

---

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie,  
Stoffwechsel und klinische Infektiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas M. Gress**

---

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

---

**Die Rolle von CUX1 bei Hypoxie von hepatischen Sternzellen -  
in vitro Untersuchungen an der human hepatischen Zelllinie  
LX-2**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Eva Mareike Gondro, geb. Becker, aus Bad Soden am Taunus  
Marburg, 2021**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 14.12.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr PD Dr. T. Wissniowski

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Mandić

# *Meiner Familie*

*„Iucundi acti labores.“*

(Cicero, *de finibus* 2,105)

## Zusammenfassung

Leberfibrose stellt die häufigste gemeinsame Endstrecke chronischer Lebererkrankungen dar. Die Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen der Leberfibrose soll die Forschungsgrundlage für noch nicht ausreichend entwickelte Therapiemöglichkeiten bieten. Diese Arbeit trägt zu einem besseren Verständnis der Funktion von CUX1 in hepatischen Sternzellen und Beteiligung an der Pathogenese einer Leberfibrose bei.

CUX1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zu den Homöobox-Proteinen gehört. Er ist für die Transkription von Genen verantwortlich, die eine Vielzahl von biologischen Prozessen in der Zelle steuern. Studien haben gezeigt, dass CUX1 zur Karzinogenese, unter anderem beim hepatozellulären Karzinom (HCC), beitragen kann. Im Nierenzellkarzinom unterdrückt CUX1 die Expression des HIF-1-hemmenden Faktors (FIH-1) und führt zu einem erhöhten Spiegel des Hypoxiemarkers HIF-1.

Hepatische Sternzellen können durch hypoxischen Stress aktiviert werden. Ihre Aktivierung gilt als Schlüsselereignis der Leberfibrose. Die Rolle von CUX1 in hepatischen Sternzellen ist bislang nicht bekannt. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Rolle von CUX1 in hepatischen Sternzellen, die unter hypoxischem Stress stehen und untersucht, ob dessen Suppression zu einer Veränderung des physiologischen Mechanismus führt. Als Hypoxiemodell dienen das etablierte Cobaltchloridmodell sowie die Hypoxiekammer. Durch Transfektion von siRNA gegen *CUX1* wird ein Knockdown erreicht. Die Expression von Hypoxiemarkergenen, Aktivierungsmarkergenen und Zellzyklusmarkergenen wird mittels qRT-PCR durchgeführt. Die qRT-PCR-Daten werden durch die Ergebnisse durchgeführter Western Blots ergänzt. Durch die Transfektion eines Plasmids, eine Promotorsequenz für *HIF1A* enthaltend, und gleichzeitiger *CUX1*-Suppression wird die Beziehung von CUX1 und HIF-1 näher untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass CUX1 die Aktivierung von hepatischen Sternzellen unter Hypoxie steuert. Als Repressor von *COL1A1*, dem für Kollagen-Typ-I codierenden Gen, kann ein *CUX1*-Knockdown zu einer vermehrten Bildung der Extrazellulärmatrix beitragen. Es kann zudem eine

indirekte Einflussnahme auf die Adaptation der Zellen auf Hypoxie durch Repression des HIF-1-hemmenden Faktors (FIH-1) analog zu den Ergebnissen beim Nierenzellkarzinom aufgezeigt werden. Eine *CUX1*-Suppression fördert die hypoxische Antwort der hepatischen Sternzellen. Eine direkte Beziehung von *CUX1* und HIF-1 kann nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird eine Regulation des Zellzyklus beobachtet. *CUX1* ist ein Repressor von *CDKN1A*, welches für den Transkriptionsfaktor p21 codiert.

*CUX1* spielt eine physiologische Rolle in der Homöostase der Sternzellruhe. Veränderungen der *CUX1*-Expression oder Funktion können zu Pathomechanismen in der Leber beitragen und sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

## Abstract

Liver fibrosis is the most common end stage of chronic liver diseases. This work contributes to a better understanding of the function of CUX1 in hepatic stellate cells and its involvement in the pathogenesis of liver fibrosis.

CUX1 is a transcription factor that belongs to the homeobox proteins. It is responsible for the transcription of genes that control a variety of processes. It can contribute to carcinogenesis, including hepatocellular carcinoma (HCC). In renal cell carcinoma CUX1 suppresses the factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) and leads to increased level of the hypoxia marker HIF-1.

This work focuses on the role of CUX1 in hepatic stellate cells under hypoxic stress and investigates whether its suppression leads to a change in the physiological process. The established cobalt chloride model and the hypoxia chamber were used as hypoxia models. A knockdown is achieved by transfection with siRNA against *CUX1*. The expression of hypoxia markers, activation markers and cell cycle markers was performed by qRT-PCR and by Western blot. The relationship between CUX1 and HIF-1 was further investigated by transfection with a plasmid containing a promoter sequence for *HIF1A* and simultaneous *CUX1*-suppression.

The results illustrate that CUX1 controls the activation of hepatic stellate cells under hypoxia. As a repressor of *COL1A1*, the gene encoding for collagen type 1, a *CUX1*-knockdown can contribute to an increased formation of the extracellular matrix. Furthermore, an indirect influence on the adaptation of cells to hypoxia by repression of the factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) was observed, thus supporting the previous findings observed in renal cell carcinoma. *CUX1*-suppression promotes the hypoxic response of hepatic stellate cells. Although, a direct relationship between CUX1 and HIF-1 could not be demonstrated. In addition *CUX1*-downregulation leads to an increase of *CDKN1A*-transcription.

CUX1 is physiologically relevant in the homeostasis of stellate cell dormancy. Changes in *CUX1*-expression or function may contribute to pathomechanisms in the liver and should be the subject of future research.

## Inhaltsverzeichnis

Tabellen- & Abbildungsverzeichnis .....	X
Abkürzungsverzeichnis .....	XII
1 Einleitung .....	1
1.1 Leberfibrose .....	1
1.2 Beitrag der Hypoxie zu Lebererkrankungen.....	9
1.3 Der Transkriptionsfaktor CUX1 .....	13
1.4 Fragestellung und Zielsetzung.....	16
2 Material & Methoden.....	17
2.1 Material .....	17
2.2 Methoden .....	25
3 Ergebnisse.....	48
3.1 Suppression von <i>CUX1</i> mittels Transfektion mit siRNA gegen <i>CUX1</i> -spezifische mRNA .....	48
3.2 Etablierung des CoCl <sub>2</sub> -Hypoxie-Modells .....	48
3.3 Ermittlung des Zeitintervalls der Inkubationszeit von LX-2 unter Hypoxie..	50
3.4 Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter hypoxischen Bedingungen mittels qRT-PCR .....	52
3.5 Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von <i>CUX1</i> mittels qRT-PCR .....	55
3.6 Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von <i>CUX1</i> und Hypoxie mittels qRT-PCR .....	57
3.7 Zusammenfassung der qRT-PCR Daten .....	61
3.8 Ergänzung der qRT-PCR Daten durch Western Blot .....	62
3.9 Messung der Aktivität von HIF-1-alpha mittels einer Luciferase- Reportergen-Analyse .....	70
3.10 FACS-Validierung der Proteinexpression von alpha-SMA .....	71

3.11 Morphologie der Zellen .....	73
4 Diskussion .....	75
4.1 Hypoxische Antwort der LX-2 Zellen.....	75
4.2. Rolle von CUX1 bei der Aktivierung hepatischer Sternzellen.....	83
4.3. Die Rolle von CUX1 bei der Zellzykluskontrolle .....	87
4.4. Fazit .....	89
5 Literaturverzeichnis.....	XIII
6 Anhang .....	XXV



## Tabellen- & Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Chemikalien & Substanzen.....	17
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 3	Verwendete Kits .....	19
Tabelle 4	Geräte & Dauermaterialien .....	20
Tabelle 5	Verwendete Medien.....	22
Tabelle 6	Verwendete Software .....	22
Tabelle 7	Verwendete siRNA -Zelltransfektion .....	23
Tabelle 8	Verwendete Primer – PCR Analyse.....	23
Tabelle 9	Verwendete Primärantikörper -Western Blot.....	23
Tabelle 10	Verwendete Sekundärantikörper-Western Blot.....	24
Tabelle 11	Verwendete Antikörper-FACS Analyse.....	24
Tabelle 12	Zellkultur-Zellkulturflaschen und Mengenrelationen verwendeter Chemikalien.....	26
Tabelle 13	Herstellung Transfektionsreagenz:5nM siRNA .....	28
Tabelle 14	Herstellung einer Kobaltchloridlösung bekannter Stoffmengenkonzentration .....	30
Tabelle 15	Beispiel für die Beimpfung der Zellen mit einer 200µM CoCl <sub>2</sub> Lösung.....	31
Tabelle 16	Beispiel für die Zusammensetzung des cDNA-Synthesemixes .....	33
Tabelle 17	Zyklus Thermocycler-cDNA Synthese .....	33
Tabelle 18	Zusammensetzung des Masterreaktionsmixes-PCR .....	34
Tabelle 19	Beispiel Pipettierschema PCR-Platte.....	35
Tabelle 20	Zyklus PCR-Thermocycler.....	36
Tabelle 21	Zusammensetzung HEPES-Puffer .....	38
Tabelle 22	Zusammensetzung 1% SDS-Hot Lysis Puffer .....	38
Tabelle 23	Zusammensetzung Elektrophoresemix.....	40
Tabelle 24	Zusammensetzung Elektrophoresemix Spezialfall Kollagen 1 .....	40
Tabelle 25	Zusammensetzung TBS-T Puffer .....	41
Tabelle 26	Zusammensetzung Transfektionskomplex Ko-Transfektion siRNA & DNA	45
Abbildung 1	Pathophysiologischer Zusammenhang von Entzündung und Fibrose.....	5
Abbildung 2	Phasen der Sternzellaktivierung .....	7
Abbildung 3	Matrix-und Zellveränderung bei hepatischer Fibrose .....	8
Abbildung 4	Vereinfachtes Schema Semi-Dry Blot-System.....	41

Abbildung 5 Luciferase-Reportergen-Analyse, schematischer Plasmidsequenzaufbau	43
Abbildung 6 qRT-PCR: Suppression von CUX1	48
Abbildung 7 qRT-PCR: Etablierung CoCl <sub>2</sub> -Modell	49
Abbildung 8 qRT-PCR: Etablierung CoCl <sub>2</sub> -Modell (2)	49
Abbildung 9 qRT-PCR: Zeitintervallermittlung der Inkubationszeit unter Hypoxie	50
Abbildung 10 qRT-PCR: Zeitintervallermittlung der Inkubationszeit unter Hypoxie (2)	51
Abbildung 11 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie - CoCl <sub>2</sub>	52
Abbildung 12 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie - CoCl <sub>2</sub>	53
Abbildung 13 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie - Hypoxiekammer	54
Abbildung 14 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie - Hypoxiekammer	55
Abbildung 15 qRT-PCR: sechs Stunden siCUX1	56
Abbildung 16 qRT-PCR: 24 Stunden siCUX1	57
Abbildung 17 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie – CoCl <sub>2</sub> + siCUX1	57
Abbildung 18 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie – CoCl <sub>2</sub> + siCUX1	58
Abbildung 19 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie – Hypoxiekammer + siCUX1	59
Abbildung 20 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie – Hypoxiekammer + siCUX1	60
Abbildung 21 Bestimmung des Proteinlevels von CUX1	62
Abbildung 22 Bestimmung des Proteinlevels von CUX1	63
Abbildung 23 Bestimmung des Proteinlevels von HIF-1-alpha	65
Abbildung 24 Bestimmung des Proteinlevels von HIF-1-alpha durch Western Blot	66
Abbildung 25 Bestimmung des Proteinlevels von Kollagen-Typ-I	67
Abbildung 26 Bestimmung des Proteinlevels von Kollagen-Typ-I	69
Abbildung 27 Luciferase-Assay nach Doppeltransfektion	70
Abbildung 28 Luciferase-Assay nach Doppeltransfektion	71
Abbildung 29 FACS Analyse alpha-SMA, sechs Stunden Inkubationsintervall	72
Abbildung 30 FACS Analyse alpha-SMA, 24 Stunden Inkubationsintervall	73
Abbildung 31 Morphologie der hepatischen Sternzelle: LX-2, Zellkultur	73
Abbildung 32 Morphologie der hepatischen Sternzelle	74
Abbildung 33 Morphologie der hepatischen Sternzelle	74

## Abkürzungsverzeichnis

ACTA2	Gen: Alpha-Actin-2
alpha-SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	CREB-Binding Protein
CDK	Cyclin Dependent Kinases
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN1B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B
CDP	CCAAT-Displacement-Protein
CLD	Cronic Liver Diseases
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COL1A1	alpha-1 Type- I-Collagen
CUTL1	Cut Like Protein 1
CUX1	Cut Like Homeobox 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FIH-1	Factor Inhibiting HIF-1
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1	Hypoxia Inducible Factor 1
HIF1AN	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha Inhibitor
HIF-1-alpha	Hypoxia Induced Factor-1-alpha
HRE	Hypoxia Responsive Elements
HSC	Hepatic Stellate Cells
HSZ	hepatische Sternzellen
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
LDS	Lithium Dodecyl Sulfat
MOPS	Morpholino-Propansulfonsäure
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
O <sub>2</sub>	Disauerstoff
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PHD	Prolyhydroxylase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RBP	Retinol Binding Protein
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1
TBS-T	TRIS Buffered Saline with Tween 20
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TNFalpha	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
WHO	World Health Organisation

# 1 Einleitung

## 1.1 Leberfibrose

Die Leber stellt das zentrale Stoffwechselorgan unseres Körpers dar und ist in fast alle metabolischen Funktionen des Körpers mit eingebunden. Angesichts dieser Komplexität ist es bis heute nicht möglich die Leberfunktion durch Technik oder Pharmazeutika zu ersetzen. Umso kritischer ist die Tatsache, dass Lebererkrankungen häufig sehr spät oder sogar erst postmortal diagnostiziert werden (Friedman 2003).

Der bindegewebige Umbau des Parenchyms, als Leberfibrose bezeichnet, ist die häufigste gemeinsame Endstrecke chronischer Lebererkrankungen (CLD) verschiedenster Ursachen (Friedman 2003). „Zwischen Leber und Milz, passt immer noch ein Pils“ ist eine im Volksmund gerne verwendete Redewendung. Alkoholbedingte Lebererkrankungen sind gerade in den westlichen Ländern von hoher Relevanz (Moon et al. 2019). Jedoch nimmt vor allem die Verfettung der Leber durch zunehmende Fehlernährung meist im Rahmen eines metabolischen Syndroms einen immer größer werdenden Stellenwert in der Genese von Lebererkrankungen ein (Baumeister et al. 2008; Moon et al. 2019). Ätiologisch nicht zu vernachlässigen sind Viruserkrankungen, toxische Schädigungen durch Medikamente, Autoimmunerkrankungen, sowie Stoffwechsel- und Erbkrankheiten (Campana und Iredale 2017). Die Progression der Leberfibrose ist ein kritischer Faktor bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. Eine fortgeschrittene Fibrose stellt die Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer Leberzirrhose und deren klinischen Komplikationen dar und prädisponiert diese Patienten für die Entstehung eines Leberzellkarzinoms (Bataller und Brenner 2005; Campana und Iredale 2017). Die Morbidität und Mortalität in Zusammenhang mit chronischen Lebererkrankungen bleibt weltweit eine Herausforderung und hat sowohl klinische, als auch gesundheitsökonomische Relevanz (Campana und Iredale 2017). Leider ist das therapeutische Repertoire noch stark eingeschränkt. Die Bereitstellung einer wirksamen antifibrotischen Therapie ist Gegenstand wissenschaftlicher Forschung und ein wichtiger klinischer Bedarf,

der noch nicht ausreichend gedeckt werden kann (Schuppan et al. 2018; Weiskirchen und Tacke 2016). Das bessere Verständnis der komplexen pathophysiologischen Mechanismen, die sich bei der Ausbildung einer Leberfibrose abspielen, tragen zu der Entwicklung von Therapieansätzen maßgeblich bei (Weiskirchen und Tacke 2016).

### **1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie chronischer Lebererkrankungen**

Die enorme Relevanz von chronischen Lebererkrankungen für den klinischen Alltag, aber auch für die Volkswirtschaft, wird häufig unterschätzt und erst ersichtlich, wenn die Zahlen genauer betrachtet werden.

Weltweit waren im Jahr 2017 1,5 Milliarden Menschen von einer chronischen Lebererkrankung betroffen. Jedes Jahr versterben global zwei Millionen Menschen an den Folgen einer Lebererkrankung (James et al. 2018; Moon et al. 2019). Deutschlandweit beträgt die Inzidenz einer Leberzirrhose 250 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Herold 2017). Dabei erkranken doppelt so viele Männer wie Frauen (Tapper und Parikh 2018). Laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes verstarben im Jahr 2017 15.872 Menschen in Deutschland an chronischen Lebererkrankungen. Damit zählen diese in der Mortalitätsstatistik zu den 20 häufigsten Todesursachen (Todesursachenstatistik 2017, Statistisches Bundesamt). Über die Hälfte der an Lebererkrankungen Verstorbenen in Deutschland weisen eine alkoholbedingte Ätiologie auf. Bereits aus dem Gesundheitsbericht für Deutschland von 1998 geht hervor, dass 80 Prozent der chronischen Lebererkrankungen auf einen Alkoholmissbrauch zurückzuführen sind. Schließlich hat jeder fünfte Erwachsene nachweislich eine durch Alkohol und Fehlernährung bedingte Fettleber, welche die Vorstufe zu einer chronischen Erkrankung darstellt (Baumeister et al. 2008).

Global betrachtet resultiert eine chronische Lebererkrankung meistens aus einer nicht-alkoholisch bedingten Fettlebererkrankung (NASH, 60%) als Folge eines metabolischen Syndroms. Ebenso zählen Hepatitis-B-Virusinfektionen (29%), Hepatitis-C-Virusinfektionen (9%) oder, vor allem in den westlichen

Ländern, alkoholbedingte Lebererkrankungen (2%) zu den Hauptauslösern (James et al. 2018; Moon et al. 2019).

Durch die geschilderten hohen Fallzahlen erklärt sich auch die Generierung eines sehr hohen volkswirtschaftlichen Schadens. Dieser belief sich im Jahr 2015 in Deutschland für Erkrankungen der Leber (ICD K70 -77) auf über eine Milliarde Euro (Krankheitskostenrechnung, statistisches Bundesamt).

### **1.1.2 Pathomechanismus: Leberfibrose**

Fibrose ist das Ergebnis einer Wundheilungsreaktion bei anhaltender Leberzellschädigung, an der eine Reihe von Zelltypen und Mediatoren zur Eindämmung der Organschädigung beteiligt sind. Obwohl selbst ein akuter Reiz die Mechanismen der Fibrogenese aktiviert, sind andauernde Signale im Rahmen einer chronischen Erkrankung erforderlich, damit sich eine signifikante Fibrose akkumulieren kann. Beispiele dieser andauernden Einflüsse können Infektionen, Medikamenteneinnahme, Stoffwechselstörungen oder ein Autoimmunangriff sein. Der langwierige Charakter des Fortschreitens der Leberfibrose ist, im Gegenteil zu dem schnellen Fortschreiten in Niere und Lunge, größtenteils der Regenerationsfähigkeit der Leber zuzuschreiben (Friedman 2008b). Unabhängig von der unterschiedlichen Ätiologie der chronischen Leberschädigung verläuft der dadurch ausgelöste pathophysiologische Prozess im Folgenden jedoch weitestgehend uniform (Tacke und Weiskirchen 2010). Die hepatische Fibrogenese spiegelt dabei komplizierte Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Leberzelltypen, Mediatoren und der Extrazellulärmatrix wider (Guo und Friedman 2007).

Die Initiation der Fibrogenese geht meist von den Hepatozyten aus (Neubauer et al. 1995). Diese stellen den Angriffspunkt der meisten hepatotoxischen Wirkstoffe dar (Higuchi et al. 1992). Allgemein löst jede chronische Störung der hepatischen Homöostase jedoch notwendige Stimuli zur Fibrogenese aus (Friedman 2008b). Die Leberfibrose ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von kontraktilen und fibrogenen Myofibroblasten, die eine Narbe erzeugen, welche die Verletzung einkapselt. Die primäre und am besten charakterisierte Quelle der Myofibroblasten sind die aktivierten hepatischen Sternzellen (HSZ;

eng. HSC). In der physiologisch gesunden Leber sind hepatische Sternzellen im Raum von Disse lokalisiert und der Hauptspeicherort von Vitamin A. Die Vitaminspeicherung erfolgt in zytoplasmatischen Lipidtröpfchen (Friedman 1996). Zudem spielen Sternzellen in der Leber eine Rolle bei der Sekretion von Zytokinen. So erfolgt die Modulation der Hepatozytenmasse durch die Ausschüttung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und des Hepatozytenwachstumsfaktors (HGF). Darüber hinaus beeinflussen sie die Regulation des Blutflusses durch die Expression der Marker der glatten Muskulatur Vimentin und Desmin (Friedman 1999). Sie gehören zur nicht-parenchymatösen Zellpopulation in der Leber und weisen in ihrer Morphologie sternförmige Ausläufer auf (Friedman 2008a). Die Aktivierung von hepatischen Sternzellen, d.h. der Übergang von ruhenden Zellen in proliferative, fibrogene und kontraktile Myofibroblasten, ist das Schlüsselereignis in der Pathogenese der Leberfibrose (Friedman 2000).

Bei einer Gewebeschädigung der Leber mit Zelluntergang kommt es initial, neben einer Myofibroblastenaktivierung, immer auch zu einer begleitenden Entzündungsreaktion, die wiederum zur Unterhaltung der Sternzellaktivierung beiträgt (siehe Abbildung 1). Im Sinne einer primären Wundheilungsreaktion werden durch eine Gewebeverletzung Thrombozyten durch Kontakt mit extrazellulären Matrixkomponenten aktiviert und neutrophile Granulozyten rekrutiert. Die Sternzellaktivierung führt zur Ausschüttung von Zytokinen mit Rekrutierung von weiteren Immunzellen aus dem Blut, wie T-Lymphozyten und Monozyten. Diese primäre Immuninfiltration führt zu einer akuten Entzündungsreaktion. Bei Persistenz des schädigenden Reizes kommt es nicht zur Restitution des Gewebes. Es entsteht eine chronische Entzündungsreaktion mit weiterer Schädigung des Parenchyms und anhaltender Freisetzung fibrogener Stimuli aus geschädigten Zellen und aus den Immunzellen selbst (Heymann et al. 2009).

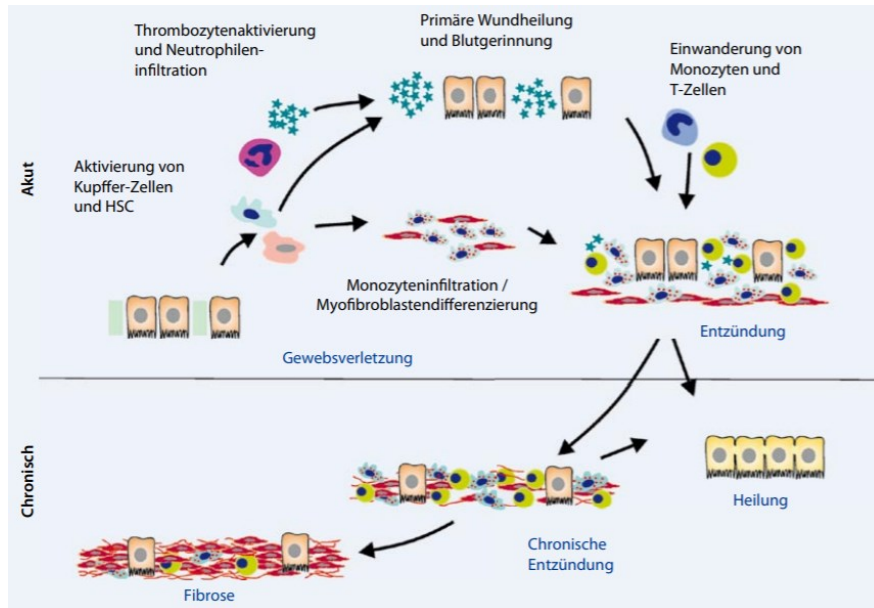


Abbildung 1 Pathophysiologischer Zusammenhang von Entzündung und Fibrose (Tacke und Weiskirchen 2010)

Es wurden viele extrazelluläre Faktoren identifiziert, welche die Sternzellaktivierung antreiben, jedoch sind geschädigte Hepatozyten und aktivierte Kupferzellen die primären Effektoren (Mormone et al. 2011). Die intensive Forschung der letzten Jahre hat ein komplexes System der Regulation der Sternzellaktivierung nachweisen können. Zu den fibrogenen Mediatoren gehören neben apoptotischen Körpern, Lipoperoxiden und Zytokinen, die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Oxidativer Stress entsteht durch die Produktion von Oxidationsmitteln wie beispielsweise Superoxid-Anionenradikalen ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Hydroxyradikalen (OH). Quellen können geschädigte Mitochondrien, aktivierte Entzündungszellen oder Produkte des Cytochrom P450 Komplexes sein. Auch Hypoxie, ein früher fibrogener Stimulus, führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Störung der mitochondrialen Funktion. Diese akkumulierenden ROS überschreiten mit der Zeit die antioxidative Kapazität der Leber. Durch Schädigung von Lipiden, Proteinen und DNA induziert deren Reaktion die weitere Zellschädigung und Apoptose von Hepatozyten (Guo und Friedman 2007; Hernandez-Gea und Friedman 2011). Aber auch andere Mediatoren, wie beispielsweise intermediäre Metabolite von Drogen oder aus dem Alkoholmetabolismus sowie Hepatotoxine führen zur direkten Aktivierung der Sternzellen (Mormone et al.



2011). Ebenso führen fibrogene Stimuli zur Aktivierung der spezifischen Makrophagen. Kupfferzellen setzen wiederum eine breite Palette löslicher Botenstoffe frei, die vielfältige und entscheidende parakrine Wirkungen auf alle andere Leberzellen haben (Nieto 2006). Sie sind eine Hauptquelle von TGF $\beta$  (*'Transforming Growth Factor beta'*) und PDGF (*'Platelet Derived Growth Factor'*). Im Rahmen der Leberfibrose wirkt TGF $\beta$  als potenter Wachstumshemmer und induziert die Hepatozytenapoptose. Des Weiteren stimuliert er die Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen in Myofibroblasten und steigert die Matrixsynthese durch diese enorm (Gressner und Weiskirchen 2006). Auch PDGF fördert die Kollagenbildung durch Proliferationssteigerung der aktivierten hepatischen Sternzellen (Borkham-Kamphorst et al. 2007).

Die Sternzellaktivierung kann konzeptionell in zwei Phasen, Initiation und Perpetuation, unterteilt werden. Die Initiation, auch als präinflammatorisches Stadium bekannt, bezieht sich auf frühe Veränderungen in Genexpression und Phänotyp. Es ist das Ergebnis von primär parakriner Stimulation durch geschädigte parenchymale Zellen und aktivierten Kupfferzellen, wie oben beschrieben. Bei Aufrechterhaltung dieser Reize gehen die Zellen in die sogenannte Perpetuierungsphase über. Dabei beinhaltet die Aufrechterhaltung der Aktivierung von Sternzellen phänotypische Schlüsselreaktionen, die durch parakrine und vor allem autokrine Stimuli vermittelt werden. Abbildung 2 zeigt typische Reaktionen auf eine fortbestehende Leberschädigung, welche hauptsächlich Proliferation, Kontraktilitätssteigerung, Fibrogenese, Retinoidverlust, Chemotaxis und Rekrutierung von weiteren Immunzellen inkludiert (Friedman 1999; Friedman 2000).

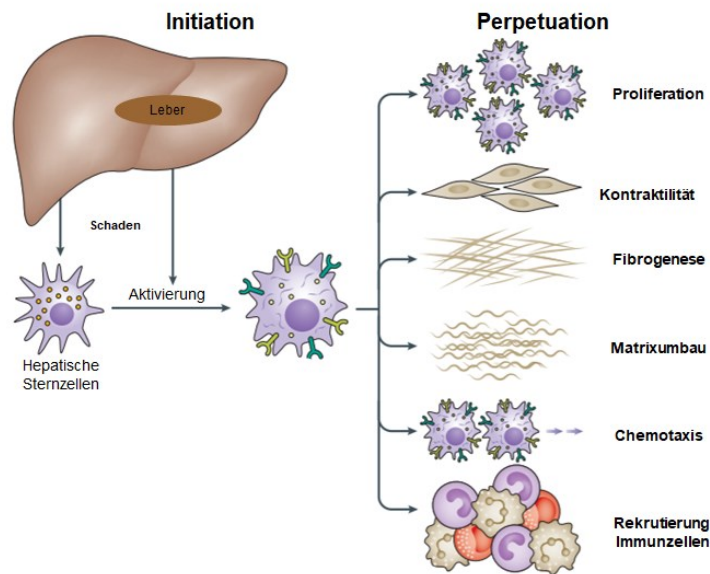


Abbildung 2 Phasen der Sternzellaktivierung (modifiziert nach Tsuchida und Friedman 2017)

Die aktivierten myofibroblastischen Sternzellen kennzeichnen sich gegenüber ruhenden Zellen durch erhöhte Expression von alpha-SMA (*'alpha Smooth Muscle Actin'*). Myofibroblasten sind mit alpha-SMA ausgestattet, weshalb man eine erhöhte Expression des Aktins als Aktivierungsmarker für transdifferenzierte Sternzellen in fibrogene Myofibroblasten heranziehen kann (Hellerbrand et al. 1999; Ramadori et al. 1990; Friedman 2000).

