

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Harnblasenkarzinom	2
1.1.1	Epidemiologie, Symptome, Risikofaktoren und Pathogenese des Harnblasenkarzinoms	2
1.1.2	Klassifizierung des Harnblasenkarzinoms	3
1.1.3	Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	5
1.1.4	RNA-basierte Tumormarker des Harnblasenkarzinoms	5
1.1.5	Transkriptomanalysen	7
1.2	S100A6 (S100 Calcium-bindendes Protein A6)	7
1.3	TRAM1 (Translocation associated membrane protein 1)	9
1.4	Zirkuläre RNAs	12
1.4.1	Die Entdeckung von zirkulären RNAs	12
1.4.2	Die Entstehung zirkulärer RNAs	13
1.4.3	Vorkommen und Eigenschaften von zirkulären RNAs	15
1.4.4	Funktionen zirkulärer RNAs	16
1.4.4.1	Regulation der Transkription und des Spleißens	16
1.4.4.2	Funktion als miRNA-Sponge	17
1.4.4.3	Bindung von RBPs	17
1.4.4.4	Translation von zirkulären RNAs	17
1.4.5	Zirkuläre RNAs in Krebserkrankungen	18
1.4.6	Zirkuläre RNAs im Harnblasenkarzinom	19
1.4.7	Klinische Anwendungen von zirkulären RNAs	21

1.4.7.1	Zirkuläre RNAs als potentielle Biomarker	21
1.4.7.2	Zirkuläre RNAs als potentielle therapeutische Ziele und Vektoren	21
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	22
2	Material	25
2.1	Geräte	26
2.2	Verbrauchsmaterialien	29
2.3	Chemikalien	30
2.4	Puffer und Lösungen	33
2.5	Zellkultur	35
2.5.1	Zellkulturmedien und -zusätze	35
2.5.2	Humane Zelllinien	36
2.6	Bakterienkultur	36
2.6.1	Bakterienkulturmedien	36
2.6.2	Bakterienstämme	37
2.7	Enzyme	37
2.8	Antikörper	38
2.9	Kits	38
2.10	Größenstandards	39
2.11	Nukleinsäuren	40
2.11.1	Primerpaare	40
2.11.2	Antisense-Oligonukleotide	40
2.12	Programme	40
3	Methoden	47
3.1	<i>In silico</i> Analysen von Transkripten und Anwendungen	47
3.1.1	<i>In silico</i> Analysen von linearen Transkripten	47
3.1.2	<i>In silico</i> Analysen von zirkulären Transkripten	48
3.1.2.1	Analyse zirkulärer Transkripte eines Genlokus	48
3.1.2.2	Analyse RNA-bindender Proteine mit vorhergesagten Bindungsstellen in zirkulären Transkripten	48
3.1.2.3	Analyse flankierender Intron-Sequenzen von zirkulären Transkripten	48
3.1.3	Entwicklung von Primerpaaren	49
3.1.4	Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden	50

3.1.4.1	Faltung von Transkripten	51
3.1.4.2	Entwurf von Antisense-Oligonukleotiden	51
3.1.4.3	Modifikationen von Antisense-Oligonukleotiden	51
3.1.5	Analyse von miRNA-Bindungsstellen in Transkripten	52
3.2	Zellbiologische Methoden	53
3.2.1	Kultivierung und Passagieren von Zelllinien	53
3.2.2	Kryokonservierung von Zelllinien	54
3.2.3	Transfektion von Zelllinien mit Antisense-Oligonukleotiden	54
3.2.4	Tamoxifen-Behandlung von ECV-304-Zellen	55
3.2.5	Zellernte	55
3.2.5.1	Zellernte für RNA-Isolation	55
3.2.5.2	Zellernte für DNA-Isolation	55
3.2.5.3	Zellernte für Western Blot Analysen	56
3.2.5.4	Zellernte für Western Blot Analysen nach alternativen Protokollen	56
3.2.5.5	Zellernte für Vitalitäts- und Apoptosemessung	57
3.2.6	Zellfraktionierung	58
3.2.7	Vitalitäts- und Apoptosemessung	58
3.3	Molekularbiologische Methoden	60
3.3.1	RNA-Isolation	60
3.3.1.1	RNA-Isolation aus Zelllinien	60
3.3.1.2	DNA-Hydrolyse	60
3.3.1.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	61
3.3.1.4	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	61
3.3.1.5	RNA-Isolation aus Urin	62
3.3.2	DNA-Isolation aus Zelllinien	62
3.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	63
3.3.4	Hybridisierung von Nukleinsäuren und RNase H-Spaltung	64
3.3.5	RNase R-Hydrolyse	65
3.3.6	Reverse Transkription	66
3.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	68

