

Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der häufigsten Gründe für Krebs-assoziierte Todesfälle weltweit. Studien prognostizieren einen starken Anstieg der HCC Inzidenzen in den nächsten Jahren, was unter Anderem dem globalen Anstieg von Adipositas zugeschrieben werden kann. Es ist von dringendem Interesse die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Krankheit und ihrer Risikofaktoren zu entschlüsseln und damit den Weg für neue Therapien zu bereiten.

Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in dem *FTO* Gen sind besonders stark mit Adipositas assoziiert. Außerdem wurde gezeigt, dass FTO – eine RNA m⁶A Demethylase – sowie m⁶A Modifikationen in unterschiedlichen Krebsformen fehlreguliert sind. Die vorliegende Studie untersucht die Rolle von hepatischem FTO während der Entwicklung von HCC. Hierfür wurden dicke und dünne leberspezifische FTO Knockout Mäuse (FTO_{L-KO}) einem Diethylnitrosamin (DEN)-HCC Modell unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von hepatischer FTO Expression zu einer vermehrten HCC Entwicklung in schlanken Mäusen führt. Allerdings konnte zu diesem fortgeschrittenen Stadium des HCCs keine Veränderung in Zellproliferation oder Zelltod in den FTO-defizienten Mäusen festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass der schützende Effekt von hepatischem FTO früher, in der HCC Initiations-Phase liegt. Tatsächlich wurde eine dynamische Regulation von FTO bei akutem, DEN-induziertem Leberschaden festgestellt. In FTO_{L-KO} Mäusen wurde eine erhöhte Stabilität von CUL4A detektiert, wohingegen in Lebern von Kontroll-Mäusen eine Reduktion von CUL4A gefunden wurde. Desweiteren konnte mittels meRIP gezeigt werden, dass *Cul4a* mRNA ein *Downstream target* von FTO während akuter Leberschädigungen ist. CUL4A, ein *Scaffold* Protein für die CRL4 E3 Ubiquitin Ligase, reguliert wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellzyklus Progression und DNA Reparatur und ist in verschiedenen Krebsformen hochreguliert. Folglich deutet die vorliegende Studie darauf hin, dass bei akuter Leberschädigung FTO die *Cul4a* mRNA demethyliert, was zu einer reduzierten Stabilität und/oder Translation führt. Die reduzierten CUL4A Level führen höchstwahrscheinlich zu einer Reduktion der Zellzyklus Progression und zu einer erhöhten DNA Reparatur, was schlussendlich zu reduzierter Tumor Bildung führen könnte. Diese Erkenntnisse zeigen, dass FTO ein vielversprechendes Ziel-Gen in der HCC Therapie sein könnte.

Zusätzlich wurde eine neue Mauslinie entwickelt, welche ein Cre- und Dre-aktivierbares, selbstzerstörendes (s)Cas9 Protein in dem ROSA26 Locus exprimiert. Das Cre- und Dre-vermittelte Ausschneiden der loxP- beziehungsweise rox-flankierten

STOP Kassetten führt zur spezifischen Expression von CAS9 und tdTOMATO in Zellen, die Cre- und Dre-positiven sind. Die gRNAs gegen Cas9/tdTOMATO und gegen das Zielgen werden durch die Injektion eines AAVs *in vivo* zum Zielgewebe gebracht. Der AAV enthält neben den beiden U6 gRNA Kassetten zusätzlich ein Cre/Dre aktivierbares ZsGreen. Die Infektion mit dem AAV führt folglich zur Expression von ZsGreen sowie zu einem knockout von Cas9/tdTOMATO und dem Zielgen, was einen Farbwechsel der Zellen von rot zu grün induziert. Dieses neue Ampelsystem ermöglicht nicht nur die Visualisierung von erfolgreicher Gen-Veränderung, sondern sorgt zusätzlich für eine selbst-zerstörendes Cas9, was potenzielle Off-Target Effekte reduziert.

