer 12er-Lochplatte ausgesäten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit je 350 µl RLT Puffer je Vertiefung lysiert. Zum Zelllysate wurden 350 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und die Suspension auf eine RNeasy Säule (RNeasy Mini Kit, Qiagen) überführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei Raumtemperatur. Es folgte ein 15-sekündiger Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden 700 µl RW1 Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) hinzugegeben, gefolgt von einer 15-sekündigen Zentrifugation bei 10000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl RPE Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) hinzugegeben. Nach 15-sekündiger Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Durchfluss erneut verworfen. Danach wurden erneut 500 µl RPE Puffer hinzugegeben worauf ein 2-minütiger Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm folgte. Die Säule wurde in ein frisches Auffangröhrchen (RNeasy Mini Kit, Qiagen) überführt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, 70 µl RNase freies H<sub>2</sub>O appliziert und die Säule bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die eluierte RNA bei -80 °C weggefroren.

#### 3.7.2 Quantitative Real-time PCR

##### Experimentelles Vorgehen

Die Genexpression wird mittels der *quantitative reverse transcriptase real-time PCR* (qrt PCR) quantifiziert (Tabelle 23). Das Reaktionsvolumen für eine Reaktion betrug 15 µl im 96er-Lochplattenformat und setzte sich wie folgt zusammen: 7,5 µl QuantiFast SYBR Green RT-PCR Mastermix und 3,925 µl RNase freies H<sub>2</sub>O, 1,5 µl Primer Mix aus je 0,75 µl je Primer, 0,075 µl QuantiFast RT Mix, 2 µl gesamt RNA mit maximaler Menge von 50 ng.

**Tabelle 22: Verwendete Primer für die qrtPCR für die Genexpressionsanalyse mittels qrtPCR**

Primer	Sequenz 5' - 3' /Bestellnummer	Hersteller
hACTB fw:	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	Eurofins MWG Operon
hACTB rev:	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
hPML fw:	Hs_PML_2_SG QuantiTect Primer Assay, #QT01841945	Qiagen, Venlo, Niederlande
hPML rev:		
hRASSF6 fw:	ACAGGACCCAGATTCCTATGTC	Eurofins MWG Operon
hRASSF6 rev:	GCTGCTTCACTCATGGTTCTAT	
hNLRP12 fw:	ACCAGACCTTGACCGACCTT	Eurofins MWG Operon
hNLRP12 rev:	GAGGACTCGGAGTTTGCAGC	

**Tabelle 23: Programm der qrtPCR für die Genexpressionsanalyse mit dem QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit.**

		Temperatur	Zeitintervall	
1	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	50°C	10 min	40 Zyklen
2	Primäre Aktivierung der HotStarTaq Plus DNA Polymerase	95°C	5 min	
3	Denaturierung	95°C	10 s	
4	Primer Annealing/Elongation	60°C	30 s	
5	Schmelzkurve	$\Delta T = -0,5^\circ\text{C}$ pro min (95°C – 60°C)		

### Primer-spezifische Eichgeraden Erstellung

Für die Erstellung der Eichgeraden wurden unbehandelte Kontrollproben mit den jeweils spezifischen Primern vorbereitet und die RT-PCR durchgeführt. Anschließend wurde das RT-PCR Produkt mit dem Quiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration mittels Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Mit folgender Formel 2 wurde jeweils die Kopienzahl der primerspezifischen PCR-Produkte pro Volumeneinheit ermittelt.

**Formel 2: Kopienzahlbestimmung der PCR Produkte**

$$\text{Kopienzahl} \left[ \frac{1}{\mu\text{L}} \right] = \frac{C_{\text{PCR-Produkt}} \left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right]}{M_{\text{PCR-Produkt}} \left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} \cdot N_A \cdot 10^6$$

Danach wurde eine Verdünnungsreihe der primer-spezifischen PCR Produkte erstellt, in welcher die Konzentration von  $1 \times 10^0$  Kopien/ Reaktion bis  $1 \times 10^8$  Kopien/ Reaktion betrug. Anschließend wurde mit der Konzentrationsreihe und den spezifischen Primern eine qrt-PCR nach Herstellerangaben durchgeführt (Quantifast SYBR Green PCR Kit, Qiagen). Die Software des PCR Cyclers (Biorad CFX Manager) wurde für die Eichgeradenberechnung verwendet.

Auswertung

Die qrt-PCR wurde unter Verwendung der ermittelten Geradengleichungen ausgewertet. Die Kopienzahl des primer-spezifischen PCR Produktes wurde zuerst mit folgender Formel 3 bestimmt.

**Formel 3: Kopienzahlbestimmung des qrt-PCR Produktes**

$$\text{Kopienzahl} = 10^{\left( \frac{\text{Ct} - \text{Achsenabschnitt der Eichgerade}}{\text{Steigung der Eichgerade}} \right)}$$

Danach wurde die errechnete Kopienzahl des Zielgens auf die Kopienzahl des *housekeeping* Gens  $\beta$ -Aktin normiert und prinzipiell mit  $10^6$  multipliziert (Formel 4).

**Formel 4: Bestimmung der Genexpression des Zielgens**

$$\text{Genexpression}_{\text{Zielgen}} = \frac{\text{Kopienzahl}_{\text{Zielgen}}}{\text{Kopienzahl}_{\beta - \text{Aktin}}} \cdot 10^6$$

Anschließend wurde der *Fold Change* nach folgender Formel 5 berechnet um Unterschiede in der Genexpression zwischen Zielgen und unbehandelter Kontrolle festzustellen.

**Formel 5: Bestimmung des *Fold Change*.**

$$Fold\ Change_{Stimulation} = \frac{Genexpression_{behandelt}}{Genexpression_{unbehandelt}}$$

3.8 Einfluss eines heterozygoten *knockouts* von PML, RASSF6 oder NLRP12 auf Zellproliferation und Apoptose

3.8.1 Zellproliferation via BrdU Assay

Die Zellproliferation wurde mittels Cell Proliferation EILISA, BrdU (Roche) bestimmt. Es wurden  $2 \times 10^2$  Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Übernacht-Inkubation wurden 10 µl BrdU labelling solution pro 100 µl Medium auf die Zellen gegeben (Endkonzentration 10 µM BrdU) und für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und 200 µl Fixationslösung pro 96er-Vertiefung zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen um die Flüssigkeit zu entfernen, wobei die adhärenen Zellen dabei am Boden der 96er-Lochplatte haften blieben. Daraufhin wurden die Zellen mit je 100 µl Anti-BrdU Antikörper (Stocklösung 1:100 in Antibody dilution solution) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde nochmals ausgeschlagen und dreimal mit je 250 µl Waschlösung (1:10 mit ddH<sub>2</sub>O) gewaschen. Anschließend wurde 100 µl Substratlösung (Lösung B 1:100 mit Lösung A) pro Vertiefung hinzugegeben und die Platte für 3 min bei Raumtemperatur unter schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellproliferation durch Chemilumineszenz gemessen (BMG Labtech).

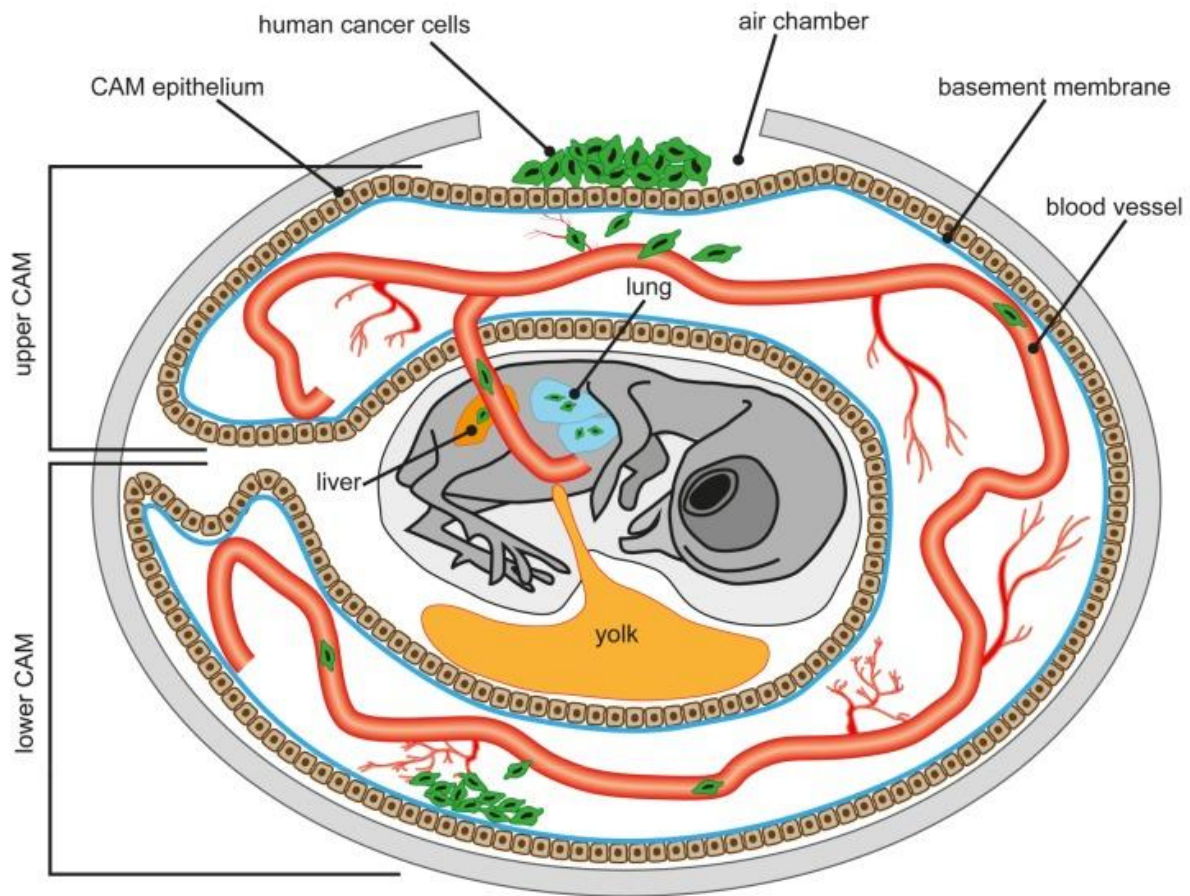
### 3.8.2 Apoptose der Zellen via Caspase-3/7 Assay

Die Apoptoserate der Zellen wurde mittels Apo-One Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega) festgestellt. Zuerst wurden  $2 \times 10^2$  Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät und über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. Es wurden 50  $\mu$ l des Mediums abgenommen und 50  $\mu$ l des Caspase Substrates zugegeben (1:100 in Caspase Puffer) und die Zellen anschließend unter schütteln für 2 Stunden unter Lichtausschluss bei 37 °C inkubiert. Darauf wurde eine Messung bei der Anregungswellenlänge 485 nm und der Emissionswellenlänge 520 nm durchgeführt. Anschließend konnte die Apoptose durch Normalisierung der behandelten Zellen auf die unbehandelten Kontrollen bestimmt werden.

### 3.9 CAM Assay

Mittels Chorioallantois-Membran (CAM) Assay wurde der Einfluss der Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 auf das Tumorwachstum untersucht.





**Abbildung 6: Schematische Übersicht über den CAM Assay. Modifiziert nach Dünker and Jendrossek, 2019**

Übersicht über den CAM Assay und der Applikation der Tumorzellen.

### 3.9.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden mittels Neubauer Zählkammer, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, gezählt und auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro 50  $\mu$ l PBS eingestellt und im Reaktionsgefäß bei 3000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen im Gesamtvolumen von  $1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l PBS pro Ei auf die CAM aufgebracht.

### 3.9.2 Hühnchen Graft am Embryonaltag 10

Die befruchteten Eier wurden in den Brutschrank eingelegt und 10 Tage unter Rotation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Am Embryonaltag 10 (E10) wurden die Eier durchleuchtet, um die die Haupt-CAM-Ader und die Gabelung dieser Ader zu identifizieren. Von dieser ausgehend wurde ein etwa 1 cm<sup>2</sup> großes Quadrat auf 1 cm Entfernung mit einem Bleistift markiert und anschließend ein kleines Loch mit einer spitzen Schere in die Schale am runden Ende des Eies gemacht. Dies dient der späteren Absenkung der CAM. Danach wurde das gekennzeichnete Quadrat mit einem Dremel ausgesägt und mit PBS der Eierschalenstaub entfernt. Das aufgesägte Fenster wurde danach, samt weißer Eihaut, vorsichtig mit einer Pinzette entfernt was zu einem Absinken der CAM führte. Die Applikationsstelle wurde mit einem Wattestäbchen leicht angeraut und die vorbereiteten Zellen (Kapitel 3.9.1) appliziert. Daraufhin wurde das Ei etwa 5 min ruhen gelassen, bevor es mit Tape verschlossen wurde. Die kleine Inzision am runden Ende des Eies wurde ebenfalls mit Tape verschlossen. Die Eier wurden für weitere 7 Tage bei 37 °C im Brutschrank ohne Drehung bebrütet.

### 3.9.3 Präparation der Tumore am Embryonaltag 17

Um die obere und untere CAM freizulegen wurden die Eier, nach 15-minütiger Eiskühlung, der Längsachse nach aufgeschnitten. Der Embryo wurde dekaptiert und samt unterer CAM entsorgt. Die obere CAM wurde mit PBS ausgespült und hinsichtlich entwickelter Tumore untersucht, wonach die Eihälfte mit PBS geflutet und zur Fotodokumentation (NIS Elements 3.22.15, Nikon) ein Bild des Tumors aufgenommen wurde. Die Tumore wurden für weitere Analysen in eine mit PBS gefüllte 24er-Lochplatte überführt.

### 3.9.4 Bestimmung des Einflusses von PML, RASSF6 und NLRP12 auf TumorgroÙe und Gewicht

Die Tumore wurden herauspräpariert, die Größe mittels Fotodokumentation festgehalten und das Gewicht mittels Feinwaage bestimmt. Die TumorgroÙe und das Tumorgewicht wurden zwischen den Tumoren, welche durch Applikation der Hepatomzellen mit heterozygoten *knockout* und den Tumoren welche durch Applikation der Hepatomzellen ohne heterozygoten *knockout* entstanden, miteinander verglichen. Für die Auswertung und graphische Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels einem ungepaarten Student's T- Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf  $P \leq 0,05$  gesetzt.

### 3.9.5 Bestimmung der RNA Expression von PML, RASSF6 und NLRP12 in den Tumoren im CAM Modell

Die isolierten Tumore wurden in 2 ml ReaktionsgefäÙe überführt und 350 µl RLT Puffer zur Stabilisierung hinzugegeben. Diese wurden dann mittels TissueRuptor (Dremel von Qiagen, tissue ruptor) homogenisiert und die RNA Isolation nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt.

Die Reverse Transkription wurde mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit durchgeführt (Qiagen) und die Reaktion lief mit einem Gesamtvolumen von 20 µl. Für die reverse Transkription wurde 1 µl RNA (8 µl Volumen) eingesetzt. Zuerst wurden für Mix A bestehend aus 2 µl gDNA Wipeout Puffer und 4 µl RNase freies Wasser pro Ansatz und für Mix B 4 µl RT Puffer, 1 µl RT Primer Mix und 1 µl Reverse Transkriptase pro Ansatz angesetzt. Erst wurden 6 µl Mix A vorgelegt und 8 µl RNA hinzugegeben. Dies wurde 2 min bei 42 °C erhitzt, um genomische DNA zu eliminieren. Darauf wurden 6 µl Mix B hinzugegeben und die reverse Transkription fand 20 min bei 42 °C statt. Um die reverse Transkriptase zu inaktivieren wurden die Proben 3 min bei 95 °C erhitzt.

Die TaqMan Expression Assays (Kapitel 2.11) wurden für die darauffolgende TaqMan Real-Time PCR verwendet. Es wurden jeweils 50 ng cDNA mit einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe eingesetzt und nach Herstellerangaben mit dem TaqMan™ Gene Expression Master-Mix (Thermo Scientific) durchgeführt. Dies geschah in technischen

Triplikaten nach folgendem Temperaturprogramm (Tabelle 23). Die 18-S ribosomale Untereinheit diente in allen TaqMan Assays als interne Referenz.

**Tabelle 24: Programm der TaqMan Real-Time Assays**

Schritt	Dauer	°C	Zyklen
Initiale Heizphase	2 min	50 °C	1
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1
Denaturierung	15 s	95 °C	40
Hybridisierung	60 s	60 °C	

### 3.10 Statistische Auswertung

#### 3.10.1 Statistische Auswertung von *in vitro* und *in vivo* Analysen

Für die statistische Auswertung der *in vitro* Experimente wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$ SEM (*standard error of the mean*) oder als Standardabweichung angegeben. Varianzen zwischen zwei Gruppen wurden mittels Student's T-Test mit Welch Korrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $P \leq 0,05$  gesetzt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software).

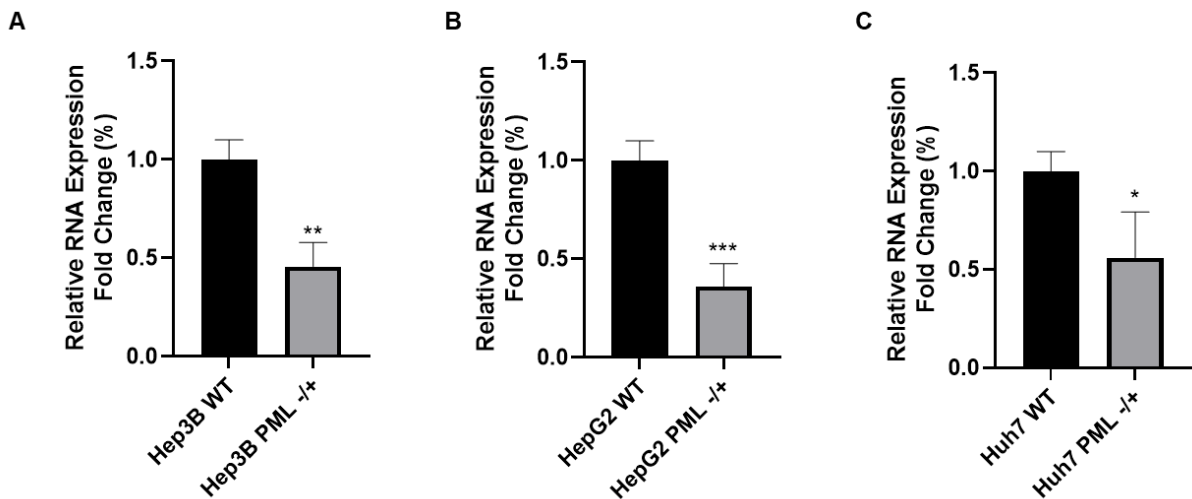
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Heterozygoter *knockout*

Um den Einfluss von PML, RASSF6 und NLRP12 auf die Hepatokarzinogenese genauer zu untersuchen, wurden die Hepatomzelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B mit einem heterozygoten *knockout* von Exon 1 in diesen Proteinen generiert.

#### 4.1.1 Relative RNA Expression von PML

Die *knockout* Effizienz wurde mittels qPCR (Kapitel 3.7) für den jeweiligen heterozygoten PML *knockout* in den drei Hepatomzelllinien überprüft und zeigte eine signifikant verminderte Genexpression. In den Hep3B heterozygoten PML *knockout* Zellen war die Genexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant um 54 % vermindert ( $P^{**} = 0,004$ ). In den HepG2 Zellen mit heterozygoten PML *knockout* war die PML Expression signifikant um 64 % ( $P^{***} = 0,0006$ ) und in den Huh7 Zellen mit heterozygoten PML *knockout* signifikant um 44 % ( $P^{*} = 0,0297$ ) reduziert, im Vergleich zu der korrespondierenden Kontrollzelllinie ohne heterozygoten PML *knockout* (Abbildung 7 A-C).

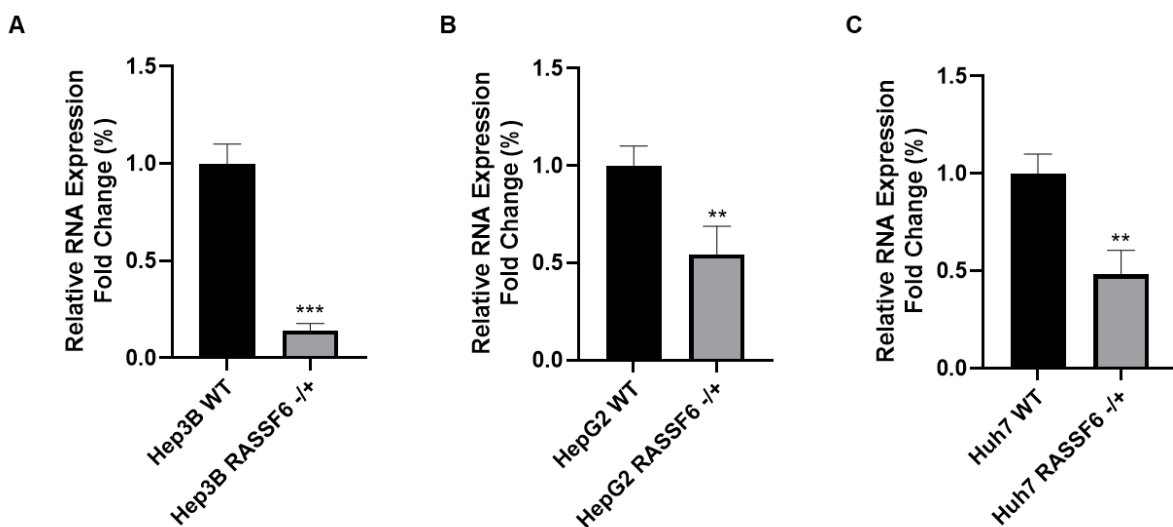


**Abbildung 7: Relative RNA Expression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die relative RNA Expression ist als *Fold Change* und Standardabweichung der heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P^{**} = 0,004$ ); **B:** HepG2 ( $P^{***} = 0,0006$ ); **C:** Huh7 ( $P^{*} = 0,0297$ ). Die Analyse erfolgte in drei unabhängigen Experimenten und wurde mittels qrtPCR gemessen. Die PML Genexpression wurde auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin normiert und erfolgte in drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

#### 4.1.2 Relative RNA Expression von RASSF6

Auch für den heterozygoten *knockout* des RASSF6 Gens zeigte die qrtPCR Analyse (Kapitel 3.7) für alle Hepatomzelllinien eine signifikant verminderte Genexpression. Die Genexpression war in den Hep3B Zellen mit heterozygoten RASSF6 *knockout* um 86 % signifikant reduziert, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ( $P^{***} = 0,0002$ ). Die RASSF6 Genexpression war, im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollzelllinien, sowohl in den HepG2 Zellen mit heterozygoten RASSF6 *knockout* um 46 % signifikant vermindert ( $P^{**} = 0,0056$ ) als auch in den Huh7 Zellen mit heterozygoten RASSF6 *knockout* um 52 % ( $P^{**} = 0,002$ ) (Abbildung 8 A-C).