Die Qualität, Quantität und Verteilung von Extrazellulärmatrixkomponenten in der Leber durchlaufen während der Fibrogenese dramatische Veränderungen (Schuppan et al. 2001). Die zirrhotische Leber kann bis zu sechsmal mehr Gesamtgehalt an Kollagen und Proteoglykan als die gesunde Leber enthalten (Rojkind et al. 1979). Die Extrazellulärmatrix ist ein hochdynamisches Milieu, das einem ständigen Umbau unterliegt, wobei die Synthese neuer Komponenten bei gleichzeitigem Abbau stattfindet. Es entstehen pathologische Zustände, wenn die Remodellierung übermäßig oder unkontrolliert durchgeführt wird (Mormone et al. 2011). Leberfibrose tritt als Folge von Dysregulation im Matrix Auf- und Abbau zusätzlich zu einer erhöhten Matrixsynthese auf (Arthur 2000). Diese quantitativen und qualitativen Änderungen in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix resultieren in einer sogenannten „Kapillarisation der Sinuskurve“. Dies bedeutet den Verlust der endothelialen

Fenestrierung und hepatozytärer Mikrovilli sowie Veränderungen in der mikrovaskulären Gefäßstruktur. Diese Veränderungen schaffen eine funktionelle und physikalische Behinderung des bidirektionalen Plasmaflusses zwischen sinusförmigen Lumen und Hepatozyten, was zu einer Organdysfunktion führt (Hernandez-Gea und Friedman 2011; Friedman 2000). Abbildung 3 verdeutlicht nochmals die zellulären Veränderungen und Umgestaltung der Extrazellulärmatrix, die zu einer Organdysfunktion beitragen.

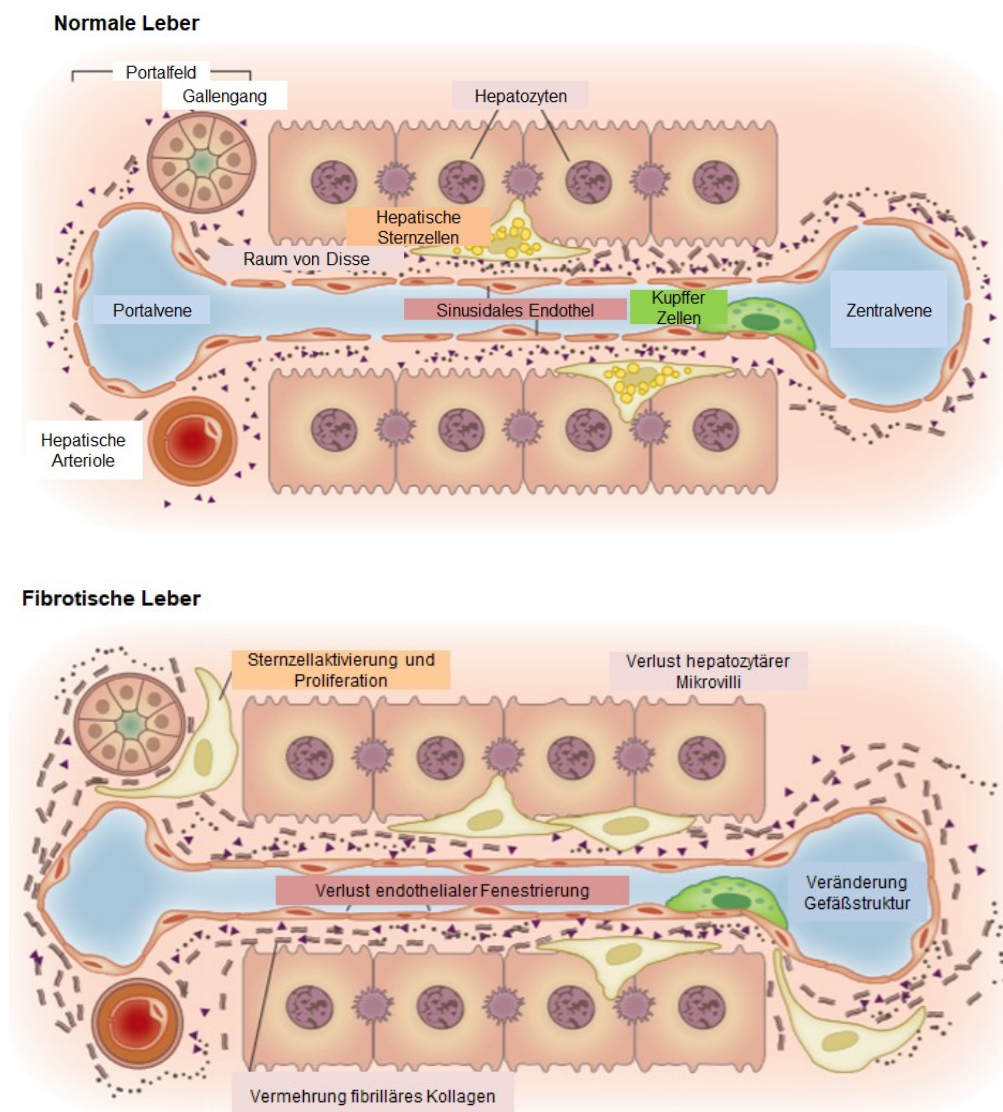


Abbildung 3 Matrix- und Zellveränderung bei hepatischer Fibrose (modifiziert nach Hernandez-Gea und Friedman 2011)

### Regressionsmechanismen der Leberfibrose:

Die Leber mit ihrer einzigartigen regenerativen Kapazität verfügt über die bemerkenswerte Fähigkeit Narben zu resorbieren (Friedman 2012). Eine Leberfibrose kann nach erfolgreicher Behandlung einer chronischen Lebererkrankung spontan abklingen. Bei der Klärung des Schicksals aktivierter hepatischer Sternzellen nach Abklingen der Verletzung haben sich mindestens drei Mechanismen bestätigt: Apoptose, Seneszenz und Reversion. Aktivierte Sternzellen exprimieren Todesrezeptoren, wodurch eine Bindung von Liganden die Zellen in Apoptose überführt. Einige aktivierte Sternzellen entkommen dem programmierten Zelltod während der Regression der Leberfibrose. Sie kennzeichnen sich durch Herunterregulierung der Expression fibrogener Gene und den Erwerb eines, den ruhenden Sternzellen ähnelnden, Phänotyps. Ein Unterschied existiert jedoch durch das Ausbleiben der Expression ruheassoziiertes Gene. Diese revertierten oder inaktivierten Sternzellen verbleiben in einem Zustand mit erhöhter Fähigkeit zur Reaktivierung als Reaktion auf fibrogene Stimuli. Ein dritter Regressionsmechanismus stellt die Seneszenz, die Zellalterung, von aktivierten Sternzellen dar (Tsuchida und Friedman 2017). Zelluläre Seneszenz ist eine stabile Form des Zellzyklusstillstandes (Campisi und Di d'Adda Fagagna 2007). Der Tumorsuppressor p53 fördert die Seneszenz durch die Transaktivierung von Genen, welche die Proliferation hemmen, einschließlich des für den cyclinabhängigen Kinaseinhibitor p21 codierenden Gens (He et al. 2007).

## **1.2 Beitrag der Hypoxie zu Lebererkrankungen**

Sauerstoff übernimmt wichtige Funktionen in biochemisch relevanten Reaktionen sowie als Signalmolekül bei der Modulation der Genexpression. Besonders in der mitochondrialen Atmungskette dient es als endgültiger Elektronenakzeptor bei der Verbrennung von organischen Substraten wie Glucose, um Energie in Form von ATP zu gewinnen (Kietzmann et al. 2006). Hypoxie kann somit dazu führen, dass eine unzureichende Menge ATP gebildet und die Zelle mit Energie unterversorgt wird (Kietzmann und Görlach 2005). Die DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren können durch verschiedene

Reaktionen wie Phosphorylierung, Oxidation oder Sauerstoffanreicherung beeinflusst werden (Kietzmann et al. 2006). Als stark metabolisches Gewebe ist Sauerstoff als Elektronenakzeptor im Energiestoffwechsel für die Leber unentbehrlich. Er reguliert zudem die metabolische Zonierung (Jungermann und Kietzmann 2000). Somit können Defekte im Sauerstoffsystem vor allem in der Leber zur Ausbildung von Erkrankungen wie Fibrose und Karzinomen beitragen (Kietzmann et al. 2006; Shi et al. 2007).

Hypoxie ist ein kritischer und früher fibrogener Stimulus. Fibrose und Hypoxie verstärken sich gegenseitig bei persistierender, parenchymaler Verletzung. Zum einen entstehen hypoxische Zustände durch die pathologischen Veränderungen bei Leberschädigung, zum anderen trägt Hypoxie zur Fibrogenese und Angiogenese erheblich bei. Im Rahmen der Leberzellschädigung können Sauerstoffmangelzustände auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Zu diesen Mechanismen zählen die Verringerung der Porosität des Sinusendothels, intrahepatische Shuntbildung, Vasokonstriktion, Kompression und Thrombosen, sowie verstärkte metabolische Anforderungen mit erhöhtem Sauerstoffbedarf (Guo und Friedman 2007). Bei der nicht-alkoholisch bedingten Fettlebererkrankungen (NASH) kommt es durch vermehrte Lipideinlagerung im Zytosol mit einhergehender Volumenzunahme der Hepatozyten zu Verringerung des intrasinusidalen Volumens und einem verminderten Blutfluss. Zusammen mit einer bei Fettlebern beobachteten endothelialer Dysfunktion tragen diese Ursachen durch Mikrozirkulationsanomalien zu einer Sauerstoffunterversorgung der Hepatozyten bei (Anavi et al. 2017). In der Folge beeinträchtigt der Sauerstoffmangel die mitochondrielle Funktion und erzeugt oxidativen Stress, ein stark fibrogener Mediator (Guo und Friedman 2007).

Das Schlüsselereignis in der Pathogenese der Leberfibrose stellt die Aktivierung hepatischer Sternzellen zu fibrogenen Myofibroblasten dar (Friedman 2000). Hepatische Sternzellen werden nachweislich durch Hypoxie aktiviert (Shi et al. 2007; Ankoma-Sey et al. 2000). Hypoxie induzierte Expression des vaskulären Zellwachstumsfaktors VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), sowie Kollagen-Typ-I sind mit Angiogenese und Fibrogenese bei experimenteller Zirrhose assoziiert (Corpechot 2002). Sauerstoffmangel

führt zu einer gesteigerten Kollagen-Typ-I-Synthese, dem vorherrschenden fibrillären Kollagen in der fibrotischen Leber. Ebenso findet eine erhöhte Expression von HIF-1-alpha, einem zentralen Regulator der zellulären Reaktionen auf Hypoxämie, statt. Dies wiederum induziert die Angiogenese, unter anderem durch Steigerung von vaskulären Zellwachstumsfaktoren, wie VEGF (Corpechot 2002; Shi et al. 2007).

### **1.2.1 Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor (HIF-1)**

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der eine Adaptation des Organismus an Hypoxie ermöglichen kann. Er ist an einer Vielzahl wichtiger biologischer Prozesse beteiligt, zu denen auch die Regulation von Angiogenese, Erythropoese, Matrixmetabolismus, Glykolyse, vasomotorischer Tonuskontrolle, Zellüberleben und Zelltod gehören (Metzen und Ratcliffe 2004). HIF-1 besteht aus einer alpha-Untereinheit (Gen: *HIF1A*), die einer sauerstoffabhängigen Regulation unterliegt und einer konstitutiv im Zellkern vorhandenen beta-Untereinheit (Wang und Semenza 1993; Wenger 2002). Es wurden zwei primäre Mechanismen identifiziert, durch welche die HIF-1-alpha-Aktivität durch Sauerstoff reguliert wird (Lando 2002). Unter sauerstoffreichen Verhältnissen werden Prolylreste der alpha-Untereinheit von HIF-Prolylhydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Dadurch findet eine Erkennung durch das Produkt des von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Gens als Teil eines Protein-Ubiquitin-Ligase-Komplexes statt, wodurch die alpha-Untereinheit ubiquitiniert und zum proteosomalen Abbau bestimmt wird (Jaakkola et al. 2001; Maxwell et al. 1999). Ein zweiter Mechanismus, der zur Regulierung der HIF-Transkriptionskaskade beiträgt, stellt die Hydroxylierung von Asparaginresten durch den HIF-inhibierenden Faktor (FIH-1, '*Factor Inhibiting HIF*') dar. Hydroxylierte Asparaginreste verhindern eine Rekrutierung des Koaktivators p300/CBP und damit die Bildung des aktiven HIF-1-alpha-Transkriptionskomplexes. Unter Normoxie ist die HIF-Transkriptionskaskade somit inaktiviert (Lando 2002; Hewitson et al. 2002).

Unter hypoxischen Bedingungen bleibt die Hydroxylierung von Prolyl- und Asparaginresten jedoch aus. Die alpha-Untereinheit wird stabilisiert und entgeht

dem proteosomalen Abbau (Jaakkola et al. 2001; Lando 2002). Durch Stabilisierung wird diese in den Zellkern transloziert, wo sie mit der beta-Untereinheit dimerisiert und durch Rekrutierung weiterer Koaktivatoren einen aktiven Transkriptionskomplex bildet. Dieser Komplex reguliert, durch Bindung an die hypoxiesensitiven Elemente (HRE,) in Promotoren von zahlreichen Zielgenen, die Transkription vieler Gene, welche an der Anpassung an die hypoxischen Bedingungen beteiligt sind (Wenger 2002; Bracken et al. 2003). Prolylhydroxylasen und FIH-1 fungieren demnach als Sauerstoffsensoren in der Zelle und reagieren auf Schwankungen in der Sauerstoffversorgung (Metzen und Ratcliffe 2004). Es gibt zahlreiche Gene, an welchen der Transkriptionskomplex regulierend beteiligt ist. Unter anderem wird die Expression des Angiogeneseaktivators VEGFA (Gen: *VEGFA*) (Bracken et al. 2003; Forsythe et al. 1996) und des Glukosetransporters GLUT-1 (Gen: *SLC2A1*) (Benjamin L. Ebert et al. 1995) verstärkt. VEGFA stimuliert die Angiogenese, um das hypoxische Organ durch Neovaskularisation hinreichend mit Sauerstoff und Substraten zur Energiegewinnung versorgen zu können (Forsythe et al. 1996). Während der Aktivierung hepatischer Sternzellen im Rahmen der Fibrogenese wird VEGFA nachweislich hochreguliert und stimuliert zudem die Zellproliferation, Migration und Kollagenproduktion (Novo et al. 2007). Das für GLUT-1 wird im Rahmen einer HIF-1-vermittelten Anpassung des Energiestoffwechsels vermehrt exprimiert. Durch anaerobe Glykolyse, dem Abbau von Glukose in Pyruvat und anschließend zu Laktat, kann trotz Sauerstoffmangel die Energiegewinnung in Form von ATP aufrechterhalten werden. Dabei wird durch Einbau der Glukosetransporter in die Zellmembran die vermehrte Bereitstellung von Glukose gewährleistet (Chen et al. 2001). Zum anderen wird der aerobe Stoffwechsel HIF-1-vermittelt direkt unterdrückt. Der Eintritt von Pyruvat in den Tricarbonsäurezyklus zur aeroben Energiegewinnung wird durch Hemmung der Pyruvatdehydrogenase verhindert. Dadurch wird die Bildung hypoxisch reaktiver Sauerstoffradikale geschwächt und die Zelle vor der induzierten Apoptose geschützt (Kim et al. 2006; Brahimi-Horn et al. 2007).

### 1.3 Der Transkriptionsfaktor CUX1

Homöobox-Gene, bzw. HOX-Gene, kodieren für Transkriptionsfaktoren, die im Weiteren die Expression ganzer Genverbände regulieren. Diese wiederum tragen zur Determination der Zelle bei. Homöotische Gene weisen ein gemeinsames Charakteristikum auf. Eine Sequenz von 183 Basenpaaren, die Homöobox, kodiert für eine sogenannte Homöodomäne, welche die Bindung zur DNA vermittelt (Gehring 1987). Genetische Studien mit der Taufliege *Drosophila melanogaster* haben gezeigt, dass das Homöoboxprotein CUT eine wichtige Rolle bei der Zelltypbestimmung in verschiedenen Geweben spielt (Blochlinger et al. 1988). Orthologe Gene (*CUX1/CDP/CUTL1*) werden bei mehreren Metazoen, einschließlich dem Menschen, isoliert (Neufeld et al. 1992; Andres et al. 1994).

Der Transkriptionsfaktor CUX1 (*'Cut Like Homeobox 1'*) ist ein evolutionär hoch konserviertes Homöoboxprotein, das an der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt ist (zusammengefasst in Nepveu 2001; Sansregret und Nepveu 2008). Als Determinante der Zellentwicklung scheint CUX1 vermehrt in undifferenzierten, proliferierenden Zellen exprimiert zu werden. Die Expression von CUX1 wird im sich entwickelnden Embryo in multiplen Geweben hochreguliert, aber in späteren Entwicklungsstadien, die mit dem Austritt aus dem Zellzyklus und der terminalen Differenzierung zusammenfallen, herunterreguliert (Vanden Heuvel et al. 1996). Studien haben jedoch auch gezeigt, dass CUX1 in terminal differenzierten Zellen vieler Gewebe exprimiert wird, vor allem in transformierten Tumorzellen. Die Expression von CUX1 ist bei hochgradigen Karzinomen signifikant erhöht und korreliert beispielsweise umgekehrt mit der Überlebenszeit bei Brustkrebs. Dies legt nahe, dass CUX1 eine zentrale Rolle bei der Koordination eines Genexpressionsprogramms spielt, das mit Zellmotilität und Tumorprogression in Zusammenhang steht (Michl et al. 2005). Hingegen wird in einer älteren Studie CUX1 eine Rolle als möglicher Tumorsuppressor zugeschrieben (Zeng et al. 1999). *CUX1* selbst stellt ein Transkriptionsziel von TGF- $\beta$  dar, ein bekannter fibrogener Stimulus im Rahmen der Leberfibrose (Michl et al. 2005). Der Transkriptionsfaktor CUX1 besitzt charakteristischerweise bis zu vier DNA-Bindungsdomänen: eine



Homöodomäne aus 61 Aminosäuren und drei sogenannte 'Cut-Repeats', bei denen es sich um drei Regionen von je 73 Aminosäuren handelt (Blochlinger et al. 1988; Andres et al. 1994). Darüber hinaus trägt CUX1 auch eine autoinhibitorische Domäne (ID) an seinem N-Terminus (Truscott et al. 2004) und zwei aktive Repressionsdomänen (R1 und R2) an seinem C-Terminus (Mailly et al. 1996). Es wurden mehrere Isoformen von CUX1 ausgemacht. Die DNA-Bindungseigenschaft und transkriptionelle Aktivität werden durch die Kombination der in der Isoform vorhandenen DNA-Bindungsdomänen bestimmt. Während die Vollängen-Isoform p200 nur die Transkription unterdrückt, fungieren die kürzeren Isoformen p110, p90, p80 und p75 je nach Promotor als Transkriptionsrepressoren oder -aktivatoren (Sansregret und Nepveu 2008). CUX1 ist an mindestens drei intrazellulären Prozessen beteiligt, die in der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen: Zellproliferation, Zellmotilität und programmierter Zelltod.

#### 1. Zellproliferation:

Studien haben gezeigt, dass CUX1 nicht nur eine Rolle bei der zellulären Differenzierung spielt, sondern auch Einfluss auf die Zellzyklusprogression nimmt. CUX1 fungiert als Repressor bei der Zellzyklus-Regulation durch Unterdrückung des Cyclinkinaseinhibitors p21 beim Übergang von der G1-Phase (Wachstumsphase) zur S-Phase (Synthesephase) (Coqueret et al. 1998). Ebenso kann ein repressiver Einfluss von CUX1 auf p27 nachgewiesen werden (Ledford et al. 2002). Die Tumorsuppressorproteine p21 und p27 sind direkte Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen (CDK,) und führen bei Aktivierung zu einem Zellzyklusarrest mit folgenden Reparaturmechanismen, bzw. Überführung in den programmierten Zelltod, um die Vermehrung geschädigten Zellmaterials zu unterbinden. CDKs sind an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Werden diese nicht durch Tumorsuppressorproteine kontrolliert und bei Vorliegen einer Zellschädigung inhibiert, bewirkt dies ein unkontrolliertes Zellwachstum. Die geschädigte Zelle umgeht natürliche Schutz- und Reparaturmechanismen. Ein charakteristisches Merkmal der Karzinogenese (Abukhdeir und Park 2008).

CUX1 wird auch im Rahmen eines hepatozellulären Karzinoms eine onkogene Rolle zugeschrieben. Eine Stummschaltung von CUX1 in Leberkrebszellen führt unter hypoxischen Bedingungen zu einer stabilen Expression von p21. Demzufolge hemmt CUX1 die Transkription von p21 unter hypoxischem Stress im Rahmen der Leberschädigung und wirkt antiapoptotisch (Blümel et al. 2015).

## 2. Zellmotilität

Zellen, welche die p110 Isoform exprimieren, zeigen eine erhöhte Zellmigration und -invasion. Die Isoform p110 übernimmt funktionell eine Rolle sowohl bei der Aktivierung von Genen, welche die Zellmotilität fördern, als auch bei der Unterdrückung der Expression motilitätshemmender Gene (Kedinger et al. 2009; Michl et al. 2005).

## 3. Apoptose

CUX1 wird eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben. Studien an Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen, dass eine Depletion von CUX1 durch siRNA die TNFalpha-('Tumor Necrosis Factor alpha') und TRAIL-induzierte ('Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand') Apoptose erhöht, während eine Überexpression von CUX1 die Zellen vor der Apoptose bewahrt (Ripka et al. 2007). In hepatozellulären Karzinomen kann ebenfalls eine Apoptoseresistenz gegenüber TRAIL durch CUX1-Expression nachgewiesen werden (Hofmann et al. 2017).

### **1.3.1. Korrelation von CUX1 und HIF-1-alpha**

Sowohl CUX1, als auch HIF-1-alpha, sind bei verschiedenen Tumoren erhöht und für die metastatische Progression dieser verantwortlich (Michl et al. 2005). Eine mögliche Korrelation beider Faktoren kann durch Einflussnahme von CUX1 auf den HIF-inhibierenden Faktor (FIH-1) nachgewiesen werden. FIH-1 hemmt unter Normoxie die Aktivität von HIF-1-alpha (Lando 2002; Hewitson et al. 2002). Dennoch kann in Nierenzellkarzinomen eine signifikante Aktivitätssteigerung von HIF-1-alpha trotz idealer Sauerstoffversorgung aufgezeigt werden. Ursächlich dafür scheint der molekulare Mechanismus der

transkriptionellen Regulation von FIH-1 durch CUX1 zu sein. CUX1 weist eine Bindungsstelle für den Promoter des für FIH-1 codierenden Gens *HIF1AN* auf und fungiert im Zusammenspiel mit der Proteinkinase C als Repressor der Transkription des HIF-hemmenden Faktors (Li et al. 2007).

#### 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Eine ganze Reihe von pathologischen Zuständen wird mit Veränderung der CUX1-Expression oder Regulation in Verbindung gebracht. Ergebnisse einer früheren Studie lassen die Vermutung zu, dass CUX1 an der Aktivierung von hepatischen Sternzellen, dem Schlüsselereignis in der Pathogenese der Leberfibrose, beteiligt ist (Vanden Heuvel et al. 2005). Die Rolle von CUX1 in der Pathogenese der Leberfibrose ist jedoch bisher ungeklärt. Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf der Rolle von CUX1 in hepatischen Sternzellen unter hypoxischem Stress. Hypoxie spielt als fibrogener Mediator ebenfalls eine zentrale Rolle in der Fibrogenese. Eine Korrelation zwischen CUX1 und Hypoxie in Rahmen der Pathogenese der Leberfibrose ist bisher nicht untersucht und soll daher in dieser Arbeit verifiziert werden.

Dabei liegt das Interesse vor allem auf folgenden Fragestellungen:

- Gibt es eine Korrelation zwischen CUX1 und Hypoxie?
- Gibt es eine Modulation von HIF-1-alpha?
- Wie reagieren die hepatischen Sternzellen nach Suppression von *CUX1*, bzw. nach Suppression von *CUX1* in Kombination mit Hypoxie?

Als Grundlagenforschung soll mit dieser Arbeit eine Voraussetzung für künftige in-vivo Versuche geschaffen werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Substanzen

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien & Substanzen

Chemikalie/Substanz	Hersteller	Hauptsitz Hersteller
2-Mercaptoethanol 98+% (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma-Aldrich Corporation (MERCK KGaA)	St. Louis, Missouri, USA
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.		
Aquaresist, Wasserbad-Schutzmittel	VWR International LLC	Radnor, Pennsylvania, USA
Attractene Transfection Reagent 0,1ml	Qiagen N.V.	Venlo, Niederlande
Bromphenol Blue (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S)	Sigma-Aldrich Corporation (MERCK KGaA)	St. Louis, Missouri, USA
CryoSure – DMSO ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO)	WAK-Chemie Medical GmbH	Steinbach/Ts., Deutschland
Cobalt(II)chloride hexahydrate (CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Corporation (MERCK KGaA)	St. Louis, Missouri, USA
Complete™ Mini, Protease Inhibitor Cocktail	F. Hoffmann-La Roche AG	Basel, Schweiz
Dulbecco's PBS (1x) Puffer ohne Calcium und Magnesium	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare Lifescience)	Pasching, Oberösterreich
Elemin® NA, Desinfektion	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ethanol absolute >99,8% (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Sigma-Aldrich Corporation (MERCK KGaA)	St. Louis, Missouri, USA
Ethanol absolut (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), vergällt mit MEK (Methylethylketon, C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O)	Otto Fisher GmbH & Co. KG	Saarbrücken, Deutschland
Flow Cytometry Fixation Buffer (1x)	R&D Systems Inc. (Bio-Techne Corporation)	Minneapolis, Minnesota, USA
Flow Cytometry Permeabilization/ Wash Buffer 1 (1x)	R&D Systems Inc. (Bio-Techne Corporation)	Minneapolis, Minnesota, USA
Formaldehyde, wt37% sol. in water, stab. 5-10% Methanol (CH <sub>2</sub> O)	Acros Organics (Thermo Fisher Scientific Inc.)	New Jersey, USA
Gentamycin (10mg/ml)	Biochrome GmbH (MERCK KGaA)	Berlin, Deutschland
Gibco®, Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) (+) 4,5g/L D-Glucose (+) L-Glutamin (-) Pyruvate	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
Gibco®, Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) (+) 4,5g/L D-Glucose, (+) L-Glutamin (+) Pyruvate	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
Gibco®, FBS -Fetal Bovine Serum	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
Glycerol 99+% (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Corporation (MERCK KGaA)	St. Louis, Missouri, USA
HEPES Pufferan > 99,5% p.a. (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen N.V.	Venlo, Niederlande

MagicMark™ XP Western Standard	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Sigma-Aldrich Corporation (MERCK KGaA)	St. Louis, Missouri, USA
Natronlauge 2mol/L (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare Lifescience)	Pasching, Oberösterreich
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	F. Hoffmann-La Roche AG	Basel, Schweiz
ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker, 4.6 – 300kDa	Lonza Group AG	Basel, Schweiz
Red Alert (10X) Western Blot Stain	Merck Millipore (MERCK KGaA)	Billerica, Massachusetts, USA
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Salzsäure 2 mol/L (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure >99% (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Sodium Orthovanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Corporation (MERCK KGaA)	St. Louis, Missouri, USA
TBS 1x, pH 7,6; CHEMsolute®	Th.Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)amino- methanhydrochloride (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl)	MERCK KGaA	Darmstadt, Deutschland
Trypsin EDTA (1x) 0,05%/0,02% in PBS, ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Biochrome GmbH (MERCK KGaA)	Berlin, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Hauptsitz Hersteller
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-one International GmbH	Kremsmünster, Oberösterreich
15 ml-und 50 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
96 Well PCR Plate, Non-Skirted, Low- Profile	STARLAB International GmbH	Hamburg, Deutschland
96 Well Solid White Flat Bottom Polystyrene TC-Treated Microplates	Corning, Inc.	Corning, New York, USA
Amersham Protran Premium 0,2 µm NC, Nitrocellulose Blotting	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland

Membrane		
BD Microlance 3 19 G x 1 1/2", 1,1 mm x 40 mm	Becton, Dickinson & Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Biosphere Filter Tips 0,1-2,5 µl; 0,1-10µl; 0,1-20µl; 2-100µl; 2-200µl; 100-1000µl; 1250 extra long	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
CryoPure Gefäß 1,8 ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Extra thick blot paper/filter paper	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Feather Disposable Scalpel	FEATHER Safety Razor Co., Ltd.	Osaka, Japan
Filtropur S 0,2	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Fisherbrand Pasteurpipetten aus Glas mit offener Spitze	Fisher Scientific Co LLC (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Hampton, New Hampshire, USA
Kapillarspitzen 200µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark Worldwide Inc.	Koblenz, Deutschland
Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Microflex Xceed Powder-free Nitrile Examination Gloves	Fisher Scientific Co LLC (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Hampton, New Hampshire, USA
MidiTips Premium 10, 100, 200, 1000µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Millex-HA, 0,45µm	Merck Millipore (MERCK KGaA)	Billerica, Massachusetts, USA
Mikrotestplatte 96 Well, F mit Deckel	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Multiply-Pro Farbmix, 0,2ml Einzelgefäß	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
NuPage® 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 12 Well	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA
Parafilm M, Laboratory Film	American National Can Company	Manhattan, New York City, USA
SafeSeal Micro Tube, 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Tube, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
TC-Flaschen, Standard T25 (25cm <sup>2</sup> ), T75 (75cm <sup>2</sup> ), T175 (175cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 6 Well, Standard, F mit Deckel	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
X-Clear Advanced Polyolefin StarSeal	STARLAB international GmbH	Hamburg, Deutschland

