

Emely Cathrin Dreher
Dr. med.

Genomweiter *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* Screen zur Identifizierung essentieller Gene in der hypoxischen Umgebung des hepatozellulären Karzinoms

Fach/Einrichtung: Pathologie
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat Stephanie Rössler

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache und zählt trotz Entwicklungsfortschritten neuer Systemtherapien weiterhin zu den Tumoren mit einer sehr schlechten Prognose. Klinisch auffällig wird die Erkrankung meistens erst in einem fortgeschrittenen Stadium, in welchem bereits aufgrund des schnellen Tumorzellwachstums und folglich mangelnder Blutversorgung, der Tumor die Bildung einer hypoxischen Mikroumgebung sowie zelluläre adaptive Mechanismen stimuliert. Mit einem reduzierten Sauerstofflevel im Tumorgewebe wird der Transkriptionsfaktor *Hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 α induziert, der zur Zellproliferation, Metastasierung und zu Resistenzen gegen Chemotherapeutika führt. Über die einzelnen, essentiellen Gene für das Zellüberleben im HCC unter gleichzeitig hypoxischen Sauerstoffbedingungen ist bisher wenig bekannt. Daher konzentrierte sich diese Arbeit auf die Identifizierung essentieller Gene für das Zellüberleben insbesondere unter Hypoxie im HCC.

Zur Identifizierung dieser Gene wurde ein genomweiter *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas9 Knockout Screen in zwei unabhängigen HCC Zelllinien durchgeführt. Für die Funktionalität des Gen-Editierungskomplexes wurden vorab verschiedene Prozesse zur Präzision und Effizienz einzeln geprüft. Hierzu konnte im ersten Schritt gezeigt werden, dass die Proteinexpression der Endonuklease Cas9 nicht zwingend Aussagen über deren Aktivität ergab. Trotz unterschiedlicher Cas9 Proteinexpression in den beiden Zelllinien konnten anhand durchflusszytometrischer Messungen des *Green fluorescent protein* (GFP) Expressionsnachweises sowie Viabilitätsmessungen nach dem Knockout essentieller Gene für das Zellüberleben, die Funktionalität der Cas9 nachgewiesen werden. Weitere Prozessüberprüfungen wie die Titerbestimmung, genomische DNA Isolation oder Polymerase-Kettenreaktion Amplifikation bestärkten die Notwendigkeit, die einzelnen Schritte im Voraus zu testen und nach den gleichen Bedingungen wie im eigentlichen Screen durchzuführen.

Zur Induktion des Signalwegs HIF-1 α wurde sich im Rahmen dieser Arbeit für die Simulation der Hypoxie mithilfe von Dimethyloxalylglycine (DMOG) entschieden. Nach der Bestimmung der erforderlichen Konzentration anhand der Western Blot Analyse konnte anschließend der

Behandlungszeitraum anhand der Polymerase-Kettenreaktion Analyse festgelegt werden. DMOG behandelte Zellen aktivierten den HIF Signalweg über eine Dauer von bis zu drei Tagen, was zur Hochregulierung von Zielgenen führte, die für die Metastasierung, Apoptose und das Tumorwachstum relevant sind. Die kontinuierliche Behandlung mit DMOG ermöglichte die Durchführung eines CRISPR/Cas9 Knockout Screens unter Hypoxie ähnlichen Bedingungen. Im Anschluss an die Qualitätskontrollen, Filterung signifikanter Gene und Identifizierung der stärksten essentiellen Gene des *Next-Generation Sequencing* Datensatzes folgten erste Funktionstest zur Relevanz der ausgewählten Gene in einer hypoxischen Umgebung. Es stellte sich heraus, dass hepatozelluläre Karzinomzellen unter DMOG Behandlung eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Knockdown der *Citratsynthase (CS)* zeigten, welches somit als essentielles Gen unter Normoxie einzuordnen war. Gleiches konnte nach dem Knockdown von *Peroxisome biogenesis factor 10 (PEX10)* beobachtet werden, was allerdings nicht den zu erwartenden Ergebnissen entsprach. Hingegen konnten die Gene *Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)* und *Death domain associated protein (DAXX)* nach den Analysen der Koloniebildung als besonders essentiell unter Hypoxie im HCC identifiziert und bestätigt werden.

In dieser Arbeit wurden essentielle Gene identifiziert, die in Zelllinien des Leberzellkarzinoms entweder von einer unterschiedlichen Sauerstoffversorgung abhängig oder unabhängig sind. Mithilfe dieser Gene wurden potenzielle Angriffspunkte für die Behandlung von Leberkrebs gefunden, die zu einer besseren Prognose führen könnten.