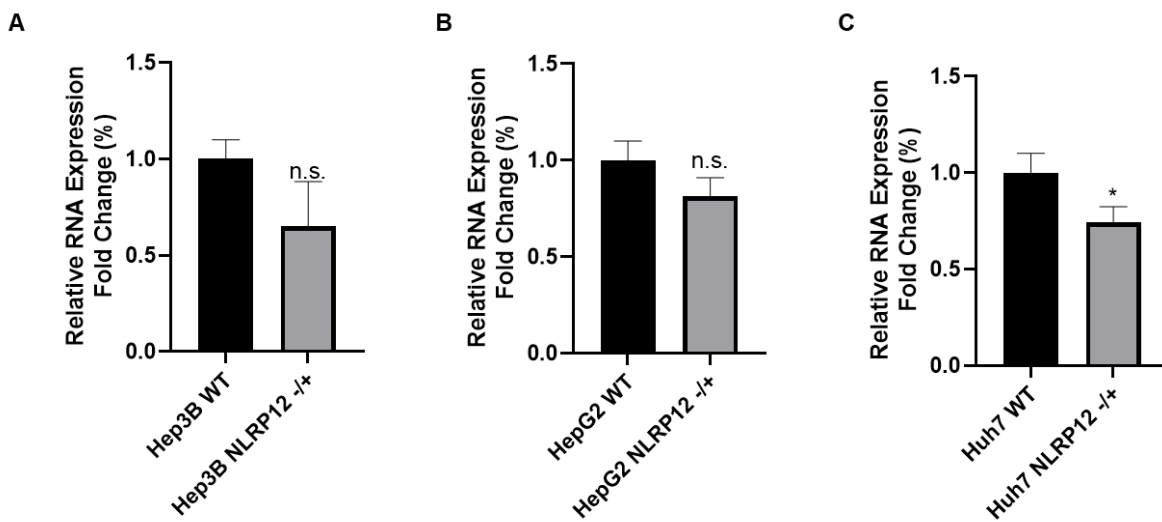


**Abbildung 8: Relative RNA Expression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten RASSF6 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Dargestellt ist der *Fold Change* und die Standardabweichung der relativen RNA Expression der heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT). **A:** Hep3B ( $P^{***} = 0,0002$ ); **B:** HepG2 ( $P^{**} = 0,0056$ ); **C:** Huh7 ( $P^{**} = 0,002$ ). Die Analyse wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und mittels qrtPCR verifiziert. Hierbei wurde auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin normiert. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

### 4.1.3 Relative RNA Expression von NLRP12

Auch der heterozygote *knockout* des NLRP12 Gens wurde mittels qrtPCR (Kapitel 3.7) in allen drei Hepatomzelllinien überprüft (Abbildung C). Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen war die Genexpression in den Hep3B Zellen mit heterozygoten NLRP12 *knockout* ( $P = 0,0751$ ) um 35 % und in den HepG2 Zellen mit heterozygoten NLRP12 *knockout* um 19 % vermindert ( $P = 0,0812$ ). In den Huh7 Zellen mit heterozygoten NLRP12 *knockout* konnte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen eine um 26 % signifikant verminderte Genexpression des NLRP12 beobachtet werden ( $P^* = 0,0259$ ) (Abbildung 9 A-C).



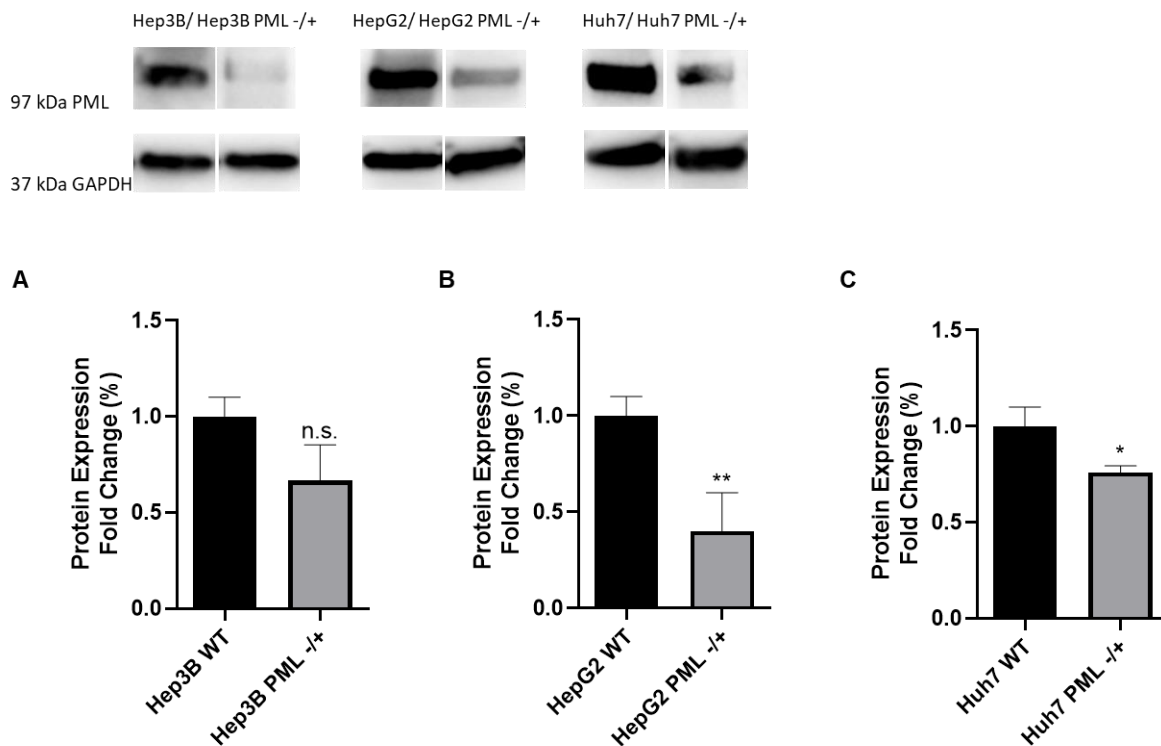
**Abbildung 9: Relative RNA Expression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten NLRP12 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die relative RNA Expression ist als *Fold Change* und Standardabweichung der heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P = 0,0751$ ); **B:** HepG2 ( $P = 0,0812$ ); **C:** Huh7 ( $P^* = 0,0259$ ). Es erfolgte eine qrtPCR Analyse der drei unabhängigen Experimenten mit anschließender Normierung auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.



#### 4.1.4 Proteinexpression von PML

Mittels Western Blot Analyse (Kapitel 3.6) wurde die *knockout* Effizienz in den Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 für den jeweiligen heterozygoten PML *knockout* überprüft und zeigte eine verminderte Proteinexpression. In den heterozygoten Hep3B PML *knockout* Zellen war die Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 33 % vermindert ( $P = 0,0523$ ). In der Zelllinie HepG2 mit heterozygoten PML *knockout* bestand eine signifikante Verminderung der Proteinexpression um 60 % ( $P^{**} = 0,0054$ ) und in den Huh7 Zellen mit heterozygoten PML *knockout* eine um 24 % ( $P^* = 0,0171$ ) verminderte Proteinexpression, verglichen mit der jeweiligen Kontrollzelllinie ohne heterozygoten *knockout* (Abbildung 10 A-C)

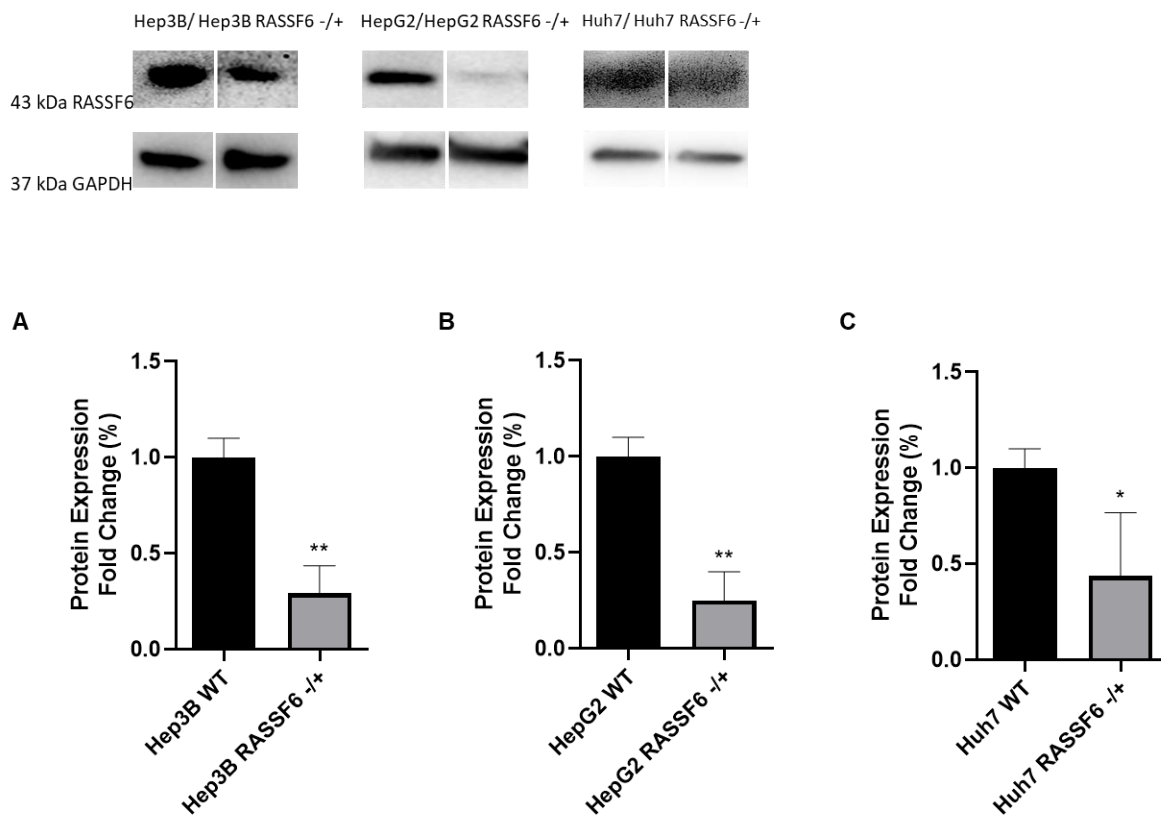


**Abbildung 10: Proteinexpression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Proteinexpression ist als *Fold Change* der heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P = 0,0523$ ); **B:** HepG2 ( $P^{**} = 0,0054$ ); **C:** Huh7 ( $P^* = 0,0171$ ). Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageJ, von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigem Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet.

#### 4.1.5 Proteinexpression von RASSF6

Für den jeweiligen heterozygoten RASSF6 *knockout* in den Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 wurde die Proteinexpression bezüglich der *knockout* Effizienz mittels Western Blot ermittelt (Kapitel 3.6) und war signifikant vermindert. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle war diese in den Hep3B Zellen mit heterozygoten RASSF6 *knockout* um 71 % vermindert ( $P^{**} = 0,0021$ ), in der HepG2 Zelllinie mit heterozygoten RASSF6 *knockout* um 75 % ( $P^{**} = 0,002$ ) und in der Hepatomzelllinie mit heterozygoten RASSF6 *knockout* um 56 % ( $P^* = 0,0378$ ) (Abbildung 11 A-C).

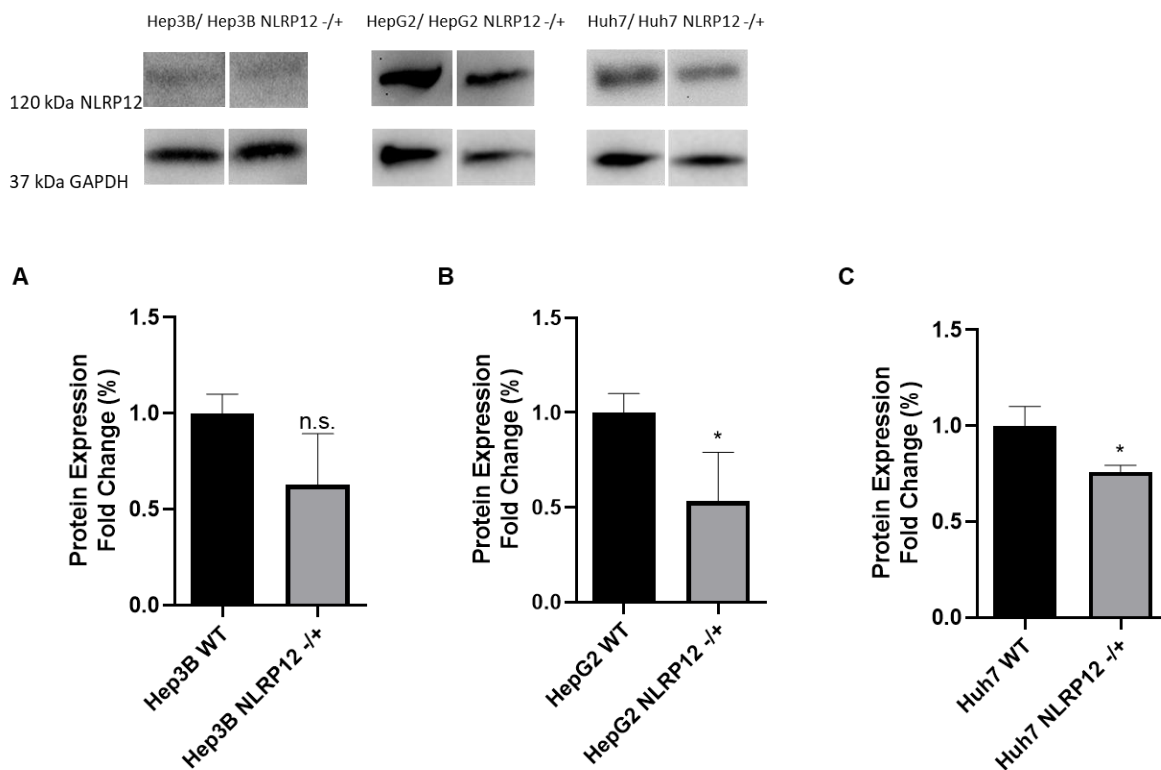


**Abbildung 11: Proteinexpression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten RASSF6 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Proteinexpression ist als *Fold Change* der heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P^{**} = 0,0021$ ); **B:** HepG2 ( $P^{**} = 0,002$ ); **C:** Huh7 ( $P^* = 0,0378$ ). Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageJ, von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigem Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

#### 4.1.6 Proteinexpression von NLRP12

Mittels Western Blot (Kapitel 3.6) wurde die Proteinexpression für den jeweiligen heterozygoten PML *knockout* in den Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 bezüglich der *knockout* Effizienz überprüft und zeigte eine Verminderung. In den Hep3B heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen war die Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 37 % vermindert ( $P = 0,0861$ ). In der Zelllinie HepG2 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* bestand eine signifikante Verminderung der Proteinexpression um 47 % ( $P^* = 0,0429$ ) und in den Huh7 Zellen mit heterozygoten NLRP12 *knockout* um 24 % ( $P^* = 0,0171$ ), verglichen mit der jeweiligen Kontrollzelllinie ohne heterozygoten *knockout* (Abbildung 12 A-C).



**Abbildung 12: Proteinexpression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten NLRP12 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

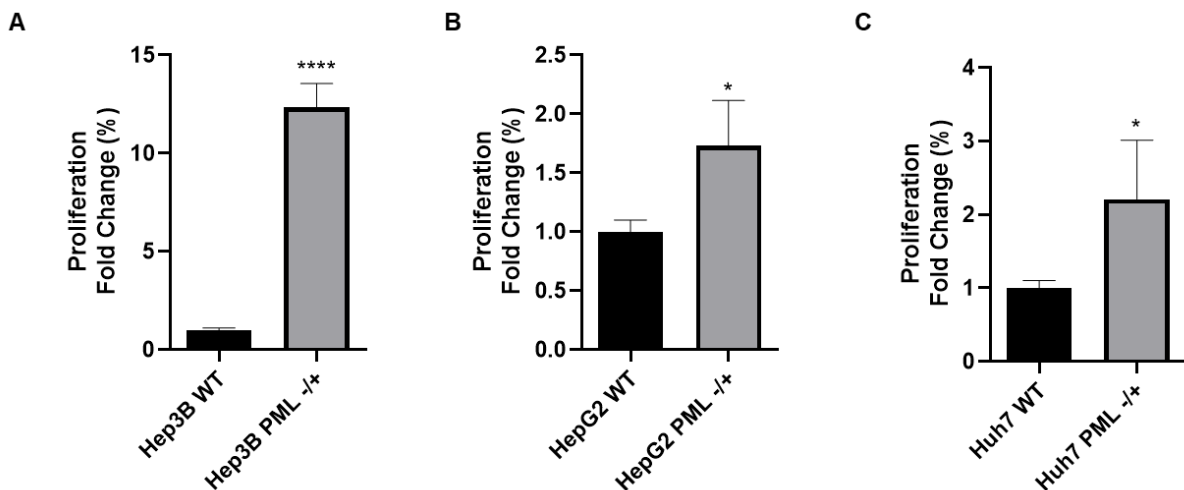
Die Proteinexpression ist als *Fold Change* der heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 *-/+*) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P = 0,0861$ ); **B:** HepG2 ( $P^* = 0,0429$ ); **C:** Huh7 ( $P^* = 0,0171$ ). Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageJ, von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

## 4.2 Die Rolle von PML in der Hepatokarzinogenese

Um den Einfluss von PML auf die Proliferation genauer zu untersuchen wurde das Proliferationsverhalten der Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML *knockout* mittels BrdU Assay untersucht und mit den unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Der BrdU Proliferations-Assay wurde nach Herstellerangaben (siehe Kapitel 3.8.1) durchgeführt.

### 4.2.1 Der Einfluss von PML auf die Proliferation von Hepatomzellen

Die Proliferation der Hep3B ( $P^{****} = 0,0001$ ), HepG2 Zellen ( $P^* = 0,0251$ ) und Huh7 Zellen ( $P^* = 0,0461$ ) mit heterozygoten PML *knockout* nahm, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, signifikant zu. (Abbildung 13 A-C). In Hep3B um 1134 %, in HepG2 um 73 % und in Huh7 um 121 %.



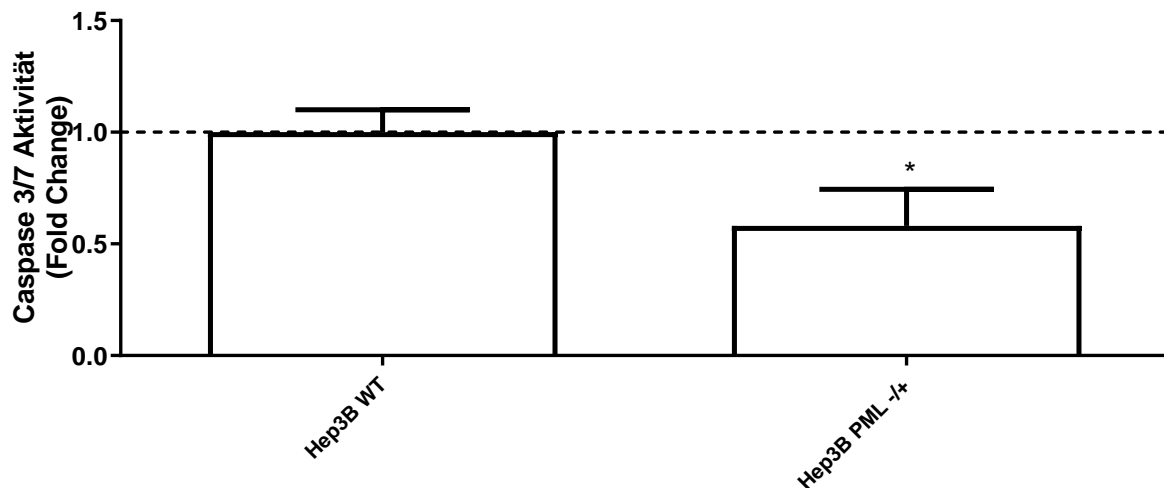
**Abbildung 13: Zellproliferation der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Zellproliferation wurde mittels BrdU Assay gemessen und als *Fold Change* und Standardabweichung der heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P^{****} = 0,0001$ ); **B:** HepG2 ( $P^* = 0,0251$ ); **C:** Huh7 ( $P^* = 0,0461$ ). Die Messung fand zwei Stunden nach Applikation statt und wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mittels zweiseitigem ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

#### 4.2.2 Der Einfluss von PML auf die Apoptose von Hepatomzellen

Um den Einfluss von PML auf das Apoptoseverhalten zu untersuchen wurde die Apoptose der Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML *knockout* mittels Caspase 3/7 Assay nach Herstellerangaben gemessen (siehe Kapitel 3.8.2). Der heterozygote PML *knockout* beeinflusste die Apoptose der Hepatomzelllinien tendenziell aber jedoch nicht immer signifikant (Abbildung 14 bis 16).

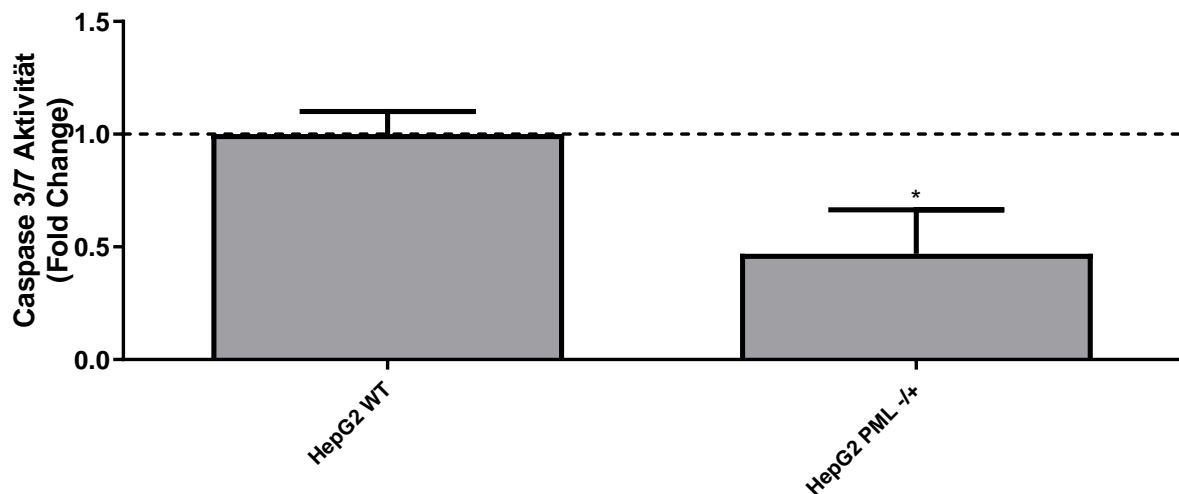
Die Bestimmung der Apoptose mittels Caspase 3/7 Assay zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Hep3B Zellen für die Hep3B Zellen mit heterozygoten PML *knockout* eine um 42 % signifikant verminderte Apoptose ( $P^* = 0,0118$ ) (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Apoptose der Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten PML *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Das Apoptoseverhalten der Zellen wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen und als *Fold Change* und Standardabweichung der Hep3B heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML +/-) normalisiert auf die Hep3B Kontrollzellen (WT) dargestellt ( $P^* = 0,0118$ ). Die Analyse erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

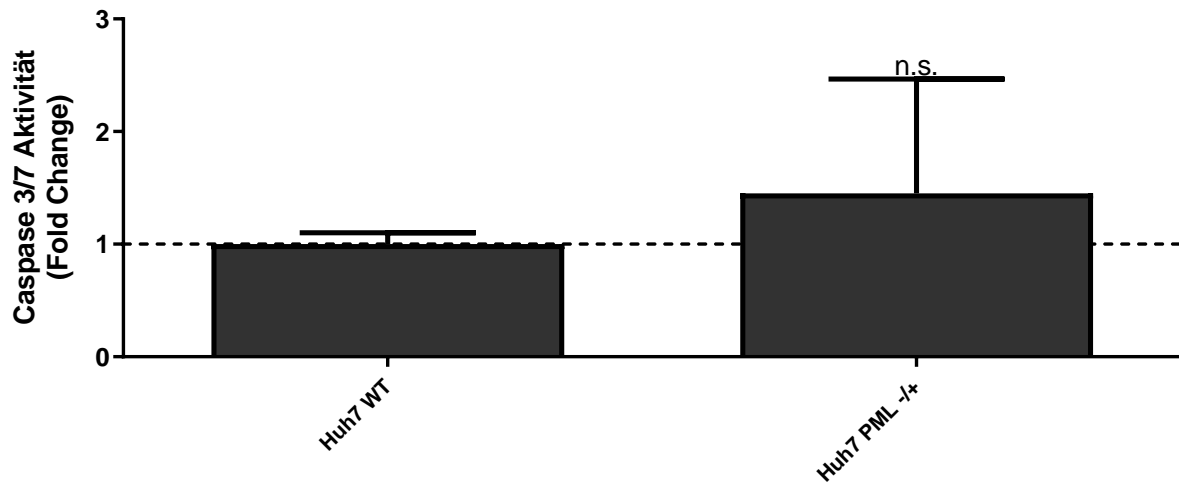
Bei den HepG2 Zellen mit heterozygoten PML *knockout* kam es zu einer um 53 % signifikant verminderten Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten HepG2 Zellen ( $P^* = 0,0138$ ) (Abbildung 15). Der heterozygote PML *knockout* führte somit zu einer signifikanten Reduktion des Apoptoseverhaltens in der Zelllinie HepG2 (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Apoptose der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten PML *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen und als *Fold Change* und Standardabweichung der HepG2 heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML +/-) normalisiert auf die HepG2 Kontrollzellen (WT) dargestellt ( $P^* = 0,0138$ ). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

Es zeigte sich eine Tendenz zu einer um 45 % erhöhten Apoptose durch den heterozygoten PML *knockout* in der Zelllinie Huh7 ( $P = 0,4882$ ) (Abbildung 16).