## 2.1.3 Kits

Tabelle 3 Verwendete Kits

Kit	Inhalt	Hersteller	Hauptsitz Hersteller
GoTaq® qPCR Master Mix	CXR Reference Dye GoTaq® qPCR Master Mix Nuclease-free Water	Promega Corporation	Madison, WI, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	iScript™ Reverse Transcriptase iScript™ Reverse Transcription Reaction Mix Nuclease-free Water	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA

Luciferase Assay System	Luciferase Assay Buffer Luciferase Assay Substrate (lyophilized), E152A Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (5x)	Promega Corporation	Madison, WI, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Albumin Standard Ampules 2mg/ml; BCA Reagent A BCA Reagent B	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set	BSA Component 1 of 7 -125µg/ml BSA BSA Component 2 of 7 -250µg/ml BSA BSA Component 3 of 7 -500µg/ml BSA BSA Component 4 of 7 -750µg/ml BSA BSA Component 5 of 7 -1000µg/ml BSA BSA Component 6 of 7 -1500µg/ml BSA BSA Component 7 of 7 -2000µg/ml BSA	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
RNeasy Plus Mini Kit	Collection Tubes 1,5ml; 2ml gDNA Eliminator Mini Spin Columns; RNase-free water; RNeasy Mini Spin columnne; RPE Buffer; RTL Plus Buffer; RW1 Buffer	Qiagen N.V.	Venlo, Niederlande
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

## 2.1.4 Geräte und Dauermaterialien

Tabelle 4 Geräte & Dauermaterialien

Gerät/Material	Hersteller	Hauptsitz Hersteller
Absaugpumpe: Vario Air®	Drägerwerk AG & Co. KGaA	Lübeck, Deutschland
Attune™ Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Waltham, Massachusetts, USA
Autoklav: Systec VX-95	Systec GmbH	Linden, Deutschland
Becherglas 25ml, 50ml, 100ml, 150ml, 250ml	Duran Produktions GmbH & Co. KG	Mainz, Deutschland
Beckman GS-15R Zentrifuge	Beckman Coulter Corporation	Brea, USA
Biopak® Polisher	Merck Millipore (MERCK KGaA)	Billerica, Massachusetts, USA
C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Centrifuge 5430R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Combi Spin, FVL-2400N	Biosan Ltd.	Riga, Lettland

Emax Precision Microplate Reader S/N E10643	Molecular Devices, LLC	Sunnyvale, Kalifornien, USA
Eppendorf Reference Pipette 0,1-2,5µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Pipette 0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben, 250ml, Weithals	Duran Produktions GmbH & Co. KG	Mainz, Deutschland
Flex Cycler2	Analytik Jena AG	Jena, Deutschland
Freezers (-86°C), MDF-U7, V.I.P. Series	Sanyo Denki K.K.	Osaka, Japan
Fusion Chemilumineszenz Kamera C10-079	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C): Liebherr Comfort	Liebherr-International AG	Bulle, Schweiz
GloMax®-Multi Detection System	Promega Corporation	Fitchburg, WI, USA
Heraeus Labofuge 400R Function Line	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
	PZ HTL S.A.	Warszawa, Polen
Innova Co-48 Co2 Inkubator	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Eppendorf AG)	Edison, New Jersey, USA
Integra Pipetboy pro	Integra Biosciences AG	Zizers, Schweiz
Kohlendioxid, 50 l	Linde AG	Pullach, Deutschland
Kühlschrank (4°C): Liebherr	Liebherr-International AG	Bulle, Schweiz
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Manitowoc Flockeneisbereiter	Manitowoc Deutschland GmbH	Herborn, Deutschland
Messzylinder 10, 25, 50, 100, 500, 1000ml	ISOLAB Laborgeräte GmbH	Wertheim, Deutschland
Mikroskop DM-IL LED	Leica Microsystems CMS GmbH	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Nikon TMS	Nikon Metrology NV	Tokio, Japan
Mikroskop Nikon TMS-F	Nikon Metrology NV	Tokio, Japan
Nanodrop Lite Spectrophotometer	Fisher Scientific Co LLC (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Hampton, New Hampshire, USA
Neubauer improved	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter Accumet Basic	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Pipetierhilfe Accu-Jet Pro	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt, Deutschland
Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
QPod, Milli-Q	Merck Millipore (MERCK KGaA)	Billerica, Massachusetts, USA
Reinigungs-und Desinfektionsautomat Miele Professional G7883	Miele & Cie. KG	Gütersloh, Deutschland
Rolltaumelbrett CAT RM5	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH	Staufen, Deutschland
Rotationsrüttler	Köttermann GmbH & Co. KG	Uetze, Deutschland
Secuflow Tischabzug	Waldner Laboreinrichtung GmbH & Co. KG	Wangen, Deutschland
SNAP i.d. Protein Detection System	Merck Millipore (MERCK KGaA)	Billerica, Massachusetts, USA
SNAP i.d. Blot Holders	Merck Millipore (MERCK KGaA)	Billerica, Massachusetts, USA
Sonicator: Branson 12	Kobe KG	Marburg



Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschl.
Sterilwerkbank Herasafe (HS) 12	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Sterilwerkbank Telstar BIO-II-A	Azbil Telstar S.L.	Barcelona, Spanien
Stickstoffflasche 5.0	Linde AG	Pullach, Deutschland
Thermo Heraeus Biofuge Pico, Heraeus instruments	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Thermocell Cooling & Heating Block CHB-202	Bioer Technology Co., Ltd.	Hangzhou, China
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
VacuuHandControl VHC pro	Vaccubrand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Vortex Mixer neoLAB 7-2020	neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
Waage Kern ABS 80-4N	Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Waage Kern PLS 4200-2 F	Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Wärmeschrank Heracell	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Wasserbad Julabo TW20	Julabo GmbH	Seelbach, Deutschland
XCell SureLock Elektrophoresekammer	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Carlsbad, Kalifornien, USA

## 2.1.5 Medien

Tabelle 5 Vverwendete Medien

Medium	Zusammensetzung	
Wachstumsmedium für LX-2, 2% FBS in DMEM	500 ml 10 ml 5 ml	Dulbecco's Modified Eagle Medium Fetal Bovine Serum 10000 U/ml Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin
Einfriermedium für LX-2	5 ml 35 ml 10 ml	CryoSure DMSO Dulbecco's Modified Eagle Medium Fetal Bovine Serum

## 2.1.6 Software

Tabelle 6 Verwendete Software

Software	Hersteller	Hauptsitz Hersteller
Adobe Photoshop CC	Adobe Systems Inc.	San Jose, Kalifornien, USA
Attune® Cytometric Software Version 1.2.5	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.)	Waltham, Massachusetts, USA
Bio-1d advanced	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
Bio-Rad CFX Manager™ 2.0	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Fusion CAPt 15.15 für Windows	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
Leica LAS AF	Leica Microsystems CMS GmbH	Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Microsoft Paint	Microsoft Corporation	Redmond, USA
REST 2009 Relative Expression Software Tool V2.0.13	Qiagen N.V.	Venlo, Niederlande
SoftMax Pro 3.1.1	Molecular Devices, LLC	Sunnyvale, Kalifornien, USA

## 2.1.7 siRNA – Zelltransfektion

Tabelle 7 Verwendete siRNA -Zelltransfektion

Produktname	Katalognummer	Spezies	Hauptsitz Hersteller
AllStars Negative Control siRNA 20nmol	SI03650318	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
HS_CUTL1_7 FlexiTube siRNA 20nmol	SI04244009	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

## 2.1.8 Primer - PCR Analyse

Tabelle 8 Verwendete Primer – PCR Analyse

ACTA2	Hs_ACTA2_1_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT00088102	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
BETA-AKTIN	Hs_ACTB_1_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT00095431	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
CDKN1A		PrimePCR™ PreAmp for SYBR® Green Assay		Human	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
CDKN1B		PrimePCR™ PreAmp for SYBR® Green Assay		Human	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
COL1A1	Hs_COL1A1_1_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT00037793	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
CUTL-1	Hs_CUX1_1_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT00060592	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
FIH-1	Hs_HIF1AN_1_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT00077133	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT01192646	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
GLUT1	Hs_SLC2A1_1_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT00068957	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hif-1-alpha	Hs_HIF1A_1_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT00083664	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
VEGFA	Hs_VEGFA_6_SG	QuantiTect® Primer Assay	QT01682072	Human	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

Alle verwendeten Primer wurden vom Hersteller validiert.

## 2.1.9 Primärantikörper - Western Blot

Tabelle 9 Verwendete Primärantikörper -Western Blot

Antigen	Produktname	Katalognummer	Beschreibung	Verdünnung	Hauptsitz Hersteller
Alpha-SMA	Anti-alpha smooth muscle Aktin antibody [E184]	ab 32575	Kaninchen, monoclonal, IgG	1:1000	Abcam plc., Cambridge, UK
Beta-Aktin	Anti-β-Aktin, Clone AC-74	A2228	Maus, monoclonal, IgG	1:1000	Sigma-Aldrich Corporation, St.

					Louis, Missouri, USA
Collagen 1	Anti-Collagen 1 antibody	ab34710	Kaninchen, polyclonal, IgG	1:500	Abcam plc., Cambridge, UK
Collagen 1	Anti-Collagen 1 antibody [EPR7785]	ab138492	Kaninchen, monoclonal, IgG	1:500	Abcam plc., Cambridge, UK
CUTL1	Anti-CUTL1 antibody [2A10]	ab54583	Maus, monoclonal, IgG1	1:1000	Abcam plc., Cambridge, UK
GAPDH	Anti-GAPDH antibody- Loading Control	ab9485	Kaninchen, polyclonal, IgG	1:1000	Abcam plc., Cambridge, UK
HIF-1-alpha	Anti-HIF-1-alpha [H1alpha67]-CHIP Grade	ab1	Maus, monoclonal, IgG2b	1:1000	Abcam plc., Cambridge, UK

## 2.1.10 Sekundärantikörper-Western Blot

Tabelle 10 Verwendete Sekundärantikörper-Western Blot

Produktname	Katalognummer	Beschreibung	Verdünnung	Hauptsitz Hersteller
Anti-Mouse IgG (Fab specific) Peroxidase	A9917	Ziege; Spezifische Anti-Maus IgG Peroxidase	1:10 000	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase	A0545	Ziege; Spezifische Anti-Kaninchen IgG Peroxidase;	1:10 000	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA

## 2.1.11 Antikörper-FACS Analyse

Tabelle 11 Verwendete Antikörper-FACS Analyse

Antigen	Produktname	Beschreibung	Katalognummer	Konzentration	Hauptsitz Hersteller
$\alpha$ -Smooth Muscle Actin	Human $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Alexa Fluor® 488-conjugated Antibody	Monoclonal Mouse IgG2A Clone # 1A4	IC1420G	5 $\mu$ l/1mio. Zellen	R&D Systems Inc.; Minneapolis, Minnesota, USA
Unspezifischer Antikörper	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Polyclonal Mouse IgG	#A 11001	0,5 $\mu$ l/1mio. Zellen	Invitrogen AG (Thermo Fisher Scientific Inc.); Carlsbad, Kalifornien, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie LX-2**

Zur Klärung der Fragestellung wird von Dr. S.L. Friedman, Mount Sinai School of Medicine, New York, eine etablierte hepatische Sternzelllinie humanen Ursprungs zur Verfügung gestellt. Die Versuche in dieser Arbeit werden allesamt mit der Zelllinie LX-2 durchgeführt. Auf Grundlage seiner Arbeit zur Isolation hepatischer Sternzellen aus menschlichen Spenderorganen (Friedman et al. 1992) können für Forschungszwecke zwei immortalisierte Leberzelllinien, LX-1 und LX-2, etabliert werden. Dadurch werden die Probleme der Artenspezifität und Kulturvariabilität primär isolierter hepatischer Sternzellen unter Beibehaltung wichtiger Schlüsselmerkmale der natürlichen Genexpression überwunden und stabile Eigenschaften für optimale Versuchsbedingungen geschaffen. Die Zelllinie LX-2 charakterisiert sich durch spontane Immortalisierung einer Untergruppe von frühpassagierten LX-1-Zellen, die unter reduzierten Nährstoffbedingungen gezüchtet werden (Xu et al. 2005).

Für die folgende Arbeit werden Zellen der Zelllinie LX-2 kultiviert. Aus Gründen des Produkt-, Personen- und Umweltschutzes werden alle Arbeiten mit der Zellreihe in einem Labor der Sicherheitsstufe zwei unter sterilen Bedingungen bei Anwendung von stets sterilem, bzw. autoklaviertem Material an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank praktiziert. Die Zellen werden in belüfteten Zellkulturflaschen in einem Inkubator bei 37°C, fünfprozentigem CO<sub>2</sub>-Niveau und fünfundneunzigprozentiger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hierfür eingesetztes Dulbecco's Modified Eagle Medium wird zuvor mit zwei-prozentigem fetalen Kälberserum und einprozentigem Penicillin/Streptomycin (100IU/ml Penicillin/100µg/ml Streptomycin) entsprechend bekannter Vorgehensweise zur Kultivierung von LX-2 versetzt (Xu et al. 2005; Weiskirchen et al. 2013). Die Kontrolle des Zellwachstums erfolgt durch regelmäßige Lichtmikroskopie.

### 2.2.1.2 Subkultivierung

Bei achtzigprozentiger Konfluenz der adhärennten Zellen erfolgt die Passagierung, um eine ständige Proliferation zu gewährleisten. Vor jeglicher Arbeit mit der Zellkultur werden, sofern nicht anders erwähnt, benötigte Substanzen im Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Nach festem Schema werden die Zellen mit auf die Wachstumsfläche der Zellkulturflasche abgestimmten Substanzmengen behandelt (Tabelle 12). Zunächst wird das verbrauchte Medium abgesaugt, um anschließend die Zellen mit 1xPBS (ohne Magnesium und Kalzium) kurzzeitig zu waschen. Nachfolgend werden die adhärennten Zellen vom Flaschenboden mittels einer proteolytischen Reaktion durch Zugabe von Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS) und einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C gelöst. Eine Kontrolle der Reaktion wird mittels Lichtmikroskopie durchgeführt. Zeitnah erfolgt die Zugabe von zuvor auf Eis kalt gestelltem Vollmedium, welches mengenmäßig dem Dreifachen der vorher verwendeten Menge Trypsin entspricht, um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Nach Aufnahme der Zellen in ein Zentrifugenröhrchen wird die Zellsuspension für acht Minuten bei Raumtemperatur und 1000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der hierbei entstandene Zellpellet wird mit warmem Medium resuspendiert und verdünnt in neue Zellkulturflaschen überführt. Bei gleicher Flaschengröße erfolgt das Zellsplitting im Verhältnis 1:3, andernfalls 1:1 bei Anwendung einer nächstgrößeren Zellkulturflasche. Das Medium wird regelmäßig alle drei bis vier Tage gewechselt, sofern der pH-Indikator im Medium nicht schon früher durch Farbumschlag einen großen Nährstoffverbrauch anzeigt.

Größe der Zellkulturflasche	PBS	Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% in PBS	Medium für die „Stoppreaktion“	Medium in Zellkulturflaschen
T 25 (25cm <sup>2</sup> )	2ml	1ml	3ml	6ml
T 75 (75cm <sup>2</sup> )	4ml	2ml	6ml	12ml
T 175 (175cm <sup>2</sup> )	8ml	4ml	12ml	18ml

Tabelle 12 Zellkultur-Zellkulturflaschen und Mengenrelationen verwendeter Chemikalien

### **2.2.1.3 Zellzahlbestimmung:**

Zum Auszählen werden von den passagierten und mit Medium resuspendierten Zellen zehn Mikroliter Suspension in eine Neubauer Zellzählkammer überführt. Hierbei werden alle vier Quadranten der Zählkammer berücksichtigt und ein arithmetischer Mittelwert gebildet. Die Volumengröße eines Quadranten beträgt 0,1 Mikroliter ( $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} * 10^4$ ;  $\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl/ml} * \text{Volumen der Zellsuspension}$ ).

### **2.2.1.4 Kryokonservierung:**

Für Langzeitaufbewahrungszwecke werden die Zellen durch Einfrieren konserviert. Die Lagerung erfolgt in einem Tiefkühler bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zunächst werden die Zellen geerntet und ausgezählt. Zum Einfrieren der Zellen wird der gewonnene Zellpellet mit Einfriermedium resuspendiert, sodass in einem Milliliter Medium ca. eine Millionen Zellen in einem Kryoröhrchen suspendiert sind. Das Medium entspricht folgender Zusammensetzung aus 70% DMEM, 20% FCS und zehn Prozent Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO dient hierbei als Frostschutzmittel, um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern.

### **2.2.1.5 Auftauen von Zellen:**

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kryoröhrchen werden zum Auftauen zunächst im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zum Schmelzpunkt erwärmt. Zügig wird die aufgetaute Suspension in eine mit Medium vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Bei einer Millionen Zellen wird eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von  $75\text{cm}^2$  präferiert.

### **2.2.1.6 Suppression (Knockdown) von CUX1 mittels Transfektion mit siRNA gegen CUX1 spezifische mRNA**

Durch Einbringung von Mediatoren wie spezifischen kleinen RNA-Molekülen (siRNA) in die Zelle, kann der Abbau von Boten-RNA (mRNA) initiiert und die Expression des Gens unterdrückt werden. Dabei lagern sich die kleinen Ribonukleinsäureteilchen an die Boten-RNA an, wodurch diese ihre eigentliche Funktion verliert und die Synthese von Proteinen unterbunden wird. Dies stellt

ein potentes Werkzeug zur Untersuchung von Genen dar und soll auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommen, um die Rolle des Transkriptionsfaktors CUX1 in hepatischen Sternzellen erforschen zu können (Elbashir et al. 2001). Die Suppression von CUX1 wird mittels Transfektion von CUX1-mRNA spezifischer siRNA (Qiagen, Zielsequenz: 5'-AGAGATTGATGCACTGAGTAA-3'; Sinn-strang: 5'-AGAUUGAUGCACUGAGUAATT-3') unter Anwendung und Anpassung des Herstellerprotokolls von Qiagen „Fast-Forward Transfection of LX-2 cells with siRNA using HiPerfect Transfection Reagent“ durchgeführt. Die Negativkontrolle erfolgt unter Einsatz einer unspezifischen siRNA (Qiagen), welche keine Homologie zu menschlichen Transkripten aufzeigt. Das Transfektionsreagenz wird durch Pipettieren der in der Tabelle 13 benannten Substanzen in ein kleines Gefäß, anschließendem Vortexen und Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten hergestellt. Ausgangskonzentration der sowohl für die Suppression von CUX1, als auch für die Negativkontrolle angewendeten siRNA beträgt 20nmol/ml, welches einer 20 mikromolaren Lösung entspricht. Der Tabelle 13 sind bereits die für das entsprechende Volumen der Zellkulturgefäße benötigten Mengen siRNA zu entnehmen, die der im Protokoll geforderten fünf Nanomolar konzentrierten Lösung entsprechen.

<b>Beispielrechnung:</b> T25 Zellkulturflasche, 6ml Endvolumen, Endkonzentration siRNA 5nM		
→ 1µl siRNA (20nM, entsprechend 20nmol/ml) zu 6ml Medium => Verdünnung 1:6000		
→ 20nmol/ml / 6000 = 0,0033nmol/ml = 3,33nmol/L = 3,33nM		
→ Gefordert sind 5nM → 5/3,33 = 1,5; <b>1,5µl siRNA/T-25 Zellkulturflasche</b>		
	NTC (Allstars Negative Control)	CUX1
Well einer 6-Well Platte (2,3ml Endvolumen)	100µl Medium ohne FBS 0,57µl siRNA 12µl HiPerFect	100µl Medium ohne FBS 0,57µl siRNA 12µl HiPerFect
T25 Zellkulturflasche (6ml Endvolumen)	100µl Medium ohne FBS 1,5µl siRNA 12µl HiPerFect	100µl Medium ohne FBS 1,5µl siRNA 12µl HiPerFect
T75 Zellkulturflasche (12ml Endvolumen)	100µl Medium ohne FBS 3µl siRNA 12µl HiPerFect	100µl Medium ohne FBS 3µl siRNA 12µl HiPerFect

Tabelle 13 Herstellung Transfektionsreagenz:5nM siRNA

Es erfolgt das Ernten und Auszählen von Zellen. Im Anschluss wird der Zellpellet bekannter Zellzahl durch Zentrifugation (1000rpm, 4°C) gewonnen und die Zellen mit Medium und Transfektionsreagenz resuspendiert und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Suppression von CUX1 wird immer 48 Stunden

vor dem nachfolgenden Experiment durchgeführt. Der Erfolg der Transfektion und dadurch bewirkten Suppression von *CUX1* wird mittels Nachweises vermindert vorliegender *CUX1*-spezifischer mRNA in der qRT-PCR (siehe Seite 31) sowie Nachweises verminderter Proteinsynthese im Western Blot (siehe Seite 36) kontrolliert.

### **2.2.1.7 Etablierung des CoCl<sub>2</sub>-Hypoxie-Modells sowie korrelierend dazu das Hypoxiemodell in der Hypoxiekammer bei der Zelllinie LX-2**

Zunächst wird ein Modell für die verwendete Zellreihe basierend auf den hypoxieinduzierenden Eigenschaften von Kobalt(II)-chlorid etabliert. In einem zweiten Versuch soll der Effekt von unzureichender Sauerstoffzufuhr auf die Zellen mittels einer Hypoxiekammer untersucht werden.

Kobaltchlorid ist dafür bekannt, den Effekt von Sauerstoffmangel auf die Zelle nachahmen zu können. Dies wird bedingt durch die Eigenschaft, hypoxie-induzierbare-Faktoren, wie HIF-1-alpha, stabilisieren und die Zelle in einen, mit realem Sauerstoffmangel vergleichbaren, Zustand versetzen zu können (Muñoz-Sánchez und Chánez-Cárdenas 2018; Yuan et al. 2003; Wu und Yotnda 2011).

Die Versuche in der Hypoxiekammer konnten im molekularbiologischen Labor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Marburg (Leitung: PD Dr. Hänze) durchgeführt werden. Das Prinzip der Hypoxiekammer beruht auf der Tatsache, dass der hypoxische Effekt auf die Zellen durch ein reduziertes Sauerstoffangebot im Inkubator erreicht wird. In der Kammer werden den Zellen ein Gasgemisch mit fünfprozentigem CO<sub>2</sub>, zur Stabilisierung des pH-Werts der Zellen, sowie 0,5% Sauerstoff zur Verfügung gestellt. Der Rest des Gasgemisches besteht aus Stickstoff (Wu und Yotnda 2011).

#### **Kobalt(II)-chlorid:**

Zur Etablierung eines Versuchsmodells, bei dem die hypoxieinduzierenden Eigenschaften des Kobaltchlorids für die Erforschung der Fragestellung wirken, jedoch zu keiner toxischen und damit hemmenden Wirkung auf die Syntheseprozesse in der Zelle führen, wird die Wirkung verschiedener Konzentrationen des Kobaltchlorids auf die LX-2 Zellen getestet. Geprüft



werden Konzentrationen von 200 – 600 Mikromolar. Die Zellen sollen zunächst geerntet und abgezählt in neuen Zellkulturflaschen über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Im weiteren Verlauf wird zunächst eine Basislösung mit Kobaltchlorid nach dem in Tabelle 14 aufgeführten Schema hergestellt.

<p><b>Ausgangskonzentration:</b>  100mg/ml; 237,93g/mol Kobalt(II)chloride hexahydrate (Sigma-Aldrich GmbH)</p> <p>→ 237,93g = 1mol/l ; 237,93mg = 1mmol/ml</p> <p>→ 100mg = 0,4mmol/ml</p>
<p><b>Herstellung Lösung A:</b></p> <p>→ 100mg CoCl<sub>2</sub> in 1ml RNase freiem Wasser → 0,4mmol/ml</p> <p><b>= 400 000µM Lösung</b></p>
<p><b>Herstellung Lösung B:</b></p> <p>→ 10µl Lösung A &amp; 990µl Medium; 1:100 Verdünnung</p> <p><b>= 4000µM Lösung</b></p>

*Tabelle 14 Herstellung einer Kobaltchloridlösung bekannter Stoffmengenkonzentration*

Nach Herstellung der Basislösung B erfolgt das Entfernen des Mediums aus der Zellkulturflasche. Anschließend werden die Zellen mit Medium und Kobaltchloridbasislösung mengenmäßig entsprechend der vorher definierten Stoffmengenkonzentration beimpft und für festgelegte Zeitintervalle von sechs und 24 Stunden bei 37°C erneut inkubiert. Die Schwellenkonzentration, die noch keine toxische Wirkung auf die Zellen aufzeigt, wird mittels Expressionsrate der Aktivitätsgene *COL1A1* (Kollagen-Typ-I) und *ACTA2* (Alpha-Aktin 2) durch qRT-PCR ermittelt. Der Nachweis einer hypoxischen Wirkung erfolgt ebenfalls mittels qRT-PCR und Western Blot, als auch durch ein Luciferase-Assay zum Nachweis der Aktivität des Hypoxiemarkers HIF-1-alpha. Da sich eine 200 mikromolare Konzentration als Schwellenkonzentration mit den geforderten Kriterien einer hypoxischen Wirkung ohne toxische Suppression der Aktivitätsgene sowohl nach sechs, als auch nach 24 Stunden Inkubation darstellt (siehe 3.2.), werden die weiteren Experimente in dieser Versuchsreihe mit benannter Konzentration von 200 Mikromolar durchgeführt. Beispielhaft sind in Tabelle 15 benötigte Volumina an Medium und Basislösung B in den entsprechenden Kulturgefäßen aufgeführt, um die Zellen einer 200 Mikromolar konzentrierten Kobaltchloridlösung auszusetzen.

Beispielrechnung: T25 Zellkulturflasche, Endvolumen 6ml, Endkonzentration 200µM CoCl <sub>2</sub>		
→ Lösung B: 4000µM → Verdünnung 1:20, um eine 200µM Konzentration zu erreichen		
→ 6ml Endvolumen → <b>300µl Basislösung B &amp; 5700µl Medium</b>		
Well einer 6-Well Platte	Endvolumen: 2ml	100µl Lösung B + 1900µl Medium
T25 Zellkulturflasche	Endvolumen: 6ml	300µl Lösung B + 5700µl Medium
T75 Zellkulturflasche	Endvolumen: 12ml	600µl Lösung B + 11 400µl Medium
T175 Zellkulturflasche	Endvolumen: 18ml	900µl Lösung B + 17 100µl Medium

Tabelle 15 Beispiel für die Beimpfung der Zellen mit einer 200µM CoCl<sub>2</sub> Lösung

## Hypoxiekammer

Analog zu dem Hypoxiemodell mittels Kobaltchlorid werden für das Modell in der Hypoxiekammer Zellen geerntet, gezählt, in Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht im Inkubator, zu gleichen Bedingungen wie oben genannt, kultiviert. Am nächsten Tag erfolgt ebenfalls ein Mediumwechsel. Die Zellen werden anschließend für festgelegte Zeitintervalle von sechs und 24 Stunden in einer Hypoxiekammer bei 37°C und <0,5% O<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Die Erfolgskontrolle erfolgt analog.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die von K. Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986) ist heutzutage eine etablierte und weiterentwickelte Methode, um kleinste Mengen Nukleinsäure vervielfältigen und qualitativ messen zu können (Holland et al. 1991). Eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Methode ermöglicht in drei Schritten zusätzlich eine quantitative Genexpressionsanalyse. Bei der sogenannten Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wird zunächst gewonnene mRNA in cDNA durch Einsatz reverser Transkriptase umgeschrieben. Mittels PCR erfolgt eine Amplifizierung der cDNA Sequenzen. Durch Einbringen fluoreszierender Sonden, die nach jedem PCR-Zyklus ein Signal abgeben, kann die Amplifikationsrate proportional zur Fluoreszenzsignalstärke quantitativ in Echtzeit bestimmt werden (Higuchi et al. 1992). Je mehr Vervielfältigungen vorliegen, umso stärker das fluoreszierende Signal. Im gleichen Arbeitsschritt werden also die Gensequenzen amplifiziert, detektiert und quantitativ erfasst. (Gibson et al. 1996)

Der nachfolgend beschriebenen qRT-PCR sind Versuche mit der Zellreihe wie in 2.2.1.6. oder 2.2.1.7. erläutert, sowie die Kombination aus beiden Versuchen (*CUX1*-Suppression & Hypoxieinduktion) vorangestellt. Für die Versuche wurden biologische Replikate angefertigt.

Die nachfolgenden aufgeführten Versuchsschritte werden alle mit gekühlten Reagenzien und Lagerung der Proben auf Eis durchgeführt. Somit lässt sich einer RNA-Denaturierung durch ubiquitär vorkommende Nukleasen vorbeugen.

#### **RNA-Isolierung:**

Um die RNA aus den Zellen extrahieren zu können, müssen die Zellen zunächst geerntet werden. Allerdings ist bei diesem Versuch zu beachten, dass sowohl Medium, das zur Waschung verwendete PBS, als auch die Trypsin-Zell-Suspension einer Probe allesamt in einem 50 Milliliter Röhrchen gesammelt und nichts verworfen wird. Hierdurch soll die Menge zu extrahierender RNA maximiert werden. Für die RNA-Isolierung und Anwendung der eingesetzten Pufferlösungen ist es essenziell die Zellzahl einer Probe zu kennen, weshalb diese zunächst noch bestimmt werden muss. Anschließend erfolgt die Zentrifugation (1000rpm, 4°C). Der durch Absaugen des Überstandes gewonnene Pellet wird nochmals mit einem Milliliter PBS resuspendiert, danach in ein 1,5 Milliliter Mikroröhrchen zur erneuten Zentrifugation überführt und der Überstand wiederum abgesaugt. Die RNA-Isolierung wird mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die RNA wird in 20 Mikroliter RNase freiem Wasser gelöst. Zur Aufbewahrung werden die Proben in den 1,5 Milliliter Gefäße bei -80°C im Tiefkühler gelagert.