3.3.7.1	Konventionelle PCR mittels der Taq-Polymerase	68
3.3.7.2	Konventionelle PCR mittels der AmpliTaq-Polymerase	70
3.3.7.3	Quantitative PCR	71
3.3.8	Elektrophoretische Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren	75
3.3.8.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	75
3.3.8.2	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	77
3.3.9	Quantifizierung von Gelbanden	78
3.3.10	DNA-Isolation aus Agarosegelen	79
3.3.11	Klonierung von DNA-Fragmenten in kompetente Bakterienzellen	79
3.3.11.1	Ligation von DNA-Fragmenten	79
3.3.11.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen	80
3.3.11.3	Kolonie-PCR	80
3.3.11.4	Analytische Restriktionsverdauung von Plasmid-DNA	81
3.3.11.5	Herstellung von Glycerinkulturen zur Konservierung ausgewählter Bakterienstämme	81
3.3.12	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	81
3.3.12.1	Minipräparation	82
3.3.12.2	Kitlose Minipräparation	82
3.3.13	Sequenzierung von DNA	83
3.4	Biochemische Methoden	84
3.4.1	SDS-PAGE	84
3.4.2	Western Blot	85
3.4.3	Immunodetektion mittels Antikörpern	86
4	Ergebnisse	89
4.1	Auswahl von Markerkandidaten für das Harnblasenkarzinom	89
4.1.1	Vorarbeiten	89
4.1.2	Kriterien für die Auswahl von Markerkandidaten	90
4.1.3	Ergebnisse der Transkriptomanalyse für S100A6	92

4.1.4	Ergebnisse der Transkriptomanalyse für TRAM1	93
4.2	Nachweis von TRAM1-Transkripten in Zelllinien	94
4.2.1	Lineare und zirkuläre Transkripte des TRAM1-Genlokus	94
4.2.2	PCR-basierter Nachweis von Transkripten des TRAM1-Genlokus	96
4.2.3	Klonierung und Sequenzierung von TRAM1-Amplifikaten	99
4.2.4	Nachweis von TRAM1-Transkripten auf RNA-Ebene	104
4.2.5	Nachweis von TRAM1-Transkripten mittels quantitativer PCR	108
4.2.5.1	Nachweis von TRAM1-Transkripten mittels konvergenten Primern	109
4.2.5.2	Nachweis von zirkulären TRAM1-Transkripten mittels divergenten Primern	111
4.2.5.3	Entwicklung neuer divergenter Primerpaare für den spezifischen Nachweis zirkulärer TRAM1-Transkripte	112
4.2.5.4	Etablierung von divergenten Primerpaaren für die Quantifizierung von zirkulären TRAM1-Transkripten	115
4.2.6	Entwurf von divergenten Primern gegen circTRAM1-58 und circTRAM1-59	120
4.2.7	Fazit zum Nachweis von linearen und zirkulären TRAM1-Transkripten in Zelllinien	120
4.3	Weitere experimentelle Nachweise zur Zirkularität von TRAM1-Transkripten	122
4.3.1	Analyse der flankierenden Intronsequenzen von vorhergesagten zirkulären TRAM1-Transkripten	122
4.3.2	Überprüfung der <i>tandem repeat</i> Hypothese für TRAM1-Transkripte	122
4.3.3	RNase R-Hydrolyse von TRAM1-Transkripten	124
4.3.4	Fazit zu den weiteren experimentellen Nachweisen zur Zirkularität von TRAM1-Transkripten	128