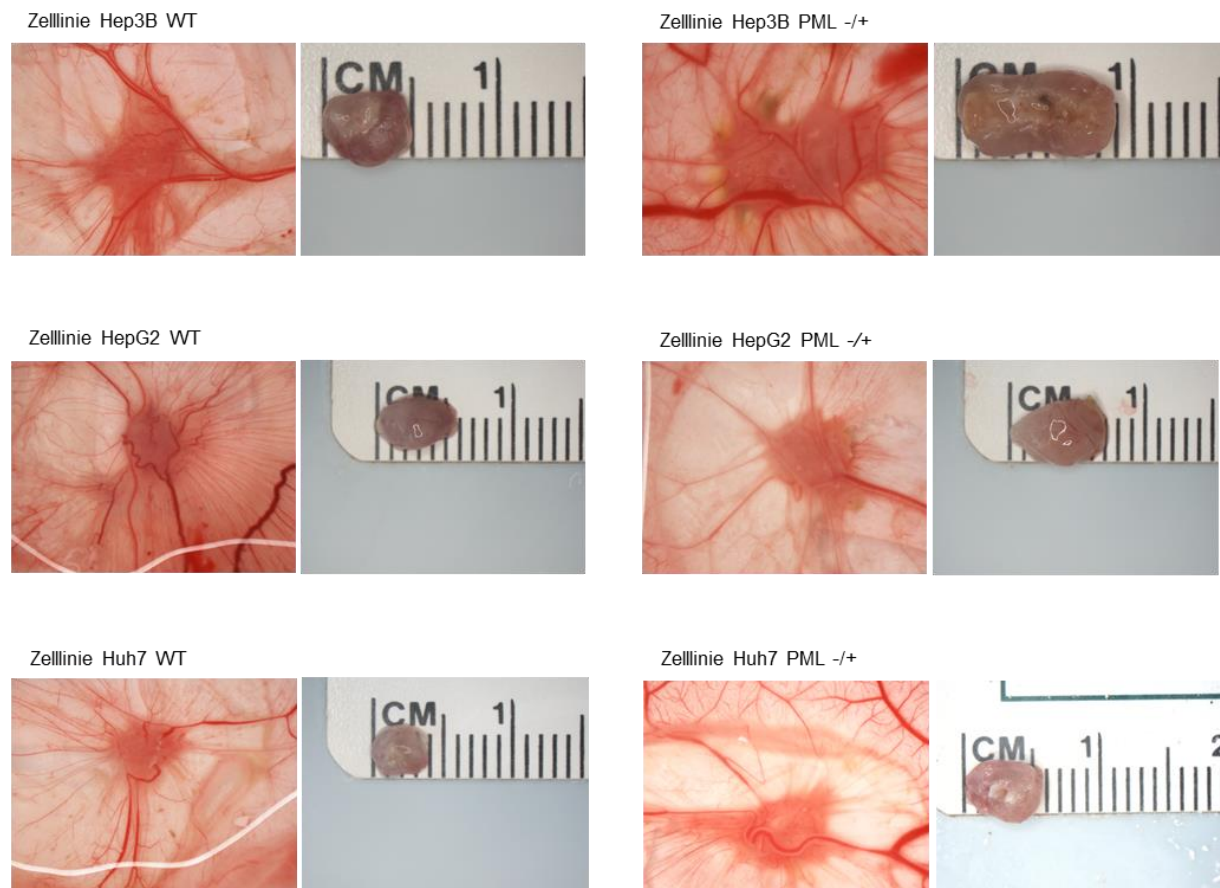


**Abbildung 16: Apoptose der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten PML *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Assay bestimmt. Dargestellt ist der *Fold Change* und die Standardabweichung der Huh7 heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML +/-) im Vergleich zu der unbehandelten Huh7 Kontrollzelllinie (WT). Es zeigte sich eine Tendenz zu erhöhter Apoptose ( $P = 0,4882$ ). Die Analyse erfolgte in mindestens drei Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$ .

#### 4.2.3 Der Einfluss von PML auf das Tumorwachstum des HCCs im CAM Modell

Um den Einfluss von PML auf die Tumorgröße und das Tumorgewicht zu untersuchen wurde der CAM Assay durchgeführt (siehe Kapitel 3.9) (Abbildung 17). Es wurden die Hepatomzelllinien als Kontrolle und die Hepatomzelllinien mit dem heterozygoten PML *knockout*, wie in Kapitel 3.9.1 beschrieben, appliziert.

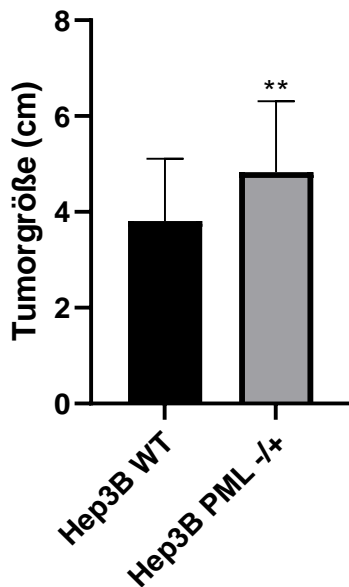


**Abbildung 17: Beispiele der Fotodokumentation der durch den heterozygoten PML *knockout* entstandenen Tumore aus dem CAM Modell**

Beispielhafte Ansicht der Tumore die im CAM Modell durch die Applikation von den Kontrollzelllinien und mit heterozygoten PML *knockout* entstanden sind. Dargestellt sind die Tumore in der Eierschale und auf dem Lineal. Die Fotodokumentation entstand mit NIS Elements 3.22.15, Nikon.



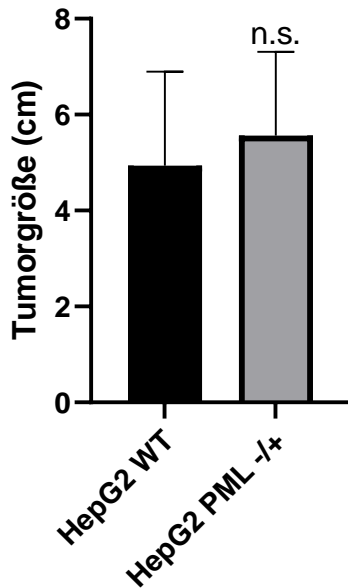
Die Tumorgröße der Tumore, welche durch Applikation der Hep3B Zellen mit dem heterozygoten PML *knockout* entstanden, war signifikant größer im Vergleich zu den Tumoren die sich nach Applikation der unbehandelten Hep3B Kontrollzellen entwickelten ( $P^{**} = 0,0094$ ). Die Ergebnisse zeigen, dass der heterozygote PML *knockout* in den Hep3B Zellen zu signifikant größeren Tumoren führt ( $P^{**} = 0,0094$ ) (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Tumorgröße von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten PML *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der Hep3B heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML -/+) sowie der Hep3B Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell entstanden sind, wurden nach 7-tägiger Inkubation isoliert und mit einem Lineal die Größe in cm bestimmt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant größer ( $P^{**} = 0,0094$ ). Es wurden mindestens drei Experimente analysiert und die Größe als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$ .

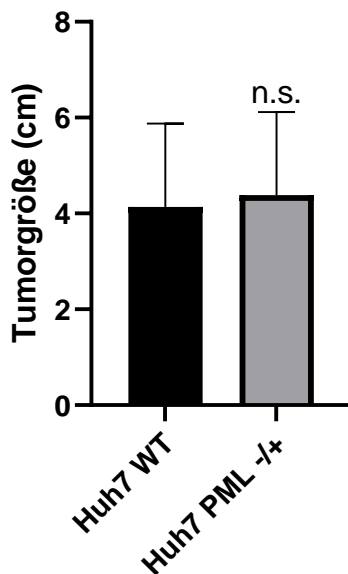
Die Tumorgröße der Tumore, welche durch die Applikation der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten PML *knockout* entstanden, war tendenziell etwas größer im Vergleich zu den Tumoren die sich nach Applikation der Kontrollzellen bildeten ( $P = 0,1696$ ) (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Tumorgröße von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten PML *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, welche durch die Applikation der Hepatomzelllinie HepG2 (WT) und der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten PML *knockout* (PML +/-) nach 7-tägiger Inkubation entstanden, wurden isoliert und mit dem Lineal gemessen ( $P = 0,1696$ ). Die Größe ist als Balkendiagramm in cm mit Standardabweichung dargestellt. Es wurden mindestens drei Experimente analysiert. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

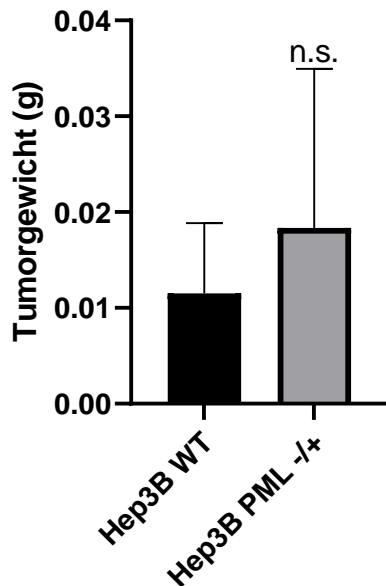
Die Größe der Tumore, welche durch die Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten PML *knockout* im CAM Modell entstanden, war im Vergleich zu den gebildeten Tumoren nach Applikation der Kontrollzellen kaum verändert ( $P = 0,6062$ ) (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Tumorgöße von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten PML *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Via CAM Assay wurden die Tumore, die nach Applikation der Huh7 heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML -/+) sowie der Huh7 Kontrollzellen (WT) nach 7-tägiger Inkubation entstanden, isoliert und mit einem Lineal vermessen. Es bestand keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle ( $P = 0,6062$ ). Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  von mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm in cm mit Standardabweichung dargestellt.

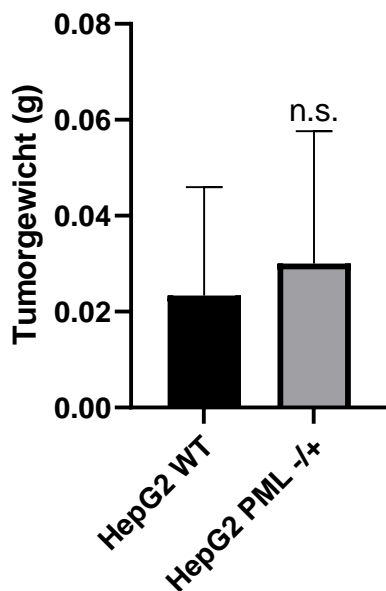
Das Tumorgewicht der Tumore, welche durch die Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten PML *knockout* im CAM- Assay entstanden, war tendenziell etwas höher als das Gewicht der Tumore, die sich nach Applikation der Kontrollzellen bildeten ( $P = 0,0594$ ) (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Einfluss eines heterozygoten PML *knockouts* in Hep3B Zellen auf das Tumorgewicht im CAM Modell**

Die Tumore, die nach Applikation der Hep3B heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML -/+) sowie der Hep3B Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell entstanden sind, wurden nach 7-tägiger Inkubation isoliert und mittels Feinwaage das Gewicht in Gramm bestimmt. Dargestellt ist das Gewicht in Gramm als Balkendiagramm mit Standardabweichung. Es erfolgten mindestens drei Experimente für die Analyse. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant schwerer ( $P = 0,0594$ ). Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

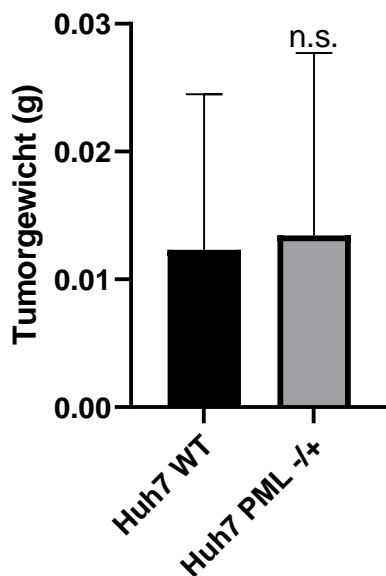
Das Gewicht der Tumore aus dem CAM Modell, welche durch die Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten PML *knockout* entstanden sind, war im Vergleich zu den Tumoren die sich nach Applikation der Kontrollzellen entwickelten etwas erhöht (P = 0,2741) (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Tumorgewicht von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten PML *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der HepG2 heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML -/+) sowie der HepG2 Kontrollzellen (WT) entstanden, wurden nach 7-tägiger Inkubation isoliert und das jeweilige Gewicht in Gramm mittels Feinwaage ermittelt (P = 0,2741). Das Gewicht wird als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt; für die Analyse erfolgten mindestens drei Experimente. Die statistische Analyse wurde mittels zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

Das Tumorgewicht der Tumore, welche durch die Applikation der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten PML *knockout* entstanden, wurde durch den heterozygoten PML *knockout* nicht beeinflusst, jedoch ist eine leichte Steigung zu sehen ( $P = 0,7623$ ) (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Tumorgewicht von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten PML *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

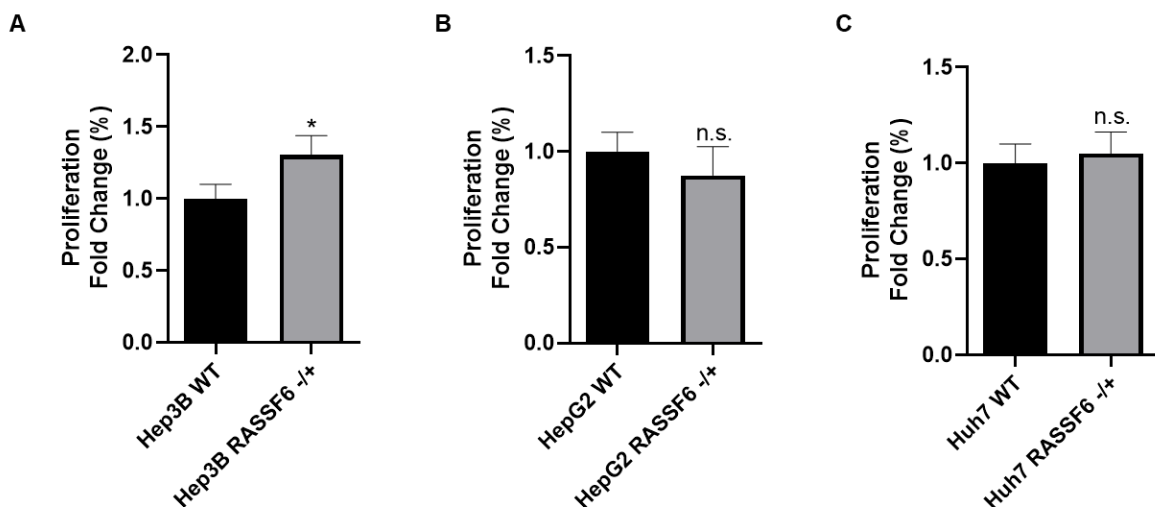
Die Tumore, die nach Applikation der Huh7 heterozygoten PML *knockout* Zellen (PML +/-) sowie der Huh7 Kontrollzellen (WT) im CAM Assay nach 7-tägiger Inkubation entstanden, wurden isoliert und das jeweilige Gewicht mittels Feinwaage ermittelt. Dargestellt ist das Gewicht in Gramm als Balkendiagramm mit Standardabweichung. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant schwerer ( $P = 0,2623$ ). Analysiert wurden mindestens drei Experimente. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

### 4.3 Die Rolle von RASSF6 in der Hepatokarzinogenese

Der Einfluss eines heterozygoten RASSF6 *knockouts* auf die Zellproliferation der Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 wurde wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben mittels BrdU Assay genauer untersucht (Abbildung 24).

#### 4.3.1 Der Einfluss von RASSF6 auf die Proliferation von Hepatomzellen

Durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* kam es in den Hep3B Zellen zu einer signifikant stärkeren Zellproliferation welche um 30 % erhöht war ( $P^* = 0,0361$ ). Im Falle der HepG2 ( $P = 0,2724$ ) und Huh7 ( $P = 0,5705$ ) Zellen mit heterozygoten PML *knockout* wurde im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen keine Zunahme der Proliferation beobachtet. In den HepG2 Zellen mit heterozygoten PML *knockout* war die Proliferation um 12 % vermindert, wohingegen sie in Huh7 mit heterozygoten PML *knockout* um 5 % durchschnittlich erhöht war (Abbildung 24 A-C).



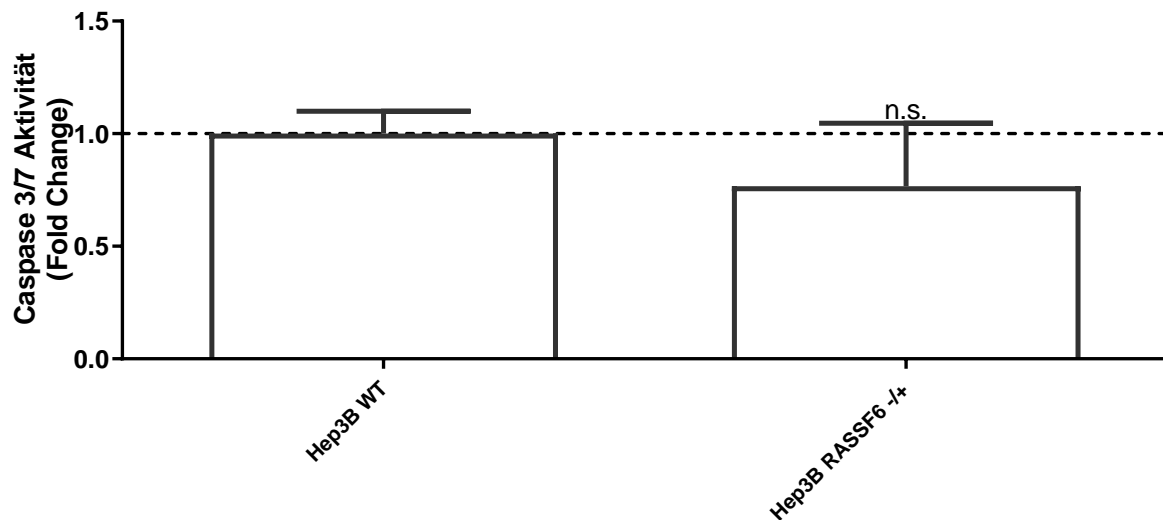
**Abbildung 24: Zellproliferation der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten RASSF6 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Zellproliferation wurde mittels BrdU Assay gemessen und als *Fold Change* und Standardabweichung der heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P^* = 0,0361$ ); **B:** HepG2 ( $P = 0,2724$ ); **C:** Huh7 ( $P = 0,5705$ ). Zwei Stunden nach Applikation fand die Messung statt, welche für jeweils drei unabhängige Experimente analysiert wurde. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

#### 4.3.2 Der Einfluss von RASSF6 auf die Apoptose von Hepatomzellen

Der Einfluss des RASSF6 Gens auf die Apoptose wurde in den Hepatomzelllinien mit heterozygoten RASSF6 *knockout* mittels Caspase 3/7 Assay (Kapitel 3.8.2) untersucht.

Die Apoptose wurde durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* in Hep3B tendenziell um 23 % vermindert ( $P = 0,2453$ ) (Abbildung 25).

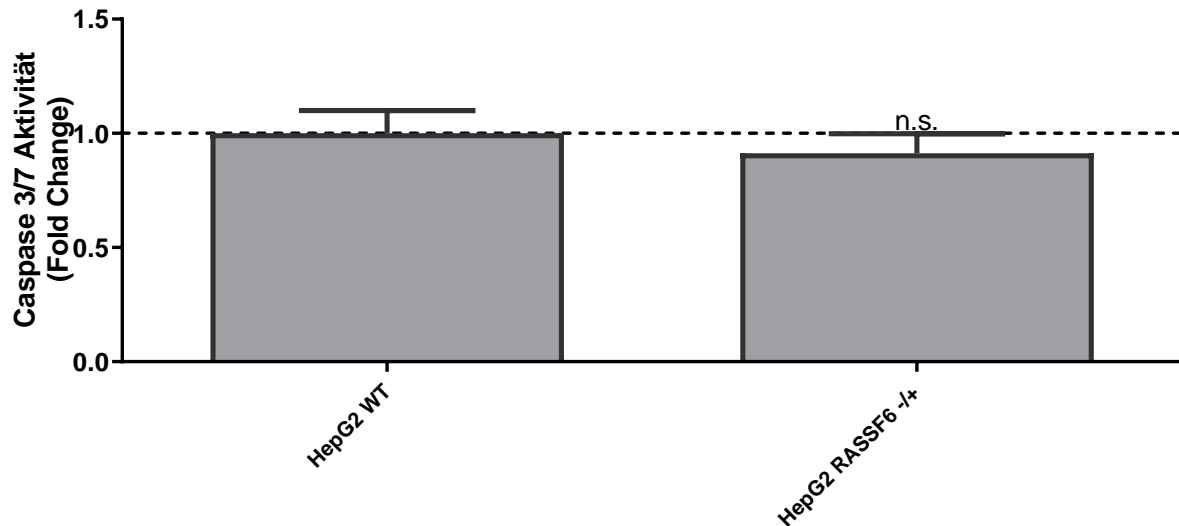


**Abbildung 25: Apoptose der Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten RASSF6 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Das Apoptoseverhalten der Zellen wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen und als *Fold Change* und Standardabweichung der Hep3B heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 +/-) normalisiert auf die Hep3B Kontrollzellen (WT) dargestellt ( $P = 0,2453$ ). Tendenzuell wird die Apoptose durch den heterozygoten *knockout* vermindert. Die Analyse erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.



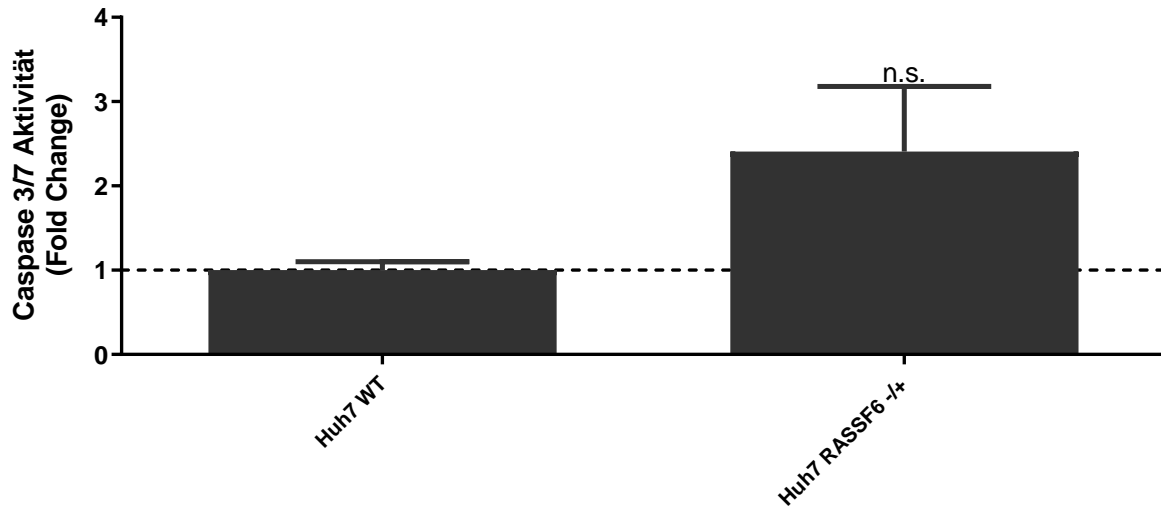
Die Apoptose wurde in den HepG2 Zellen durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* mit 9 % Reduktion nicht signifikant beeinflusst ( $P = 0,2680$ ) (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Apoptose der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen. Die Caspase 3/7 Aktivität ist als *Fold Change* als Balkendiagramm mit Standardabweichung der HepG2 heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 +/-) normiert auf die HepG2 Kontrollzellen (WT) dargestellt ( $P = 0,2680$ ). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$ .

Die Apoptose wurde in Huh7 durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* nicht signifikant erhöht ( $P = 0,1179$ ), jedoch ist zu erkennen das eine Tendenz zu erhöhter Apoptose durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* in der Zelllinie Huh7 2 Std. nach Behandlung besteht (Abbildung 27).