#### **Bestimmung RNA-Konzentration:**

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgt mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 Nanometern. Zunächst erfolgt eine Leerwertmessung mit einem Mikroliter RNase freiem Wasser. Es schließt sich die Messung der Proben unter Verwendung von ebenfalls einem Mikroliter an. Die Messung wird immer unmittelbar vor der Gewinnung von cDNA aus den Proben durchgeführt, um Schwankungen des RNA-Gehalts durch Lagerung des Materials zu berücksichtigen.

### cDNA-Synthese:

Hierfür kommt *das iScript™ cDNA Synthesis Kit* von Bio-RAD zur Anwendung. Es wird nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Der folgenden Tabelle können an den RNA-Gehalt der einzelnen Probe angepasste Mengen für die Komponenten der cDNA-Synthese entnommen werden. Das Endvolumen der Reaktionslösung für eine Probe ist auf 20 Mikroliter festgelegt, ebenso die Menge von vier Mikroliter des Reaktionsmixes und ein Mikroliter der Reversen Transkriptase. Je nach RNA-Ausgangskonzentration der Proben aus einem Versuchsaufbau werden für die an RNA-Gehalt variablen Proben eine einheitliche Menge RNA (300-500 Nanogramm) für die Gewinnung von cDNA festgelegt. Angepasst an die verwendete RNA-Menge wird zum Erreichen eines Totalvolumens von 20 Mikroliter die Reaktionslösung durch RNase freies Wasser ergänzt. Der Reaktionsmix und die Proben werden in kleinste Eppendorfgefäße pipettiert.

		Probe 1	Probe 2	Probe 3
5 iScript Reaktionsmix	4µl	4µl	4µl	4µl
iScript Reverse Transkriptase	1µl	1µl	1µl	1µl
RNA-Template	variabel	4,9µl	8,55µl	14,9µl
Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	variabel	10,1µl	6,45µl	0,1µl
Totales Volumen	20µl	20µl	20µl	20µl

Tabelle 16 Beispiel für die Zusammensetzung des cDNA-Synthesemixes

Anschließend erfolgt die Inkubation der Proben in einem Thermocycler für 40 Minuten. Der Tabelle 17 ist der Zyklus für die cDNA-Synthese in dem Gerät zu entnehmen.

Zeit	Temperatur	
5 Minuten	25°C	Assoziation der Primer
30 Minuten	42°C	Erststrangsynthese durch Reverse Transkriptase: Entstehung von mRNA/DNA-Hybriden
5 Minuten	85°C	Inaktivierung der Reversen Transkriptase

Tabelle 17 Zyklus Thermocycler-cDNA Synthese

Sofern die Proben nicht für weitere Versuche eingesetzt werden, werden sie im Gefrierer bei -20°C gelagert und aufbewahrt.

### Quantitative Echtzeit-PCR:

Mit der in cDNA umgeschriebenen RNA wird im Weiteren eine quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung der relativen Expressionsmenge des untersuchten Gens durchgeführt. Es wird hierfür das *qPCR Kit Gotaq®* von Promega angewendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Für die Reaktion kommt eine 96-Well-PCR-Platte zur Anwendung. Insgesamt soll jedes Well ein Gesamtvolumen von 20 Mikroliter umfassen, wovon jeweils zwei Mikroliter der Probe, RNase freiem Wasser zur Leerwertmessung oder einer Verdünnung der Standardreihe mit je 18 Mikroliter des Masterreaktionsmixes entsprechen.

Zunächst erfolgt die Herstellung des Masterreaktionsmixes. Dieser besteht aus folgenden Komponenten:

- Gotaq Supermix (Taq DNA Polymerase & Reaktionspuffer mit fluoreszierendem Farbstoff)
- Primer (für das zu untersuchende Gen spezifisches Oligonukleotid, das als Startsequenz für die Polymerase dient)
- RNase freies Wasser.

Der Tabelle 18 ist die Zusammensetzung des Masterreaktionsmixes mit der jeweilig geforderten Volumengabe pro Well zu entnehmen. Für die Herstellung des Mixes wird die Anzahl der Wells mit den jeweils benötigten Mengen pro Well multipliziert und in ein Eppendorfgefäß zusammen pipettiert. Da das Totalvolumen des Masterreaktionsmixes jedoch nicht von den 18 Mikrolitern abweichen soll, wird die Differenz bei Verwendung unterschiedlicher Marken bei Primern mit RNase-freiem Wasser ausgeglichen.

Gotaq Supermix	10µl/Well
Primer	2µl, bzw. 1µl/ Well
RNase-freies Wasser	6µl, bzw. 7µl/Well

*Tabelle 18 Zusammensetzung des Masterreaktionsmixes-PCR*

Um die Effizienz der PCR-Reaktion später bestimmen und somit auf die Quantität der untersuchten Proben schließen zu können, bedarf es der Herstellung einer Standardreihe mit den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32. Hierfür werden jeweils ein Mikroliter jeder verwendeten Probe gepoolt und mit gleicher Menge RNase-freiem Wasser in einem ersten kleinen Eppendorfgefäß suspendiert. In fünf weitere Gefäße wird die gleiche Menge

des RNase-freien Wassers vorgelegt. Nach Mischung der Proben mit dem Wasser im ersten Gefäß durch Auf- und Abziehen mit der Pipette erfolgt die Übernahme der Hälfte des Volumens in das zweite Gefäß und eine erneute Mischung. Bei Fortsetzung dieses Vorgangs bis zum sechsten Gefäß ergeben sich in den einzelnen Gefäßen die oben genannten Verdünnungen.

Nach Herstellung des Masterreaktionsmixes und der Standardreihe erfolgt das Pipettieren von jeweils 2µl der Probe (zu untersuchende mRNA) oder RNase-freiem Wasser zur Leerwertmessung und Reinheitskontrolle, bzw. der Verdünnungen der Standardreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) mit je 18 Mikroliter des Masterreaktionsmixes pro Well. Von jeder Probe werden je zwei technische Replikate erzeugt. Der Tabelle 19 ist ein Beispielschema einer solchen PCR-Platte zu entnehmen.

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	GAPDH (1) (LX-2; NTC)	GAPDH (2) (LX-2; CUX1)	Leerprobe		
<b>B</b> (technisches Replikat)	GAPDH (1) (LX-2; NTC)	GAPDH (2) (LX-2; CUX1)	Leerprobe		
<b>C</b>	Standard GAPDH 1:2	Standard GAPDH 1:4	Standard GAPDH 1:8	Standard GAPDH 1:16	Standard GAPDH 1:32
<b>D</b>	Beta-Aktin (1) (LX-2; NTC)	Beta-Aktin (2) (LX-2; CUX1)	Leerprobe		
<b>E</b> (technisches Replikat)	Beta-Aktin (1) (LX-2; NTC)	Beta-Aktin (2) (LX-2; CUX1)	Leerprobe		
<b>F</b>	Standard Beta-Aktin 1:2	Standard Beta-Aktin 1:4	Standard Beta-Aktin 1:8	Standard Beta-Aktin 1:16	Standard Beta-Aktin 1:32

*Tabelle 19 Beispiel Pipettierschema PCR-Platte*

Im Anschluss wird die PCR-Platte mit einer Folie versiegelt und für zwei Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Die eigentliche Kettenreaktion erfolgt nun durch die Inkubation der Platte in einem Thermocycler, der den in Tabelle 19 aufgeführten Zyklus immer wieder durchläuft.

Zeit	Temperatur	Schritte	Zyklen
2 Minuten	95°C	Initiale Denaturierung	1 Zyklus
ca. 1 Minute	95°C	Denaturierung	25-35 Zyklen
ca. 1 Minute	42-65°C	Anlagerung Primer	
1 Minute/Kilobase	65°C	Polymerisation	
5 Minuten	72°C	Finale Polymerisation	1 Zyklus
Undefiniert	4°C	Aufbewahrung	

Tabelle 20 Zyklus PCR-Thermocycler

### Auswertung:

CP-Werte (Crossing-Point-Werte) werden durch die Software *Bio-Rad CFX Manager™ 2.0*. ermittelt. Sie werden zur Quantifizierung der vorhandenen Startmenge an DNA herangezogen und entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen die nötig sind, um ein zuvor festgelegtes, konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen, sodass sich am 'Crossing Point' in allen Proben die gleiche Menge neu synthetisierter DNA befindet. Mittels der Software *REST 2009 (Relative Expression Software Tool V2.0.13* von Qiagen) wird eine effizienzkorrigierte relative Quantifizierung vorgenommen. Die aus technischen Replikaten ermittelten mittleren CP-Werte werden als Mittelwert von biologischen Replikaten zusammengefasst und die Expressionsunterschiede behandelte Zellen in Relation zu unbehandelten Zellen, normiert auf ein konstitutiv exprimiertes Houskeeping-Gen, berechnet. Das Programm berücksichtigt die durch die Verdünnungsreihe ermittelte Effizienz der PCR (Pfaffl 2004).

## **2.2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**

### **2.2.3.1 Ergänzung der qRT-PCR Daten durch Western Blot**

Der Western Blot wird als Methode zur Identifizierung von Proteinen aus Proben genutzt. Bereits 1938 legte A. Tiselius mit der Entwicklung einer Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht die Grundlage für die bis heute weiterentwickelte Gelelektrophorese (Tiselius 1938). Mittels Transfers der Proteine von Gel auf

Nitrozellulosepapier sowie Anwendung spezifischer und fluoreszierender Antikörper kann das Zielprotein detektiert werden. Dadurch können Aussagen über das Molekulargewicht des Proteins, sowie seine Quantität in der Probe getroffen werden. (Towbin et al. 1979).

#### **Probenvorbereitung zur Proteinextraktion:**

Die Vorbereitung der Zellen zur Gewinnung der Proteine aus den Proben entspricht zunächst exakt der Vorgehensweise wie in 2.2.2.1. zur RNA-Gewinnung beschrieben. Auch bei diesem Versuch werden die Proben bei allen Versuchsschritten auf Eis gelagert, um der Proteindenaturierung entgegen zu wirken. Der in 1,5 Milliliter PBS gelöste Zellpellet wird in einem nächsten Schritt mehrfach gewaschen, um sämtliche Verunreinigungen der Probe zu beseitigen. Hierfür wird die Zellsuspension für zehn Minuten bei vier Grad Celsius und 1000rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Pellet erneut mit PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wird in der Regel drei Mal wiederholt, genau solange bis sich der Überstand klar zeigt. Bei zuvor mit Kobaltchlorid behandelten Zellen ist zu beachten, dass der Zellpellet gelblich gefärbt vorliegen kann. Nach der letzten Waschung wird der Überstand abgesaugt, sodass der Zellpellet möglichst trockengelegt ist.

#### **Proteinextraktion:**

Um an die Proteine in der Zelle zu gelangen, bedarf es einer Zellyse. Dieser Zellaufschluss mittels osmotischer Lyse wird durch die dreißigminütige Inkubation der Zellen mit einem hypotonen Puffer, Lagerung auf Eis sowie durch zwischenzeitiges mehrmaliges Vortexen der Suspension erreicht. In Tabelle 20 ist die Zusammensetzung des Puffers aufgezeigt. Das zu verwendende Volumen an Puffer wird der Zellmenge angepasst. Bei Vorliegen von weniger als 1,5 Millionen Zellen pro Probe wird der Pellet lediglich mit 20-30 Mikroliter Puffer suspendiert, um einer zu geringen Proteinkonzentration pro Mikroliter später vorzubeugen. Bei größeren Zellmengen kommt 50 Mikroliter Puffer zum Einsatz.



**HEPES-Puffer:**

- 1) 10mM HEPES in 10ml destilliertes Wasser
  - M= 238,31g/mol; 10mM = 0,01mol/L
  - M\* c= Massenkonzentration: 0,01mol/L \* 238,31g/mol = 2,3831g/L  
= **23,831g/10mL**
- 2) pH-Einstellung: geforderter pH von 7,6  
→ Einstellung mit pH Meter durch ggf. Zusetzen von Natronlauge
- 3) Zusetzen von:
  - 1x Tablette Phosphataseinhibitor
  - 1x Tablette Proteinkinaseinhibitor
- 4) Lösung mit 0,2 oder 0,4 Syringe filtern!

*Tabelle 21 Zusammensetzung HEPES-Puffer*

Anschließend erfolgt die Zellfraktionierung durch Zentrifugation. Die Zell-Puffer-Suspension wird für 30 Minuten bei vier Grad Celsius und 13 000rpm zentrifugiert. Die Proteine befinden sich nun im Überstand des Zentrifugats. Dieses wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die sich im entstandenen Pellet befindlichen Zellbestandteile können verworfen werden.

**Proteinextraktion: Spezialfall Kollagen-Typ-1 (Gen COL1A1)**

Zur Darstellung von Kollagen-Typ-1 bedarf es einem stärkeren Lyseverfahren als der osmotischen Lyse mittels HEPES(Ethansulfonsäure)-Puffer. Nach Rücksprache mit der Firma Abcam erfolgt das nachfolgende Lyseprotokoll unter Verwendung von 1%SDS(sodium dodecyl sulfate)-Hot-Lysis-Puffer und Nutzung eines ultraschallgestützten mechanischem Zellaufschlussverfahren nach Herstellerangaben.

**1% SDS-Hot-Lysis-Puffer, Endvolumen 50ml:**

- 1) 35ml destilliertes Wasser mit 10mM Tris-HCl (Puffersubstanz) versetzen
  - M= 157,6g/mol
  - 10mM = 0,01mol/L
  - M\* c= Massenkonzentration => 0,01mol/L \* 157,6 g/mol = 1,576g/L  
→ **78,8mg/50ml**
- 2) pH-Einstellung: geforderter pH von 8,0  
→ Einstellung mit pH Meter durch ggf. Zusetzen von Natronlauge, bzw. Salzsäure
- 3) Zusatz von 1% SDS (Natriumlaurylsulfat → Denaturierungsmittel)  
→ 1% entsprechen **500mg** auf 50ml
- 4) Zusatz von 1mM Natriumorthovanadat (Enzyminhibitor)→ bei 100mM Substrat: 1:100 Verdünnung, um 1mM zu erhalten: **500ul** auf 50ml
- 5) Auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O bis 50ml

*Tabelle 22 Zusammensetzung 1% SDS-Hot Lysis Puffer*

Für die Zellyse wird der wie oben beschrieben gewonnene Zellpellet mit ca. 1,5 Millionen Zellen mit 100 Mikroliter des 1%SDS-Hot-Lysis-Puffer suspendiert. Sofern weniger Zellen vorliegen, bietet sich die Suspendierung mit weniger Lysepuffer an, um im Anschluss ausreichend Protein pro Mikroliter vorliegen zu haben. Die Zell-Puffer-Suspension wird für (15-) 30 Minuten auf 90°C erhitzt und währenddessen mehrmalig auf einem Vortexmischer gemixt. Anschließend erfolgt die mechanische Lyse im Ultraschallbad für weitere 30 Minuten. In der Zentrifuge bei 10 000rpm, vier Grad Celsius werden die Zellen für zehn Minuten fraktioniert. Die Proteine befinden sich nun im Überstand, werden in kleine Eppendorfgefäße überführt und der Pellet kann verworfen werden.

Sofern die Proben nicht für weitere Versuche eingesetzt werden, werden sie im Gefrierer bei -20°C gelagert und aufbewahrt.

#### **Messung der Proteinkonzentration:**

Die Messung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgt mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific Inc. sowie unter Anwendung einer etablierten Standardreihe des gleichen Herstellers (*Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set*) nach Herstellerangaben. Die Proben werden hierfür mit dem zuvor verwendeten Lysepuffer (HEPES, bzw. 1%SDS-Hot-Lysis-Puffer) verdünnt. Bei einer Wellenlänge von 570 Nanometer wird die Proteinkonzentration in den Proben unter Anwendung des Mikroplatten-Lesegeräts und der Software *SoftMax Pro 3.1.1 (Molecular Devices, LLC)* ausgewertet.

#### **Probenvorbereitung für die Elektrophorese:**

Nach Erkenntnis der Proteinkonzentration einer Probe, wird das benötigte Volumen an Probe mit Hilfe der Formel  $V = m/c$  (Volumen = Masse/ Stoffkonzentration) bestimmt, um 25 Mikrogramm (ggf. 20 Mikrogramm) Protein pro Probe zu erhalten. Das Totalvolumen pro Well für die sich anschließende Gelelektrophorese begrenzt sich auf 20 Mikroliter. Es erfolgt das Pipettieren von der Probe, ggf. ergänzt durch den eingesetzten Lysepuffer (HEPES) zusammen mit einem Reduktionsmittel und einem LDS-Puffer (Lithium Dodecyl Sulfat Puffer) sowie anschließendem Erhitzen auf 70°C für zehn Minuten, um Sekundär- und Tertiärstrukturen und ggf. Disulfidbrücken innerhalb der Proteine

aufzuschließen. Die genaue Zusammensetzung des Elektrophoresemixes erschließt sich aus der Tabelle 22.

Totalvolumen: 20µl	
2µl	Reduktionsmittel
13µl	X µl Proteinmenge für 25µg Protein + X µl Hepes-Lysepuffer (Ergänzung auf 13µl)
5µl	LDS Puffer

*Tabelle 23 Zusammensetzung Elektrophoresemix*

**Spezialfall Probenvorbereitung: Kollagen-Typ-1 (Gen COL1A1):** Zur Darstellung von Kollagen-Typ-1 im Western Blot bedarf es einer anderen Zusammensetzung des Probenpuffers für die Gelelektrophorese, welche sich nach den Angaben des Herstellers Abcam richtet. Es erfolgt wie oben beschrieben die Bestimmung des benötigten Volumens Probe, um 25 Mikrogramm Protein zu erhalten. Ebenso wird von einem Totalvolumen von 20 Mikroliter pro Well ausgegangen. Die Zusammensetzung des pipettierten Elektrophoresemixes ist der Tabelle 24 zu entnehmen. Es erfolgt gleichfalls eine Erhitzung bei 70°C für zehn Minuten.

Totalvolumen 20µl	
10µl	X µl Proteinmenge für 25µg Protein + X µl 1%SDS Hot-Lysepuffer (Ergänzung auf 10µl)
10µl	2,5% SDS Probenpuffer

*Tabelle 24 Zusammensetzung Elektrophoresemix Spezialfall Kollagen 1*

### **Gelelektrophorese:**

Für die Gelelektrophorese wird ein vorgefertigtes Polyacrylamidgel (NuPage® 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen) in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und ein geeigneter Elektrophoresepuffer (hier MOPS (Morpholinopropan-sulfonsäure)- Puffer 1:20 verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O) zugegeben. Zur Auftrennung der denaturierten Proteine wird der hergestellte Elektrophoresemix einer jeweiligen Probe in je eine Kammer des Gels sowie in eine zusätzliche Kammer ein vorgefertigter Größenmarker, welcher Proteine bekannter Größe enthält und dadurch die Abschätzung der Proteine in der zu bestimmenden Probe ermöglicht, geladen. Anschließend wird eine elektrische Spannung von 150 Volt für ca. eine Stunde angelegt.

### **Semidry Blot: Proteintransfer vom Gel auf die Membran:**

Für den Transfer bedarf es einer Transferpufferlösung bestehend aus fünf Prozent Transferpuffer, zehn Prozent Methanol und 85% ddH<sub>2</sub>O. Es wird das Gel aus der Kammer gelöst und nach in Abbildung 4 folgendem Schema zwischen Filzmembranen und anliegender Nitrozellulosemembran gebettet. Für den Elektrotransfer kommt das Semidry Blot-System zum Einsatz. Der Filzmembranstapel, Gel und Nitrozellulosemembran beinhaltend, wird mit Transferpufferlösung durchnässt, zwischen Kathode und Anode platziert und eine senkrecht zum Gel verlaufende Spannung von 25 Volt für 30 Minuten angelegt.

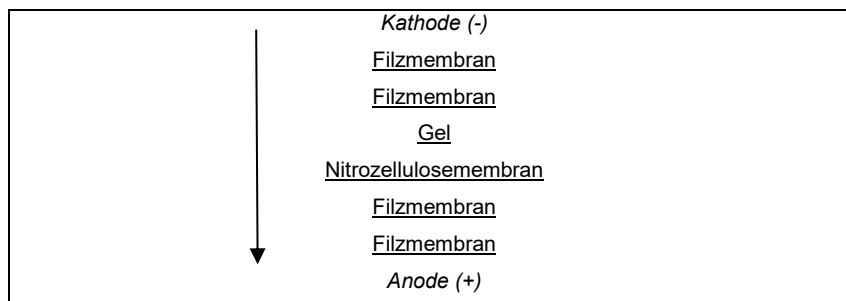


Abbildung 4 Vereinfachtes Schema Semi-Dry Blot-System

Zur visuellen Kontrolle der Transferierung der Proteinbanden wird die Membran mit 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnter RedAlert™ Lösung durch reversible Bindung an die Proteine gefärbt. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran mit den nun enthaltenen Proteinbanden in einen Waschpuffer, TBS-T-Puffer (Tris-Buffered Saline with Tween20) (siehe Tabelle 25), überführt und die Färbung ausgewaschen.

TBS-T Puffer (Tris-Buffered Saline with Tween20)	- 1l ddH <sub>2</sub> O - 2x Tabletten TBS (1fach) - 1ml Tween20
---	--

Tabelle 25 Zusammensetzung TBS-T Puffer

### **Immundetektion:**

Die starke Bindungsaffinität der Nitrozellulosemembran würde ohne weitere Behandlung zur unspezifischen Bindung der im nächsten Schritt eingesetzten Antikörper an freie Bindungsstellen führen und die spezifische Detektion der zu untersuchenden Probe erschweren. Um Verfälschungen durch unspezifische Bindung oder verstärkte Hintergrundsignale an freien Bindungsstellen zu vermeiden, wird die Membran geblockt. Hierfür wird die Membran in ein 50

Milliliter Röhrchen überführt und mit 3 Milliliter verdünntem bovinen Serumalbumin (4% BSA (bovines Serumalbumin)/TBS-T Puffer Lösung) für 30 Minuten auf einem Taumelrollbrett bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem für das gesuchte Protein spezifischen Primärantikörper über Nacht auf dem Taumelrollbrett im Kühlraum bei vier Grad Celsius. Dieser wird stark verdünnt mit vier Prozent BSA/TBS-T Lösung, in der Regel 1:1000, bzw. 1:500. Die Verdünnung richtet sich zunächst nach den Empfehlungen des Herstellers auf dem Produktdatenblatt, muss aber experimentell ausgetestet und ggf. angepasst werden. Die eingesetzten Primärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungsstufen und eingesetzten Sekundärantikörpern sind der Tabelle 9 und 10 zu entnehmen. Mit einer nur zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur stellt der Primärantikörper für Beta-Aktin eine Ausnahme dar. Es folgen drei Waschschriffe mit Hilfe des *SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System* (Merck) unter Einsatz des Waschpuffers TBS-T, um schwächer und ungebunden haftende Antikörper zu entfernen. Anschließend wird die Membran mit dem Sekundärantikörper, welcher gegen spezifische Regionen des Primärantikörpers (i.d.R. gegen Fc-Teil) gerichtet ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollbrett behandelt. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers mit vier Prozent BSA/TBS-T beläuft sich auf 1:10 000. Nach weiteren Waschschriffen mit TBS-T Puffer zur Entfernung nicht anhaftender Sekundärantikörpern werden die Proteinbanden mittels einer Chemilumineszenzreaktion und unter Verwendung eines speziellen Scanners mit Einsatz der Software *Fusion CAPt 15.15 für Windows* (Vilber Lourmat GmbH) detektiert und sichtbar gemacht. Die Ladekontrolle erfolgt mit Detektion von Beta-Aktin. Beta-Aktin als Produkt eines Haushaltsgens mit konstitutiver Expression ermöglicht die Sicherstellung einer gleichmäßigen Probenverteilung und damit Interpretationsmöglichkeit des Western Blots.

Zur Detektion der Probe sowie von Beta-Aktin zur Ladekontrolle oder weiterer Proteine auf gleicher Membran bedarf es entweder dem Zerschneiden der Membran oder einem Stripping. Zum Zerschneiden der Membran werden die Proteinbanden und vor allem die Proteinbanden des Standards mit bekannter

Größe mit RedAlert™ Lösung dargestellt. Nach Kenntnis der zu erwartenden Größe des zu detektierenden Proteins wird die Membran zugeschnitten. Somit können die Membranhälften gleichzeitig mit unterschiedlichen Antikörpern behandelt werden. Als Alternative zum Zerschneiden der Membran bietet sich das Stripping-Verfahren an. Nach Detektion eines Proteins bedarf es der Entfernung der gebundenen Antikörper mittels Inkubation der Membran mit Strippingpuffer für zehn Minuten, anschließendem Waschen und erneutem Blocken. Nach dieser Prozedur kann die Membran mit neuen Antikörpern zur Detektion weiterer Proteine behandelt werden. Dies bietet sich vor allem an, wenn die zu untersuchenden Proteine Ähnlichkeiten in Größe und der damit zu erwartenden Lokalität auf der Membran aufweisen.

### **Quantitative Auwertung der Western Blot Ergebnisse:**

Mittels der Software *Bio-1d advanced* (Vilber GmbH) können die Signalintensitäten des Western Blots normiert auf Beta-Aktin durch eine Densitometrie quantitativ verifiziert werden. Die Messung erfolgt jeweils dreimal unter Bildung eines Mittelwertes.

### **2.2.3.2 Messung der Aktivität von HIF-1-alpha, Luciferase-Reportergen-Analyse (Luciferase Assay System)**

Die Luciferase-Reportergen-Analyse ist ein Verfahren zur Untersuchung der Genexpression auf Transkriptionsebene. Wie in Abbildung 5 gezeigt, wird die Promotersequenz, also eine von dem zu untersuchendem Gen regulierte Region, mit einer für Luciferase kodierenden DNA-Sequenz fusioniert (Wet et al. 1987). Diese Fusionssequenz befindet sich auf einem rekombinanten Plasmid, der in die Zelle transfiziert werden kann.

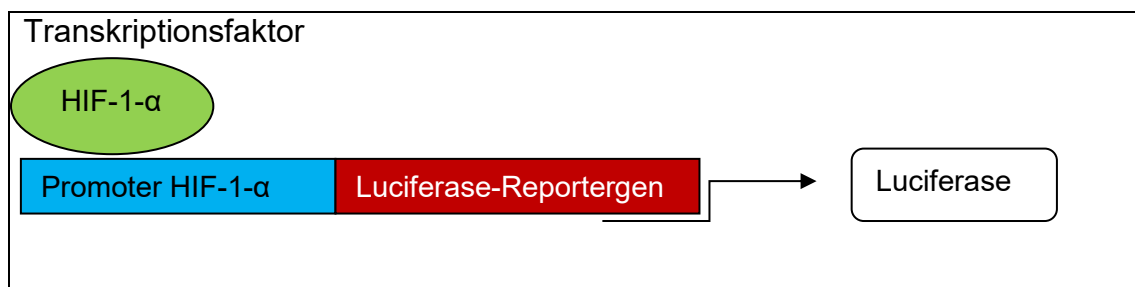


Abbildung 5 Luciferase-Reportergen-Analyse, schematischer Plasmidsequenzaufbau, Bsp. Untersuchung der Hif-1-alpha Transkriptionsfaktoraktivität

Durch Zugabe von Luciferin und Sauerstoff katalysiert die Luciferase eine Reaktion, die Licht erzeugt (Boeckx 1984). Durch ein Luminometer kann die erzeugte Lichtmenge erfasst werden und als quantitatives Maß für die Aktivität und Wirkung des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors in Bezug auf die Expression seines Zielgens herangezogen werden. Die Lichtmenge verhält sich proportional zur Aktivität des Proteins. Dieser Versuch soll die Untersuchung der HIF-1-alpha-Aktivität unter Hypoxie sowie die Korrelation mit der CUX1-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen aufzeigen. Hierfür wird zunächst eine Ko-Transfektion unter Anwendung und Anpassung des Herstellerprotokolls von Qiagen „*Fast-Forward Cotransfection of HepG2 Cells with si-RNA-DNA and DNA Using Attractene Transfection Reagent*“ durchgeführt. Durch zeitgleiche Induktion einer CUX1-Suppression und Einbringen eines rekombinanten Plasmids (Malec et al. 2010), der eine Zielsequenz (HRE) des Transkriptionsfaktors HIF-1-alpha vor einem für eine Luciferase kodierenden Genabschnitt enthält sowie Induktion einer hypoxischen Reaktion durch Kobaltchlorid, kann die Luciferaseaktivität proportional zur Aktivität des Transkriptionsfaktors in Bezug auf die CUX1-Aktivität ausgewertet werden.

#### **Ko-Transfektion:**

Zunächst werden die Zellen geerntet und gezählt. Im Anschluss werden 40 000 Zellen pro Well einer weißwandigen 96-Well-Platte in 100 Mikroliter Medium ausgesät. Kurzfristig werden die Zellen unter den bekannten Wachstumsbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Es folgt die Ko-Transfektion von siRNA gegen CUX1-spezifischer mRNA, bzw. unspezifischer siRNA in der Vergleichsgruppe (NTC) mit DNA, welche die HIF-1-alpha spezifische Zielsequenz sowie das Luciferasereporter gen inkludiert. Hierfür erfolgt die Herstellung eines Transfektionskomplexes aus den in Tabelle 26 benannten Komponenten. Diese werden zusammen pipettiert, anschließend gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Ausbildung des Transfektionskomplexes inkubiert.

Transfektionskomplex Ko-Transfektion, pro Well einer 96-Well-Platte:	
-	50µl Medium (ohne Serum)
-	0,2µg DNA
-	0,75µl Attractene Transfektionsreagenz
-	5nM siRNA ( <i>CUX1</i> -spezifisch, bzw. unspezifisch)

Tabelle 26 Zusammensetzung Transfektionskomplex Ko-Transfektion siRNA & DNA

Der Transfektionskomplex wird tröpfchenweise den Zellen zugeführt. Es erfolgt eine Inkubation unter den typischen Wachstumsbedingungen für 48 Stunden. Die Kontrollgruppe (MOCK) wird wie in 2.2.1.6 mit unspezifischer siRNA transfiziert.

