Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung ..................................................................................................................... 1
   1.1 Das kolorektale Karzinom ....................................................................................... 1
   1.1.1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz ........................................................................ 3
   1.1.2 Familiäre adenomatöse Polypose ..................................................................... 5
   1.1.2.1 Adenomatöses Polyposis-coli Gen ................................................................. 7
   1.2 Keratin bilden Intermediärfilamente .................................................................... 7
   1.2.1 Keratin 23 ........................................................................................................ 10
   1.2.2 Keratin 23 in der Kolonkarzinogenese ............................................................... 12
   1.3 Die Apoptose ......................................................................................................... 14
   1.3.1 Die Caspasen ..................................................................................................... 15
   1.4 Signalwege der Zelle ............................................................................................. 16
   1.4.1 Der Tumornekrose-Faktor TNF-α und -Rezeptor ............................................. 16
   1.4.2 Der Transkriptionsfaktor NF-κB ...................................................................... 18
   1.4.3 Das Protoonkogen c-myc .................................................................................. 22
   1.4.4 Die Bcl-2 Familie .............................................................................................. 24
   1.4.4.1 Der anti-apoptotische Faktor Bcl-2 ................................................................. 26
   1.4.4.2 Der anti-apoptotische Faktor Bcl-xL .............................................................. 26
   1.4.4.3 Die Bcl-2 Mitglieder regulieren die Apoptose ................................................ 27
2. Ziel der Arbeit .............................................................................................................. 28
3. Methoden .................................................................................................................... 29
   3.1 Zellbiologische Methoden ..................................................................................... 29
   3.1.1 Die Adenomzelllinie LT97 ............................................................................... 29
   3.1.2 Herstellung des speziellen Nährmediums für die Adenomzellen LT97 29
   3.1.3 Mediumwechsel ............................................................................................... 31
3.1.4 Splitten der Adenomzellen LT97.................................................................31
3.1.5 Zellzählung..................................................................................................32
3.1.6 Transfektion der Adenomzellenlinie LT97 mittels eines lentiviralen shRNA Vektorsystems............................................................33
3.1.7 Apoptose-Assay: Caspase-Glo® 3/7 Assay.................................................35
3.2 Molekularbiologische Methoden .................................................................36
3.2.1 RNA Präparation mit der sauren Phenolmethode.................................36
3.2.2 Messung der RNA-Konzentration............................................................37
3.2.3 Herstellung eines Formaldehyd-Agarosegels für die RNA...................37
3.2.4 DNase-Verdau mit Turbo-DNase.............................................................39
3.2.5 Phenolchloroform-Extraktion .................................................................39
3.2.6 Natriumacetat-Ethanol-Fällung ...............................................................39
3.2.7 cDNA-Synthese.........................................................................................40
3.2.8 Quantitative Real Time–PCR .................................................................41
3.2.9 Herstellung eines Agarosegels zur DNA-Gelelektrophorese...............44
3.2.10 Globale Genexpressionsanalyse .............................................................45
3.2.10.1 Bioinformatische Auswertung der Array Daten.................................48
4. Ergebnisse ........................................................................................................50
4.1 Transduktion der Adenomzellen LT97 mit einem lentiviralen shRNA Vektorsystems zur Suppression der Keratin 23-Expression........50
4.2 RNA-Konzentrations- und Qualitätskontrolle .............................................51
4.3 quantitative Real Time-PCR ........................................................................52
4.3.1 Keratin 23 Expressionsuntersuchung......................................................52
4.3.2 Auswertung der DNA-Gelelektrophorese..............................................55
4.4 Identifikation von KRT23-Zielgenkandidaten mittels der RNA-Array-Technologie ........................................................................58
4.5 Aktivitätserhöhung der Caspasen-3 und -7 ..............................................60
5. Diskussion .................................................................62
   5.1 Keratin 23 abhängig regulierte Gene.................................62
   5.2 Keratin 23 reguliert die Expression von TNF-α .....................63
   5.3 Keratin 23-abhängige Regulation des Transkriptionsfaktors NF-κB .64
   5.4 Keratin 23 inhibiert die Apoptose über Bcl-2 und Bcl-\( \chi_L \) ..............66
   5.5 Keratin 23 hat eine proliferationsfördernde Wirkung über das Protoonkogen c-myc ..............................................................69
   5.6 Keratin 23 reguliert die Apoptose über die Caspasen-3 und -7 ..........70
   5.7 Funktion und Bedeutung von Keratin 23 in der Kolonkarzinogenese .71
   5.8 Bewertung der Ergebnisse und Perspektive für weitere Projekte ......74
6. Zusammenfassung ..................................................................76
7. Literaturverzeichnis .................................................................77
8. Anhang .............................................................................91
   8.1 Verwendete Materialien .......................................................91
   8.2 Ergebnisse der globalen Genexpressionsanalyse .........................99