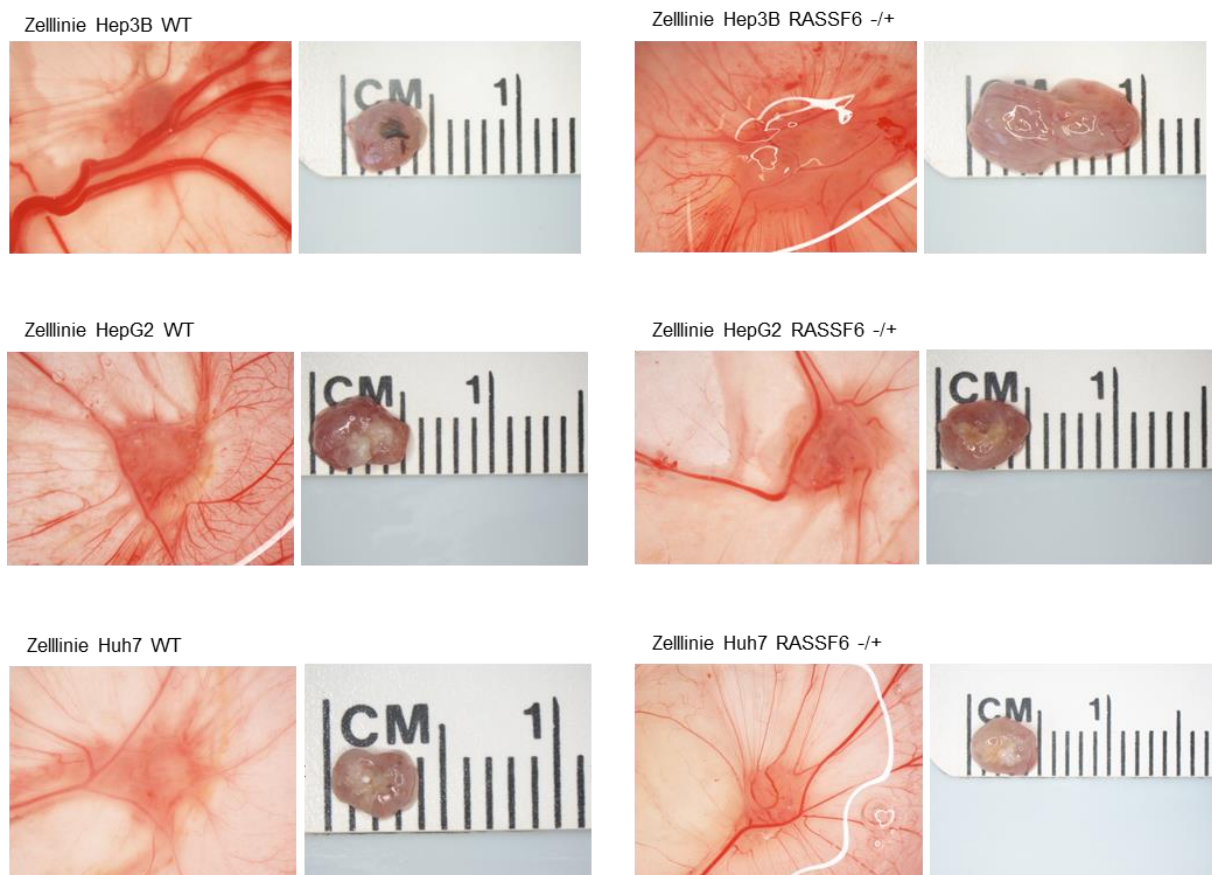


**Abbildung 27: Apoptose der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen. Dargestellt ist der *Fold Change* als Balkendiagramm mit Standardabweichung der Huh7 heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) normalisiert auf die Huh7 Kontrollzellen (WT) ( $P = 0,1179$ ). Es erfolgten mindestens drei unabhängige Experimente. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

### 4.3.3 Der Einfluss von RASSF6 auf das Tumorwachstum des HCC's im CAM Modell

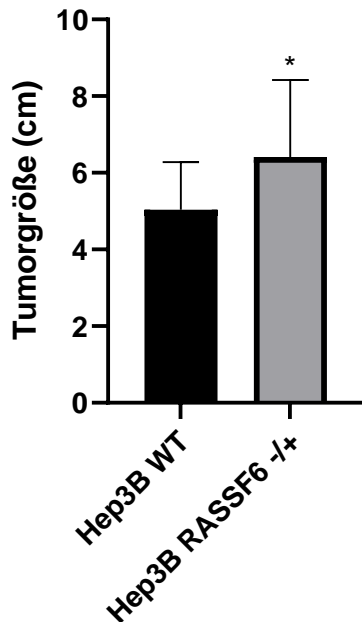
Der Einfluss des Tumorsuppressorproteins RASSF6 auf das Tumorwachstum wurde mittels CAM Assay untersucht (siehe Kapitel 3.9). Hierfür wurden die Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 mit und ohne heterozygoten RASSF6 *knockout* appliziert und die daraus entstandenen Tumoren isoliert. Anschließend wurde sowohl die Größe in cm als auch das Gewicht in Gramm der jeweiligen Tumore bestimmt.



**Abbildung 28: Beispiele der Fotodokumentation der durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* entstandenen Tumore aus dem CAM Modell**

Darstellung der Tumore die im CAM Modell durch die Applikation der Hepatomzellen ohne RASSF6 und mit heterozygoten RASSF6 *knockout* entstanden sind. Die Ansicht stellt die Tumore in der Eierschale und auf dem Lineal dar. Die Fotodokumentation entstand mit NIS Elements 3.22.15, Nikon.

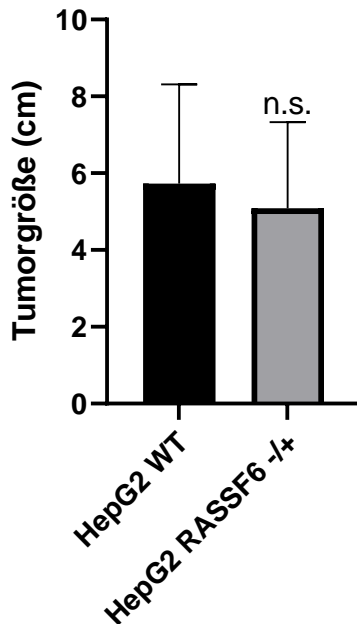
Die Tumorgröße der Tumore, welche durch Applikation der Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten RASSF6 *knockout* entstanden, wurde durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* signifikant erhöht ( $P^* = 0,0287$ ) (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Tumorgröße von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten RASSF6 *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der Hep3B heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) sowie der Hep3B Kontrollzellen (WT) nach 7-tägiger Inkubation im CAM-Modell entstanden, wurden isoliert und mit dem Lineal vermessen ( $P^* = 0,0287$ ). Die Größe ist in cm als Balkendiagramm mit Standardabweichung angegeben und wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

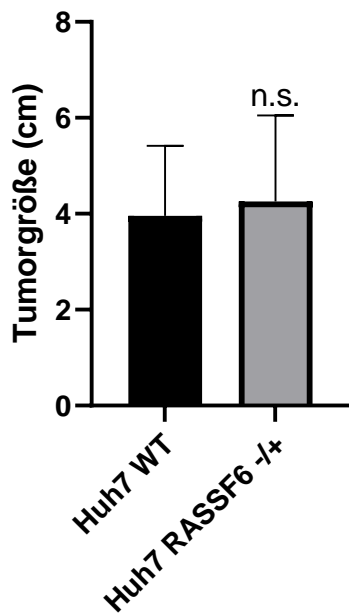
Die Tumorgröße der Tumore aus dem CAM-Modell, welche durch die Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* entstanden, wurde durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* tendenziell vermindert ( $P = 0,1940$ ) (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Tumorgröße von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten RASSF6 *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der HepG2 heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 +/-) sowie der HepG2 Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell entstanden, wurden nach 7-tägiger Inkubation isoliert und mit einem Lineal die Größe in cm bestimmt. Die Tumorgröße war im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant ( $P = 0,1940$ ) verändert. Die Tumorgröße ist als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Analysiert wurden mindestens drei Experimente. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

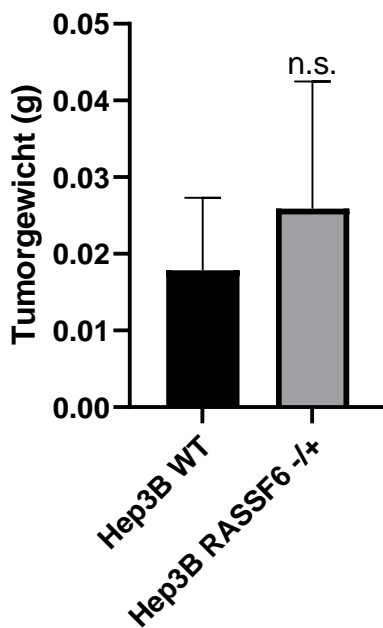
Die Größe der Tumore, welche durch Applikation der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* im CAM- Modell entstanden, war tendenziell etwas größer als die Tumore, die aus den applizierten Huh7 Kontrollzellen entstanden (P = 0,4508) (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Tumorgröße von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der Huh7 heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) sowie der Huh7 Kontrollzellen (WT) nach 7-tägiger Inkubation im CAM-Modell entstanden, wurden isoliert und die Größe in cm mit einem Lineal bestimmt (P = 0,4508). Es wurden mindestens drei Experimente durchgeführt und die Darstellung erfolgte als Balkendiagramm mit Standardabweichung. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

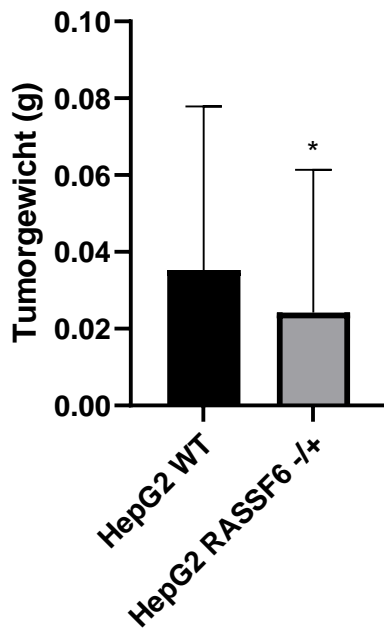
Das Tumorgewicht der Tumore, welche durch die Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten RASSF6 *knockout* im CAM Modell entstanden, wurde durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* tendenziell aber jedoch nicht signifikant beeinflusst ( $P = 0,1087$ ) (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Tumorgewicht von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten RASSF6 *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore aus dem CAM Modell, die nach Applikation der Hep3B heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) sowie der Hep3B Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell entstanden, wurden nach 7-tägiger Inkubation isoliert und mittels Feinwaage das Tumorgewicht in Gramm bestimmt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant schwerer ( $P = 0,1087$ ). Es wurden mindestens drei Experimente durchgeführt und die Darstellung erfolgt als Balkendiagramm mit Standardabweichung. Die statistische Analyse mittels zweiseitigem ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$ .

Das Gewicht der Tumore, welche durch Applikation der HepG2 heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen im CAM Assay entstanden, wurde durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* signifikant vermindert ( $P^* = 0,034$ ) (Abbildung 33).

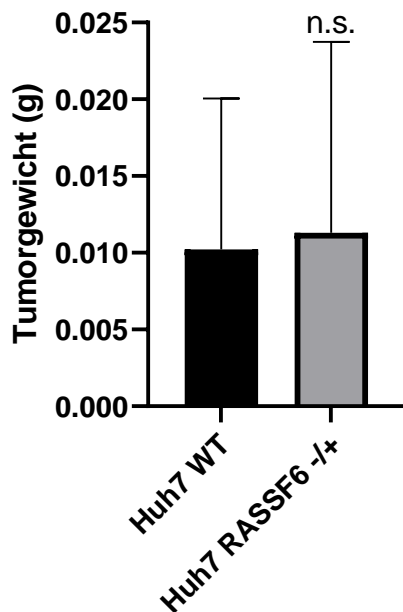


**Abbildung 33: Tumorgewicht von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten RASSF6 *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der HepG2 heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 +/-) sowie der HepG2 Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell nach 7-tägiger Inkubation entstanden, wurden isoliert und mittels Feinwaage das Gewicht in Gramm bestimmt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant schwerer ( $P^* = 0,034$ ). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente ausgewertet und die Ergebnisse als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.



Das Tumorgewicht der Tumore aus dem CAM Assay, welche durch Applikation der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* entstanden, wurde durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* nicht signifikant beeinflusst ( $P = 0,3193$ ) (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Tumorgewicht von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten RASSF6 *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

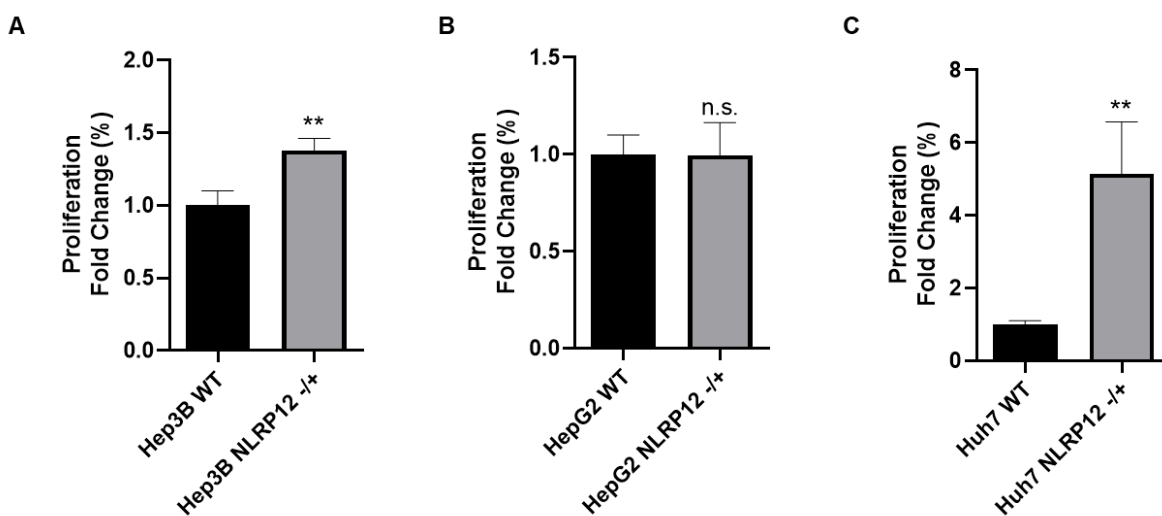
Die Tumore, die nach Applikation der Huh7 heterozygoten RASSF6 *knockout* Zellen (RASSF6 -/+) sowie der Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell nach 7-tägiger Inkubation entstanden, wurden isoliert und mittels Feinwaage das Gewicht in Gramm bestimmt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant schwerer ( $P = 0,3193$ ). Es erfolgten mindestens drei Experimente für die Analyse und das Tumorgewicht ist als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

#### 4.4 Die Rolle von NLRP12 in der Hepatokarzinogenese

Weiter wurde der Einfluss des Tumorsuppressorgens NLRP12 auf die Zellproliferation der Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 mittels BrdU Assay (vergleiche Kapitel 3.8.1) untersucht.

##### 4.4.1 Der Einfluss von NLRP12 auf die Proliferation von Hepatomzellen

Die Proliferation wird in der Hepatomzelllinie Hep3B durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* um 38 % signifikant erhöht ( $P^{**} = 0,007$ ). In HepG2 Zellen mit dem heterozygoten NLRP12 *knockout* konnte keine Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden ( $P = 0,9778$ ), wohingegen die Proliferation der Huh7 Zellen mit heterozygoten NLRP12 *knockout* um 414 % signifikant erhöht wurde ( $P^{**} = 0,0075$ ) (Abbildung 35 A - C).



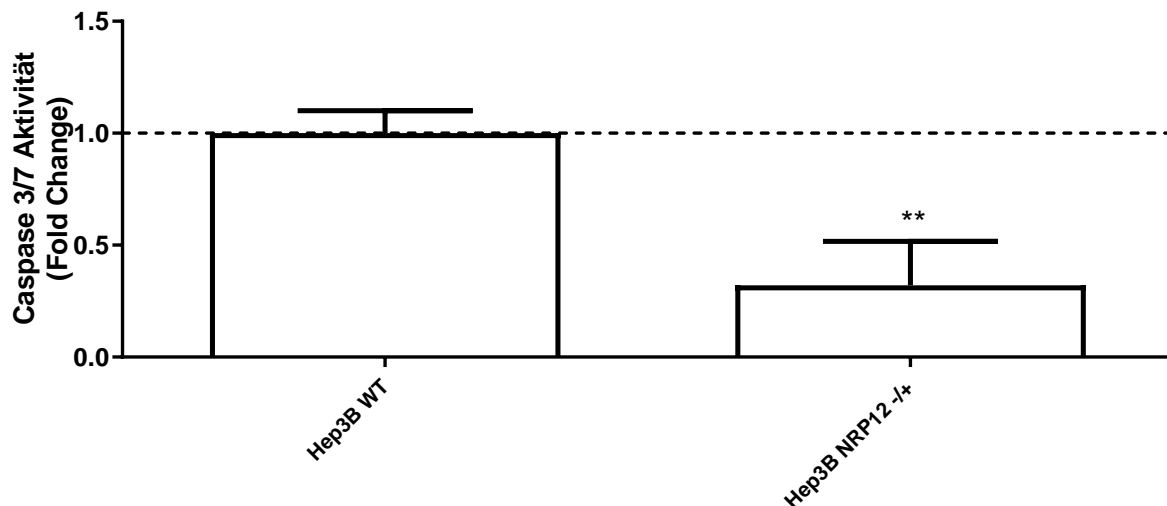
**Abbildung 35: Zellproliferation der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten NLRP12 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Zellproliferation wurde mittels BrdU Assay nach 2-stündiger Inkubation gemessen und ist als *Fold Change* und Standardabweichung der heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) normalisiert auf die Kontrollzellen (WT) dargestellt. **A:** Hep3B ( $P^{**} = 0,007$ ); **B:** HepG2 ( $P = 0,9778$ ); **C:** Huh7 ( $P^{**} = 0,0075$ ). Für die Analyse wurden mindestens drei Experimente ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

#### 4.4.2 Der Einfluss von NLRP12 auf die Apoptose von Hepatomzellen

Wie das NLRP12 Gen die Apoptose in den Hepatomzelllinien mit heterozygoten NLRP12 *knockout* beeinflusst wurde mit dem Caspase 3/7 Assay gemessen (siehe Kapitel 3.8.2) (Abbildung 36 bis 38).

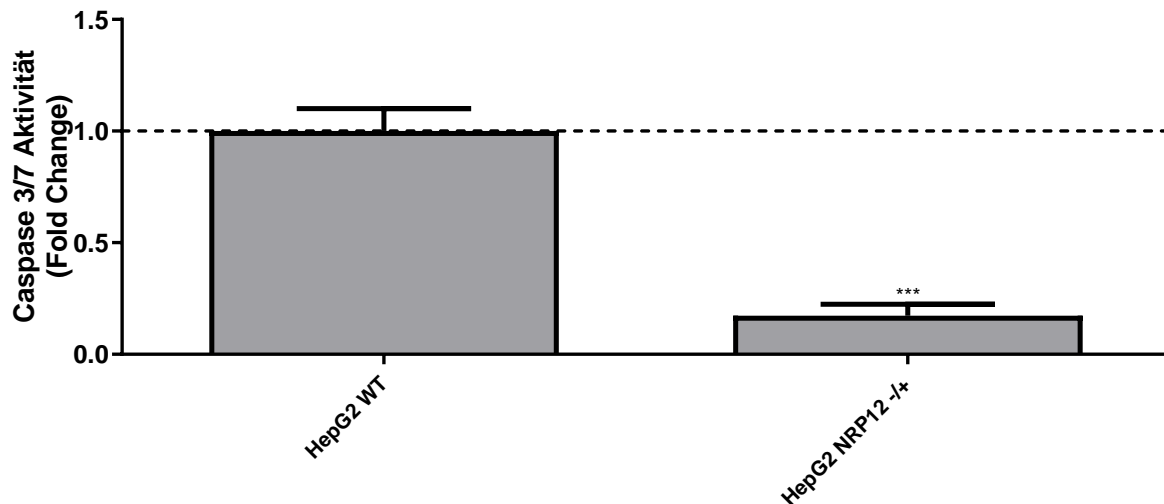
Die Apoptose wurde in Hep3B durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen signifikant um 68 % vermindert ( $P^{**} = 0,003$ ) (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Apoptose der Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten NLRP12 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Das Apoptoseverhalten der Zellen wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen und ist als *Fold Change* und Standardabweichung der heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 +/-) normalisiert auf die Hep3B Kontrollzellen (WT) dargestellt. Die Apoptose war im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert ( $P^{**} = 0,003$ ). Die Messung wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

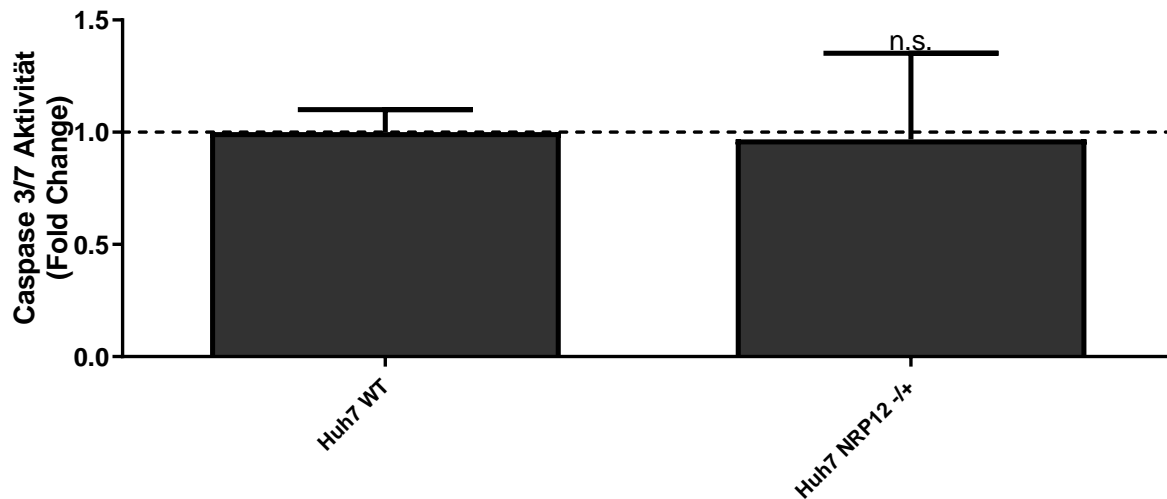
Im Vergleich zu der unbehandelten HepG2 Kontrollzelllinie war die Apoptose in der Hepatomzelllinie HepG2 mit dem heterozygoten NLRP12 *knockout* um 83 % signifikant vermindert ( $P^{***} = 0,0002$ ) (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Apoptose der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen und ist als *Fold Change* und Standardabweichung der HepG2 heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) normalisiert auf die HepG2 Kontrollzellen (WT) dargestellt. Die Apoptose wird durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* signifikant vermindert ( $P^{***} = 0,0002$ ). Es wurden mindestens drei Experimente analysiert. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

Die Apoptose wurde in der Hepatomzelllinie Huh7 mit dem heterozygoten NLRP12 *knockout* mit 3 % Verminderung nicht signifikant beeinflusst ( $P = 0,8944$ ) (Abbildung 38).