### **Hypoxie:**

Nach erfolgter Transfektion nach 48 Stunden Inkubation mit dem Transfektionskomplex folgt die Induktion einer hypoxischen Reaktion durch Kobaltchloridlösung, bzw. ein reiner Mediumwechsel in der Kontrollgruppe (MOCK). Medium wurde aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit je 200 Mikroliter pro Well einer 200 mikromolaren Kobaltchloridlösung beimpft. Die Inkubation erfolgt bei bekannten Wachstumsbedingungen für jeweils sechs, bzw. 24 Stunden.

### **Luciferase-Reportergen-Analyse (Luciferase Assay System):**

Die Hypoxiereaktion wird nach sechs, bzw. 24 Stunden gestoppt und eine Luciferase-Reportergen-Analyse durchgeführt. Hierbei wird das Luciferase Assay System von Promega angewandt und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Medium, bzw. Medium-Kobaltchloridlösung wird abgesaugt und die in den Wells adhären Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend werden Lysepuffer und Analysereagenz pipettiert. Die Auswertung erfolgt mittels eines Luminometers.

Es werden je sechs Duplikate einer Versuchsgruppe angefertigt und die Mittelwerte der Intensität der Lumineszenz bestimmt. Zudem werden mittels Microsoft Excel® die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts errechnet. Durch einen zweifachen Students T-Test wird das Signifikanzniveau bestimmt.

### **2.2.3.3 Durchflusszytometrische Validierung (FACS-Analyse) der Proteinexpression von alpha-SMA**

'*Fluorescence-activated Cell Sorting*' (FACS) beschreibt eine Form der Durchflusszytometrie, welche bereits 1969 entwickelt wurde (Hulett et al. 1969).



Diese Methode ermöglicht durch fluoreszierende Markierung eine spezifische Subpopulation, wie hier alpha-SMA, innerhalb einer großen Population genauer identifizieren und quantifizieren zu können.

Dem Versuch einer durchflusszytometrischen Validierung der Expression von alpha-SMA ist die Transfektion der Zellen mit siRNA für *CUX1*-spezifischer mRNA oder unspezifischer siRNA in der Kontrollgruppe vorangestellt. Anschließend erfolgt die Induktion einer Hypoxie durch 200 mikromolare Kobaltchloridlösung oder Inkubation in der Hypoxiekammer für sechs und 24 Stunden, bzw. die Inkubation mit Nährmedium ohne Einleitung einer hypoxischen Reaktion. Nach Stoppen der hypoxischen Reaktion nach sechs, bzw. 24 Stunden werden die Zellen zunächst geerntet. Die Vorgehensweise entspricht der in 2.2.1.2. erläuterten. Die nachfolgenden aufgeführten Versuchsschritte sind alle mit gekühlten Reagenzien und Lagerung der Proben auf Eis durchgeführt. Somit lässt sich einer Proteindenaturierung vorbeugen. Bei diesem Versuch werden sowohl Medium, das zur Waschung verwendete PBS, als auch die Trypsin-Zell-Suspension einer Probe allesamt in einem 50 Milliliter Röhrchen gesammelt. Es folgt die Zellzahlbestimmung einer jeden Probe. Anschließend werden die Proben zehn Minuten bei 800-1000rpm und vier Grad Celsius zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbliebenen Zellpellets, die Proteine beinhaltend, werden mit je sechs Milliliter PBS resuspendiert. Für die nächsten Versuchsschritte werden jeweils zwei Milliliter der Zell-PBS-Suspension in ein kleines Eppendorfgefäß überführt. Die in die Eppendorfgefäße überführten Zellen werden erneut für fünf Minuten bei 300rcf und vier Grad Celsius zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt mit zwei Milliliter PBS wird ein zweites Mal wiederholt. Nach Dekantierung des Überstandes wird der Pellet mit je 0,5 Milliliter kaltem *Flow Cytometry Fixation Buffer* (R&D Systems Inc.) resuspendiert und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Nach Zentrifugieren (fünf Minuten, 300rcf, vier Grad Celsius) und Verwerfen des Überstandes folgt erneut die zweimalige Waschung mit PBS wie oben beschrieben. Der verbliebene Pellet wird mit je 200 Mikroliter *Flow Cytometry Permeabilization/Wash Buffer1* (R&D Systems Inc.) resuspendiert. Anschließend werden die Proben mit spezifischen

fluoreszierenden Antikörpern gegen alpha-SMA bei Raumtemperatur für 30 Minuten abgedunkelt durch Alufolie inkubiert (siehe Tabelle 11). Die Proben werden erneut zentrifugiert (fünf Minuten, 300rcf, vier Grad Celsius) und der Überstand dekantiert. Ein letzter Waschschrift mit 200 Mikroliter *Flow Cytometry Permeabilization/Wash Buffer1* und Zentrifugieren (fünf Minuten, 300rcf, vier Grad Celsius) folgt, bevor der Pellet endgültig mit 400 Mikroliter PBS resuspendiert wird, und die Probe kurzfristig bis zur Messung im Durchflusszytometer abgedunkelt in Alufolie vorliegt.

Für eine Negativkontrolle werden unbehandelte Zellen (ohne Transfektion, keine Hypoxie) wie oben beschrieben behandelt und je ein Exemplar mit dem für alpha-SMA-spezifischen Antikörper, einem unspezifischen Antikörper (Tabelle 11), bzw. ohne Antikörper (Leerprobe) inkubiert.

Die Auswertung der Proben erfolgt mit dem *Attune™ Acoustic Focusing Cytometer* (Applied Biosystems) und der Software *Attune® Cytometric Software Version 1.2.5*.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Suppression von *CUX1* mittels Transfektion mit siRNA gegen *CUX1*-spezifische mRNA

Grundlage für die Untersuchung der genannten Fragestellung stellt die Supprimierung der Expression des Genprodukts von *CUX1* dar. Basierend auf den positiven Ergebnissen zur Herunterregulierung von *CUX1* in hepatozellulären Karzinomzellen aus vorangegangenen Arbeiten meiner Arbeitsgruppe (Blümel et al. 2015; Hofmann et al. 2017) wird mittels Einbringung von siRNA in die LX-2 Zellen die Expression des Genprodukts von *CUX1* herunterreguliert (wie in 2.2.1.6. beschrieben). Durch qRT-PCR kann, wie in Abbildung 6 aufgezeigt, die stark signifikante ( $p < 0,001$ ) Supprimierung von *CUX1* im Vergleich zur Negativkontrolle (NTC) nachgewiesen werden.

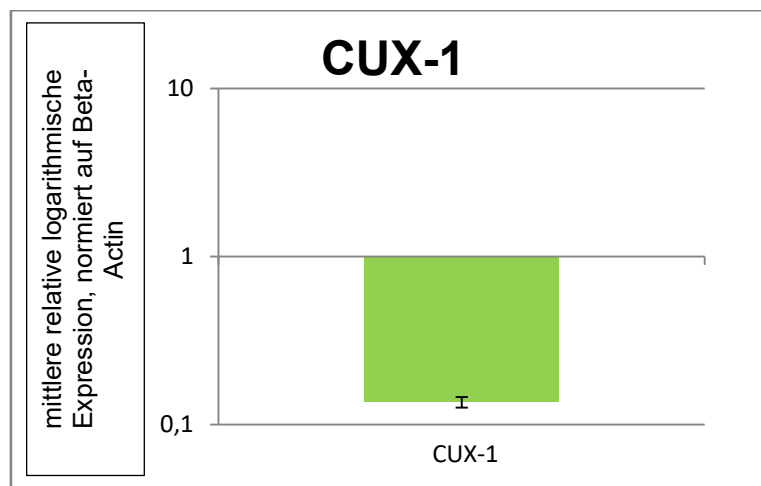


Abbildung 6 qRT-PCR: Suppression von *CUX1* mittels Transfektion von siRNA gegen *CUX1*; mittlere relative logarithmische Expression von *CUX1* nach Suppression durch siRNA im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor 0,136, normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin, Signifikanz mit \* markiert,  $p < 0,001$ ; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

#### 3.2 Etablierung des $\text{CoCl}_2$ -Hypoxie-Modells

Zunächst wird die Schwellenwertkonzentration ermittelt, die einen hypoxischen Effekt erzielt ohne modulierend, bzw. toxisch auf die Genexpression der verwendeten Zelllinie LX-2 zu wirken. Mittels Bestimmung der Expressionsrate der Aktivitätsgene *ACTA2* und *COL1A1* durch qRT-PCR soll diese Schwellenwertkonzentration identifiziert werden. Orientierend an den

Ergebnissen früherer Studien (Muñoz-Sánchez und Chánez-Cárdenas 2018; Lison 2001) werden Konzentrationen zwischen 200 Mikromolar und 600 Mikromolar mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe getestet.

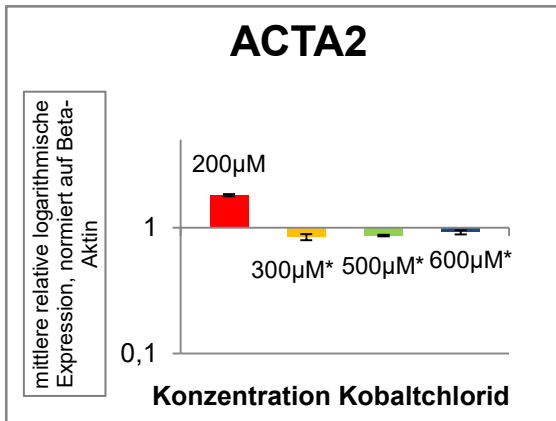


Abbildung 7 qRT-PCR: Etablierung  $\text{CoCl}_2$ -Modell; mittlere relative logarithmische Expression von ACTA2 nach 24 Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid unterschiedlicher Konzentrationen (200 µM, 300 µM, 500 µM, 600 µM), normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Abbildung 7 zeigt, dass durch die Inkubation der LX-2 Zellen mit einer 200 mikromolaren Kobaltchloridlösung über 24 Stunden eine tendenzielle Steigerung der Genexpression von ACTA2 (relative Expressionsrate 1,809) aufgezeigt werden kann. Hingegen wird bei höheren Konzentrationen eine signifikant ( $p < 0,05$ ) stabile Expression des Gens beobachtet. Die verhältnismäßige Überexpression von ACTA2 bei Anwendung von 200 Mikromolar im Vergleich zu einer stabilen Expression bei höheren Stoffmengenkonzentrationen des Kobaltchlorids wird wie eine Reduzierung der Genexpression und somit als negativ modulierend, bzw. toxische Wirkung bewertet.

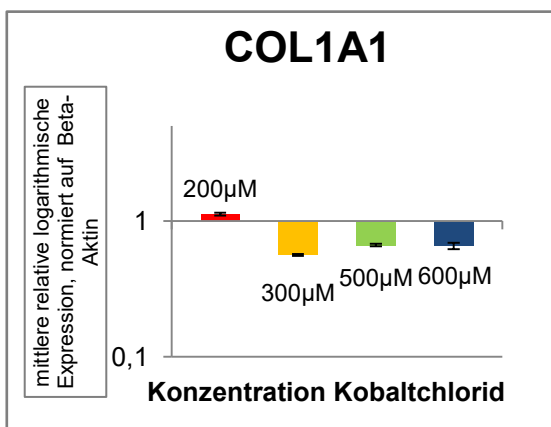


Abbildung 8 qRT-PCR: Etablierung  $\text{CoCl}_2$ -Modell (2); mittlere relative logarithmische Expression von COL1A1 nach 24 Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid unterschiedlicher Konzentrationen (200 µM, 300 µM, 500 µM, 600 µM), normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

*COL1A1* wird unabhängig der Stoffmengenkonzentration des Kobaltchlorids konstant exprimiert. Es findet keine relevante Veränderung der Expression durch Kobaltchlorid statt. Jedoch kann ein Trend beobachtet werden, der sich mit den Ergebnissen des Versuchs mit *ACTA2* deckt und eine Tendenz zu einer negativen Wirkung auf die Genexpression bei höheren Kobaltchloridkonzentrationen als 200 Mikromolar aufzeigt (Abbildung 8). Eine 200 mikromolare Kobaltchloridkonzentration wird demnach als Schwellenwertkonzentration definiert und für alle weiteren Versuche dieser Arbeit herangezogen.

### 3.3 Ermittlung des Zeitintervalls der Inkubationszeit von LX-2 unter Hypoxie

Neben der richtigen Stoffmengenkonzentration von Kobaltchlorid spielt wie in 3.2 beschrieben das Zeitintervall für die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen eine entscheidende Rolle, um den gewünschten und keinen toxischen Effekt auf die Genexpression zu erzielen. Um für die weiteren Versuche in dieser Arbeit ein optimales Zeitintervall zur Inkubation unter hypoxischen Bedingungen definieren zu können, wird der hypoxische Effekt auf die Expressionsrate der Aktivitätsgene *ACTA2* und *COL1A1* durch qRT-PCR nach unterschiedlichen Zeitintervallen von sechs, 24 und 48 Stunden im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe untersucht.

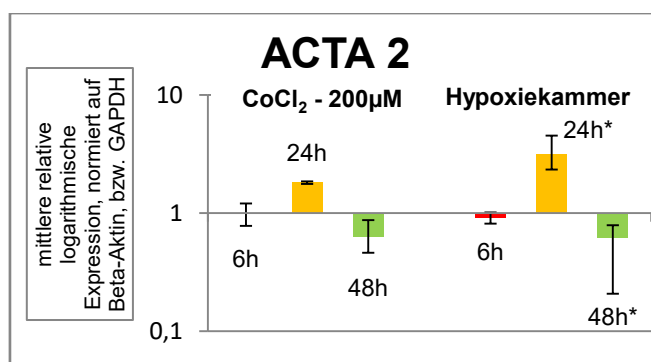


Abbildung 9 qRT-PCR: Zeitintervallermittlung der Inkubationszeit unter Hypoxie; mittlere relative logarithmische Expression von *ACTA2* nach sechs, 24 und 48 Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid (200µM), bzw. in der Hypoxiekammer, normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin, bzw. GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Es wird belegt, dass die Expression von *ACTA2* nach Inkubation mit Kobaltchlorid über sechs Stunden stabil bleibt (Abbildung 9). Nach 24 Stunden zeigt sich eine tendenzielle Zunahme mit sich nach 48 Stunden Inkubation anschließender konstanter Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Es kann somit ein negativ modulierender Effekt nach 48 Stunden Inkubation unter hypoxischen Bedingungen demonstriert werden.

Noch viel eindeutiger sind die Ergebnisse durch Inkubation der Zellen bei gleichen Zeitintervallen in der Hypoxiekammer. Nach initial stabiler Expression von *ACTA2* wird eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Genexpression nach 24 Stunden Inkubation, entsprechend einer Aktivierung der Zellen, bewiesen. Nach 48 Stunden stellt sich auch hier eine signifikant ( $p < 0,05$ ) stabile Expression ein.

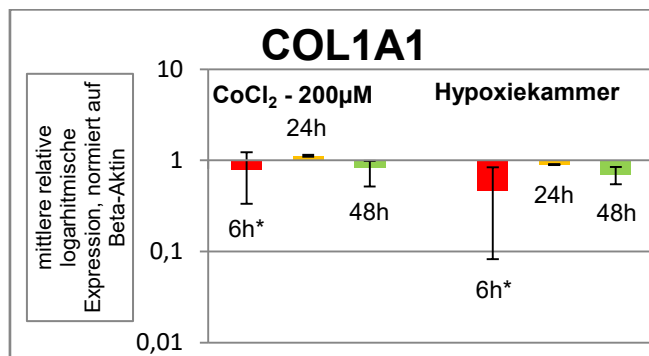


Abbildung 10 qRT-PCR: Zeitintervallermittlung der Inkubationszeit unter Hypoxie (2); mittlere relative logarithmische Expression von *COL1A1* nach sechs, 24 und 48 Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid (200µM), bzw. in der Hypoxiekammer, normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass die Genexpression von *COL1A1* auch nach unterschiedlicher Inkubationszeit von sechs, 24 und 48 Stunden mit Kobaltchlorid stabil bleibt. Unter hypoxischen Bedingungen in der Hypoxiekammer stellt sich nach initialer, signifikanter ( $p < 0,05$ ) Supprimierung eine stabile Expression nach 24 Stunden ein, die auch nach 48 Stunden noch nachweisbar ist.

Unter hypoxischen Bedingungen bleibt die Expression der Aktivitätsgene in den untersuchten LX-2 Zellen stabil oder wird bis zu einer Inkubationszeit von 24 Stunden positiv moduliert. Nach 48 Stunden Inkubation stellt sich verhältnismäßig eine negativ modulierende Wirkung auf die Genexpression der Aktivitätsgene ein. Folglich werden sich anschließende Versuche unter

hypoxischen Bedingungen mit Inkubationsintervallen von sechs und 24 Stunden durchgeführt.

### 3.4 Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter hypoxischen Bedingungen mittels qRT-PCR

Hierfür werden LX-2 Zellen jeweils für sechs oder 24 Stunden Hypoxie ausgesetzt. Dabei kommen eine Inkubation mit Kobaltchlorid (200µM) oder das Modell der Hypoxiekammer zum Einsatz. Als Vergleich dient eine unbehandelte Kontrollgruppe, welche Normoxie ausgesetzt ist.

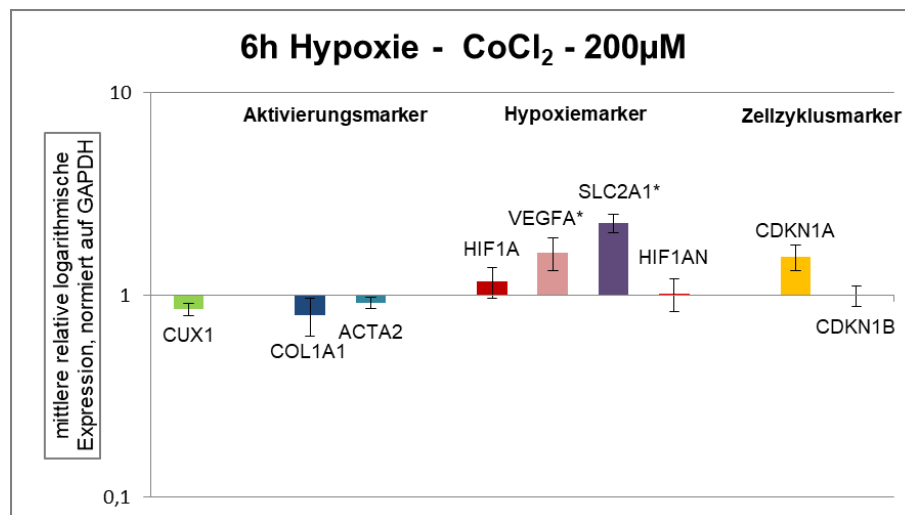


Abbildung 11 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie - CoCl<sub>2</sub> ; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen; mittlere relative logarithmische Expression nach sechs Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid (200µM), normiert auf das Houskeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Auf eine sechsstündige Inkubationszeit mit Kobaltchlorid reagieren die LX-2 Zellen mit einer stabilen, unveränderten Expression von CUX1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 11). Es gibt keine Nachweise einer Aktivierung der Zellen, da eine konstante Expression von ACTA2 und COL1A1 beobachtet werden kann. Es wird auch kein Einfluss auf Zellzyklus und Überleben der Zellen festgestellt bei unveränderter Expression der Zellzyklustranskripte für p21 (Gen: CDKN1A) und p27 (Gen: CDKN1B). Entgegen der Annahme, dass durch Hypoxie die Expression von HIF1A, für

HIF-1-alpha codierend, stark zunehmen würde, wird auch hier keine Veränderung beobachtet. Es kann jedoch unter den Zielgenen von HIF1 eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Expressionsrate von *SLC2A1* aufgezeigt werden. *VEGFA* bleibt unverändert und signifikant ( $p < 0,05$ ) stabil exprimiert nach sechs Stunden Hypoxie. *HIF1AN* - für den Gegenspieler von HIF-1 codierend - zeigt ebenfalls eine stabile Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

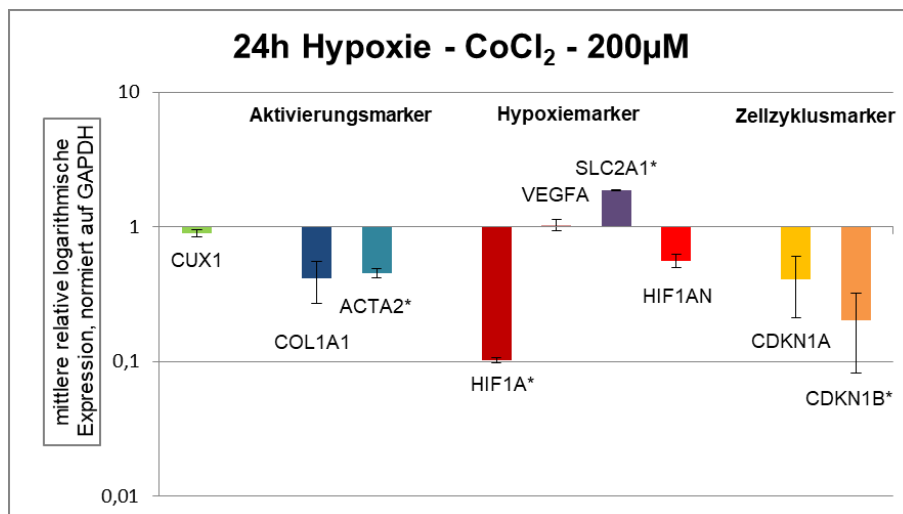


Abbildung 12 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie -  $\text{CoCl}_2$  ; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen; mittlere relative logarithmische Expression nach 24 Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid ( $200\mu\text{M}$ ), normiert auf das Housekeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Die Expression von *CUX1* zeigt sich auch nach 24 Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid unbeeinflusst (Abbildung 12). Es wird eine Herunterregulierung von *COL1A1* und eine signifikante Abnahme der Expressionsrate von *ACTA2* beobachtet. Zudem kommt es zu einer signifikanten Suppression von *HIF1A*. Die Zielgene von HIF-1, *VEGFA* und *SLC2A1*, weisen eine stabile Expression auf. Die Expression von *HIF1AN* bleibt auch nach 24 Stunden Hypoxie unbeeinflusst im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Zellzyklusgene *CDKN1A* und *CDKN1B* werden relevant signifikant negativ durch die hypoxischen Bedingungen beeinflusst.



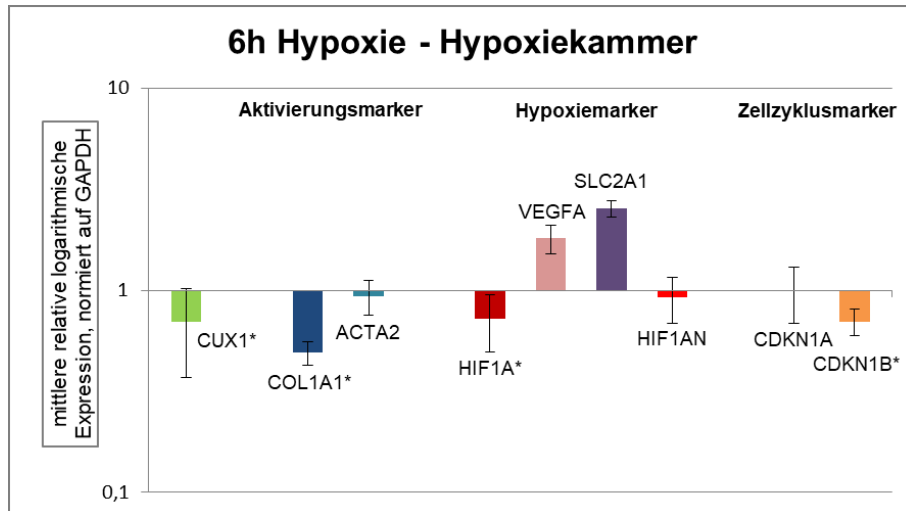


Abbildung 13 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie - Hypoxiekammer; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen; mittlere relative logarithmische Expression nach sechs Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer, normiert auf das Houskeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Analog zu den Versuchen mit Kobaltchlorid wird der hypoxische Effekt auf LX-2 Zellen durch Inkubation im sauerstoffarmen Milieu in einer Hypoxiekammer getestet. Nach sechs Stunden Hypoxie kann auch hier signifikant keine Veränderung der *CUX1*-Expressionsrate verzeichnet werden (Abbildung 13). *COL1A1* wird signifikant herunterreguliert, während *ACTA2* weiterhin stabil exprimiert wird. Es wird ebenfalls *HIF1A* und das Zielgen von HIF-1 *VEGFA* konstant exprimiert, während *SLC2A1* eine Steigerung der Expressionsrate entsprechend der Ergebnisse mit chemisch induzierter Hypoxie aufzeigt. Die Zellzyklusgene *CDKN1A* und *CDKN1B* bleiben unverändert exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

24 Stunden in der Hypoxiekammer wirken sich neutral auf die Genexpression von *CUX1* aus (Abbildung 14). Analog zur chemischen Hypoxie durch Kobaltchlorid werden die Aktivierungsgene (*COL1A1* und *ACTA2*) signifikant herunterreguliert. *HIF1A* wird in diesem Stadium signifikant supprimiert. Eine hypoxische Reaktion wird durch die Steigerung von *VEGFA* als Zielgen von HIF-1 nachgewiesen. *SLC2A1* wird stabil exprimiert. *HIF1AN* zeigt sich weiterhin unbeeinflusst. Interessanterweise wird eine relevante Steigerung der

Expressionsrate von *CDKN1A* nachgewiesen. *CDKN1B* wird hingegen weiterhin signifikant stabil exprimiert und durch die Hypoxie nicht moduliert.

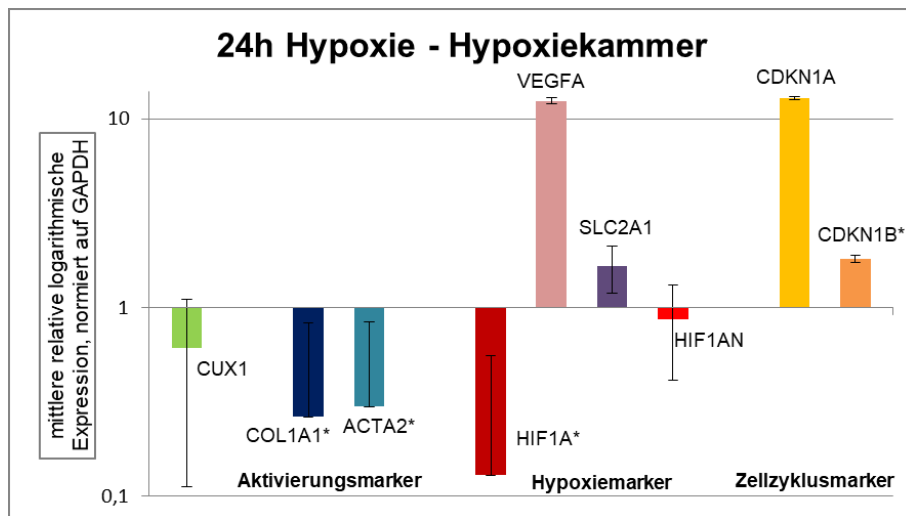


Abbildung 14 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie - Hypoxiekammer; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen; mittlere relative logarithmische Expression nach 24 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer, normiert auf das Houskeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM). Negative Werte der Standardfehler können in einer logarithmischen Skala nicht korrekt dargestellt werden; signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

### 3.5 Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von *CUX1* mittels qRT-PCR

Die Expression von *CUX1* wird mittels Einbringung von siRNA in die LX-2 Zellen herunterreguliert und diese wie in 2.2.1.6 für 48 Stunden mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Nach weiteren sechs und 24 Stunden Inkubation unter Normoxie wird durch qRT-PCR die Expressionsrate der zu untersuchenden Marker im Vergleich zur Expressionsrate der Negativkontrolle (NTC) ermittelt.

Im Vergleich zur Negativkontrolle kann eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Minderung der Expressionsrate von *CUX1* nachgewiesen werden (Abbildung 15). Der Knockdown von *CUX1* alleine zeigt nach sechs Stunden Wirkdauer keine modulierende Wirkung auf die weiterhin im Vergleich zur Negativkontrolle stabil exprimierten Aktivierungsgene. Ebenfalls nimmt die Suppression von *CUX1* keinen Einfluss auf die Expression des Hypoxiemarkergens *HIF1A* und den

Zielgenen von dessen Transkript *VEGFA* und *SLC2A1*. Diese werden konstant exprimiert. Jedoch zeigt sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Expressionsrate von *HIF1AN* und dem Zellzyklusgen *CDKN1A*. Die Expression von *CDKN1B* bleibt signifikant ( $p < 0,05$ ) unverändert im Vergleich zur Negativkontrolle.