4.4	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse für Transkripte des S100A6-Genlokus	129
4.4.1	Darstellung und PCR-basierter Nachweis der Transkripte des S100A6-Genlokus	129
4.4.2	Klonierung und Sequenzierung von S100A6-Amplifikaten	132
4.4.3	Nachweis von S100A6-Transkripten mittels quantitativer PCR	136
4.4.4	Nachweis weiterer vorhergesagter zirkulärer Transkripte des S100A6-Genlokus	138
4.4.5	Überprüfung der Zirkularität von S100A6-Transkripten	139
4.4.5.1	Analyse der flankierenden Intronsequenzen von vorhergesagten zirkulären S100A6-Transkripten	139
4.4.5.2	Überprüfung der <i>tandem repeat</i> Hypothese für S100A6-Transkripte	140
4.4.5.3	RNase R-Hydrolyse von S100A6-Transkripten	142
4.4.6	Fazit zu vorhergesagten zirkulären S100A6-Transkripten	143
4.5	Differentielle Genexpressionsanalysen in Zelllinien und Urinproben	145
4.5.1	Differentielle Genexpressionsanalysen in Zelllinien	146
4.5.1.1	Differentielle Genexpressionsanalyse für lineare Transkripte	146
4.5.1.2	Differentielle Genexpressionsanalyse für zirkuläre Transkripte	148
4.5.2	Auswahl von Standardgenen für nachfolgende Expressionsstudien	149
4.5.3	Differentielle Genexpressionsanalysen in Urinproben	152
4.5.3.1	Auswahl von Transkripten für Genexpressionsanalysen in Urinproben	152
4.5.3.2	Differentielle Genexpressionsanalyse in <i>gepoolten</i> Urinproben der Transkriptomanalyse	153

4.5.3.3	Differentielle Genexpressionsanalyse in cDNA-Bibliotheken der Transkriptomanalyse	156
4.5.4	Fazit zu differentiellen Genexpressionsanalysen von S100A6- und TRAM1-Transkripten in Zelllinien und Urinproben	159
4.6	<i>In silico</i> Studien zu zirkulären TRAM1-Transkripten	160
4.6.1	Analyse von miRNA-Bindungsstellen in TRAM1-Transkripten	160
4.6.2	Analyse des circRNA-miRNA-mRNA-Netzwerkes von zirkulären TRAM1-Transkripten	161
4.6.3	Analyse RNA-bindender Proteine mit vorhergesagten Bindungsstellen in zirkulären TRAM1-Transkripten	162
4.7	Funktionelle Studien zu Transkripten des TRAM1-Genlokus	163
4.7.1	Nachweis des TRAM1-Proteins in Zelllinien	163
4.7.2	Analyse von Interaktionspartnern des TRAM1-Proteins	169
4.7.3	Lokalisation von TRAM1-Transkripten in der Zelle	170
4.7.4	Suppression von TRAM1-Transkripten in Zelllinien	171
4.7.4.1	Etablierungsarbeiten zur Suppression von TRAM1-Transkripten in Zellen	173
4.7.4.2	Suppression von TRAM1-Transkripten in RT-4	177
4.7.4.3	Suppression von zirkulären TRAM1-Transkripten in ECV-304	179
4.7.4.4	Funktionelle Studien zur Suppression von TRAM1-Transkripten in ECV-304	181
4.7.5	Fazit der funktionellen Studien zu Transkripten des TRAM1-Genlokus	189
5	Diskussion	193
5.1	Nachweis von zirkulären Transkripten	193
5.1.1	Vorgehen und Methoden zum Nachweis zirkulärer Transkripte	193

5.1.2	Unterscheidung von Artefakten und realen zirkulären Transkripten	196
5.1.3	Nachweis von zirkulären Transkripten per Transkriptomanalyse	200
5.2	TRAM1- und S100A6-Transkripte als potentielle Tumormarker für das Harnblasenkarzinom	203
5.3	Funktionelle Studien zu zirkulären TRAM1-Transkripten	206
5.3.1	Funktionen zirkulärer TRAM1-Transkripte	206
5.3.2	Zelluläre Lokalisation zirkulärer TRAM1-Transkripte	208
5.3.3	Funktionsanalyse durch Hemmung zirkulärer TRAM1-Transkripte	210
5.4	Zirkuläre Transkripte als potentielle Tumormarker und therapeutische Ziele und Vektoren für das Harnblasenkarzinom	213
Literaturverzeichnis		219