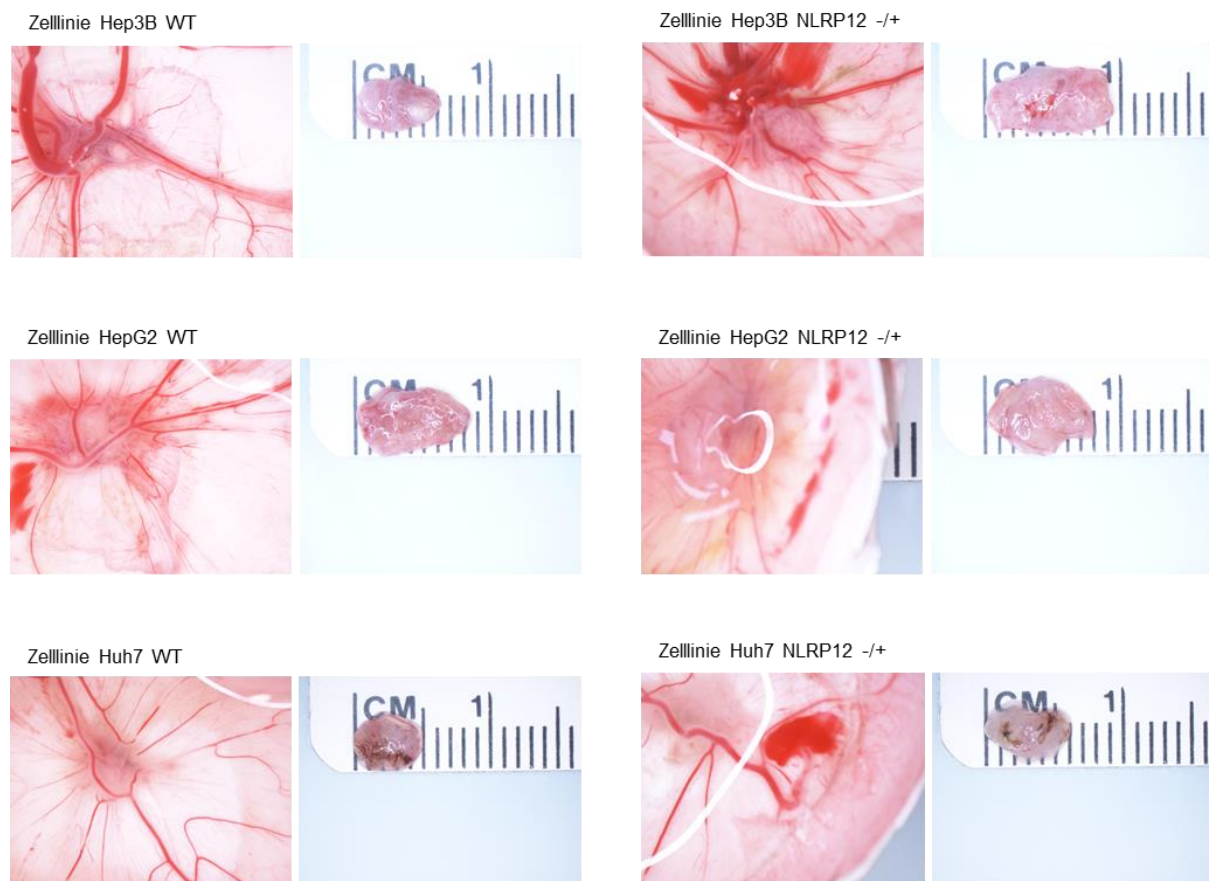


**Abbildung 38: Apoptose der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* versus der jeweiligen Kontrollzelllinie**

Die Apoptose wurde mittels Caspase 3/7 Assay gemessen und ist als *Fold Change* und Standardabweichung der Huh7 heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 +/-) normalisiert auf die Huh7 Kontrollzellen (WT) dargestellt. Die Apoptose wurde in mindestens drei Experimenten analysiert ( $P = 0,8944$ ). Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

#### 4.4.3 Der Einfluss von NLRP12 auf das Tumorwachstum des HCC's im CAM Modell

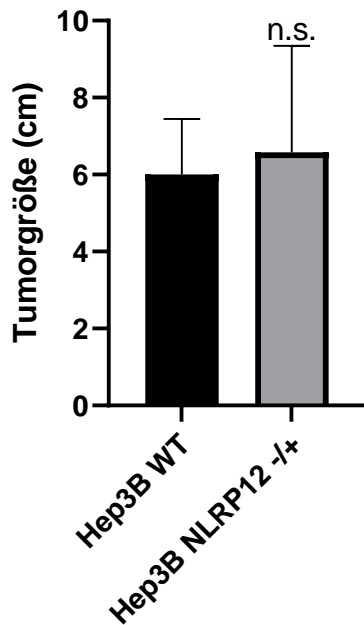
Der Einfluss des NLRP12 Gens auf das Tumorgroße und Gewicht wurde mittels CAM Assay untersucht. Es wurden sowohl die Hep3B, HepG2 und Huh7 Zellen mit heterozygoten NLRP12 *knockout* als auch die unbehandelten Kontrollzellen appliziert und die gebildeten Tumore isoliert (siehe Kapitel 3.9).



**Abbildung 39: Beispiele der Fotodokumentation der durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* entstandenen Tumore aus dem CAM Modell**

Ansicht der Tumore die im CAM Modell durch die Applikation von Hepatomzellen ohne NLRP12 und mit heterozygoten NLRP12 *knockout* entstanden sind. Dargestellt sind die Tumore in der Eierschale und auf dem Lineal. Die Fotodokumentation entstand mit NIS Elements 3.22.15, Nikon.

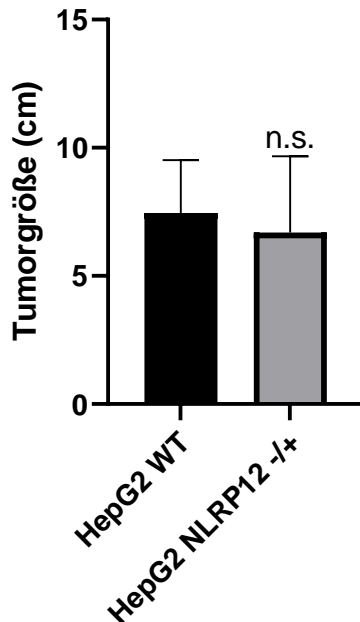
Die Tumorgröße der Tumore, welche durch die Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten NLRP12 *knockout* entstanden, wurde durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* tendenziell beeinflusst ( $P = 0,4761$ ) (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Tumorgröße von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten NLRP12 *knockout*-Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der Hep3B heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) sowie der Hep3B Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell entstanden sind, wurden nach 7-tägiger Inkubation isoliert und mit einem Lineal die Größe in cm bestimmt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant größer ( $P = 0,4761$ ) was aus mindestens drei unterschiedlichen Experimenten hervorgeht und als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt wurde. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

Die Größe der Tumore aus dem CAM Modell, welche durch die Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* entstanden, wurden durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* tendenziell beeinflusst ( $P = 0,3657$ ) (Abbildung 41).

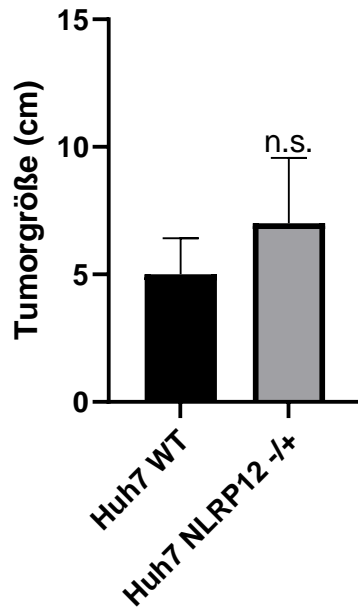


**Abbildung 41: Tumorgöße von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore, die nach Applikation der HepG2 heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) sowie der HepG2 Kontrollzellen (WT) im CAM-Modell nach 7-tägiger Inkubation entstanden, wurden isoliert und mit einem Lineal die Größe bestimmt. Die Tumorgöße in Gramm war im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant ( $P = 0,3657$ ). Die Tumorgöße wurde als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt und aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.



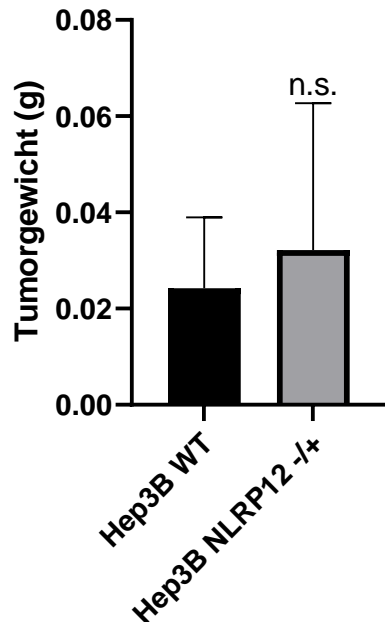
Die Größe der Tumore welche durch die Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* im CAM Modell entstanden war tendenziell größer ( $P = 0,0794$ ) (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Tumorgröße von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore aus dem CAM Assay, die nach Applikation der Huh7 heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 *-/+*) sowie der Huh7 Kontrollzellen (WT) entstanden sind, wurden isoliert und mit einem Lineal die Größe in cm bestimmt. Es wurden mindestens drei unabhängige Analysen als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Es bestand keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach 7-tägiger Inkubation ( $P = 0,0794$ ). Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

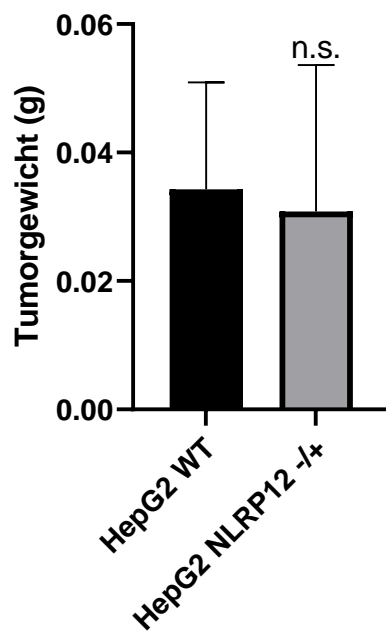
Das Gewicht der Tumore, welche durch die Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten NLRP12 *knockout* im CAM Modell entstanden, wurde durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* tendenziell erhöht (P = 0,3685) (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Tumorgewicht von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten NLRP12 *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Die im CAM Modell entstandenen Tumore, die sich nach Applikation der Hep3B heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) sowie der Hep3B Kontrollzellen (WT) entwickelten, wurden isoliert und das jeweilige Gewicht in Gramm mittels Feinwaage ermittelt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle etwas schwerer (P = 0,3685). Die Analyse der mindestens drei unabhängigen Experimente erfolgte nach 7-tägiger Inkubation und wurde als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

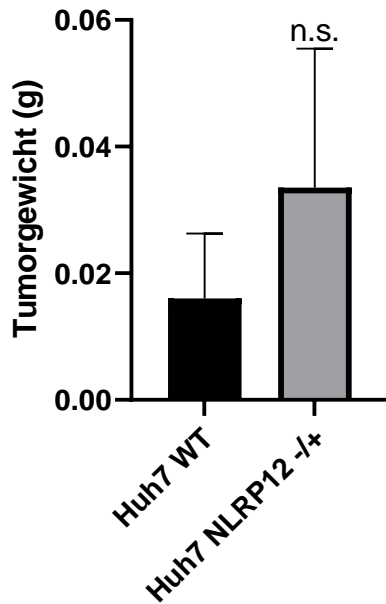
Das Tumorgewicht der Tumore aus dem CAM Assay, welche durch die Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten heterozygoten NLRP12 *knockout* entstanden, wurde durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* nicht beeinflusst ( $P = 0,5983$ ) (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Tumorgewicht von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Die Tumore aus dem CAM Modell, die nach Applikation der HepG2 heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) sowie der HepG2 Kontrollzellen (WT) entstanden, wurden isoliert und das jeweilige Gewicht mittels Feinwaage bestimmt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant schwerer ( $P = 0,5983$ ). Das Gewicht wurde in Gramm angegeben und als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente nach 7-tägiger Inkubation analysiert. Die statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.

Das Tumorgewicht der Tumore, welche sich durch die Applikation der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* entwickelten, zeigte eine deutliche Gewichtszunahme, welche aber keine statistische Signifikanz aufwies ( $P = 0,0667$ ) (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Tumorgewicht von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* -Tumoren im CAM Assay**

Die im CAM Modell entwickelten Tumore, die nach Applikation der Huh7 heterozygoten NLRP12 *knockout* Zellen (NLRP12 -/+) sowie der Huh7 Kontrollzellen (WT) nach 7-tägiger Inkubation im CAM Modell entstanden, wurden isoliert und das jeweilige Gewicht in Gramm mittels Feinwaage ermittelt. Die Tumore waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant schwerer ( $P = 0,0667$ ). Die Analyse erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurde als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  durchgeführt.



## 5 Diskussion

Die molekularen Hintergrundmechanismen der Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 wurden mittels einem CRISPR/Cas9 generierten heterozygoten *knockout* in PML, RASSF6 und NLRP12 im Hinblick auf die Tumorentwicklung und -progression des HCC untersucht. Der heterozygote *knockout* wurde in den Hepatomzellen Huh7, HepG2 und Hep3B generiert und der Einfluss des heterozygoten *knockouts* auf die Proliferation und Apoptose untersucht. Die Mechanismen und Signalwege im Bezug auf Proliferation und Apoptose wurden weiterhin charakterisiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss des heterozygoten *knockouts* in PML, RASSF6 und NLRP12 auf die Tumorentwicklung im CAM Modell untersucht.

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) ist ein System, das von Bakterien und den meisten Archaeen als adaptives Immunsystem verwendet wird, indem ortsspezifische Doppelstrangbrüche (DSB) eingeführt werden (Jiang and Doudna, 2017). Der DSB wird durch die CRISPR-assoziierte Nuklease 9 (Cas 9) eingeführt, eine RNA-gesteuerte Endonuklease mit der Fähigkeit, DNA anzuvisieren und zu schneiden (Robb, 2019; Manghwar *et al.*, 2019). Darauf folgend werden DNA-Schadensreparaturmechanismen über nicht homologe Endverbindung (NHEJ) aktiviert, bei denen der DSB erneut ligiert wird und Indel-Mutationen (**I**nsertion und/oder **D**eletion) verursacht werden (Ran *et al.*, 2013).

In der hier vorliegenden Arbeit konnten mittels dieser Methode heterozygote *knockouts* der Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 in den Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 erzeugt werden. Die Generierung von homozygoten *knockouts* wurde hier auch versucht, erwies sich jedoch als schwierig ohne das Amp-Resistenz Gen in den Vektoren, womit die Möglichkeit bestünde die Zellen nach Plasmidaufnahme mittels einer Antibiotika-Resistenz zu selektieren.

Die Zelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 sind wertvolle Leberkrebs-Zellmodelle für *in vitro* Experimente (Qiu *et al.*, 2014; Krelle *et al.*, 2013). Die Hep3B Zelllinie weist aufgrund einer Deletion im TP53-Gen (Lee and Park, 2015) keine endogene p53-Expression auf (Lee *et al.*, 2001), die HepG2 Zellen tragen das WT p53 (Kim *et al.*,

2019) und die Huh7 Zelllinie hat eine Punktmutation im p53 Codon 220 das die Halbwertszeit von p53 erhöht (Müller *et al.*, 1997). Die Zelllinie Hep3B hat außerdem noch ein integriertes Hepatitis B Virus Genom (Lin *et al.*, 2003). Entsprechend unterscheiden sich die Zelllinien was auch zu Unterschieden in den Ergebnissen führt.

Die mit CRISPR/Cas9 modifizierten Zellen (Deletion von Exon 1) wurden auf die CAM-Membran aufgebracht, um die Tumorentwicklung aus den Hepatomzellen mit und ohne heterozygoten *knockout* zu analysieren und diese unter normalen atmosphärischen und nicht sterilen Bedingungen zu vergleichen. Es ist bekannt, dass der CAM-Assay ein kosten- und zeiteffektives Modell ist, in welchem die Zellen angewendet werden können ohne dabei eine Immunantwort auszulösen, da der Hühnerembryo von Natur aus Immundefizient ist (Ribatti, 2016). Zusätzlich wurde berichtet, dass der CAM-Assay zur Beobachtung der Angiogenese während der Entwicklung des menschlichen hepatozellulären Karzinoms im Hühnerei verwendet wurde, was zeigt, dass es ein wertvolles Modell ist, das die HCC Entwicklung darstellen kann (Lv *et al.*, 2016). Ein weiterer Vorteil der Verwendung des CAM-Assays besteht darin, dass er nicht als Tierversuch angesehen wird und weder die Genehmigung durch die Ethikkommission noch andere Verwaltungsverfahren implementiert (Ribatti, 2016). Der CAM Assay wurde in dieser Arbeit erfolgreich angewandt und ermöglichte eine relativ schnelle Tumorbildung und effiziente Zellauftragung.

### 5.1 Positiver Einfluss von PML auf die HCC Tumorentwicklung

Der Tumorsuppressor PML (Lang *et al.*, 2019) ist in verschiedene zelluläre Prozesse wie Seneszenz über p53-Aktivierung und Rb-Protein-Pathway-Assoziation involviert (Ferbeyre *et al.*, 2000; Regad *et al.*, 2009). Darüber hinaus hängt die Stabilisierung oder Destabilisierung von p53 in PML NBs von der PML NB-Zusammensetzung ab und kann zelltypspezifisch sein, so dass PML ein p53-Häufigkeitsregulator ist (Guan and Kao, 2015). Da p53 eine wichtige Rolle spielt, wie z. B. Stillstand des Zellzyklus, Apoptose, DNA-Reparatur und Seneszenz, hat PML über die p53-Interaktion Einfluss auf mehrere zelluläre Prozesse (Guan and Kao, 2015).

Wie bereits von Straub *et al.*, 2019 festgestellt, handelt es sich bei PML in transgenen HCV-Mäusen um einen HCC-induzierenden Faktor (Straub *et al.*, 2019), daher wurde der Einfluss auf die HCC-Entwicklung näher untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein heterozygoter PML *knockout* in der Zelllinie Hep3B eine signifikant verringerte RNA-Expression und eine verminderte Proteinexpression aufweist. Die Ergebnisse zeigen, dass der heterozygote PML *knockout* einen signifikanten Anstieg der Zellproliferation und eine signifikante Abnahme der Apoptose herbeiführt. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung von Straub *et al.*, wo eine erhöhte Proliferation durch einen PML *knockdown* mittels si-RNA in Hep3B beschrieben wurde (Straub *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein heterozygoter PML *knockout* in Hep3B Zellen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Apoptose während der hepatozellulären Entwicklung in der Hep3B Zelllinie spielt. In der Literatur wird beschrieben, dass PML-NBs durch verschiedene Mechanismen die von Viren ausgeübt werden um die Virusreplikation zu begünstigen gestört werden können und im Fall der HBV-Replikation, wie dies in der Zelllinie Hep3B der Fall ist, kann die Anzahl und Morphologie von PML-NBs verändert werden (Wang *et al.*, 2011). Im Falle einer HBV-Infektion ist bekannt, dass die Transkription und Replikation des DNA-Virus in PML NBs stattfindet (Yoon and Yu, 2001). Die Applikation der Hep3B heterozygoten PML *knockout* Zellen im CAM Modell ergab auch signifikant größere und tendenziell schwerere Tumore was darauf schließen lässt, dass PML die Tumorentwicklung des HCC bei Viruslast positiv beeinflusst.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch, dass ein heterozygoter PML *knockout* in HepG2 Zellen die Zellproliferation erhöht, was mit Ergebnissen von Straub *et al.*, 2019 übereinstimmt. Ebenfalls wurde bei einer verringerten PML Expression eine verminderte Apoptose beobachtet. Die Verringerung der Apoptose war zu erwarten, da PML-NBs die p53-Aktivität und damit die Apoptose-Reaktion bei genotoxischem Stress oder onkogener Transformation regulieren (Krieghoff-Henning and Hofmann, 2008). Darüber hinaus besitzt HepG2 eine normale und funktionelle Form von p53 (Lee and Park, 2015), welche von PML beeinflusst wird. Auch hier resultierte der heterozygote PML *knockout* in einer tendenziellen Zunahme der Tumorgöße und des Tumorgewichts. Daher scheint der heterozygote PML *knockout* eine Rolle bei der Entwicklung des hepatozellulärem Karzinoms in HepG2 Zellen zu haben.



Nach Generierung des heterozygoten PML *knockouts* in der Zelllinie Huh7 war sowohl die RNA Expression als auch die Proteinexpression signifikant reduziert. Die Zellproliferation war durch den heterozygoten PML *knockout* im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht, was ein erwartetes Ergebnis war verglichen mit den Forschungsergebnissen, in welchen ein PML *knockdown* via si-RNA erreicht wurde (Straub *et al.*, 2019). Die Apoptose wurde durch den heterozygoten PML *knockout* in der Zelllinie Huh7 nicht signifikant beeinflusst, zeigte jedoch eine Tendenz zu einem Anstieg der Apoptose. Da p53 aufgrund der Mutation im p53-Gen eine verlängerte Halbwertszeit aufweist, reichert es sich im Zellkern an und die p53-Proteinspiegel sind in der Zelllinie Huh7 erhöht (Bressac *et al.*, 1990), was erklären könnte, warum der heterozygote PML *knockout* keine Hemmfunktion in dieser Zelllinie ausgeübt. Die Tumorgroße und das Gewicht im CAM-Modell wurden im Vergleich zu den Tumoren, die sich aus der Kontrollzelle entwickelten, durch den heterozygoten PML *knockout* in der Zelllinie Huh7 nicht signifikant verändert. Es konnte dennoch eine Tendenz zu größeren und schwereren Tumoren beobachtet werden, die durch die Zunahme der Zellproliferation zu erklären sein könnte.

## 5.2 Die HCC Tumorentwicklung wird von einem heterozygoten RASSF6 *knockout* bei p53 Dysfunktion positiv beeinflusst

Das Tumorsuppressorprotein RASSF6 hat eine wichtige Funktion bei der Induktion der Apoptose über die Dissoziation des RASSF6 / MST1 / 2-Komplexes, wobei sich RASSF6 und MST1 / 2 gegenseitig hemmen (Iwasa *et al.*, 2015). Eine Überexpression von RASSF6 kann bei einer zugrundeliegenden Beeinträchtigung des Signalwegs, die zur Onkogenese führen kann, zu einer Hemmung des Hippo-Signalwegs führen (Iwasa *et al.*, 2015). In einem Mausmodell wurde berichtet, dass durch Überexpression von RASSF6 die Zellproliferation in hepatozellulären Karzinomzellen gehemmt wurde (Zhu *et al.*, 2017). RASSF6 ist auch an der Stabilisierung von p53 über die MDM2-Proteininteraktion beteiligt, wodurch MDM2 ubiquitiniert und abgebaut wird (Volodko *et al.*, 2014). Aufgrund seiner Bindung an K-Ras trägt RASSF6 auch zur Regulation des Zellzyklus bei (Allen *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde auch berichtet, dass ektopisch exprimiertes RASSF6 bei der Modulation von JNK involviert wird, indem es dessen Phosphorylierung spezifisch verstärkt, was zu einem Stillstand des G0 / G1-Zellzyklus führt (Liang *et al.*, 2014). Im HCC ist RASSF6 vermindert exprimiert (Zhu *et al.*, 2017), was auch bei verschiedenen Krebsarten wie Darmkrebs beobachtet wurde

(Zhou *et al.*, 2017). Um herauszufinden ob RASSF6 einen Einfluss auf die HCC Entwicklung hat wurde dieses Protein hier auch darauf untersucht.

Der über CRISPR / Cas9 in der Zelllinie Hep3B erzeugte heterozygote RASSF6 *knockout* resultierte in einer signifikanten Verringerung der RNA- und Proteinexpression. Darüber hinaus kam es zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* in den Hep3B Zellen. Dieses Ergebnis demonstriert, dass RASSF6 einen Einfluss auf die Proliferation hat. Auch in der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen der RASSF6 Expression und der Proliferation beschrieben (Zhu *et al.*, 2017). Hier resultierte eine RASSF6 Überexpression in einer Hemmung der Proliferation (Zhu *et al.*, 2017). Die Auswirkung des heterozygoten *knockouts* auf die Apoptose wurde analysiert und ergab, dass der heterozygote *knockout* keinen Einfluss auf die Apoptose hat. RASSF6 wird in der Literatur als proapoptotisch beschrieben (Iwasa *et al.*, 2015), aber in der hier vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose nicht signifikant durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* verringert. Aber es konnte eine tendenziell verringerte Apoptose im Vergleich zur Kontrollzelllinie beobachtet werden. Die im CAM-Modell entwickelten Tumoren waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant größer. Das Gewicht wurde durch den heterozygoten *knockout* nicht signifikant beeinflusst, zeigt jedoch eine Tendenz zu schwereren Tumoren. Die Auswirkung des heterozygoten *knockouts* in der Hep3B Zelllinie auf die Tumorentwicklung kann durch den signifikanten Anstieg der Zellproliferation, bei gleichzeitig kaum veränderter Apoptose, erklärt werden. Daher spielt RASSF6 eine Rolle bei der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen, indem es die Proliferation positiv und die Apoptose in der Zelllinie Hep3B tendenziell negativ beeinflusst.

Der heterozygote RASSF6 *knockout* in der HepG2 Zelllinie reduzierte die RNA- und Proteinexpression signifikant. Die Zellproliferation und Apoptose wurden durch den heterozygoten *knockout* nicht beeinflusst. Der heterozygote *knockout* hatte darüber hinaus auch keinen Einfluss auf die Tumorgöße, obwohl die beobachteten Tumoren tendenziell kleiner waren. Hinsichtlich des Tumorgewichts konnte jedoch eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Die Ergebnisse für den heterozygoten RASSF6 *knockout* in HepG2 Zellen geben einen Hinweis darauf, dass ein heterozygoter RASSF6 *knockout* bei einer normalen p53 Funktion das Tumorstadium negativ zu beeinflussen scheint.