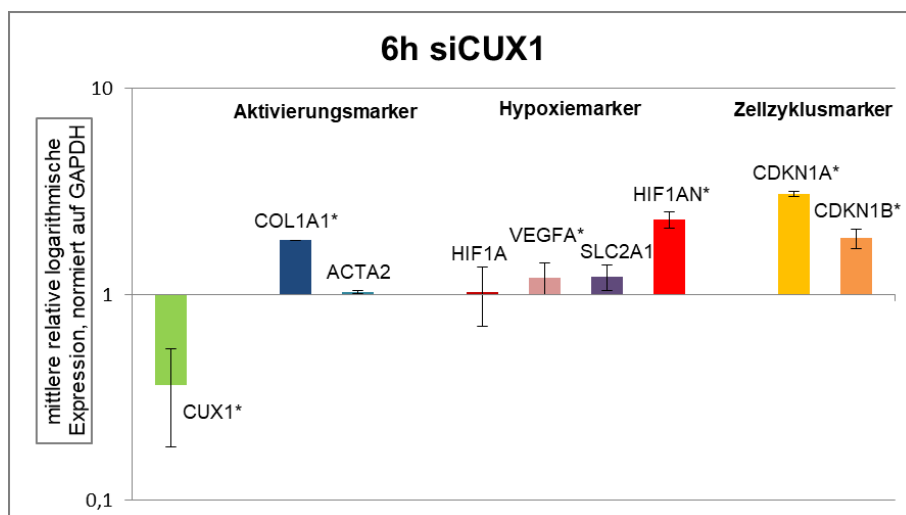


Abbildung 15 qRT-PCR: sechs Stunden siCUX1; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von CUX1; mittlere relative logarithmische Expression nach sechs Stunden Inkubation unter Normoxie, normiert auf das Houskeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Es wird analog auch bei 24 Stunden Wirkdauer nach Transfektion mit siRNA die erfolgreiche Suppression von *CUX1* nachgewiesen (Abbildung 16). Im Vergleich zu einer sechsstündigen Inkubation unter Normoxie nach Transfektion der siRNA wird jedoch nach 24 Stunden eine signifikant ( $p < 0,05$ ) negative Beeinflussung der Aktivierungsgene aufgezeigt. *HIF1A* wird signifikant ( $p < 0,05$ ) herunterreguliert. Die Zielgene, *VEGFA* und *SLC2A1*, werden hingegen weiterhin stabil exprimiert. *HIF1AN* weist eine stabile Expressionsrate auf, welche im Vergleich zu der sechsstündigen Inkubation unter Normoxie einer Suppression gleichkommt. Das Zellzyklusgen *CDKN1A* wird weiterhin signifikant ( $p < 0,05$ ) vermehrt exprimiert. *CDKN1B* erfährt eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Minderung der Expressionsrate.

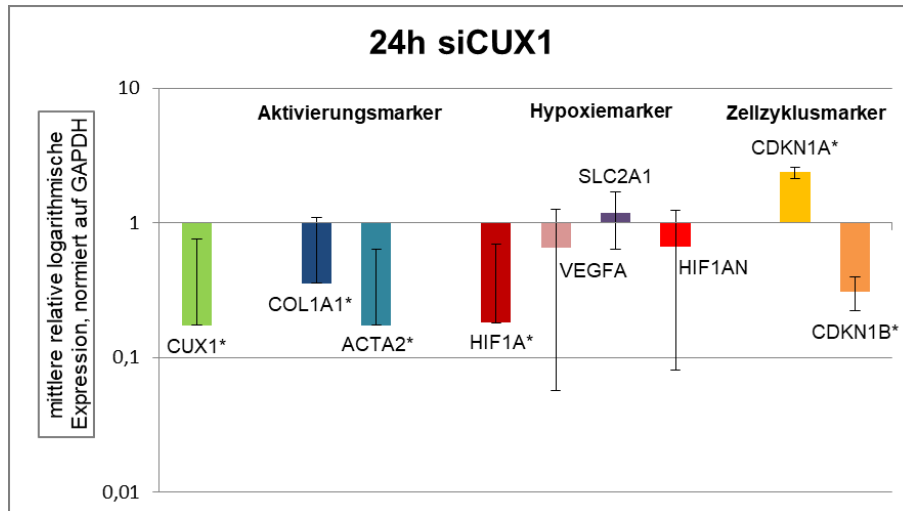


Abbildung 16 qRT-PCR: 24 Stunden siCUX1 ; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von CUX1; mittlere relative logarithmische Expression nach 24 Stunden Inkubation unter Normoxie, normiert auf das Houskeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM). Negative Werte der Standardfehler können in einer logarithmischen Skala nicht korrekt dargestellt werden; signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

### 3.6 Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von CUX1 und Hypoxie mittels qRT-PCR

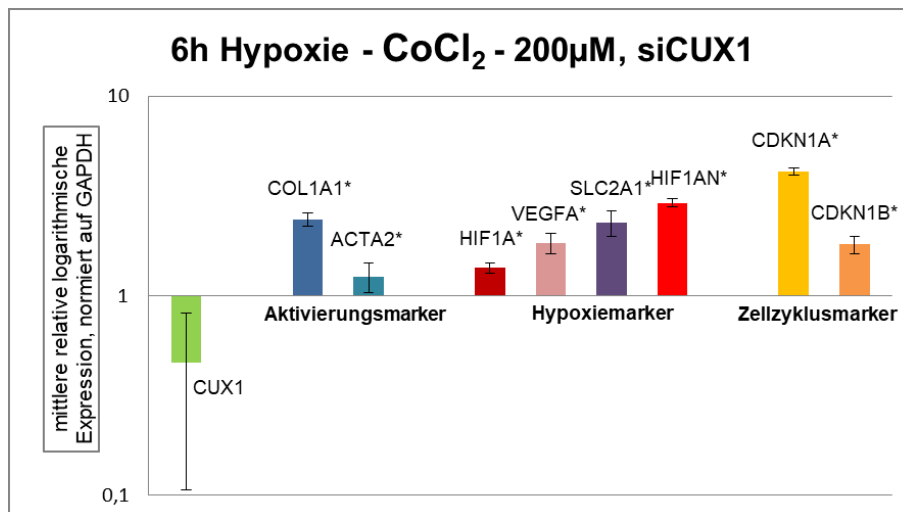


Abbildung 17 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie – CoCl<sub>2</sub> + siCUX1 ; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von CUX1; mittlere relative logarithmische Expression nach sechs Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid (200µM), normiert auf das Houskeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Durch qRT-PCR werden die Expressionsraten von Hypoxiemarkergenen, Aktivierungsmarkergenen für hepatische Fibrose und Zellzyklusmarkergenen bestimmt und mit der mit einer unspezifischen siRNA behandelten Negativkontrolle (NTC) verglichen.

Die Abbildung 17 demonstriert den Versuch der *CUX1*-Suppression in Kombination mit einer sechsstündigen Hypoxie induziert durch Kobaltchlorid. Die erfolgreiche *CUX1*-Supprimierung wird bewiesen. Interessanterweise führt der Knockdown von *CUX1* in Kombination mit einer sechsstündigen Hypoxie durch Kobaltchlorid zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Expressionsrate von *COL1A1*. *ACTA2* wird signifikant ( $p < 0,05$ ) stabil exprimiert. *HIF1A* und *VEGFA* bleiben unbeeinflusst mit konstanter Expressionsrate. Eine hypoxische Antwort der Zellen lässt sich jedoch durch signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung von *SLC2A1* nachweisen, wie bereits in den Versuchen mit reiner Hypoxie demonstriert worden ist. Auch bei diesem Versuch wird eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Expression von *HIF1AN* und *CDKN1A* beobachtet. *CDKN1B* wird signifikant ( $p < 0,05$ ) stabil exprimiert.

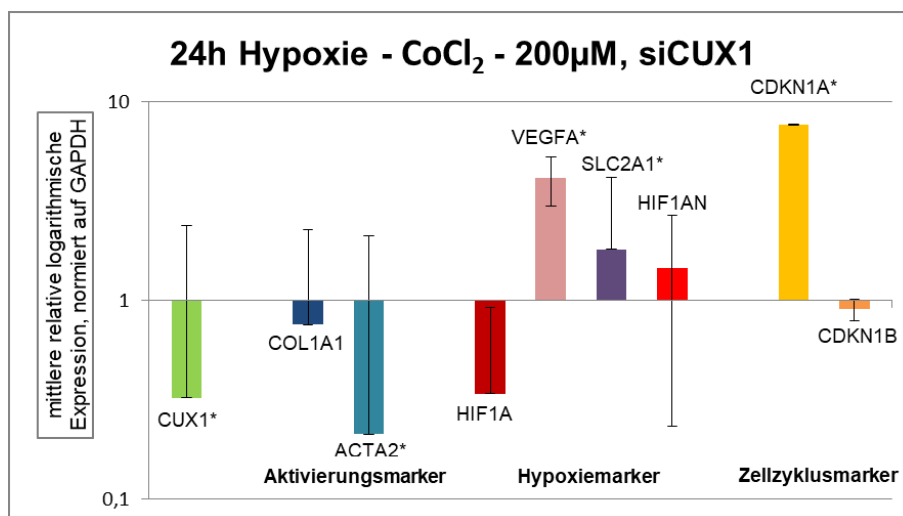


Abbildung 18 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie – CoCl<sub>2</sub> + siCUX1 ; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von CUX1; mittlere relative logarithmische Expression nach 24 Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid (200µM), normiert auf das Houskeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM). Negative Werte der Standardfehler können in einer logarithmischen Skala nicht korrekt dargestellt werden; signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Nach erfolgreicher und signifikanter ( $p < 0,05$ ) Suppression von *CUX1* in Kombination mit 24 Stunden Inkubation mit einer Kobaltchloridlösung wird eine

stabile Expression von *COL1A1* nachgewiesen (Abbildung 18). *ACTA2* wird sogar signifikant ( $p < 0,05$ ) vermindert exprimiert. Nach 24 Stunden Hypoxie zeigt sich das Hypoxiemarkergen *HIF1A* mit einer Verminderung seiner Expressionsrate. Es wird jedoch die Expression von *VEGFA* signifikant ( $p < 0,05$ ) gesteigert. Die *SLC2A1*-Expression bleibt stabil. Gleiches gilt für die nun konstante Expression von *HIF1AN*. Der Zellzyklusmarker *CDKN1A* wird weiterhin verstärkt mit Signifikanz ( $p < 0,05$ ) exprimiert. *CDKN1B* zeigt sich unbeeinflusst.

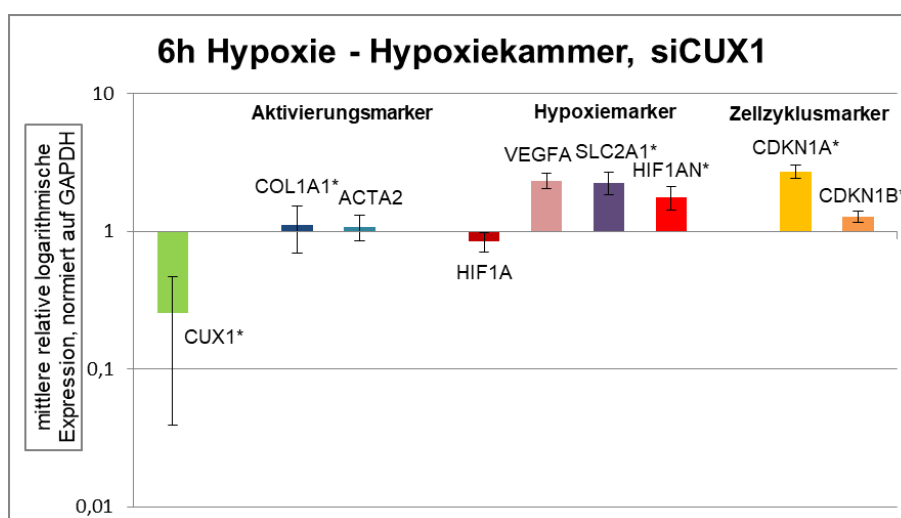


Abbildung 19 qRT-PCR: sechs Stunden Hypoxie – Hypoxiekammer + siCUX1; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von CUX1; mittlere relative logarithmische Expression nach sechs Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer, normiert auf das Housekeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM); signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Analog wird nach erfolgreicher *CUX1*-Suppression eine sechsstündige Hypoxie diesmal durch Inkubation im sauerstoffarmen Milieu induziert und die Genexpression der LX-2 Zellen getestet (Abbildung 19). Die Aktivierungsmarkergene werden stabil exprimiert. Als hypoxische Reaktion der Zellen nimmt bei stabiler Expression von *HIF1A* die Genexpression der Zielgene von HIF-1 -*VEGFA* und *SLC2A1*- stark zu. Interessanterweise wird kein positiv modulierender Effekt auf *HIF1AN* nachgewiesen. Jedoch zeigt sich auch hier eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Zunahme der Expression von *CDKN1A* und eine stabile Expression von *CDKN1B*.

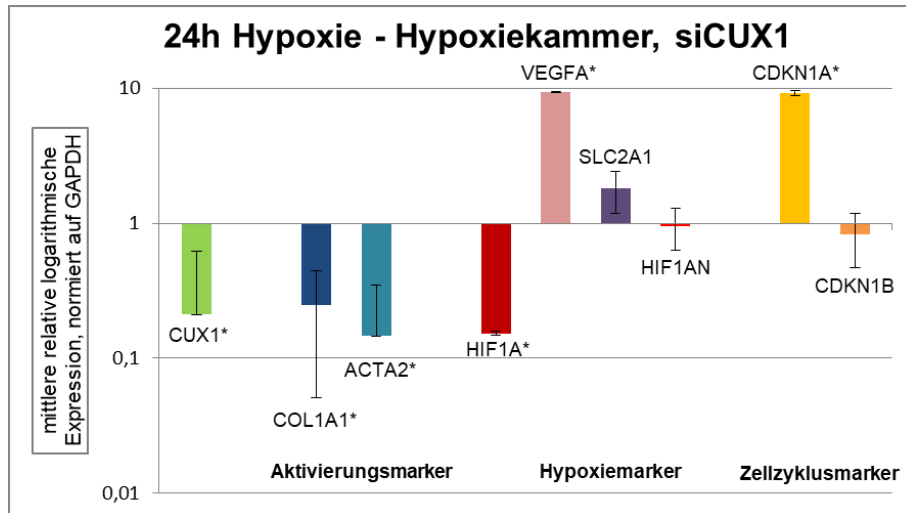


Abbildung 20 qRT-PCR: 24 Stunden Hypoxie – Hypoxiekammer + siCUX1; Messung der Expressionsrate von für Hypoxiemarker codierenden Genen, Aktivierungsgenen sowie Zellzyklusgenen unter Suppression von CUX1; mittlere relative logarithmische Expression nach 24 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer, normiert auf das Housekeeping-Gen GAPDH; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM). Negative Werte der Standardfehler können in einer logarithmischen Skala nicht korrekt dargestellt werden; signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) mit \* markiert.

Nach erfolgreicher CUX1-Suppression und 24 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer wird vergleichbar mit den Versuchen kobaltchloridinduzierter Hypoxie eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme der Expressionsrate der Aktivitätsgene bewiesen (Abbildung 20). Ebenfalls wird HIF1A signifikant ( $p < 0,05$ ) herunterreguliert. Hingegen kann auch hier noch eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Expressionsrate von VEGFA beobachtet werden. SLC2A1 wird nach 24 Stunden Hypoxie stabil exprimiert. HIF1AN bleibt weiterhin stabil exprimiert. Die Zellzyklusgene werden wie zuvor beschrieben signifikant ( $p < 0,05$ ) stark (CDKN1A) oder stabil (CDKN1B) exprimiert.

### 3.7 Zusammenfassung der qRT-PCR Daten

Nachfolgend werden die Ergebnisse aus den Versuchen 3.4 – 3.6 übersichtlich und zusammenhängend beschrieben.

Die Supprimierung von *CUX1* mit siRNA kann in transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

Hypoxie nimmt keinen Einfluss auf die Expression von *CUX1*.

Eine Aktivierung der Zellen bei gesteigerter Expression von *COL1A1* kann nur bei *CUX1*-Suppression in Kombination mit durch kobaltchloridinduzierter, sechsständiger Hypoxie nachgewiesen werden.

Reine Hypoxie oder die Supprimierung von *CUX1* allein weisen jeweils initial stabile Expressionsraten der Aktivitätsgene auf, die nach längerer Wirkdauer jedoch abnehmen.

Das Hypoxiemarkergen *HIF1A* wird unbeeinflusst von Hypoxie, *CUX1*-Suppression oder der Kombination aus beiden nach sechs Stunden Inkubation stabil exprimiert. Erst Inkubationsintervalle von 24 Stunden, unabhängig der Behandlung der Zellen, führen zu einer Abnahme der Expression.

Reine Hypoxie induziert nach sechs Stunden einen Anstieg der *SLC2A1*-Expression, wohingegen *VEGFA* nur nach 24 Stunden Inkubation unter hypoxischen Bedingungen in der Hypoxiekammer vermehrt exprimiert wird. Die Suppression von *CUX1* nimmt keinen Einfluss auf die Expression von *SLC2A1*, jedoch auf die Expression von *VEGFA*. *VEGFA* wird vermehrt bei *CUX1*-Suppression unter hypoxischen Bedingungen exprimiert.

Hypoxie nimmt keinen Einfluss auf die Expression des für den Gegenspieler von HIF-1 codierenden Gens *HIF1AN*. Jedoch führt eine Suppression von *CUX1* nach sechs Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Expressionsrate unabhängig des Sauerstoffniveaus.

Das Zellzyklusmarkergen *CDKN1A* wird unter *CUX1*-Knockdown hochreguliert. Hypoxie spielt bis auf eine Ausnahme, die eine Steigerung der Expressionsrate nach 24 Stunden Hypoxie verursacht, keine Rolle bei der Expression des Zellzyklusmarkergens *CDKN1A*. *CDKN1B* bleibt unbeeinflusst von *CUX1*-Suppression, Hypoxie oder der Kombination aus beiden.



### 3.8 Ergänzung der qRT-PCR Daten durch Western Blot

#### CUX1

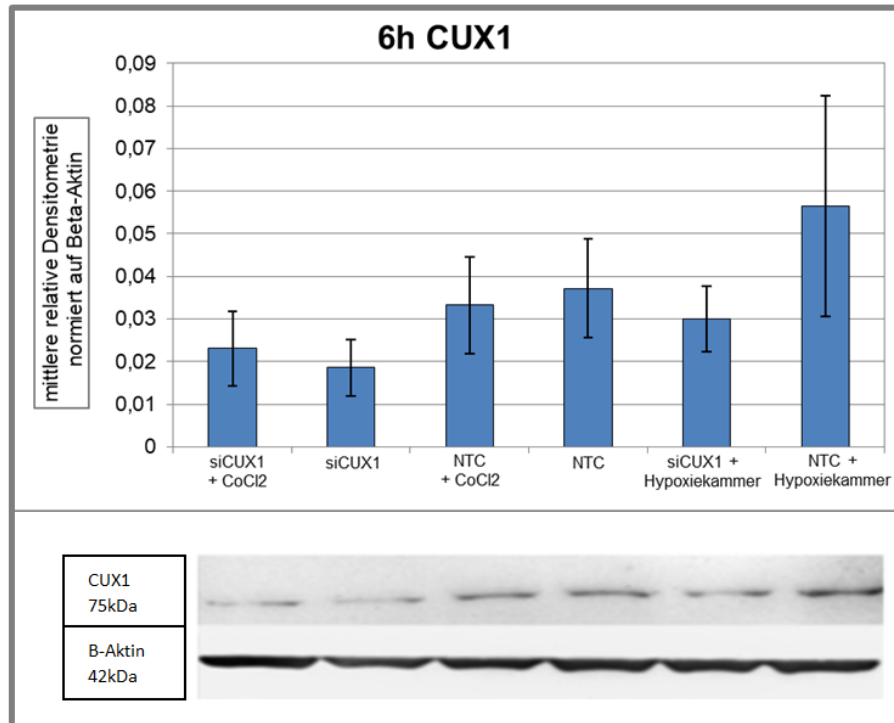


Abbildung 21 Bestimmung des Proteinlevels von CUX1 durch Western Blot nach unterschiedlicher Behandlung der LX-2 Zellen und sechs Stunden Inkubationszeit unter Normoxie, bzw. Hypoxie (200µM CoCl<sub>2</sub> oder Hypoxiekammer), qualitative und quantitative (durch Densitometrie) Darstellung normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

Auf Proteinebene kann durch Western Blot nach unterschiedlicher Behandlung der Zellen und sechsständiger Inkubation unter normoxischen oder hypoxischen Verhältnissen CUX1 als Proteinbande nur bei 75 Kilodalton identifiziert werden (Abbildung 21). Banden mit Protein von Beta-Aktin werden als Ladekontrollen bei 42 Kilodalton sichtbar. Bereits die qualitative Analyse der Proteinbanden zeigt aber anhand der Intensität der Banden im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe (NTC) die verringerte Proteinsynthese von CUX1 bei mit siRNA gegen CUX1 behandelten Zellen. Quantitativ kann das Ergebnis durch densitometrische Messung verifiziert werden. Zellen mit CUX1-Knockdown weisen signifikant eine Verringerung der relativen Proteinsynthese von CUX1 um den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (NTC) auf. Die nach CUX1-Suppression mit Kobaltchlorid behandelten Zellen exprimieren das

Protein um einen Faktor von 1,6 signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger. Auch wenn bei den Zellen mit *CUX1*-Suppression und Inkubation in der Hypoxiekammer leider keine statistische Signifikanz vorliegt, synthetisieren diese laut densitometrischer Messung das *CUX1*-Protein im Vergleich zur Kontrollgruppe nur zu 80 Prozent, also ebenfalls zu einer geringeren Rate. Bemerkenswerterweise zeigt sich eine isoliert erhöhte Proteinsynthese von *CUX1* bei der in der Hypoxiekammer inkubierten Kontrollgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die mit Kobaltchlorid behandelte Kontrollgruppe weist eine stabile *CUX1*-Proteinsynthese auf. Es kann demnach kein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Effekt der Hypoxie auf die *CUX1*-Proteinbildung ausgemacht werden.

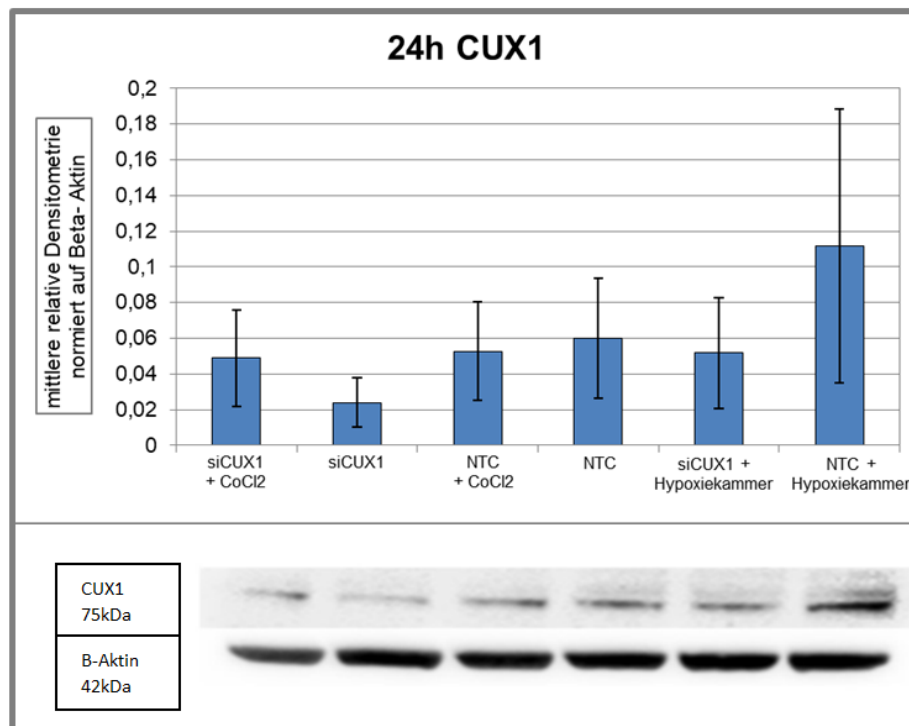


Abbildung 22 Bestimmung des Proteinlevels von *CUX1* durch Western Blot nach unterschiedlicher Behandlung der LX-2 Zellen und 24 Stunden Inkubationszeit unter Normoxie, bzw. Hypoxie (200 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> oder Hypoxiekammer), qualitative und quantitative (durch Densitometrie) Darstellung normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen unter Normoxie, bzw. Hypoxie nach unterschiedlicher Behandlung können ebenfalls Proteinbanden von *CUX1* in allen Versuchsgruppen bei 75 Kilodalton ausgemacht werden (Abbildung 22). Auch hier zeigt sich eine Abnahme der Proteinbiosynthese von *CUX1* bei den

mit siRNA gegen *CUX1* behandelten Zellen. Dabei ist qualitativ eine stärkere Abnahme der Proteinkonzentration der Zellen anhand der Intensität der Proteinbanden zu erkennen, die eine reine *CUX1*-Suppression, bzw. Supprimierung von *CUX1* kombiniert mit chemischer Hypoxie erhalten haben, als bei den Zellen, die nach *CUX1*-Knockdown in der Hypoxiekammer behandelt werden. Zudem fällt analog zu den Ergebnissen nach sechsstündiger Inkubation eine isoliert verstärkte Proteinbande von *CUX1* bei der in der Hypoxiekammer behandelten Kontrollgruppe auf. Die quantitative Auswertung mittels Densitometrie kann durch Verringerung der relativen Menge enthaltenen Proteins pro Bande in Bezug auf Beta-Aktin die *CUX1*-Suppression bestätigen, jedoch liegt keine statistische Signifikanz der Ergebnisse vor. Beachtenswerterweise zeigt sich auch in der quantitativen Messung eine isoliert erhöhte Proteinkonzentration der Kontrollgruppe, welche in der Hypoxiekammer inkubiert wird, jedoch auch ohne Signifikanz.

## HIF-1-alpha

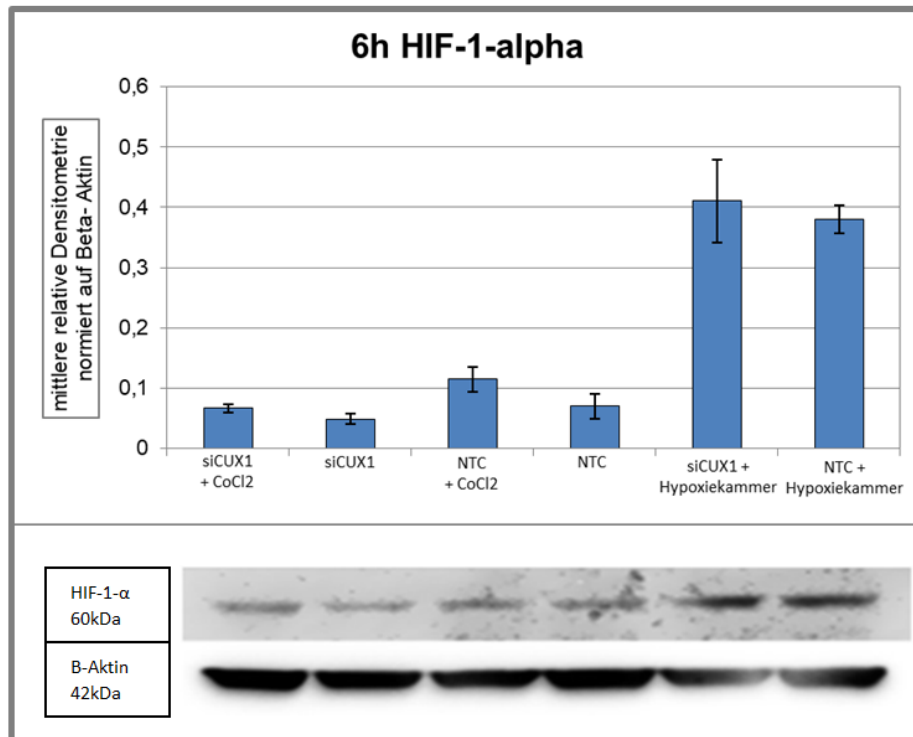


Abbildung 23 Bestimmung des Proteinlevels von HIF-1-alpha durch Western Blot nach unterschiedlicher Behandlung der LX-2 Zellen und sechs Stunden Inkubationszeit unter Normoxie, bzw. Hypoxie (200µM CoCl<sub>2</sub> oder Hypoxiekammer), qualitative und quantitative (durch Densitometrie) Darstellung normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

Die Zielsetzungen dieser Arbeit inkludieren die Frage, ob eine Korrelation zwischen CUX1 und HIF-1-alpha besteht. Im Western Blot werden Proteinbanden von HIF-1-alpha bei 60 Kilodalton identifiziert. Als Ladekontrolle dient ebenfalls Beta-Aktin. Nach sechstündiger Inkubation unter normoxischen oder hypoxischen Verhältnissen zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (NTC) verstärkte Signale der Banden der in der Hypoxiekammer behandelten Zellen unabhängig von spezifisch oder unspezifisch transfizierter siRNA (Abbildung 23). Dieses Ergebnis wird in der Densitometrie mit Signifikanz ( $p < 0,05$ ) bei Zunahme der relativen Proteinmenge um den Faktor 5,86 (*siCUX1* + Hypoxiekammer), bzw. 5,4 (NTC + Hypoxiekammer) bestätigt. Somit kann auf Proteinebene nach sechs Stunden Inkubation die hypoxische Antwort unabhängig der *CUX1*-Expression bestätigt werden. Ein nicht so starker Effekt, aber anhand der Intensität der Proteinbanden zu erahnen, ist die leichte Steigerung der HIF-1-alpha-Proteinsynthese nach kobaltchloridinduzierter

Hypoxie. In der Densitometrie lässt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (NTC) ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Effekt und eine Steigerung der relativen Proteinbildung um den Faktor 1,6 der Versuchsgruppe (NTC +  $\text{CoCl}_2$ ) nachweisen. Zellen mit *CUX1*-Suppression und Kobaltchloridbehandlung zeigen eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Proteinsynthese von HIF-1-alpha im Vergleich zu NTC. Interessanterweise wird das HIF-1-alpha-Protein nach reiner Suppression von *CUX1* laut Densitometrie zu 30 Prozent weniger exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe (NTC). Eine Signifikanz des Ergebnisses wird hier allerdings nicht nachgewiesen.