Die RNA- und Proteinexpression in Huh7 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* war im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Es wurde weder ein signifikanter Einfluss auf die Zellproliferation noch auf die Apoptose beobachtet. Dennoch wies die Apoptose im Vergleich zur Kontrolle eine Neigung zur Erhöhung auf, wie es bei dem heterozygoten PML *knockout* in den Huh7 Zellen der Fall war. Die Tumorgroße und das Tumorgewicht wurden im Vergleich zu den Tumoren, die sich aus der Kontrollzelllinie entwickelten, ebenfalls nicht durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* in Huh7 beeinflusst. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz zu größeren und schwereren Tumoren, die sich aus Huh7 mit heterozygoten RASSF6 *knockout* entwickelten. Die Ergebnisse zeigen, dass der heterozygote *knockout* von RASSF6 in Huh7 die Tumorentwicklung nicht signifikant beeinflusst.

### 5.3 Positiver Einfluss eines heterozygoten NLRP12 *knockouts* auf die HCC Tumorentwicklung bei p53 Dysfunktion

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass der Tumorsuppressor NLRP12 im HCC Tumorgewebe eine verminderte Expression ausweist (Straub et al, 2019) und eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielt. (Khan and Zaki, 2020). NLRP12 reguliert die Entzündungssignale über nichtkanonische NFκB-Signalwege, indem es den Traf3-Abbau (TNF receptor-associated factor) und die NIK-Aktivierung verhindert und die kanonischen NFκB-Signalwege, indem es die IRAK1-Phosphorylierung verhindert und so die entzündungshemmende und anti-tumorigene Funktion ausübt (Tuncer et al., 2014). Es wurde berichtet, dass der Verlust von NLRP12 eine Zunahme verschiedener Arten von Entzündungsmediatoren in Verbindung mit dem kanonischen NFκB-Signalweg verursacht, der die Tumorentstehung im Dickdarm fördert (Allen, 2014). Diese Beobachtung wurde auch in einem Mausmodell gemacht (Zaki et al., 2011, Allen et al., 2012).

Da das HCC durch chronische Entzündungen ausgelöst wird, verhindert die Hemmung der Aktivierung des JNK-Signalwegs durch NLRP12 die Proliferation neoplastischer Zellen, wodurch die HCC-Pathogenese unterdrückt wird (Khan and Zaki, 2020). Es wurde jedoch auch berichtet, dass NLRP12 die NFκB- und Erk-Signalwege in Hepatozyten nicht reguliert (Khan and Zaki, 2020).

Der heterozygote NLRP12 *knockout* in Hep3B zeigte eine Verringerung der RNA Expression, die jedoch nicht signifikant war sowie eine sichtlich verminderte Proteinexpression. Die Zellproliferation wurde durch den heterozygoten NLRP12

*knockout* in Hep3B Zellen signifikant erhöht. Bereits Straub et al konnten diese Beobachtung für einen NLRP12 knockdown mittels siNLRP12 in Hep3B machen. Da das HCC durch Entzündungsmechanismen entsteht (Refolo *et al.*, 2020) und diese auch durch HBV ausgelöst werden können (Chen and Tian, 2019), könnte die erhöhte Zellproliferation damit erklärt werden, dass der heterozygote NLRP12 *knockout* diese Entzündungsmechanismen nicht genügend hemmt und somit eine Mikroumgebung entsteht welche sich positiv auf die Tumorentstehung und somit auch auf die Proliferation auswirkt. Auch führte der heterozygote NLRP12 *knockout* zu einer signifikanten Verringerung des apoptotischen Verhaltens der Zellen. Untersuchungen ergaben, dass ein Mangel an Regulationsmechanismen der negativen NFkB-Regulation zu Apoptose in hämatopoetischen Stammzellen führt (Linz *et al.*, 2017). Da NLRP12 ein NFkB-Regulator ist (Tuncer *et al.*, 2014), würde dies erklären, warum im Fall des heterozygoten NLRP12 *knockouts* die Apoptose vermindert ist. Dies führte zu einer beobachteten Zunahme der Tumorgöße und des Gewichts. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass NLRP12 die Proliferation und Apoptose in Hep3B beeinflusst und in die Tumorentwicklung involviert sein könnte.

In der Zelllinie HepG2 führte der heterozygote NLRP12 *knockout* zu einer verringerten RNA Expression. Die Proteinexpression war signifikant reduziert. Der heterozygote *knockout* hatte in diesem Fall keinen Einfluss auf die Zellproliferation, verminderte jedoch das Apoptoseverhalten sowohl in der HepG2 als auch in der Hep3B Zelllinie, im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle signifikant. Die Tumorgöße und das Tumorgewicht aus dem CAM Modell wurden vom heterozygoten NLRP12 *knockout* im Vergleich zu den aus der Kontrollzelllinie entwickelten Tumoren nicht signifikant beeinflusst. Zu beobachten war aber, dass eine Tendenz zu kleineren und leichteren Tumoren, wie auch durch den heterozygoten RASSF6 *knockout* in HepG2, bestand. Der heterozygote NLRP12 *knockout* beeinflusst somit die Apoptose, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Tumorentwicklung.

Der heterozygote NLRP12 *knockout* in der Huh7 Zelllinie verminderte sowohl die RNA Expression als auch die und Proteinexpression signifikant. Die Zellproliferation wurde durch den heterozygoten NLRP12 *knockout* in Huh7 signifikant erhöht. Dies deckt sich mit der Beschreibung von Udden *et al.*, 2019, dass die Proliferation in HCC-Tumorgewebe signifikant erhöht war, wenn NLRP12 defizient war (Udden *et al.*, 2019). Die Apoptose wurde jedoch nicht beeinflusst wie es auch der Fall mit dem heterozygoten RASSF6 und PML *knockout* in Huh7 war. Die Tumore, die sich im CAM-

Modell aus der Zelllinie Huh7 mit heterozygoten NLRP12 *knockout* entwickelten, waren nicht signifikant größer oder schwerer, zeigten jedoch eine deutliche Zunahme in Größe und Schwere. Die Ergebnisse legen nahe, dass der heterozygote NLRP12 *knockout* in Huh7 die Tumorentwicklung im CAM Modell durch eine gesteigerte Proliferation beeinflussen könnte.

#### 5.4 Unterschiede in den Ergebnissen in den Hepatomzelllinien Huh7 und HepG2

Im Bezug auf die Apoptose hatte weder der heterozygote PML, RASSF6 noch der NLRP12 *knockout* einen signifikanten Einfluss in der Zelllinie Huh7.

Der heterozygote PML *knockout* führte in den HepG2 Zellen zu Veränderungen in der Zellproliferation und Apoptose, wohingegen der heterozygote NLRP12 *knockout* nur zu einer Veränderung der Apoptose führte. Der heterozygote RASSF6 *knockout* in den HepG2 Zellen beeinflusste weder die Proliferation noch die Apoptose, im Vergleich zu den Kontrollzellen. Bei keinem der durchgeführten heterozygoten *knockouts* kam es zu einer Bildung von größeren und schwereren Tumoren. beides nicht und folglich führte weder der heterozygote *knockout* von PML, NLRP12 oder RASSF6 in der Zelllinie HepG2 zu größeren noch schwereren Tumoren.

#### 5.5 Die PML, RASSF6 und NLRP12 Expression in den im CAM Modell entstandenen Tumoren

Sowohl das Huhn als auch der Mensch haben eine PML, RASSF6 und NLRP12 Expression (Ensembl, 2016). Da die Sequenzhomologie zwischen den menschlichen und Hühnerproteinen sehr hoch ist, wurde der Taq-Man Assay spezifisch für die Detektion der menschlichen RNA Expression ausgewählt, damit etwaige Verunreinigungen durch Hühner RNA die Ergebnisse nicht verfälschen. Die menschliche RNA von PML, RASSF6 und NLRP12 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Tumore könnte von den Zellen des Huhns beeinflusst worden sein, ebenso besteht die Möglichkeit das die applizierten menschlichen Zellen gewandert sind. Es lässt sich auch nicht ausschließen, dass das tumorumgebene Gewebe vom Huhn mitgeschnitten wodurch es zu Variationen der Tumorgöße kommen kann. Da PML, RASSF6 und NLRP12 im Hühnergewebe exprimiert werden, kann angenommen werden das die Expression von PML, RASSF6 und NLRP12 vom Huhn in den im Hühnerei entstandenen Tumoren messen zu können.



## 6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass PML, RASSF6 und NLRP12 einen Einfluss auf die HCC Entstehung haben. Darüber hinaus fanden sich Unterschiede in den Ergebnissen bezüglich der Hepatomzelllinien in den *in vitro* Analysen. Dies sollte im Bezug auf die p53 Funktionalität und Viruslast mit z. B. *knockdown* oder Überexpressions-Experimenten untersucht werden. Auch sollte das Migrationsverhalten der Zellen mit einem Migrationsassay untersucht werden, um zu verstehen ob PML, RASSF6 und NLRP12 einen Einfluss auf die Migration und Metastasierung bei einem HCC haben.

Aufgrund des fehlenden Ampicillin Selektionsmarkers könnten entsprechende Vektoren verwendet werden, um homozygote *knockouts* in den Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 zu generieren. Auch hier sollte anschließend sowohl das Proliferations- als auch Apoptoseverhalten untersucht werden und die Ergebnisse mit den Analysen der heterozygoten *knockouts* verglichen werden. Auch könnte die RNA Expression von PML, RASSF6 und NLRP12 des Hühnereimodells aus den entstandenen Tumoren gemessen werden.

Darüber hinaus sollten die Versuche auf humane HCC Gewebeproben ausgeweitet und hinsichtlich der RNA Expression von PML, RASSF6 und NLRP12 im Patientenmaterial untersucht werden. Dabei sollte die zu Grunde liegende Indikation für das HCC bei der Analyse berücksichtigt werden, um mögliche Unterschiede identifizieren zu können. Weiter sollten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) isoliert und Methylierungsanalysen vorgenommen werden, um zu untersuchen ob genetische Modifikationen in Form von SNPs (Single nucleotide Polymorphism) in den PML, RASSF6 und NLRP12 Genen zu finden sind und sich diese mit der Schwere des HCCs und der Entstehung korrelieren lassen.

Auch wäre es möglich aus dem Patientenmaterial mittels Proteinanalyse die Aktivierung von Signalwegen wie etwa dem NFκB Signalweg zu analysieren, indem die Untersuchung auf nuklearer oder zytosolischer Ebene durchgeführt wird.

## 7 Zusammenfassung

Gegenwärtig ist das hepatozelluläre Karzinom (HCC) weltweit die häufigste primäre Lebermalignität, die zu einer Lebertransplantation führt. Die Therapieoptionen für das HCC sind limitiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 auf die Hepatokarzinogenese untersucht.

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass eine PML Defizienz in Mäusen mit HCV-Proteinexpression zu einer verstärkten Tumorbildung führt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Verminderung der PML Expression in humanen Hepatomzellen mit und ohne HBV sowie p53 WT und p53 Mutation zu einer erhöhten Proliferation führt und die Tumorentstehung im CAM Modell begünstigt wird.

Die RASSF6 Expression ist bekannterweise im HCC Tumorgewebe und anderen onkologischen Erkrankungen wie Darmkrebs vermindert. Die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass eine verminderte RASSF6 Expression in Hepatomzellen mit HBV die Zellproliferation positiv und die Apoptose tendenziell negativ beeinflusst, was die Tumorentstehung des HCC im CAM Modell begünstigt.

Wie bereits bekannt, ist NLRP12 in die angeborene Immunantwort involviert und im HCC vermindert exprimiert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die verminderte Expression von NLRP12 das proliferative Verhalten von Hepatomzellen mit HBV sowie mit p53 Mutation erhöht und die Tumorentstehung begünstigt.

Der Einfluss von PML, RASSF6 und NLRP12 auf die HCC Entstehung ist eindeutig, jedoch wie in dieser Arbeit dargestellt zelllinienspezifisch. Die Tumorentstehung wird durch eine HBV Infektion begünstigt. Liegt eine p53 Mutation in Hepatomzellen vor, wird die Apoptose weder von PML, RASSF6 noch von NLRP12 stark beeinflusst. In Hepatomzellen mit intakter p53 Funktion wird die Tumorentstehung im CAM Modell tendenziell durch eine verminderte PML Expression begünstigt, jedoch durch eine verminderte RASSF6 und NLRP12 Expression tendenziell negativ beeinflusst.



## 8 Summary

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver malignancy that leads to liver transplantation worldwide. The therapy options for HCC are limited. In the here present work, the influence of the tumour suppressor proteins PML, RASSF6 and NLRP12 on hepatocarcinogenesis was investigated.

It is known from previous work that PML deficiency in mice with HCV protein expression leads to increased tumour formation. The results of the research conducted here, show that a reduction in PML expression in human hepatoma cells with and without HBV as well as p53 WT and p53 mutation leads to increased proliferation and tumour development is favoured in the CAM model.

RASSF6 expression is known to be reduced in HCC tumour tissue and other oncological diseases such as colon cancer. The results presented in this work show that a reduced RASSF6 expression in hepatoma cells with HBV influences cell proliferation positively and tends to have a negative effect on apoptosis, which favours tumorigenesis of HCC in the CAM model.

As already known, NLRP12 is involved in the innate immune response and its expression is downregulated in the HCC. The generated results show that the downregulation of NLRP12 expression increases the proliferative behaviour of hepatoma cells with HBV and with p53 mutation and promotes tumour development in the CAM model.

It is clear that PML, RASSF6 and NLRP12 have an influence on the development of HCC, but as shown in this work, it is cell line specific. Tumour development is favoured by an HBV infection. If there is a p53 mutation in hepatoma cells, apoptosis is not strongly influenced by either PML, RASSF6 or NLRP12. In hepatoma cells with intact p53 function, the downregulated expression of PML, RASSF6 and NLRP12 tended to influence tumour development in the CAM model. The tumours that arose in this cell line tended to be negatively influenced by reduced RASSF6 and NLRP12 expression.

## 9 Literaturverzeichnis

Allen, Irving Coy. "Non-Inflammasome Forming NLRs in Inflammation and Tumorigenesis." *Frontiers in Immunology*, vol. 5, 22 Apr. 2014, 10.3389/fimmu.2014.00169. Accessed 7 Dec. 2019.

Allen, Irving C., et al. "NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Noncanonical NF- $\kappa$ B Signaling." *Immunity*, vol. 36, no. 5, May 2012, pp. 742–754, [www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613\(12\)00131-8.pdf](http://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613(12)00131-8.pdf), 10.1016/j.immuni.2012.03.012. Accessed 10 Jan. 2021.

Allen, N. P. C., et al. "RASSF6 Is a Novel Member of the RASSF Family of Tumor Suppressors." *Oncogene*, vol. 26, no. 42, 13 Sept. 2007, pp. 6203–6211, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404571](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404571), 10.1038/sj.onc.1210440. Accessed 5 Apr. 2020.

Ande, Anusha, et al. "Multiscale Systems Pharmacological Analysis of Everolimus Action in Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, vol. 45, no. 4, 1 Aug. 2018, pp. 607–620, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29725796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29725796), 10.1007/s10928-018-9590-0. Accessed 5 Apr. 2020.

Avila, M. A., et al. "New Therapies for Hepatocellular Carcinoma." *Oncogene*, vol. 25, no. 27, 26 June 2006, pp. 3866–3884, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799628](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799628), 10.1038/sj.onc.1209550. Accessed 5 Apr. 2020.

Borden, Katherine L.B. "Pondering the Puzzle of PML (Promyelocytic Leukemia) Nuclear Bodies: Can We Fit the Pieces Together Using an RNA Regulon?" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1783, no. 11, Nov. 2008, pp. 2145–2154, [www.deepdyve.com/lp/elsevier/pondering-the-puzzle-of-pml-promyelocytic-leukemia-nuclear-bodies-can-PS4qW0KvAP](http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/pondering-the-puzzle-of-pml-promyelocytic-leukemia-nuclear-bodies-can-PS4qW0KvAP), 10.1016/j.bbamcr.2008.06.005. Accessed 15 Aug. 2019.

Bressac, B, et al. "Abnormal Structure and Expression of P53 Gene in Human Hepatocellular Carcinoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 5, 1 Mar. 1990, pp. 1973–1977, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC53607/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC53607/). Accessed 17 Jan. 2021.

Chen, Grace Y. "Role of Nlrp6 and Nlrp12 in the Maintenance of Intestinal Homeostasis." *European Journal of Immunology*, vol. 44, no. 2, 1 Feb. 2014, pp. 321–327, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338634), 10.1002/eji.201344135. Accessed 5 Apr. 2020.

Chen, Yongyan, and Zhigang Tian. "HBV-Induced Immune Imbalance in the Development of HCC." *Frontiers in Immunology*, vol. 10, 27 Aug. 2019, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6718466/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6718466/), 10.3389/fimmu.2019.02048. Accessed 17 Jan. 2021.

Cheng, Xiwen, et al. "Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Regulates Endothelial Cell Network Formation and Migration in Response to Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ )." *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 28, 6 July 2012, pp. 23356–23367, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22589541/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22589541/), 10.1074/jbc.M112.340505. Accessed 10 Jan. 2021.

Dünker, Nicole, and Verena Jendrossek. "Implementation of the Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Radiation Biology and Experimental Radiation Oncology Research." *Cancers*, vol. 11, no. 10, 1 Oct. 2019, p. 1499, [www.mdpi.com/2072-6694/11/10/1499](http://www.mdpi.com/2072-6694/11/10/1499), 10.3390/cancers11101499. Accessed 15 July 2020.

"Ensembl." *Ensembl.org*, 2016, [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html).

Fabregat, Isabel. "Dysregulation of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells." *World Journal of Gastroenterology : WJG*, vol. 15, no. 5, 7 Feb. 2009, pp. 513–520, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2653340/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2653340/), 10.3748/wjg.15.513. Accessed 5 Apr. 2020.

Facciorusso, Antonio, et al. "Local Ablative Treatments for Hepatocellular Carcinoma: An Updated Review." *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, vol. 7, no. 4, 6 Nov. 2016, pp. 477–489, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095567/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095567/), 10.4292/wjgpt.v7.i4.477. Accessed 5 Apr. 2020.

Farazi, Paraskevi A., and Ronald A. DePinho. "Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: From Genes to Environment." *Nature Reviews. Cancer*, vol. 6, no. 9, 1 Sept. 2006, pp. 674–687, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929323), 10.1038/nrc1934.

Ferbeyre, Gerardo, et al. "PML Is Induced by Oncogenic Ras and Promotes Premature Senescence." *Genes & Development*, vol. 14, no. 16, 15 Aug. 2000, pp. 2015–2027, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316863/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316863/).

Ferrín, Gustavo, et al. "Activation of MTOR Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 4, 13 Feb. 2020, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7072933/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7072933/), 10.3390/ijms21041266. Accessed 5 Apr. 2020.

GLOBOCAN 2018 - International Agency for Research on Cancer (IARC). Liver Cancer Incidence and Mortality Statistics Worldwide and by Region Incidence Mortality Both Sexes Males Females Both Sexes Males Females New Cases Cum. Risk 0-74 (%) New Cases Cum. Risk 0-74 (%) New Cases Cum. Risk 0-74 (%) Deaths Cum. Risk 0-74 (%) Deaths Cum. Risk 0-74 (%) Deaths Cum. Risk. 2018.

GOLLOB, J, et al. "Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway." *Seminars in Oncology*, vol. 33, no. 4, Aug. 2006, pp. 392–406, 10.1053/j.seminoncol.2006.04.002. Accessed 8 Nov. 2019.

Graziadei, Ivo. "Systemische Therapie Beim Fortgeschrittenen Hepatozellulären Karzinom." *Journal Für Gastroenterologische Und Hepatologische Erkrankungen*, vol. 18, no. 3, Sept. 2020, pp. 72–78, 10.1007/s41971-020-00080-8. Accessed 3 Mar. 2021.

Guan, Dongyin, and Hung-Ying Kao. "The Function, Regulation and Therapeutic Implications of the Tumor Suppressor Protein, PML." *Cell & Bioscience*, vol. 5, no. 1, 4 Nov. 2015, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632682/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632682/), 10.1186/s13578-015-0051-9. Accessed 24 Sept. 2019.

Hernandez–Gea, Virginia, et al. "Role of the Microenvironment in the Pathogenesis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology*, vol. 144, no. 3, Mar. 2013, pp. 512–527, 10.1053/j.gastro.2013.01.002. Accessed 4 Mar. 2020.

Herzer, Kerstin, et al. "Deficiency of the Promyelocytic Leukemia Protein Fosters Hepatitis C-Associated Hepatocarcinogenesis in Mice." *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, 11 Sept. 2012, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439406/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439406/), 10.1371/journal.pone.0044474. Accessed 5 Apr. 2020.

Herzer, Kerstin, et al. "IFN- $\alpha$ -Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Involves Promyelocytic Leukemia Protein and TRAIL Independently of P53." *Cancer Research*, vol. 69, no. 3, 1 Feb. 2009, pp. 855–862, [cancerres.aacrjournals.org/content/69/3/855](https://cancerres.aacrjournals.org/content/69/3/855), 10.1158/0008-5472.CAN-08-2831. Accessed 10 Jan. 2021.

Herzer, Kerstin. "Hepatitis C-Associated Liver Carcinogenesis: Role of PML Nuclear Bodies." *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 35, 2014, p. 12367, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4168070/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4168070/), 10.3748/wjg.v20.i35.12367. Accessed 21 Dec. 2019.

Ho, Shu-Yein, et al. "Evolution of Etiology, Presentation, Management and Prognostic Tool in Hepatocellular Carcinoma." *Scientific Reports*, vol. 10, 3 Mar. 2020, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7054529/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7054529/), 10.1038/s41598-020-61028-9. Accessed 5 Apr. 2020.

Hou, Jiajie, et al. "The Immunobiology of Hepatocellular Carcinoma in Humans and Mice: Basic Concepts and Therapeutic Implications." *Journal of Hepatology*, vol. 72, no. 1, 1 Jan. 2020, pp. 167–182, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31449859](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31449859), 10.1016/j.jhep.2019.08.014. Accessed 5 Apr. 2020.

Hsu, Kuo-Sheng, et al. "Dual Regulation of Stat1 and Stat3 by the Tumor Suppressor Protein PML Contributes to Interferon  $\alpha$ -Mediated Inhibition of Angiogenesis." *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 24, 16 June 2017, pp. 10048–10060, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28432122/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28432122/), 10.1074/jbc.M116.771071. Accessed 10 Jan. 2021.

Ikeda, Mitsunobu, et al. "Hippo Pathway-Dependent and -Independent Roles of RASSF6." *Science Signaling*, vol. 2, no. 90, 29 Sept. 2009, p. ra59, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797269](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797269), 10.1126/scisignal.2000300. Accessed 5 Apr. 2020.

Ito, Keisuke, et al. "A PML–PPAR- $\delta$  Pathway for Fatty Acid Oxidation Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance." *Nature Medicine*, vol. 18, no. 9, 19 Aug. 2012, pp. 1350–1358, 10.1038/nm.2882. Accessed 9 May 2020.

Iwasa, Hiroaki, et al. "RASSF6; the Putative Tumor Suppressor of the RASSF Family." *Cancers*, vol. 7, no. 4, 9 Dec. 2015, pp. 2415–2426, 10.3390/cancers7040899. Accessed 13 May 2020.

Jadlowiec, Caroline C, and Timucin Taner. "Liver Transplantation: Current Status and Challenges." *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22, no. 18, 14 May 2016, pp. 4438–4445, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4858627/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4858627/), 10.3748/wjg.v22.i18.4438. Accessed 5 Apr. 2020.

Jiang, Fuguo, and Jennifer A. Doudna. "CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms." *Annual Review of Biophysics*, vol. 46, no. 1, 22 May 2017, pp. 505–529, 10.1146/annurev-biophys-062215-010822. Accessed 25 Mar. 2019.

Karademir, Sedat. "Staging of Hepatocellular Carcinoma." *Hrjournal.Net*, 26 Sept. 2018, [hrjournal.net/article/view/2801](http://hrjournal.net/article/view/2801). Accessed 5 Apr. 2020.

Khan, Shahanshah, and Hasan Zaki. "Crosstalk between NLRP12 and JNK during Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 2, 13 Jan. 2020, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31941025](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31941025), 10.3390/ijms21020496. Accessed 5 Apr. 2020.

Kim, Jinchul, et al. "Wild-Type P53 Promotes Cancer Metabolic Switch by Inducing PUMA-Dependent Suppression of Oxidative Phosphorylation." *Cancer Cell*, vol. 35, no. 2, Feb. 2019, pp. 191-203.e8, [www.cell.com/cancer-cell/pdfExtended/S1535-6108\(18\)30584-1](http://www.cell.com/cancer-cell/pdfExtended/S1535-6108(18)30584-1), 10.1016/j.ccell.2018.12.012. Accessed 17 Jan. 2021.

Krelle, Anna C., et al. "Huh-7 Human Liver Cancer Cells: A Model System to Understand Hepatocellular Carcinoma and Therapy." *Journal of Cancer Therapy*, vol. 04, no. 02, 2013, pp. 606–631, [www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=30094](http://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=30094), 10.4236/jct.2013.42078. Accessed 17 Jan. 2021.

Krieghoff-Henning, Eva, and Thomas G. Hofmann. "Role of Nuclear Bodies in Apoptosis Signalling." *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1783, no. 11, 1 Nov. 2008, pp. 2185–2194, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18680765/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18680765/), 10.1016/j.bbamcr.2008.07.002. Accessed 17 Jan. 2021.

Lallemant-Breitenbach, V., and H. de The. "PML Nuclear Bodies." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 2, no. 5, 21 Apr. 2010, pp. a000661–a000661, 10.1101/cshperspect.a000661. Accessed 11 Jan. 2020.

Lallemand-Breitenbach, Valérie, and Hugues de Thé. "PML Nuclear Bodies: From Architecture to Function." *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 52, June 2018, pp. 154–161, [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067418300231](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067418300231), 10.1016/j.ceb.2018.03.011. Accessed 15 Dec. 2019.

Lång, Anna, et al. "PML Bodies in Mitosis." *Cells*, vol. 8, no. 8, 14 Aug. 2019, p. 893, 10.3390/cells8080893. Accessed 7 Jan. 2020.

Lee, K. H., et al. "Induction of Apoptosis in P53-Deficient Human Hepatoma Cell Line by Wild-Type P53 Gene Transduction: Inhibition by Antioxidant." *Molecules and Cells*, vol. 12, no. 1, 31 Aug. 2001, pp. 17–24, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11561726/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11561726/). Accessed 17 Jan. 2021.

Lee, Ursula E., and Scott L. Friedman. "Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 25, no. 2, Apr. 2011, pp. 195–206, 10.1016/j.bpg.2011.02.005. Accessed 14 Nov. 2019.

Lee, Yu Rim, and Soo Young Park. "P53 Expression in Hepatocellular Carcinoma: Influence on the Radiotherapeutic Response of the Hepatocellular Carcinoma." *Clinical and Molecular Hepatology*, vol. 21, no. 3, 2015, p. 230, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4612283/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4612283/), 10.3350/cmh.2015.21.3.230. Accessed 31 Jan. 2020.

Lefere, Sander, and Frank Tacke. "Macrophages in Obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Crosstalk with Metabolism." *JHEP Reports*, vol. 1, no. 1, May 2019, pp. 30–43, 10.1016/j.jhepr.2019.02.004. Accessed 4 Mar. 2020.

Konsultationsfassung S3-Leitlinie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Langversion 2.01 (Konsultationsfassung)- Februar 2021, AWMF Registrierungsnummer: 032 - 053OL, <https://www.dgvs.de/wissen/leitlinien/leitlinien-dgvs/hepatozellulaeres-karzinom/>

Lencioni, Riccardo, et al. "Chemoembolization of Hepatocellular Carcinoma." *Seminars in Interventional Radiology*, vol. 30, no. 01, 27 Feb. 2013, pp. 003-011, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3700789/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3700789/), 10.1055/s-0033-1333648. Accessed 26 June 2019.

Liang, Ying-Ying, et al. "RASSF6 promotes P21Cip1/Waf1-Dependent Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Activation of the JNK/SAPK Pathway in Clear Cell Renal Cell Carcinoma." *Cell Cycle*, vol. 13, no. 9, 10 Mar. 2014, pp. 1440–1449, 10.4161/cc.28416. Accessed 30 Apr. 2019.

Lin, Sue-Jane, et al. "IL-4 Suppresses the Expression and the Replication of Hepatitis B Virus in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hep3B." *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 9, 20 Oct. 2003, pp. 4708–4716, [www.jimmunol.org/content/jimmunol/171/9/4708.full.pdf](http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/171/9/4708.full.pdf), 10.4049/jimmunol.171.9.4708. Accessed 17 Jan. 2021.

Linz, Brandon M. L., et al. "Innate Immune Cell Recovery Is Positively Regulated by NLRP12 during Emergency Hematopoiesis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 198, no. 6, 15 Mar. 2017, pp. 2426–2433, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340642/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340642/), 10.4049/jimmunol.1601048. Accessed 17 Jan. 2021.

Llovet, Josep, et al. "Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: The BCLC Staging Classification." *Seminars in Liver Disease*, vol. 19, no. 03, 1999, pp. 329–338, 10.1055/s-2007-1007122. Accessed 10 Jan. 2020.

Lukens, John R., et al. "The NLRP12 Sensor Negatively Regulates Autoinflammatory Disease by Modulating Interleukin-4 Production in T Cells." *Immunity*, vol. 42, no. 4, 21 Apr. 2015, pp. 654–664, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25888258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25888258), 10.1016/j.immuni.2015.03.006. Accessed 5 Apr. 2020.

Lurje, Isabella, et al. "Treatment Strategies for Hepatocellular Carcinoma – a Multidisciplinary Approach." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 6, 22 Mar. 2019, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30909504/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30909504/), 10.3390/ijms20061465. Accessed 3 Mar. 2021.

Lv, Xiang, et al. "Original Article Establishment of Human Hepatocellular Carcinoma CAM Xenograft Model and Observation of Angiogenesis Characteristics." *Int J Clin Exp Med*, vol. 9, no. 2, 2016, pp. 3693–3698, [www.ijcem.com/files/ijcem0015049.pdf](http://www.ijcem.com/files/ijcem0015049.pdf). Accessed 10 Jan. 2021.



Manghwar, Hakim, et al. "CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing." *Trends in Plant Science*, vol. 24, no. 12, 1 Dec. 2019, pp. 1102–1125, [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138519302432](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138519302432), 10.1016/j.tplants.2019.09.006.

Marisi, Giorgia, et al. "Ten Years of Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma: Are There Any Predictive and/or Prognostic Markers?" *World Journal of Gastroenterology*, vol. 24, no. 36, 28 Sept. 2018, pp. 4152–4163, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158485/pdf/WJG-24-4152.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158485/pdf/WJG-24-4152.pdf), 10.3748/wjg.v24.i36.4152. Accessed 26 Oct. 2019.

Marquardt, Jens U., and Frank Edlich. "Predisposition to Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma: From Mechanistic Insights to Therapeutic Strategies." *Frontiers in Oncology*, vol. 9, 2019, p. 1421, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31921676](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31921676), 10.3389/fonc.2019.01421. Accessed 5 Apr. 2020.

Müller, M, et al. "Drug-Induced Apoptosis in Hepatoma Cells Is Mediated by the CD95 (APO-1/Fas) Receptor/Ligand System and Involves Activation of Wild-Type P53." *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 3, 1 Feb. 1997, pp. 403–413, 10.1172/jci119174. Accessed 7 Sept. 2020.

Niu, Zhao-Shan, et al. "Genetic Alterations in Hepatocellular Carcinoma: An Update." *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22, no. 41, 2016, p. 9069, 10.3748/wjg.v22.i41.9069. Accessed 26 Oct. 2019.

Pavel, Mihai-Calin, and Josep Fuster. "Expansion of the Hepatocellular Carcinoma Milan Criteria in Liver Transplantation: Future Directions." *World Journal of Gastroenterology*, vol. 24, no. 32, 28 Aug. 2018, pp. 3626–3636, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113720/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113720/), 10.3748/wjg.v24.i32.3626. Accessed 5 Apr. 2020.

Pinato, David J., et al. "Immune-Based Therapies for Hepatocellular Carcinoma." *Oncogene*, 10 Mar. 2020, pp. 1–18, [www.nature.com/articles/s41388-020-1249-9](http://www.nature.com/articles/s41388-020-1249-9), 10.1038/s41388-020-1249-9. Accessed 5 Apr. 2020.

Piscaglia, Fabio, and Sadahisa Ogasawara. "Patient Selection for Transarterial Chemoembolization in Hepatocellular Carcinoma: Importance of Benefit/Risk Assessment." *Liver Cancer*, vol. 7, no. 1, 2018, pp. 104–119, [www.karger.com/Article/FullText/485471](http://www.karger.com/Article/FullText/485471), 10.1159/000485471. Accessed 3 Mar. 2021.

Qiu, Guo-Hua, et al. "Distinctive Pharmacological Differences between Liver Cancer Cell Lines HepG2 and Hep3B." *Cytotechnology*, vol. 67, no. 1, 8 July 2014, pp. 1–12, 10.1007/s10616-014-9761-9. Accessed 18 Dec. 2020.

Ran, F Ann, et al. "Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System." *Nature Protocols*, vol. 8, no. 11, 24 Oct. 2013, pp. 2281–2308, 10.1038/nprot.2013.143.

Rawla, Prashanth, et al. "Update in Global Trends and Aetiology of Hepatocellular Carcinoma." *Współczesna Onkologia*, vol. 22, no. 3, 2018, pp. 141–150, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6238087/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6238087/), 10.5114/wo.2018.78941.

Refolo, Maria Grazia, et al. "Inflammatory Mechanisms of HCC Development." *Cancers*, vol. 12, no. 3, 10 Mar. 2020, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32164265](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32164265), 10.3390/cancers12030641. Accessed 5 Apr. 2020.

Regad, T., and M. K. Chelbi-Alix. "Role and Fate of PML Nuclear Bodies in Response to Interferon and Viral Infections." *Oncogene*, vol. 20, no. 49, 29 Oct. 2001, pp. 7274–7286, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11704856/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11704856/), 10.1038/sj.onc.1204854. Accessed 10 Jan. 2021.

Regad, Tarik, et al. "The Tumor Suppressor Pml Regulates Cell Fate in the Developing Neocortex." *Nature Neuroscience*, vol. 12, no. 2, 1 Feb. 2009, pp. 132–140, [www.nature.com/articles/nn.2251](http://www.nature.com/articles/nn.2251), 10.1038/nn.2251. Accessed 10 Jan. 2021.

Ribatti, Domenico. "The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM). A Multifaceted Experimental Model." *Mechanisms of Development*, vol. 141, Aug. 2016, pp. 70–77, 10.1016/j.mod.2016.05.003. Accessed 16 Oct. 2019.

Robb, G. Brett. "Genome Editing with CRISPR-Cas: An Overview." *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, vol. 19, no. 1, 12 Nov. 2019, 10.1002/cpet.36. Accessed 22 Oct. 2020.

Sahin, Umut, et al. "Oxidative Stress-Induced Assembly of PML Nuclear Bodies Controls Sumoylation of Partner Proteins." *The Journal of Cell Biology*, vol. 204, no. 6, 17 Mar. 2014, pp. 931–945, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637324](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637324), 10.1083/jcb.201305148. Accessed 5 Apr. 2020.

Siracusano, Gabriel, et al. "Cell Surface Proteins in Hepatocellular Carcinoma: From Bench to Bedside." *Vaccines*, vol. 8, no. 1, 24 Jan. 2020, p. 41, 10.3390/vaccines8010041. Accessed 28 Feb. 2020.

Smith, Bryan John. "SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins." *Basic Protein and Peptide Protocols*, vol. 32, 1994, pp. 23–34, [link.springer.com/protocol/10.1385%2F0-89603-268-X%3A23](http://link.springer.com/protocol/10.1385%2F0-89603-268-X%3A23), 10.1385/0-89603-268-x:23.

Straub, Katja, et al. "Promyelocytic Leukemia Protein Deficiency Leads to Spontaneous Formation of Liver Tumors in Hepatitis C Virus Transgenic Mice." *Cancer Medicine*, vol. 8, no. 8, 1 July 2019, pp. 3793–3802, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31144474](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31144474), 10.1002/cam4.2162. Accessed 5 Apr. 2020.

Tabrizian, Parissa, et al. "Current Management of Hepatocellular Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 30, 14 Aug. 2014, pp. 10223–10237, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132740](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132740), 10.3748/wjg.v20.i30.10223. Accessed 5 Apr. 2020.

Tsoufias, Georgios. "Hepatocellular Carcinoma and Metabolic Syndrome: The Times Are Changing and so Should We." *World Journal of Gastroenterology*, vol. 25, no. 29, 7 Aug. 2019, pp. 3842–3848, 10.3748/wjg.v25.i29.3842. Accessed 22 Sept. 2019.

Tuncer, Sinem, et al. "The Multifaceted Nature of NLRP12." *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 96, no. 6, 23 Sept. 2014, pp. 991–1000, 10.1189/jlb.3ru0514-265rr. Accessed 16 June 2020.

Udden, SM Nashir, et al. "NLRP12 Suppresses Hepatocellular Carcinoma via Downregulation of c-Jun N-Terminal Kinase Activation in the Hepatocyte." *eLife*, vol. 8, 16 Apr. 2019, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6483596/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6483596/), 10.7554/eLife.40396. Accessed 17 Jan. 2021.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115

Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289-91

Vietti Violi, Naik, et al. "Radiological Diagnosis and Characterization of HCC." PubMed, Humana Press, 2019, [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553760/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553760/). Accessed 5 Apr. 2020.

Volodko, Natalia, et al. "RASSF Tumor Suppressor Gene Family: Biological Functions and Regulation." *FEBS Letters*, vol. 588, no. 16, 19 Aug. 2014, pp. 2671–2684, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607545](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607545), 10.1016/j.febslet.2014.02.041. Accessed 5 Apr. 2020.

Wakabayashi, Taiga, et al. "Radiomics in Hepatocellular Carcinoma: A Quantitative Review." *Hepatology International*, vol. 13, no. 5, 1 Sept. 2019, pp. 546–559, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31473947](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31473947), 10.1007/s12072-019-09973-0. Accessed 5 Apr. 2020.

Wang, Eric A., et al. "Treatment Options for Unresectable HCC with a Focus on SIRT with Yttrium-90 Resin Microspheres." *International Journal of Clinical Practice*, vol. 71, no. 11, 1 Nov. 2017, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28758319](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28758319), 10.1111/ijcp.12972. Accessed 5 Apr. 2020.

Wang, Wen-Horng, et al. "Proteins ZNF198 and SUZ12 Are Down-Regulated in Hepatitis B Virus (HBV) X Protein-Mediated Hepatocyte Transformation and in HBV Replication." *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 53, no. 4, 1 Apr. 2011, pp. 1137–1147, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3079326/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3079326/), 10.1002/hep.24163. Accessed 17 Jan. 2021.

Wang, Xuan, et al. "Targeting of Growth Factors in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: The Potentials of Polysaccharides." *Oncology Letters*, vol. 13, no. 3, 1 Mar. 2017, pp. 1509–1517, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403668/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403668/), 10.3892/ol.2017.5602. Accessed 5 Apr. 2020.

Wang, Yan-Yan, et al. "Comparison of the Ability of Child-Pugh Score, MELD Score, and ICG-R15 to Assess Preoperative Hepatic Functional Reserve in Patients with Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Surgical Oncology*, vol. 118, no. 3, 1 Sept. 2018, pp. 440–445, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30259515/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30259515/), 10.1002/jso.25184. Accessed 14 Mar. 2021.

Whittaker, S., et al. "The Role of Signaling Pathways in the Development and Treatment of Hepatocellular Carcinoma." *Oncogene*, vol. 29, no. 36, 9 Sept. 2010, pp. 4989–5005, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639898](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639898), 10.1038/onc.2010.236. Accessed 5 Apr. 2020.

Wu, Meng-Yu, et al. "Molecular Targets in Hepatocarcinogenesis and Implications for Therapy." *Journal of Clinical Medicine*, vol. 7, no. 8, 13 Aug. 2018, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6112027/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6112027/), 10.3390/jcm7080213. Accessed 5 Apr. 2020.

Xu, Xiaoyin, et al. "BCL-XL Binds and Antagonizes RASSF6 Tumor Suppressor to Suppress P53 Expression." *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, vol. 22, no. 12, 1 Dec. 2017, pp. 993–1003, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29193479](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29193479), 10.1111/gtc.12541. Accessed 5 Apr. 2020.

Xu, Zhong, et al. "Loss of Pten Synergizes with C-Met to Promote Hepatocellular Carcinoma Development via MTORC2 Pathway." *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 50, no. 1, 1 Jan. 2018, p. e417, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5992985/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5992985/), 10.1038/emm.2017.158. Accessed 5 Apr. 2020.

Yamakodo, Koichiro, et al. "Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma." *Gastrointestinal Intervention*, vol. 3, no. 1, 1 June 2014, pp. 35–39, [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213179514000157](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213179514000157), 10.1016/j.gii.2014.04.002. Accessed 3 Mar. 2021.

Yoon, G. S., and E. Yu. "Overexpression of Promyelocytic Leukemia Protein and Alteration of PML Nuclear Bodies in Early Stage of Hepatocarcinogenesis." *Journal of Korean Medical Science*, vol. 16, no. 4, 1 Aug. 2001, pp. 433–438, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3054776/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3054776/). Accessed 17 Jan. 2021.

Zaki, Md Hasan, et al. "The NOD-like Receptor NLRP12 Attenuates Colon Inflammation and Tumorigenesis." *Cancer Cell*, vol. 20, no. 5, 15 Nov. 2011, pp. 649–660, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094258), 10.1016/j.ccr.2011.10.022. Accessed 5 Apr. 2020.

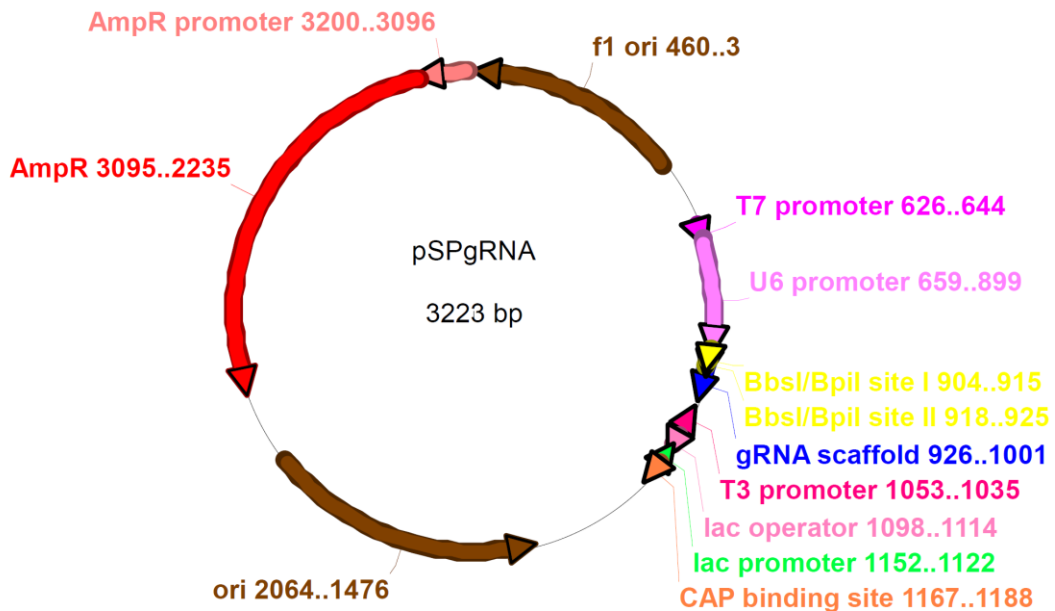
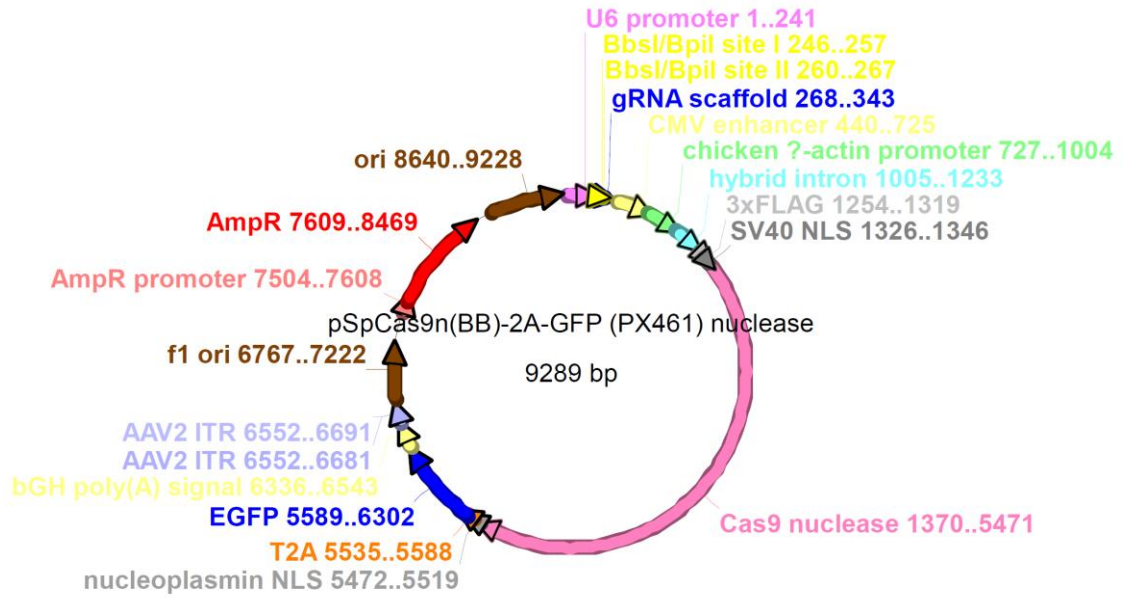
Zhou, Rui, et al. "RASSF6 Downregulation Promotes the Epithelial-Mesenchymal Transition and Predicts Poor Prognosis in Colorectal Cancer." *Oncotarget*, vol. 8, no. 33, 15 Aug. 2017, pp. 55162–55175, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28903410/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28903410/), 10.18632/oncotarget.19181. Accessed 10 Jan. 2021.

Zhu, Nan, et al. "Overexpression of RAS-Association Domain Family 6 (RASSF6) Inhibits Proliferation and Tumorigenesis in Hepatocellular Carcinoma Cells." *Oncology Research*, vol. 25, no. 6, 5 July 2017, pp. 1001–1008, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27983932](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27983932), 10.3727/096504016X14796039599926. Accessed 5 Apr. 2020.

Zhu, Xiao-Dong, et al. "Adjuvant Therapies after Curative Treatments for Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Prospects." *Genes & Diseases*, vol. 7, no. 3, 1 Sept. 2020, pp. 359–369, [reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2352304220300325?token=17BE5A61E3E573207DAA1CFFC5EC5A9BF9A824C9F2FE179DB3B6789A64DE91ACBBC56E6D6C582DD6818A22B4E931101E](http://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2352304220300325?token=17BE5A61E3E573207DAA1CFFC5EC5A9BF9A824C9F2FE179DB3B6789A64DE91ACBBC56E6D6C582DD6818A22B4E931101E), 10.1016/j.gendis.2020.02.002. Accessed 3 Mar. 2021.