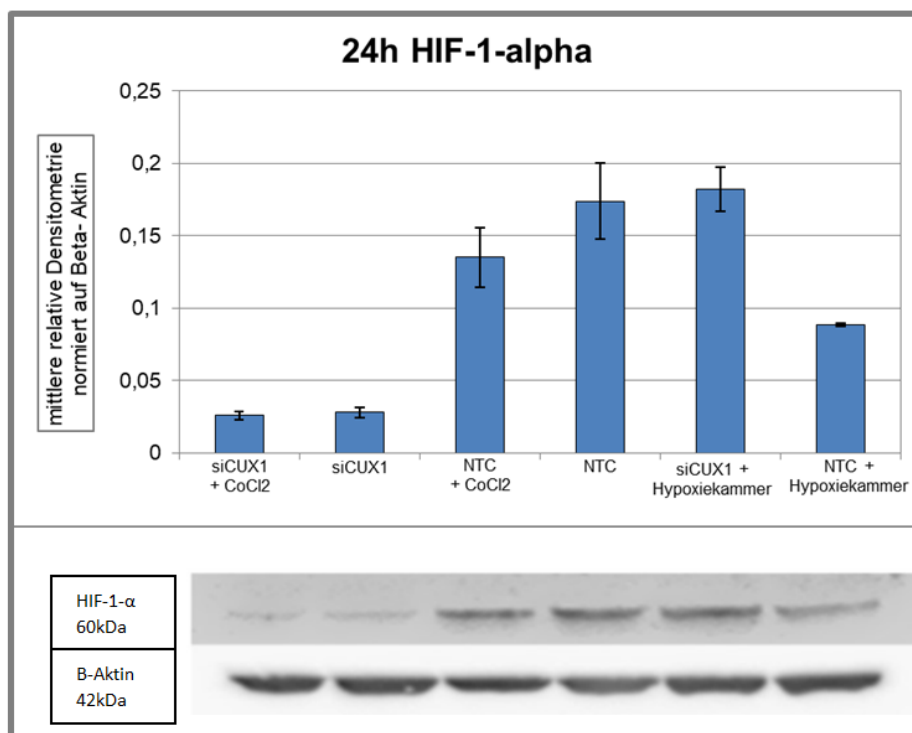


Abbildung 24 Bestimmung des Proteinlevels von HIF-1-alpha durch Western Blot nach unterschiedlicher Behandlung der LX-2 Zellen und 24 Stunden Inkubationszeit unter Normoxie, bzw. Hypoxie ( $200\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  oder Hypoxiekammer), qualitative und quantitative (durch Densitometrie) Darstellung normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM).

Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen unter Normoxie, bzw. Hypoxie wird eine qualitativ sichtbare und quantitativ signifikante Abnahme des HIF-1-alpha-Proteinlevels in allen Versuchsgruppen unabhängig der Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (NTC) beobachtet (Abbildung 24). Eine Ausnahme stellt die stabile Proteinsynthese von HIF-1-alpha in den in der Hypoxiekammer behandelten Zellen mit *CUX1*-Suppression dar. Im Vergleich zu der

sechsstündigen Inkubation ist hier aber auch von einer Abnahme des Proteinlevels zu sprechen. In Bezug auf eine fragliche Korrelation von CUX1- und HIF-1-alpha-Proteinsynthese zeigt sich ein Paradoxon. Mit Signifikanz ( $p < 0,05$ ) kann bei den in der Hypoxiekammer behandelten Versuchsgruppen eine niedrigere Syntheserate von HIF-1-alpha-Protein bei der Kontrollgruppe beobachtet werden im Vergleich zu den Zellen mit CUX1-Suppression. Bei den Zellen, welche chemischinduzierter Hypoxie ausgesetzt sind, zeigt sich eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Expression von HIF-1-alpha-Protein im Vergleich zu Zellen mit CUX1-Suppression, wenn auch insgesamt betrachtet im Vergleich zu NTC eine Herunterregulierung zu beobachten ist.

### Kollagen-Typ-I

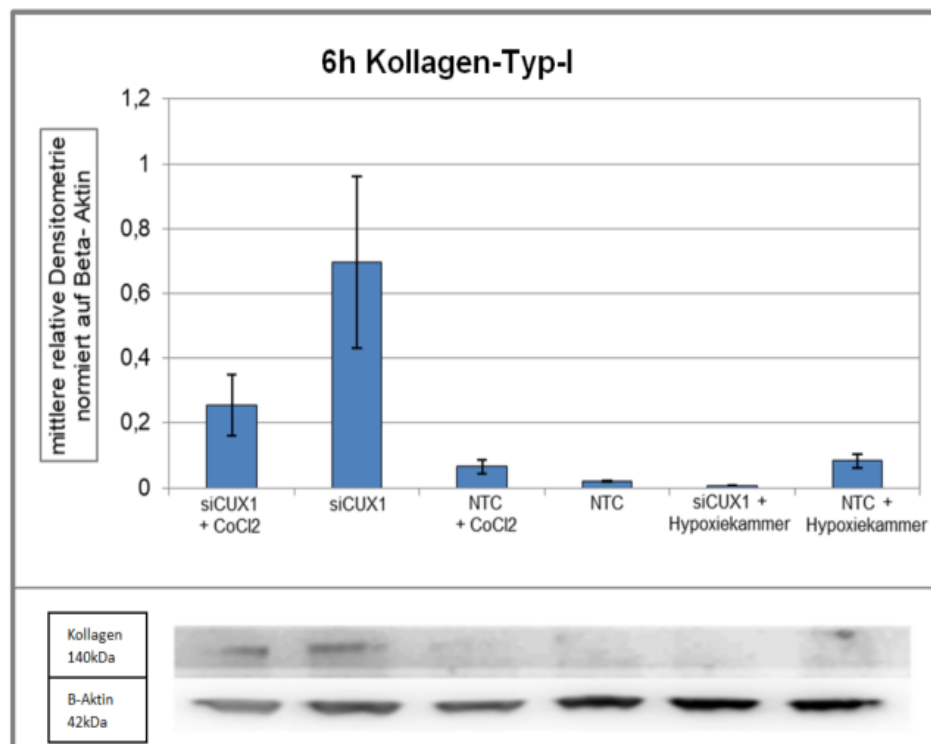


Abbildung 25 Bestimmung des Proteinlevels von Kollagen-Typ-I durch Western Blot nach unterschiedlicher Behandlung der LX-2 Zellen und sechs Stunden Inkubationszeit unter Normoxie, bzw. Hypoxie (200 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> oder Hypoxiekammer), qualitative und quantitative (durch Densitometrie) Darstellung normiert auf das Housekeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

Die Abbildung 25 demonstriert die Proteinbiosynthese von Kollagen-Typ-I nach Behandlung der Zellen mit spezifisch gegen CUX1 oder unspezifisch gerichteter siRNA und anschließender Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie über sechs

Stunden. Bei positiver Ladekontrolle von Beta-Aktin bei allen Versuchsgruppen bei 42 Kilodalton zeigen sich qualitativ im Blot nur isoliert Proteinbanden von Kollagen-Typ-I bei 140 Kilodalton. Dementsprechend ist bei der Kontrollgruppe (NTC), der mit Kobaltchlorid behandelten Kontrollgruppe und den Zellen mit *CUX1*-Suppression und Behandlung in der Hypoxiekammer von keiner, bzw. sehr geringer Proteinexpression auszugehen. Auf Proteinebene wird eine in der Densitometrie gemessene relative Erhöhung der Proteinsynthese bei Zellen mit reiner *CUX1*-Suppression, bzw. mit *CUX1*-Suppression in Kombination mit Kobaltchloridbehandlung nach sechs Stunden Inkubation gemessen. Es kann jedoch leider keine Signifikanz dieser Variation bewiesen werden. Hervorzuheben ist, dass die punktförmige Proteinansammlung der in der Hypoxiekammer behandelten Kontrollgruppe hingegen eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Proteinsynthese aufweist.

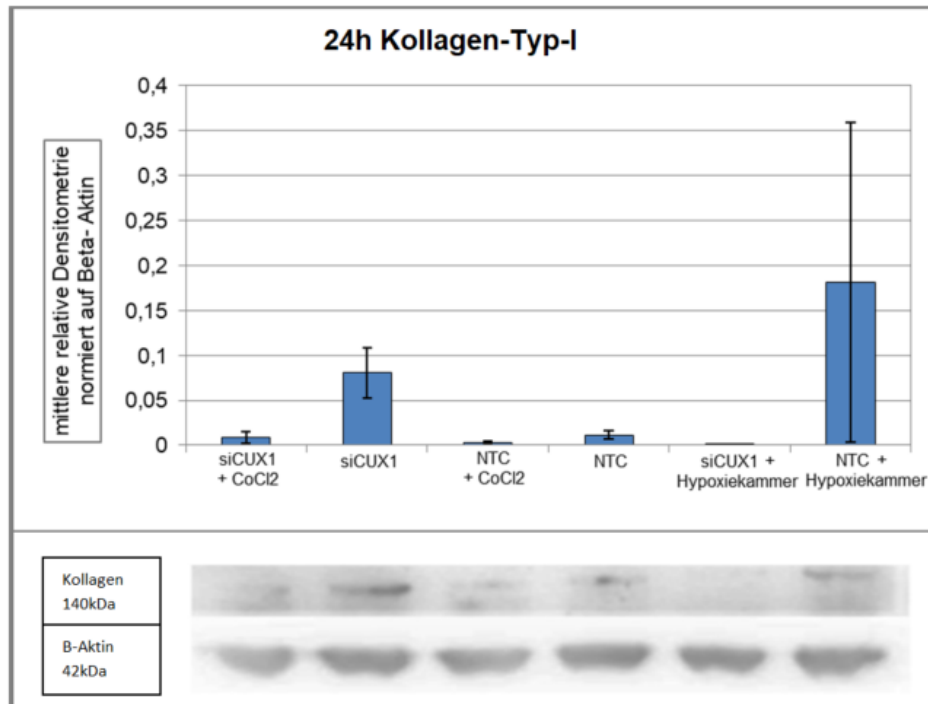


Abbildung 26 Bestimmung des Proteinlevels von Kollagen-Typ-I durch Western Blot nach unterschiedlicher Behandlung der LX-2 Zellen und 24 Stunden Inkubationszeit unter Normoxie, bzw. Hypoxie (200µM CoCl<sub>2</sub> oder Hypoxiekammer), qualitative und quantitative (durch Densitometrie) Darstellung normiert auf das Houskeeping-Gen Beta-Aktin; Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen kann ein schwaches Signal der Proteinbande von Kollagen-Typ-I bei ca. 140 Kilodalton von der Kontrollgruppe (NTC) ausgemacht werden (Abbildung 26). Es zeigt sich ein stärkeres Signal der Zellen mit reinem CUX1-Knockdown. Die quantitative Analyse beweist eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung um den Faktor 8. Die anderen Versuchsgruppen zeigen eine stabile, geringe Proteinsynthese von Kollagen-Typ-I im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Ausnahme stellt die Bande der in der Hypoxiekammer behandelten Kontrollgruppe dar, welche eine Zunahme der Proteinsynthese von Kollagen-Typ-I qualitativ suggeriert, jedoch nicht mit Signifikanz in der Densitometrie belegt werden kann.



### 3.9 Messung der Aktivität von HIF-1-alpha mittels einer Luciferase- Reportergen- Analyse

Durch Messung der Luciferaseaktivität kann Rückschluss auf die Aktivität des Hypoxiemarkers geschlossen werden, da sich die Luciferaseaktivität proportional zur HIF-1-alpha-Aktivität verhält.

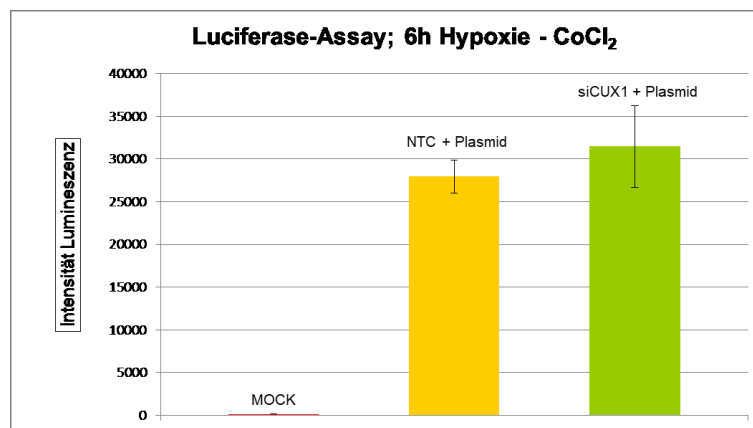


Abbildung 27 Luciferase-Assay nach Doppeltransfektion mit rekombinantem Plasmid und unspezifischer (NTC) oder spezifisch gegen CUX1 gerichteter siRNA sowie sechs Stunden Hypoxie durch 200µM CoCl<sub>2</sub>; Negativkontrolle (MOCK): sechs Stunden Normoxie nach Transfektion unspezifischer siRNA; Darstellung der Intensität der Lumineszenz (= proportional zur HIF-1-alpha Aktivität zu werten); Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

Die Negativkontrolle (MOCK), welche Normoxie ausgesetzt ist, zeigt, wie zu erwarten, nach sechs Stunden keinen Anstieg der Hypoxiemarkeraktivität (Abbildung 27). Die Zellen, welche für sechs Stunden Hypoxie ausgesetzt sind, können im Vergleich zur Negativkontrolle (MOCK) einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg der Faktoraktivität von HIF-1-alpha aufzeigen. Es kann in Übereinstimmung mit vorangegangenen Ergebnissen gezeigt werden, dass eine CUX1-Suppression keinen direkten Einfluss auf die HIF-1-alpha-Aktivität nimmt. Es besteht keine Korrelation der beiden Faktoren.

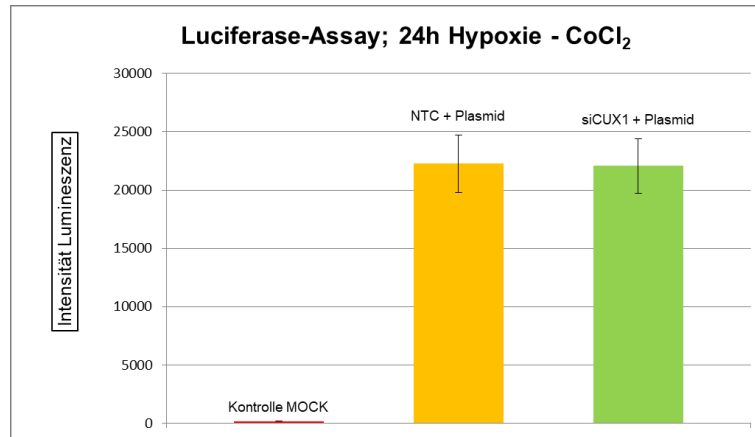


Abbildung 28 Luciferase-Assay nach Doppeltransfektion mit rekombinantem Plasmid und unspezifischer (NTC) oder spezifisch gegen *CUX1* gerichteter siRNA, sowie 24 Stunden Hypoxie durch 200µM CoCl<sub>2</sub>; Negativkontrolle (MOCK): 24 Stunden Normoxie nach Transfektion unspezifischer siRNA; Darstellung der Intensität der Lumineszenz (= proportional zur HIF-1-alpha Aktivität zu werten); Darstellung Mittelwert +/- Standardfehler (SEM).

Analog werden die Zellen einer Inkubationszeit von 24 Stunden ausgesetzt (Abbildung 28). Auch hier zeigt sich ein positives Testergebnis. Ebenfalls kann bewiesen werden, dass die HIF-1-alpha-Aktivität allein durch einen hypoxischen Reiz signifikant zunimmt, dies jedoch unabhängig von der *CUX1*- Expression.

### 3.10 FACS-Validierung der Proteinexpression von alpha-SMA

Abbildung 29 zeigt die Auswertung der FACS-Analyse zur Untersuchung der alpha-SMA-Proteinsynthese in LX-2-Zellen mit unterschiedlicher Behandlung und sechsständiger Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie. Die ungefärbte Leerprobe ist deutlich von der Negativ- und Positivkontrolle abzugrenzen. Die Negativkontrolle und Positivkontrolle überlappen leicht. Es kann dennoch ein Bereich definiert werden, der für alpha-SMA als positiv zu werten gilt.

Die Ergebnisse zeigen, dass in allen Versuchsgruppen alpha-SMA synthetisiert wird, es jedoch trotz unterschiedlicher Behandlung der Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen gibt. Weder die Expression von *CUX1*, noch ein Unterschied im Sauerstoffniveau nimmt einen modulierenden Einfluss auf die Proteinvorkommen von alpha-SMA in den Zellen. Diese Analyse bestätigt die Beobachtungen aus der qRT-PCR.

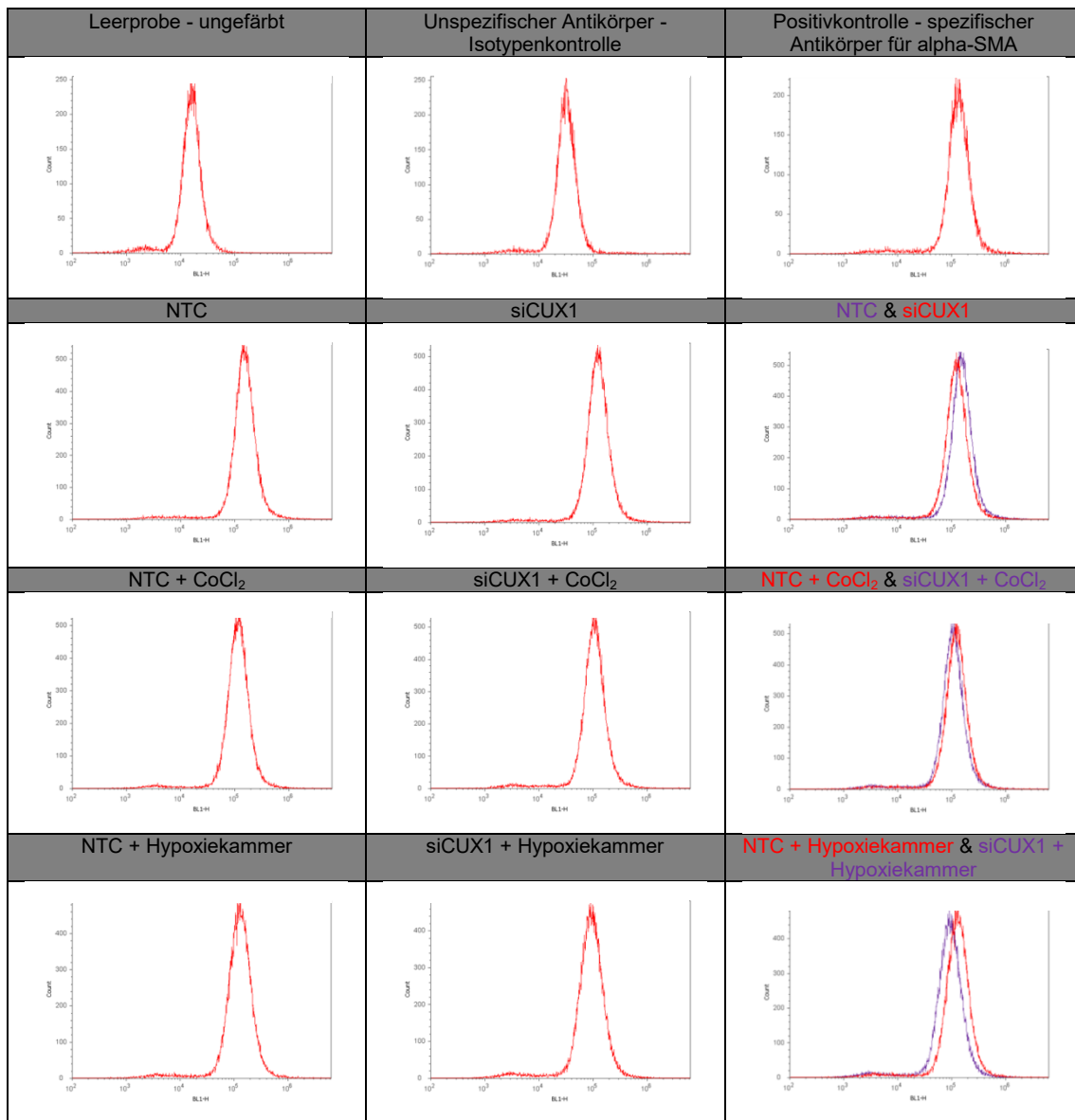


Abbildung 29 FACS Analyse alpha-SMA, sechs Stunden Inkubationsintervall

Analog wird die Analyse für ein Inkubationsintervall von 24 Stunden vorgenommen (Abbildung 30). Alle Versuchsgruppen exprimieren alpha-SMA und zeigen demnach eine messbare Fluoreszenz im positiven Bereich. Hier kann aber auch kein signifikanter Unterschied abhängig von *CUX1*-Expression und/oder Sauerstoffniveau ausgemacht werden.

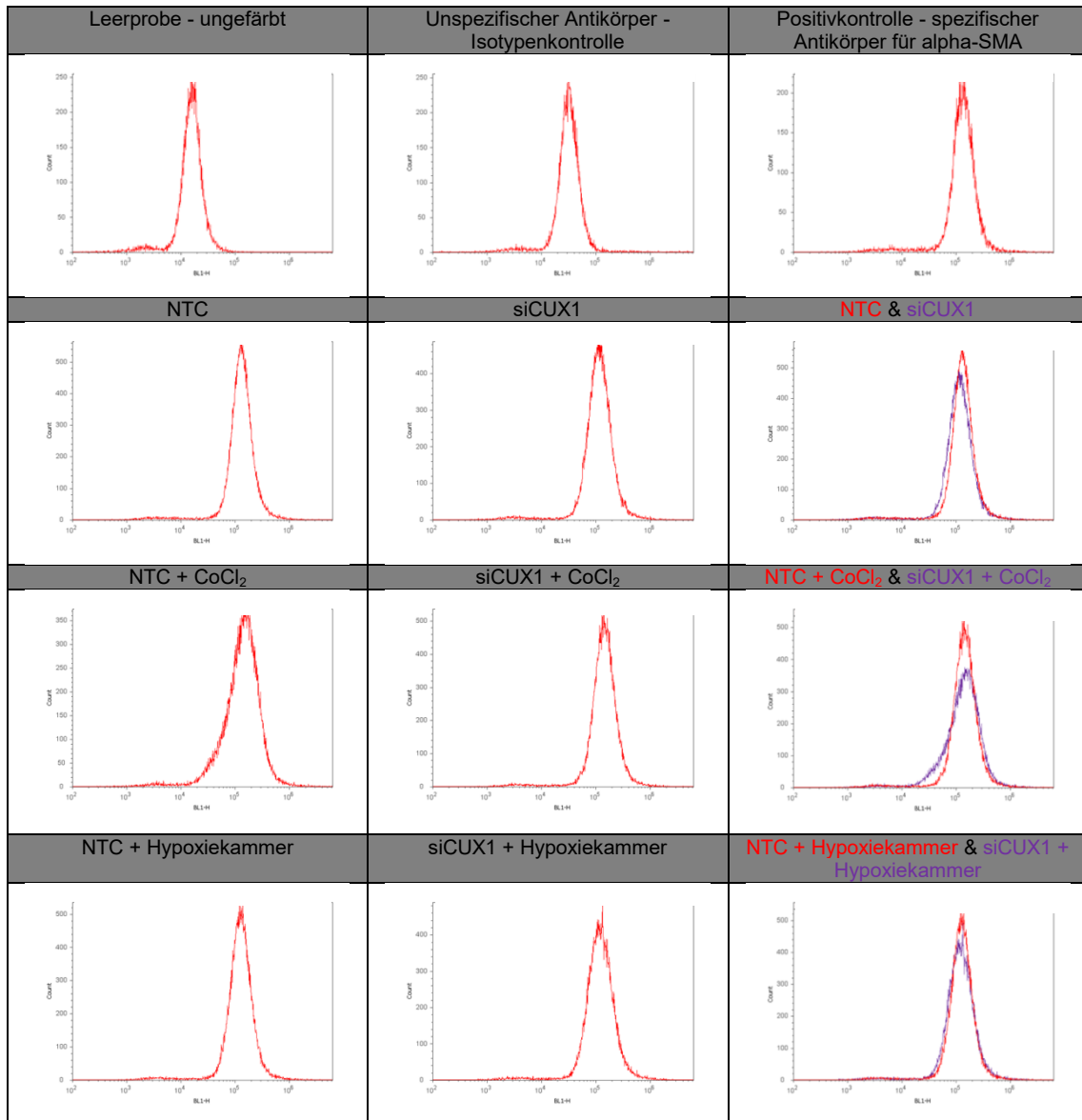


Abbildung 30 FACS Analyse alpha-SMA, 24 Stunden Inkubationsintervall

### 3.11 Morphologie der Zellen

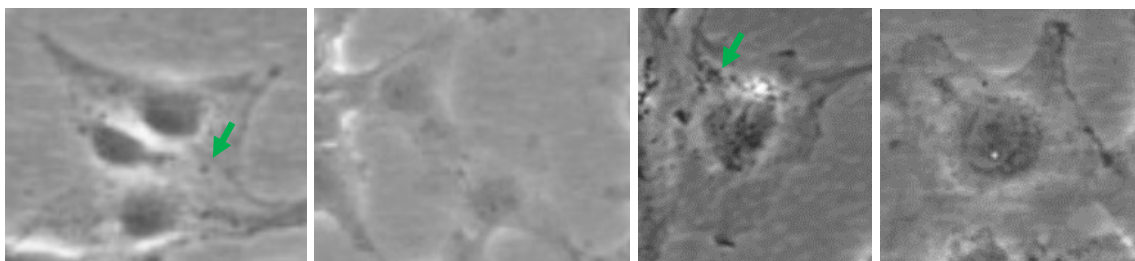


Abbildung 31 Morphologie der hepatischen Sternzelle: LX-2, Zellkultur, unbehandelt; grüner Pfeil: Retinoidtröpfchen.

Unter Verwendung eines Lichtmikroskops wird die Morphologie der LX-2-Zellen beurteilt. Abbildung 31 zeigt die Morphologie der unbehandelten hepatischen Sternzelle der immortalisierten Zelllinie LX-2 in der Zellkultur. Auffällig ist der runde Kern, sowie spindelförmige Zellkörper mit sternförmigen Zytoplasmaausläufern. Sternzellen speichern in ihrem Zytoplasma Vitamin A in Retinoidtröpfchen (Friedman 2008). In den lichtmikroskopischen Bildern lassen sich diese zytoplasmatischen Tröpfchen erahnen (siehe grüner Pfeil). In Abbildung 32a) werden unbehandelte LX-2-Zellen in der Zellkultur gezeigt. Diese zeigen vorwiegend das Bild spindel-/sternförmiger Zellkörper mit rundem Zellkern. Die Konfluenz der Zellen, die Hypoxie ausgesetzt sind, erschwert in Abbildung 32b) die Beurteilung der Morphologie. Erkennbar sind jedoch spindelförmige Zellkörper, entsprechend dem ruhenden Phänotyp. Es lassen sich zudem Retinoidtröpfchen im Zytoplasma vermuten.

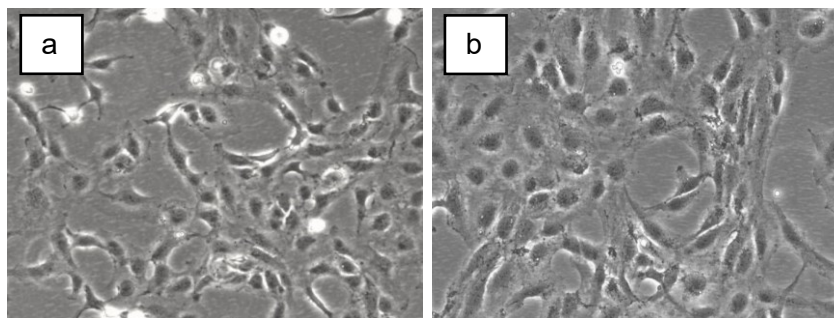


Abbildung 32 Morphologie der hepatischen Sternzelle: LX-2, Zellkultur; a) Normoxie, b) Hypoxie

Die Zellen in Abbildung 33 sind mit siRNA gegen *CUX1* transfiziert und Normoxie (a) oder Hypoxie (b) ausgesetzt. Unabhängig des Sauerstoffniveaus zeigt sich ein ähnliches Bild. Spindelförmige, schmale und abgerundete Zellkörper mit Zytoplasmaausläufern dominieren das Bild. Retinoidvakuolen lassen sich erahnen.

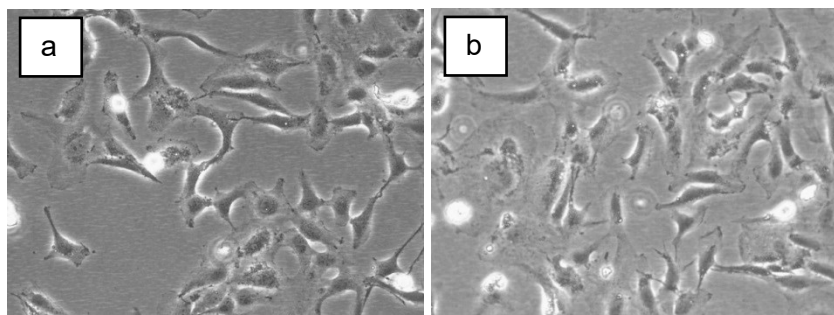


Abbildung 33 Morphologie der hepatischen Sternzelle: LX-2, Zellkultur; a) siCUX1, b) siCUX1 + Hypoxie

## 4 Diskussion

### 4.1 Hypoxische Antwort der LX-2 Zellen

Hypoxie stellt einen Hauptfaktor bei der Entstehung von Zellschäden dar und spielt eine wichtige Rolle in der Genese akuter und chronischer Lebererkrankungen (Shi et al. 2007). Frühere Studien zeigen, dass eine Verbindung zwischen Hypoxie und Fibrogenese der Leber besteht (Corpechot et al. 2002). Die HIF-Familie von Transkriptionsfaktoren gilt als primärer Effektor der adaptiven Reaktion auf Hypoxie (Metzen und Ratcliffe 2004). Unter den über 100 regulierten Genen von HIF sind *VEGFA* und *SLC2A1* zu nennen, die zur Anpassung, dem Überleben und auch zu Pathologien der Zelle bei niedrigem Sauerstoffniveau beitragen (Shi et al. 2007; C. P. Bracken et al. 2003; Forsythe et al. 1996; Benjamin L. Ebert et al. 1995). In experimentellen Modellen einer Leberfibrose wird eine HIF-Stabilisierung beobachtet (Moon et al. 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HIF zur Fibrosenentwicklung beitragen kann.