## 10 Anhang

### 10.1 Plasmidkarten der synthetischen pX461 nuc und pSPgRNA Vektoren



10.2 sgRNAs für CRISPR/Cas9

Linearisierung der Plasmide pSPgRNA und pX461\_nuc, Ligation der sgRNAs und der Plasmide

Abbr.	Location	Template	Beschreibung	Sequence 5'-3'	Zielvektor	Vektor	Guide Sequence
PML sgRNA 5 fw	upstream PML Exon 1	agctgtgggctct cctttccagaatgt ctccgtttgcagg cttgctctccatta catctacggctctt agaaagcaggg gctgcgtgtggct catctttgtacgcc	guideRNA 210revU6sensepX330	CACCGcC CGctttaccg taagtcag	pX461_nuc	pX461_nuc PML sgRNA5	ACCGCT GACTTAC GGTAAAG CGG
PML sgRNA 5 rev	upstream PML Exon 1	cagctcccggca ggacgtggcagc aagcagtgccag tgtgaacggatga	guideRNA 210revU6antisensepX330	AAACctga cttacggtaa agCGGgC			
PML sgRNA 6 fw	upstream PML Exon 1	atggatcaaagc cgggagcaggg ctgccccctgca gctctgccctacct ctcccgtttaccg taagtcagcggta ggctgcagctct	guideRNA 114revU6sensepX330	CACCGtgc ttcgtgccac gtcctgc	pX461_nuc	pX461_nuc PML sgRNA6	TGCTTCG TGCCAC GTCCTGC CGG
PML sgRNA 6 rev	upstream PML Exon 1	c	guideRNA 114revU6antisensepX330	AAACgcag gacgtggca cgaagcaC			
PML sgRNA 7 fw	downstream PML Exon 1	ttaagctttgtggt tgctgtggtggg agaggcgggaa gagagggtctaa cggaggatttgg caagtaccctag agagtgcacaaa agcgggaagtcc	guideRNA 130forwU6sensepX330	CACCgggt cctgaccgtc tcgggt	pSPgRNA	pSPgRNA PML sgRNA7	GGGTCC TGACCGT CTCGGG T GGG
PML sgRNA 7 rev	downstream PML Exon 1	agacaccagggt cctgaccgtctcg ggtggggcaggg aagggagggtg ggatagagtaga aaagaggacac ggaggagtggg gcggcctcgtg ggctgcggttctc cactgagcagttg ggcaaggtgaga agggtcagtggc	guideRNA 130forwU6antisensepX330	AAACacc gagacggtc aggacc			
PML sgRNA 8 fw	downstream PML Exon 1	c	guideRNA 62forwU6sensepX330	CACCGag agggtctaac ggaggatt	pSPgRNA	pSPgRNA PML sgRNA8	AGAGGG TCTAACG GAGGATT TGG
PML sgRNA 8 rev	downstream PML Exon 1	c	guideRNA 62forwU6antisensepX330	AAACaatc ctccgttaga ccctctC			
Rassf6 sgRNA 5 fw	upstream Rassf6 Exon 1	ttataaaaaatat aaataccggaag tgtatgcatggcct actaaatcagagt	guideRNA 19revU6sensepX330	CACCgtag gccatgcata cacttc	pX461_nuc	pX461_nuc Rassf6 sgRNA5	GTAGGC CATGCAT



Anhang

		ctcacagttgatg gtacctgggttag cagaatacatag gtggctctgtgc accctgaagcgc gaaacgctgctct gggtgaaaaaa agtgctagcagg gaaatgtgtagc					ACACTTC GGG
Rassf6 sgRNA 5 rev	upstream Rassf6 Exon 1	gaaacgctgctct gggtgaaaaaa agtgctagcagg gaaatgtgtagc aaaataacaagg aaaagaaagta acaaatctcaaat tgaaaaagaaa aatcttaaaaaga aagacgtgaata atggcgttcagtct tggttggtgcattt	guideRNA 19revU6an tisensepX3 30	AAACgaag tgatgcatgg cctac			
Rassf6 sgRNA 6 fw	upstream Rassf6 Exon 1	aaaataacaagg aaaagaaagta acaaatctcaaat tgaaaaagaaa aatcttaaaaaga aagacgtgaata atggcgttcagtct tggttggtgcattt ctcacaggccaa ttacctacagtctg ggtggactagag aatagagattaac atcagtcaaatcc cgtggttaaagcg ttaactagaatgct cattcatttctcaa gaagtgtggcag agagcaaagga gtgtacctatcag ctgttcctaagaa agtaaacactcc caacatg	guideRNA 331revU6s ensepX33 0	CACCGtct agttaacgctt taacca	pX461_ nuc	pX461_nuc Rassf6 sgRNA6	TCTAGTT AACGCTT TAACCA CGG
Rassf6 sgRNA 6 rev	upstream Rassf6 Exon 1	ctcacaggccaa ttacctacagtctg ggtggactagag aatagagattaac atcagtcaaatcc cgtggttaaagcg ttaactagaatgct cattcatttctcaa gaagtgtggcag agagcaaagga gtgtacctatcag ctgttcctaagaa agtaaacactcc caacatg	guideRNA 331revU6a ntisensepX 330	AAACtggtt aaagcgttaa ctagaC			
Rassf6 sgRNA 7 fw	downstream Rassf6 Exon 1	gtaaaaaatggg gatggggaaaa aaactttctaattc actccctggggtc atgttgagggcaa gttattagaaagc agaatccatagg caacaaagttaa gtgtgtgtgtcat agcagcctgaat cgcacacatgcct ttccttttgatttct cagaatatgctttc ctaaccaaggta agctttaggggtg ggagggagaga ggggaaagaag ggagggaaagg gtgcagagaagg gcttgaggtaaa tgtgacctagga cccctcctccctt agttcaatgagcc cttcacctgaatt gtgcctggcaaa aatcgtgccttac aaagatactaga cttctggatggcat	guideRNA 413forwU6 sensepX3 30	CACCGatt gtgttgatca tcgcac	pSPgR NA	pSPgRNA Rassf6 sgRNA7	ATTGTGT TGAATCA TCGCAC TGG
Rassf6 sgRNA 7 rev	downstream Rassf6 Exon 1	gtgtgtgtgtcat agcagcctgaat cgcacacatgcct ttccttttgatttct cagaatatgctttc ctaaccaaggta agctttaggggtg ggagggagaga ggggaaagaag ggagggaaagg gtgcagagaagg gcttgaggtaaa tgtgacctagga cccctcctccctt agttcaatgagcc cttcacctgaatt gtgcctggcaaa aatcgtgccttac aaagatactaga cttctggatggcat	guideRNA 413forwU6 antisensep X330	AAACgtgc gatgattcaa cacaatC			
Rassf6 sgRNA 8 fw	downstream Rassf6 Exon 1	gtaaaaaatggg gatggggaaaa aaactttctaattc actccctggggtc atgttgagggcaa gttattagaaagc agaatccatagg caacaaagttaa gtgtgtgtgtcat agcagcctgaat cgcacacatgcct ttccttttgatttct cagaatatgctttc ctaaccaaggta agctttaggggtg ggagggagaga ggggaaagaag ggagggaaagg gtgcagagaagg gcttgaggtaaa tgtgacctagga cccctcctccctt agttcaatgagcc cttcacctgaatt gtgcctggcaaa aatcgtgccttac aaagatactaga cttctggatggcat	guideRNA 191forwU6 sensepX3 30	CACCGcct aaccaaggt aagcttgt	pSPgR NA	pSPgRNA Rassf6 sgRNA8	CCTAACC AAGGTAA GCTTGT AGG
Rassf6 sgRNA 8 rev	downstream Rassf6 Exon 1	gtaaaaaatggg gatggggaaaa aaactttctaattc actccctggggtc atgttgagggcaa gttattagaaagc agaatccatagg caacaaagttaa gtgtgtgtgtcat agcagcctgaat cgcacacatgcct ttccttttgatttct cagaatatgctttc ctaaccaaggta agctttaggggtg ggagggagaga ggggaaagaag ggagggaaagg gtgcagagaagg gcttgaggtaaa tgtgacctagga cccctcctccctt agttcaatgagcc cttcacctgaatt gtgcctggcaaa aatcgtgccttac aaagatactaga cttctggatggcat	guideRNA 191forwU6 antisensep X330	AAACcaaa gcttacctgg ttaggC			

Anhang

		actcctcctctga gtatccttatggta gaatattgtgtga atcatcgactgg aaagaactaat					
NLRP1 2 sgRNA 5 fw	upstream NLRP12 Exon 1	ctgtctcaaaaaa aaaaaaattctcc ctggaagaggcg cagtcgcagtttg ataatacactcta ccacacacacta gtgaaatgagga aaacaagagga	guideRNA 184revU6s ensepX33 0	CACCggg ggagattaa gaaatccg	pX461_ nuc	pX461_nuc NLRP12 sgRNA5	GGGGGA GATTAAG AAATCCG AGG
NLRP1 2 sgRNA 5 rev	upstream NLRP12 Exon 1	aagcggaaaga gagtgactgtttgt caagagatccag gaagagacagc agaagtgaaaat cttttcatcagcc aagtggctcctcg gatttctaattccc ccccgaacttct cttctccaccag aacagcc	guideRNA 184revU6a ntisensepX 330	AAACcgga tttcttaatctc cccc			
NLRP1 2 sgRNA 6 fw	upstream NLRP12 Exon 1		guideRNA 174revU6s ensepX33 0	CACCGaa gaaatccga ggagccact	pX461_ nuc	pX461_nuc NLRP12 sgRNA6	AAGAAAT CCGAGG AGCCACT TGG
NLRP1 2 sgRNA 6 rev	upstream NLRP12 Exon 1		guideRNA 174revU6a ntisensepX 330	AAACagtg gctcctcgga tttcttC			
NLRP1 2 sgRNA 7 fw	downstream NLRP12 Exon 1	gtaaggagggtgg cgggacaggca aggctagaatgc cagccgggtcca gtgactcatacct gtaatctcagcac tttgggaggctga	guideRNA 40forwU6s ensepX33 0	CACCggc aaggctaga atgccagc	pSPgR NA	pSPgRNA NLRP12 sgRNA7	GGCAAG GCTAGAA TGCCAG C CGG
NLRP1 2 sgRNA 7 rev	downstream NLRP12 Exon 1	a	guideRNA 40forwU6a ntisensepX 330	AAACgctg gcattctagc cttgcc			

10.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AFP	alpha-Fetoprotein
AIH	Autoimmunhepatitis
Akt	Serine/Threonine Kinase
ALT	Alanin-Aminotransferase (ehemals GPT)
Amp	Amphicillin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APL	promyelozytärer Leukämie
ASH	alkoholisch induzierte Steatohepatitis
AST	Aspartat-Aminotransferase (ehemals GOT)
BCA	Bicinchoninsäure
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM	Chorioallantois-Membran
Cas9	CRISPR associated protein 9
CNI	Calcineurin inhibitor
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Computertomographie
DAA	direct acting antivirals
DEB-TACE	<i>drug-eluting bead TACE</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsolfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DSB	Doppelstrangbruch
E.coli	Escherichia coli
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ER	endoplasmisches Retikulum
ERK	extracelular-signal regulated kinase
et al.	und andere (et alteri)
FAK	Protein-Thyrosinkinase
Fas L	Fas Rezeptor Ligand
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor

FKBP-12	<i>FK506-binding protein 12</i>
fw	<i>forward</i>
g (k,m,µ, n,p)	Gramm (kilo, milli, mikro, nano, piko)
gGt	gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
Hep3B	Humane Hepatomzelllinie Hep3B
HepG2	Humane Hepatomzelllinie HepG2
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIFUS	<i>high-intensity focused ultrasound Ablation</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSC	hepatische Sternzellen
Huh7	Humane Hepatomzelllinie Huh7
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
Indel	Insertion/Deletion
IRAK1	interleukin 1 receptor associated kinase 1
JNK	c-Jun amino-terminal kinases
l (m,µ)	Liter (milli, mikro)
LA	Laserablation
LRR	leucinreiche Wiederholung
LT	Lebertransplantation
m (k,m,µ, n,p)	Meter (kilo, milli, mikro, nano, piko)
m (m,µ, n,p)	Molar (milli, mikro, nano, piko)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	murine double minute 2 homolog
min	Minute(n)
mIST8	<i>mammalian lethal with SEC 13 protein 8</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Boten RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MRT	Magnetresonanztomographie
MST2	<i>mammalian Ste-20-like kinase</i>
mTor	mammalian target of Rapamycin
mTORC1/2	mTor Complex 1/2
MWA	Mikrowellenablation
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NBs	<i>nuclear bodies</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NHEJ	nicht homologe Endverbindung, <i>Non-homologous end-joining</i>
NIK	NFκB inducing kinase
NLR	NOD-like Rezeptoren

NLRA	NLR Unterfamilie mit acidic transactivation domain
NLRB	NLR Unterfamilie mit baculovirus IAP repeat (BIR)
NLRC	NLR Unterfamilie mit caspase-recruitment and activation domain
NLRP	NLR Unterfamilie mit Pyrin domain (PYD)
NLRP12	NOD-like receptor family pyrin domain 12
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Photospacer-Nachbarmotivsequenz
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBC	primär biliäre Cholangitis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS (T)	Phosphatgepufferte Salzlösung (Tween) ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDGF	Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor
PET-CT	Positronen-Emission- Tomographie-CT
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration [H <sup>+</sup> ]
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qrtPCR	quantitative reverse transcriptase real-time PCR
RA	<i>Ras association</i>
RASSF6	<i>RAS associated domain family 6</i>
Rb	Retinoblastom
rev	<i>reverse</i>
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
S6K1	S6 Kinase 1
SARAH	Salvador/RASSF/Hippo
SBRT	Stereotactic Body Radiotherapy
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamide Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of mean</i> )
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
SIRT	selektive interne Radiotherapie
SNP	<i>Single nucleotide Polymorphism</i>
Stat	Signal transducer and activator of transcription
Std.	Stunde/ Stunden
t	Zeitpunkt ( <i>time</i> )

TAC	Tacrolimus
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TARE	Transarterielle Radioembolisation
TBS (T)	Tris-gepufferte Salzlösung (Tween) ( <i>Tris-puffered saline</i> )
TGF- $\alpha$	transformierender Wachstumsfaktor- alpha
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor- beta
TIME	tumor immune microenvironment
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Nodes und Metastasen
Traf	TNF receptor-associated factor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIM Domäne	dreigliedrige N-terminale Domäne
Tween	Polyoxyethylen-(20) sorbitolmonolaurat
U	<i>unit</i>
UCSF	University of California San Francisco Kriterien
US	Sonographie
USA	United States of America
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (%)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
x	fach
YAP	<i>yes-associated protein</i>
z. B.	Zum Beispiel

#### 10.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms pro 100.000 Einwohner.....	2
Abbildung 2: Ätiologie und Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms. ....	3
Abbildung 3: Das BCLC Staging System.....	6
<b>Abbildung 4: HCC Entstehung durch Einfluss von Wachstumsfaktoren.....</b>	<b>11</b>
Abbildung 5: Die zellulären Funktionen von PML. ....	14
Abbildung 6: Schematische Übersicht über den CAM Assay. Modifiziert nach Dünker and Jendrossek, 2019 .....	49
Abbildung 7: Relative RNA Expression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	54

Abbildung 8: Relative RNA Expression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	55
Abbildung 9: Relative RNA Expression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	56
Abbildung 10: Proteinexpression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	57
Abbildung 11: Proteinexpression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	58
Abbildung 12: Proteinexpression der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	59
Abbildung 13: Zellproliferation der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten PML <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	60
Abbildung 14: Apoptose der Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten PML <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	61
Abbildung 15: Apoptose der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten PML <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	62
Abbildung 16: Apoptose der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten PML <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	63
Abbildung 17: Beispiele der Fotodokumentation der durch den heterozygoten PML <i>knockout</i> entstandenen Tumore aus dem CAM Modell .....	64
Abbildung 18: Tumorgröße von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten PML <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	65
Abbildung 19: Tumorgröße von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten PML <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	66
Abbildung 20: Tumorgröße von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten PML <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	67
Abbildung 21: Einfluss eines heterozygoten PML <i>knockouts</i> in Hep3B Zellen auf das Tumorgewicht im CAM Modell .....	68
Abbildung 22: Tumorgewicht von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten PML <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	69
Abbildung 23: Tumorgewicht von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten PML <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	70
Abbildung 24: Zellproliferation der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	71

Abbildung 25: Apoptose der Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	72
Abbildung 26: Apoptose der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	73
Abbildung 27: Apoptose der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	74
Abbildung 28: Beispiele der Fotodokumentation der durch den heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> entstandenen Tumore aus dem CAM Modell .....	75
Abbildung 29: TumorgroÙe von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	76
Abbildung 30: TumorgroÙe von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	77
Abbildung 31: TumorgroÙe von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	78
Abbildung 32: Tumorgewicht von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	79
Abbildung 33: Tumorgewicht von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	80
Abbildung 34: Tumorgewicht von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten RASSF6 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	81
Abbildung 35: Zellproliferation der verschiedenen Hepatomzelllinien mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	82
Abbildung 36: Apoptose der Hepatomzelllinie Hep3B mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	83
Abbildung 37: Apoptose der Hepatomzelllinie HepG2 mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	84
Abbildung 38: Apoptose der Hepatomzelllinie Huh7 mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> versus der jeweiligen Kontrollzelllinie .....	85
Abbildung 39: Beispiele der Fotodokumentation der durch den heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> entstandenen Tumore aus dem CAM Modell.....	86
Abbildung 40: TumorgroÙe von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay.....	87
Abbildung 41: TumorgroÙe von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay.....	88



Abbildung 42: TumorgroÙe von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	89
Abbildung 43: Tumorgewicht von Hep3B Kontrolle - versus Hep3B mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	90
Abbildung 44: Tumorgewicht von HepG2 Kontrolle - versus HepG2 mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	91
Abbildung 45: Tumorgewicht von Huh7 Kontrolle - versus Huh7 mit heterozygoten NLRP12 <i>knockout</i> -Tumoren im CAM Assay .....	92

## 10.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte .....	19
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	21
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien.....	23
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 5: Verwendete Enzyme .....	25
Tabelle 6: Verwendete Antikörper. ....	25
Tabelle 7: Verwendete kompetente Zellen. ....	25
Tabelle 8: Verwendete Vektoren. ....	26
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.....	26
Tabelle 10: Verwendete Kits.....	26
Tabelle 11: Verwendete Zellzahlen und Volumina der in vitro Experimente, wenn nicht anders angegeben.....	29
Tabelle 12: Genotypisierungs-PCR Ansatz .....	40
Tabelle 13: PCR-Protokoll für die Genotypisierung der PML, RASSF6 und NLRP12 Klonierung .....	40
Tabelle 14: Verwendete PCR-Primer für die Genotypisierung der PML, RASSF6 und NLRP12.....	41
Tabelle 15: Programm der qrt-PCR für die Genexpressionsanalyse mit dem QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit.....	45
Tabelle 16: Verwendete sgRNAs für die Oligodimerisierung .....	30

Tabelle 17: PCR Ansatz für die Oligodimerisierung und Phosphorylierung .....	30
Tabelle 18: PCR Protokoll für die Oligodimerisierung und Phosphorylierung .....	31
Tabelle 19: Reaktion für die Klonierung der sgRNAs in pX461_nuc.....	31
Tabelle 20: Reaktion für die Klonierung der sgRNAs in pSPgRNA .....	31
Tabelle 21: PCR für die Klonierung der sgRNA in pX461_nuc und pSPgRNA.....	32

## 10.6 Formeln

Formel 1: Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer .....	28
Formel 2: Kopienzahlbestimmung der PCR Produkte .....	46
Formel 3: Kopienzahlbestimmung des qrt-PCR Produktes .....	46
Formel 4: Bestimmung der Genexpression des Zielgens. ....	46
Formel 5: Bestimmung des <i>Fold Change</i> . ....	47

## 11 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### 11.1 Publikationen

**Vogel N., Straub K., Busch M., Dünker N., Hardtke-Wolenski M., Herzer K. (2021)** *Influence of RASSF6 knockout on tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cell lines.*  
In preparation

### 11.2 Poster und Abstracts

**Vogel N., Straub K., Husen P., Wedemeyer H., Herzer K. (2018)** *Influence of RASSF6 and NLRP12 on growth and recurrence of human Hepatocellular Carcinoma.*  
Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg- Essen, Essen

**Vogel N., Straub K., Husen P., Paul A., Wedemeyer H., Herzer K. (2019)** *Influence of RASSF6 and NLRP12 on growth of human hepatocellular carcinoma and its recurrence after liver transplantation.* Wilsede Biotest Workshop, Undeloh

**Vogel N., Straub K., Busch M., Dünker N., Wedemeyer H., Herzer K. (2019)** *Influence of PML, RASSF6 and NLRP12 on growth and recurrence of human Hepatocellular Carcinoma.* Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg- Essen, Essen

**Vogel N., Straub K., Busch M., Dünker N., Wedemeyer H., Herzer K. (2020)** *Influence of tumour suppressor proteins on growth and recurrence of human Hepatocellular Carcinoma in the CAM model.* Wilsede Biotest Workshop, Undeloh-  
Abstract akzeptiert aber ausgefallen

**Vogel N., Straub K., Busch M., Dünker N., Wedemeyer H., Herzer K.** (2020) *Influence of PML, RASSF6 and NLRP12 on growth and recurrence of Human Hepatocellular Carcinoma.* The International Liver Congress of the European Association for the study of the liver (EASL), London, Digital veröffentlicht

**Vogel N., Straub K., Busch M., Dünker N., Herzer K.** (2020) *Einfluss von PML, RASSF6 und NLRP12 auf das Wachstum und das Wiederauftreten des humanen hepatozellulären Karzinoms.* Deutsche Transplantationsgesellschaft (DTG), Köln

**Vogel N., Straub K., Hardtke-Wolenski M., Busch M., Dünker N., Herzer K.** (2020) *Einfluss von PML, RASSF6 und NLRP12 auf das Wachstum des hepatozellulären Karzinoms im CAM Modell.* Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg-Essen, Digital in Essen

### 11.3 Vorträge

**Vogel N., Straub K., Husen P., Wedemeyer H., Herzer K.** (2018) *Genetic and epigenetic regulation of NFkB-associated Tumorsuppressor proteins RASSF6 and NLRP12 in hepatocellular carcinoma and their influence on carcinogenesis.* Laborseminar der Gastroenterologie und Hepatologie, Essen

**Vogel N., Straub K., Husen P., Wedemeyer H., Herzer K.** (2018) *Mechanisms of HCC development and recurrence & Genetic and epigenetic regulation of NFkB-associated Tumorsuppressor proteins RASSF6 and NLRP12 in hepatocellular carcinoma and their influence on carcinogenesis.* Gastroenterologie und Hepatologie Retreat, Essen

**Vogel N., Straub K., Husen P., Busch M., Dünker N., Wedemeyer H., Herzer K.** (2019) *Genetic and epigenetic regulation of NFkB-associated Tumorsuppressor proteins RASSF6 and NLRP12 in hepatocellular carcinoma and their influence on carcinogenesis and does therapy with the immunosuppressant Everolimus influence HCC recurrence following LT?*. Laborseminar der Gastroenterologie und Hepatologie, Essen

**Vogel N., Straub K., Husen P., Wedemeyer H., Herzer K.** (2019) *Influence of RASSF6 and NLRP12 on growth and recurrence of Human Hepatocellular Carcinoma*. 13. Winterseminar der medizinischen Fakultät Duisburg- Essen, Pichl, Österreich

**Vogel N., Straub K., Busch M., Dünker N., Wedemeyer H., Herzer K.** (2019) *The Influence of the Tumorsuppressor Proteins PML, RASSF6 and NLRP12 in Hepatocellular Carcinoma and on Hepatocarcinogenesis*. Gastroenterologie und Hepatologie Retreat, Essen

**Vogel N., Straub K., Busch M., Dünker N., Wedemeyer H., Herzer K.** (2019) *Einfluss von PML, RASSF6 und NLRP12 auf die Entwicklung und Rekurrenz des humanen hepatozellulären Karzinoms*. Vortrag intern mit der Abteilung für Neuroanatomie II, Essen

## **12 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

### **13 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich großen Dank aussprechen an all die Menschen, die mich bei meiner Doktorarbeit begleitet haben.

Mein besonderer Dank für die ausgezeichnete Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit gilt Prof. Dr. med. Kerstin Herzer. Danke für deinen Einsatz mit Rat und Tat.

Meinen Dank möchte ich auch meiner Freundin und Kollegin Dr. Alexandra Frey aussprechen für ihre großartige Unterstützung. Danke Alex, für alles.

Auch gilt mein Dank an Dr. Katja Straub für ihre Einführung und Vorarbeit an diesem Projekt. Danke dir.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen an die ich mich wenden durfte, um Informationen und Lösungsvorschläge zu erfragen. Dies betrifft hauptsächlich unsere Arbeitsgruppen der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, aber auch Menschen aus der Neuroanatomie, Pharmakogenetik, Urologie und Humangenetik. Danke.

Auch nochmal großen Dank für die Kooperation an die Neuroanatomie.

Für die Durchsicht dieser Arbeit drücke ich auch meinen Dank aus, an alle die sich die Zeit genommen haben sich das alles durchzulesen.

Bei dieser Gelegenheit bedanke ich mich auch vor allem bei meinen Eltern und meinem Bruder für ihre enorme Unterstützung und Ermutigung in meinen Vorhaben! Hier auch großen Dank an mein geduldiges vierbeiniges Familienmitglied.

Auch gilt großer Dank an meine Freunde für ihre guten Zusprüche und Geduld.

Ich weiß es zu schätzen und bin euch allen unendlich dankbar!



## 14 Erklärungen

### Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluss der Tumorsuppressorproteine PML, RASSF6 und NLRP12 auf die Hepatokarzinogenese“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Natalie Vogel befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Name des Betreuers

Unterschrift

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Natalie Vogel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Natalie Vogel