Um die Relevanz der Hypoxie in der Pathogenese der Leberfibrose näher zu evaluieren, wird in dieser Arbeit der in vitro Effekt von niedrigen Sauerstoffverhältnissen durch zwei unterschiedliche Modelle an der human hepatischen Sternzelllinie LX-2 untersucht. Hierfür kommen das Modell der Hypoxiekammer mit niedrigem Sauerstoffniveau und eine chemisch induzierte Hypoxie durch eine Kobaltchloridlösung zum Einsatz. Kobaltchlorid kann die Alphauntereinheit des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1-alpha) stabilisieren und den Effekt von Sauerstoffmangel auf die Zelle nachahmen. Die Verwendung von Kobaltchlorid in vitro erhöht HIF-1-alpha jedoch in einer dosis- und zeitabhängigen Weise. Für verschiedene Zelllinien kann bisher ein völlig anderes Verhalten und eine andere Anfälligkeit für Kobaltchloridkonzentrationen und Inkubationszeiten beobachtet werden. Konzentrations- und Zeitabhängigkeitskurven müssen deshalb je nach Zellart zunächst bestimmt werden (Muñoz-Sánchez und Chánez-Cárdenas 2018; Horev-Azaria et al. 2011). Die Versuche in dieser Arbeit zur Etablierung des Hypoxiemodells orientieren sich an vorangegangenen Arbeiten. Im Allgemeinen kann in verschiedenen Studien an unterschiedlichsten Zellarten gezeigt werden, dass

Konzentrationen zwischen 100 und 300 Mikromolar den gewünschten hypoxischen Effekt erzielen. Zudem wird nach zwei Stunden Inkubation mit Kobaltchlorid eine Stabilisierung von HIF-1-alpha beobachtet, die ihr Maximum nach 12 bis 48 Stunden erreicht. Bei Konzentrationen über 200 bis 300 Mikromolar, bzw. bei einer Inkubationszeit größer 48 Stunden, übt Kobaltchlorid einen toxischen Effekt auf die Zellen aus, der durch Generierung oxidativer DNA-Schäden durch ROS kombiniert mit einer Hemmung der DNA-Reparatur zum Zelltod führt (Muñoz-Sánchez und Chánez-Cárdenas 2018; Lison 2001). In Anlehnung an diese Forschungsergebnisse kann in dieser Arbeit ein Hypoxiemodell durch Anwendung von Kobaltchlorid mit einer Stoffmengenkonzentration von 200 Mikromolar etabliert werden. Diese Stoffmengenkonzentration führt zu dem gewünschten hypoxischen Effekt auf die Zellen, ohne toxisch zu wirken. Zudem kann ein Zeitintervall für die folgenden Untersuchungen von maximal 24 Stunden definiert werden. Das Zeitintervall von maximal 24 Stunden kann auch auf das Modell der Hypoxiekammer übertragen werden. Bereits frühere Untersuchungen von Shi et al. beschäftigen sich mit der Auswirkung von Hypoxie auf hepatische Sternzellen, die als primäre und am besten charakterisierte Quelle der Myofibroblasten im Rahmen einer Leberfibrose gelten (Hernandez-Gea und Friedman 2011; Friedman 2008b). Shi et al. 2007 untersucht den in vitro Effekt von einprozentigem Sauerstoffgehalt auf LX-2 Zellen. Die Zellen werden den hypoxischen Bedingungen für jeweils acht und 24 Stunden ausgesetzt. Die Studie weist eine hypoxische Reaktion der Zellen auf niedrige Sauerstoffverhältnisse durch Hochregulation des für den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (alpha- Untereinheit) codierenden Gens *HIF1A* und dem Zielgen *VEGFA* nach. Die Regulation der HIF-1-alpha-Aktivität ist auf Proteinebene bisher gut untersucht. Normoxie führt zu Destabilisierung und proteosomalem Abbau der Untereinheit, während Hypoxie zur Stabilisierung des Faktors führt (Lando 2002; Hewitson et al. 2002). Aus Untersuchungen an Nierenkarzinomzellen ist bekannt, dass der evolutionär hochkonservierte Homöobox-Transkriptionsfaktor CUX1 eine Rolle im Rahmen der HIF-Regulation spielt und zur Karzinogenese beitragen kann (Li et al. 2007). CUX1

ist an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem an der Gewebeentwicklung, Zellproliferation, Differenzierung und Migration sowie der Reaktion auf DNA-Schäden (Nepveu 2001). Neben physiologischen Prozessen zeigen Studien, dass CUX1 an der Karzinogenese in unterschiedlichsten Geweben mitwirkt und entgegen der initialen Annahmen auch in differenzierten, proliferierenden Geweben aktiv eine Rolle spielt (Michl et al. 2005). Durch Mutanten oder eine Überproduktion von CUX1 werden paradoxe Wirkweisen der verschiedenen Isoformen deutlich und CUX1 sowohl eine onkogene als auch suppressive Wirkweise zugeschrieben (Liu et al. 2020). Bei Untersuchungen zur Pathogenese des Nierenzellkarzinoms wird eine indirekt korrelierende Wirkung von CUX1 auf die Aktivität von HIF-1-alpha durch Bindung an den Promoter des für den HIF-hemmenden Faktor (FIH-1) codierenden Gens ausgemacht (Li et al. 2007). Der HIF-hemmende Faktor (FIH-1) führt unter Normoxie zur Destabilisierung der HIF-1-alpha Untereinheit und proteosomalen Abbau (Lando 2002; Hewitson et al. 2002). Die Studie von Li et al. kann eine Bindungsstelle von CUX1 an einem Promoter des Gens *HIF1AN* ausmachen. Dies erklärt neben hohen CUX1-Spiegeln beim Nierenzellkarzinom die verstärkte HIF-1-alpha-Aktivität durch CUX1-induzierte Hemmung der Expression von *HIF1AN*, für FIH-1 codierend, und Stabilisierung der HIF-1-alpha-Untereinheit, trotz Normoxie (Li et al. 2007). Diese Ergebnisse lassen eine korrelierende Wirkung der beiden Faktoren auch bei anderen Pathologien vermuten.

Die Rolle von CUX1 in hepatischen Sternzellen im Rahmen der Pathogenese einer Leberfibrose, als Endstrecke vieler chronischer Lebererkrankungen (Friedman 2003), ist bisher noch nicht untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

#### **4.1.1 Regulationsmechanismen von HIF-1-alpha**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in vitro eine Beeinflussung des HIF-Systems durch Hypoxie in human hepatischen Sternzellen.

Kurzfristige Hypoxie bewirkt unabhängig des Hypoxiemodells eine stabile Genexpression von HIF-1-alpha, nachgewiesen in einer qRT-PCR. Anhaltende Hypoxie über 24 Stunden weist eine deutliche Abnahme der mRNA auf. Auf



Proteinebene kann eine initiale Zunahme der Proteinmenge im Western Blot verzeichnet werden, während auch hier länger andauernde Hypoxie einen Abfall an HIF-1-alpha-Protein aufzeigt. Zudem wird eine Steigerung der *SLC2A1*-Expression, ein Zielgen von HIF-1, nachgewiesen. Zusammengenommen mit den Ergebnissen des Luciferase-Assays, zeigen die Ergebnisse eine Reaktion der hepatischen Sternzellen auf hypoxischen Stress und lassen zudem eine Regulation von HIF-1-alpha auf transkriptioneller oder translationaler Ebene vermuten.

HIF-1-alpha trägt bei Hypoxie zur Adaptation der Zelle bei (Metzen und Ratcliffe 2004). In den meisten Zellen wird *HIF1A* konstant exprimiert und HIF-1-alpha vor allem auf Proteinebene reguliert (Cash et al. 2007). In einigen Studien wird jedoch auch eine transkriptionelle, bzw. posttranskriptionelle Regulation nachgewiesen. Beispielsweise können Untersuchungen an Endothelzellen aufzeigen, dass eine Regulation von HIF-1-alpha auf mRNA-Ebene stattfindet. Bei akuter Hypoxie zeigt sich die Expressionsrate von *HIF1A* in den Endothelzellen stabil. Anhaltende Hypoxie führte analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit zu einem progressiven Abfall der mRNA-Spiegel. Dieser Regulationsmechanismus trägt zu einer negativen Rückkopplungsschleife bei, die vermutlich darauf abzielt, eine übermäßige Anhäufung von HIF-1-alpha-Protein bei längerer Hypoxie zu vermeiden. Die Regulation wird im Fall der untersuchten Endothelzellen nachweislich durch Doppelzink-Fingerproteine aus der Tristetraprolin-Familie (TTP) vermittelt, welche in der Lage sind durch Bindung den Zerfall physiologisch nicht relevanter mRNAs zu fördern (Chamboredon et al. 2011). Die Studienergebnisse von Chamboredon et al. ebenfalls unterstützend, zeigt sich in dieser Arbeit nach kurzer Hypoxie ein gesteigertes Proteinlevel von *HIF-1-alpha*, welches nach längerer Inkubation unter niedrigem Sauerstoffniveau wieder abnimmt. Der initiale Anstieg vermag dem zunächst nicht mehr stattgefundenen Abbau der Untereinheit im Rahmen der Regulation auf Proteinebene zuzuschreiben. Zusätzliche posttranskriptionelle Regulation führt im Verlauf zu einem geringeren Proteinlevel (Chamboredon et al. 2011). Weitere Studien zeigen jedoch auch, dass andere transkriptionelle und posttranskriptionelle

Regulationsmechanismen abhängig vom untersuchten Zelltyp existieren. Darunter beispielsweise die Regulation von HIF-1-alpha in Makrophagen durch erhöhte Expression eines natürlichen cis-Antisense-Transkripts (aHIF), welches modulierend auf die Genexpression wirkt (Poitz et al. 2014). Es wird gezeigt, dass das cis-Antisense-Transkript die HIF-1-alpha-mRNA destabilisiert, während das menschliche RBP-Antigen (RBP: engl. Retinol Binding Protein) diese stabilisiert (Poitz et al. 2014; Urchida et al. 2004; Sheflin et al. 2004). Interessanterweise beschreibt die ähnlich wie diese Arbeit aufgebaute Studie von Shi et al., welche sich bereits mit den Auswirkungen von Hypoxie auf hepatische Sternzellen (LX-2) beschäftigt, eine Hochregulierung der mRNA von HIF-1-alpha durch niedrige Sauerstoffverhältnisse, ebenfalls nachgewiesen in einer PCR. Diese Ergebnisse verstärken die Annahme möglicher transkriptioneller und/oder posttranskriptioneller Regulationsmechanismen von HIF-1-alpha in LX-2 Zellen unter Hypoxie. Ein direkter Vergleich ist trotz der Ähnlichkeit des Studiendesigns schwierig, da Shi et al. die Auswirkung der Hypoxie auf das Proteinlevel von HIF-1-alpha und dessen Zielgene nicht analysiert. Ein Trend ist aber auch dort analog zu dieser Arbeit zu erkennen. Die Expression von *HIF1A* lässt nach initialem Anstieg nach länger andauernder Hypoxie nach. Die Studie von BelAiba et al. untersucht ebenfalls in glatten Muskelzellen der Lungenarterie den Mechanismus, durch den Hypoxie die HIF-1-alpha-mRNA-Spiegel beeinflussen kann. Eine kurzfristige Hypoxie löst demnach in den glatten Muskelzellen der Lungenarterie nicht nur eine HIF-1-alpha-Proteinakkumulation aus, sondern führt auch zu einem vorübergehenden Anstieg des HIF-1-alpha-mRNA-Spiegels, welcher nach wenigen Stunden wieder auf die Basalwerte zurückkehrt (BelAiba et al. 2007). Zusätzlich zeigen mehrere in vivo Studien erhöhte Werte der HIF-1-alpha-mRNA unter hypoxischen Versuchsbedingungen (Wiener et al. 1996; Semenza et al., 1997). Ergebnisse, die sich wiederum mit denen von Shi. et al. decken. Im Gegensatz dazu und in Analogie zu den Ergebnissen dieser Arbeit kann in einer Reihe von Studien in kultivierten Zellen keine Hochregulation der HIF-1-alpha-mRNA-Spiegel unter Hypoxie nachgewiesen werden. Die Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse der HIF-1-alpha-mRNA-Regulation unter

Hypoxie sind noch nicht klar (BelAiba et al. 2007). Angesichts des vorübergehenden Charakters der Reaktion der Hochregulierung der mRNA-Spiegel könnten unterschiedliche Studiendesigns und Versuchsbedingungen zu den differenten Ergebnissen geführt haben. Dabei könnten Expositionszeiten oder unterschiedliche Hypoxiemodelle, genauso wie die möglichen Abweichungen in Kultivierung der Zellen und Passagefortschritt eine Rolle spielen. Eine weitere Erklärung liefert Minet et al., welcher von unterschiedlichen Sequenzen in der Promoterregion von *HIF1A* spricht, die die Transkription des *HIF1A*-Gens in einer zelltypspezifischen Weise verhindern könnten (Minet et al. 1999).

Die Feinmechanismen der Regulation von HIF-1-alpha scheinen komplex und abhängig vom Zelltyp. Angesichts der zu den Ergebnissen von Chamboredon et al. in dieser Arbeit ähnlich beschriebenen mRNA- und Proteinspiegel von HIF-1-alpha unter reiner Hypoxie, ist von einer möglichen posttranskriptionellen Regulation von HIF-1-alpha in Lebersternzellen auszugehen. Die Kontroverse zu den Studienergebnissen von Shi et al. bedingt ebenfalls weitere Untersuchungen, um eine mögliche transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulation von HIF-1-alpha in hepatischen Sternzellen zu analysieren und die genauen Mechanismen aufzudecken. Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt jedoch auf einer möglichen Modulation von HIF-1-alpha durch CUX1, welche analog zu vorangegangenen Untersuchungen an Nierenkarzinomzellen indirekt auf posttranslationaler Ebene nachgewiesen werden kann.

#### **4.1.2 Modulation von HIF-1-alpha durch CUX1**

Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltet die Untersuchung einer möglichen Modulation von HIF-1-alpha durch CUX1 in hepatischen Sternzellen, vor allem im Rahmen einer Hypoxie.

In hepatischen Lebersternzellen ist aufgrund dieser Studienergebnisse nicht von einer Einflussnahme von CUX1 auf HIF-1-alpha auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene auszugehen. Genauso wenig deuten diese Studienergebnisse eine Beteiligung der Regulation von CUX-1 durch HIF-1-alpha auf. Es kann jedoch eine indirekte Modulation von CUX1 auf HIF-1-alpha durch Beteiligung an der Regulation der Genexpression von *HIF1AN*, codierend

für den Gegenspieler von *HIF-1-alpha*, aufgezeigt werden, welche jedoch nur unter Normoxie zum Tragen kommt.

Hypoxie führt zu einer hypoxischen Antwort der LX-2-Zellen mit Veränderung der HIF-1-alpha-mRNA-Spiegel, jedoch unabhängig der *CUX1*-Expression. Diese Beobachtungen werden gestützt durch die Ergebnisse des durchgeführten Luciferase-Assays. Interessanterweise kann in analogen Versuchen mit humanen Hepatomzellen (Hep3B und HepG2) eine direkte, repressive Einflussnahme von *CUX1* auf die Genexpression von *HIF1A* festgestellt werden (Blümel et al. 2015). Diese Beobachtungen untermauern die vielfach beschriebenen paradoxen Wirkweisen von *CUX1* in Abhängigkeit von Zelltyp, vorkommenden Isoformen und Mutationen im *CUX1*-Gen (Ramdzan & Nepveu 2014, Liu et al. 2020).

Die indirekte Einflussnahme von *CUX1* auf HIF-1-alpha kommt allerdings nur unter Normoxie zum Tragen. In dieser Studie kann in Lebersternzellen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Li et al. bei Nierenkarzinomzellen eine Steigerung der Genexpression von *HIF1AN* nach *CUX1*-Knockdown und damit ein indirekter Einfluss auf die HIF-1-Aktivität aufgezeigt werden. Da bekanntermaßen die Regulation von HIF-1-alpha durch FIH-1 auf Proteinebene stattfindet, kann erwartungsgemäß in der qRT-PCR keine transkriptionelle Regulation von *HIF1A* in Abhängigkeit von der *CUX1*-Expression nachgewiesen werden. Auf Proteinebene wird im Western Blot unter Normoxie ein negativer Effekt auf das HIF-1-alpha-Proteinvorkommen nach *CUX1*-Knockdown beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse und derer von Li et al. ist anzunehmen, dass *CUX1* einen indirekten Einfluss auf die hypoxische Antwort der Zellen durch Regulation von *HIF1AN* nimmt. Folglich verstärkt *CUX1* eine hypoxische Adaptation der LX-2-Zellen trotz normwertiger Sauerstoffverhältnisse. Die Hydroxylaseaktivität von FIH-1 arbeitet sauerstoffsensibel (Serocki et al. 2018, Mahon et al. 2001). Hypoxie führt zur Aktivitätsminderung der Hydroxylasefunktion von FIH-1, weshalb selbst ein FIH-1-Anstieg unter Hypoxie keinen negativen Einfluss auf die HIF-1-alpha-Aktivität nimmt. Dies erklärt die Ergebnisse der Versuche unter hypoxischen Bedingungen, die keinen Einfluss von FIH-1 auf HIF-1-alpha nachweisen. Dieser Regulationsmechanismus,

CUX1, FIH-1 und HIF-1-alpha inkludierend, ist demnach anzunehmend nicht bei bestehenden Pathologien mit bereits aufgetretener Hypoxie entscheidend, könnte jedoch bei der Initiierung von Pathomechanismen eine Rolle spielen. Denkbar wäre, analog zu den Befunden in Nierenzellkarzinomen und Insulinomen (Li et al. 2007, Krug et al. 2020), eine mögliche Überexpression oder Mutation von *CUX1* in hepatischen Lebersternzellen, die durch eine Verstärkung der HIF-Kaskade zur hepatischen Fibrogenese und damit im Verlauf zur Karzinogenese beiträgt.

Eine interessante Beobachtung wird bezüglich der mRNA-Spiegel der Zielgene von HIF-1 gemacht. Unter Normoxie bleiben die mRNA-Spiegel von *VEGFA* und *GLUT1* trotz FIH-1-Anstieg unter *CUX1*-Knockdown unbeeinflusst. Anzunehmen ist, dass eine Aktivitätssteigerung von HIF-1 zu einer Steigerung der Expression der Zielgene führt. Eine Abnahme der HIF-1-Aktivität beeinflusst jedoch die basale Expression der Zielgene nicht. Unter reiner Hypoxie fällt in den Versuchen auf, dass eine HIF-1-alpha-Aktivitätssteigerung, nachzuweisen auf Proteinebene im Western Blot oder im Luciferase-Assay, zu einer schnellen Steigerung der Expressionsrate von *SLC2A1* führt. Eine erhöhte Expressionsrate von *VEGFA* fällt allerdings nur nach vierundzwanzigstündiger Hypoxie in der Hypoxiekammer auf. In der Literatur wird von einer Expressionszunahme von *VEGFA* berichtet, wenn HIF-1-alpha vermehrt aktiv ist (Novo et al. 2007). Shi et al weist eine kontinuierliche Steigerung der Expression von *VEGFA* auf mRNA-Ebene bei acht- und vierundzwanzigstündiger Hypoxie in LX-2-Zellen nach (Shi et al 2007). In dieser Arbeit zeigt sich jedoch bemerkenswerterweise eine deutliche Zunahme der *VEGFA*-Expression gegenüber reiner Hypoxie erst nach *CUX1*-Suppression in Kombination mit Hypoxie. Auffällig erscheint, dass die Ergebnisse der Versuchsgruppe, welche das Hypoxiemodell der Hypoxiekammer nutzt, eindeutiger sind als die der chemisch ausgesetzten Hypoxie. Methodenfehler, wie Pipettierfehler, Unterschiede in Zellpopulation und Passagefortschritt sind denkbar, erscheinen angesichts der Tatsache, dass die Expression von *SLC2A1* erwartungsgemäß unter hypoxischen Bedingungen steigt, jedoch

unwahrscheinlich. Demnach wäre eine HIF-unabhängige Regulation von *VEGFA* durch *CUX1* denkbar. In Magenkarzinomzellen kann eine Verbindung von *VEGF-D*, ebenfalls der *VEGF*-Familie zugehörig, zu *CUX1* festgestellt werden. Ein vermehrtes Auftreten der *CUX1*-Isoform p110 führt zu einer erhöhten Angiogenese durch Bindung der Isoform an den Promoter von *VEGF-D* (Pan et al. 2020). Demnach müsste entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit eine auf die *VEGFA*-Expression inhibierende *CUX1*-Isoform in den LX-2-Zellen vorliegen.

#### **4.2. Rolle von CUX1 bei der Aktivierung hepatischer Sternzellen**

Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen, der Übergang von ruhenden Zellen in proliferative, fibrogene und kontraktile Myofibroblasten, gilt als das Schlüsselereignis der Fibrogenese (Friedman 2000). Die Studie von Shi et al. kann an LX-2-Zellen eine Erhöhung des Aktivierungsmarkers *alpha-SMA* der glatten Muskulatur und Typ-I-Kollagen bei Exposition gegenüber Hypoxie nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass Hypoxie auch an der Aktivierung von Lebersternzellen beteiligt ist (Shi et al. 2007). In ähnlicher Weise stimuliert die Exposition kulturaktiver hepatischer Sternzellen der Ratte gegenüber Hypoxie die Synthese von Typ-I-Kollagen (Corpechot et al. 2002). Es kann nicht nur ein Zusammenhang mit Hypoxie, sondern auch von Kollagensynthese und *CUX1* in vorangegangenen Studien beobachtet werden. In Fibroblasten der Lunge, der Haut und Niere kann nachgewiesen werden, dass *CUX1* sowohl in vivo als auch in vitro mit einer verminderten Expression von Typ-I-Kollagen assoziiert ist. Die Steigerung der Expression von *CUX1* führt in den Versuchen zu einer wirksamen Unterdrückung von Typ-I-Kollagen (Fragiadaki et al. 2011). In Lungenfibroblasten werden zudem Elemente in der Enhancer-Region des menschlichen *Typ-I-Kollagen-alpha-2-Gens* (*COL1A2*) für *CUX1* identifiziert (Ikeda et al. 2016). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die *CUX1*-Isoformen bei der Bildung der Extrazellulärmatrix während der Wundheilung und Fibrose eine wichtige Rolle spielen. Die Rolle von *CUX1* in Zusammenhang mit Hypoxie ist im Rahmen der Sternzellaktivierung bisher noch nicht untersucht worden. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist jedoch davon auszugehen, dass

CUX1 ein regulierender Faktor bei der Aktivierung der hepatischen Sternzellen ist. Es wird aufgezeigt, dass CUX1 einen Einfluss auf die Expression von Typ-I-Kollagen (*COL1A1*) nimmt. Eine Modulation von alpha-SMA (*ACTA2*) wird jedoch nicht nachgewiesen.

In der qRT-PCR fällt auf, dass lediglich eine Steigerung der Kollagenexpression nach sechsständiger, kobaltchloridinduzierter Hypoxie und *CUX1*-Suppression auftritt. Der alleinige *CUX1*-Knockdown hat eine initial stabile Expression der Aktivierungsgene mit abfallender Tendenz zur Folge. Entgegen der Erwartung einer Aktivierung der hepatischen Sternzellen durch reine Hypoxie, analog zu den Ergebnissen der Studie von Shi et al., kann in der qRT-PCR nur in den Vorversuchen zur Bestimmung der Inkubationsintervalle eine Steigerung der Aktinexpression beobachtet werden. Später durchgeführte Versuche weisen keine Expressionssteigerung trotz fibrogenem Stimulus in Form von hypoxischem Stress auf. Im Gegenteil führt längere Hypoxie sogar zur Herunterregulierung der Aktivierungsgene. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Studienergebnisse dieser Arbeit und denen von Shi et al. lässt sich möglicherweise in der fortgeschrittenen Passage der Zellkultur bei den in einem späteren Verlauf durchgeführten Versuchen finden. Anzunehmen wäre eine bereits stattgefundene Aktivierung der untersuchten Zellen ausgelöst durch Stressreaktionen durch mehrmaliges Kryokonservieren, Auftauen und Passagieren, sowie gegebenenfalls Milieuunterschiede in der Nährstoffversorgung abhängig von den Intervallen des Mediumwechsels, Größe der Zellkulturflaschen und Menge der gleichzeitig kultivierten Zellen. Im Kreislauf der hepatischen Sternzellen werden nach Aktivierung verschiedene Stadien beschrieben, die die Zellen durchlaufen können, in denen sie sich auch in ihren funktionellen und sezernierenden Eigenschaften unterscheiden. Demnach würden die Zellen trotz Aktivierung weniger Aktivierungsgene, wie *ACTA2* und *COL1A1*, exprimieren. Im Falle einer Reversion bei nachlassenden Stimuli beschreiben Kisseleva et al., dass Sternzellen während der Fibroseauflösung Marker der Ruhe wiedererlangen, dennoch nicht identisch mit Zellen sind, die nie aktiviert worden sind. Stattdessen nehmen diese inaktivierten Sternzellen einen intermediären Phänotyp an, mit einer erhöhten Fähigkeit zur

Reaktivierung, wenn sie beispielsweise mit *TGF- $\beta$* , einem klassischen fibrogenen Signal, behandelt werden. Es ist nicht bekannt, ob diese präparierten Sternzellen unbegrenzt in diesem Zustand bleiben oder langsam über ein längeres Intervall in die vollständige Ruhe zurückkehren (Kisseleva et al. 2012, Friedman 2012). Fraglich ist, ob die Zellen in dieser Arbeit solch einen reversen Zustand erlangt haben, da sie nachweislich keine erhöhte Reagibilität auf den fibrotischen Reiz Hypoxie gezeigt haben. Lediglich die *CUX1*-Suppression führt bei fibrotischem Reiz zu einer Aktivierung in Form von Steigerung der Kollagensynthese. Diese Tatsache spricht eher dafür, dass die Zellen sich in Seneszenz, also in verminderter Fähigkeit der Aktivierung befinden, die fehlende Inhibition von *CUX1* jedoch zu einer Steigerung der Kollagensynthese durch den hypoxischen Reiz führt.

Den Ergebnissen zufolge spielt *CUX1* in hepatischen Sternzellen demnach eine Rolle bei der Regulation der Kollagensynthese. *CUX1* inhibiert eine vermehrte Kollagensynthese, sofern die Zelle einem fibrogenen Stimulus ausgesetzt ist. Im Rahmen einer Fibrogenese wäre ein Szenario mit Mutation und Funktionsverlust der inhibierenden *CUX1*-Isoform denkbar, die zu einer vermehrten Kollagensynthese beiträgt. Eine direkte Abhängigkeit dieses Regulationsmechanismus von Hypoxie lässt sich durch die Ergebnisse der qRT-PCR vermuten, da eine Steigerung der *COL1A1*-Expression nur in Zusammenhang mit Hypoxie auftritt. Jedoch zeigen die Ergebnisse des Western Blot auch eine hypoxieunabhängige Regulation der Kollagensynthese durch *CUX1*. Nach alleiniger *CUX1*-Suppression und in Kombination mit kobaltchloridinduzierter Hypoxie lässt sich eine Proteinakkumulation von Kollagen-Typ-I nachweisen. Auffallend ist, dass sich weder in der qRT-PCR, noch im Western Blot ein Effekt einer gesteigerten Kollagensynthese bei *CUX1*-Knockdown und Inkubation der Zellen in der Hypoxiekammer zeigt. Der hypoxische Effekt scheint jedoch nach Bewertung der HIF-1-alpha-Aktivität im Western Blot in der Hypoxiekammer stärker, als durch chemisch induzierte Hypoxie zu sein. Technisch war die Durchführung des Western Blot von Kollagen-Typ-I erschwert. Zur Darstellung von Kollagen bedarf es einem stärkeren Lyseverfahren als einer osmotischen Lyse. In Rücksprache mit dem



Hersteller der verwendeten Antikörper (Abcam) kann Kollagen jedoch unter Verwendung von 1%SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)-Hot-Lysis-Puffer und Nutzung eines ultraschallgestützten mechanischem Zellaufschlussverfahren im Western Blot dargestellt werden. Der Verlauf der Banden im Gel zeigt sich jedoch nicht so einheitlich bei Anwendung von SDS im 'Running-Puffer' wie von vorherigen Versuchen mit anderen Proteinen von geringerem Molekulargewicht unter Anwendung von HEPES bekannt.

Da alpha-SMA nicht im Western Blot dargestellt werden kann, wird die Proteinsynthese in einer FACS-Analyse überprüft. Hierbei zeigt sich kein relevanter Unterschied der Synthese des Aktivierungsmarkers in Abhängigkeit der *CUX1*-Expression. Dieses Ergebnis unterstützt die bereits beobachteten Resultate aus der qRT-PCR. Hypoxie nimmt jedoch auch keinen Einfluss auf die Aktinbildung und löst demnach nicht, wie zu erwarten, eine Aktivierung der Sternzellen aus. Mögliche Erklärungsansätze sind bereits beschrieben worden. Zudem muss hinterfragt werden, ob die angewendete Methode der FACS-Analyse verbessert werden kann, da sich Negativkontrolle und Positivkontrolle im Histogramm überlappen und demnach der Positivbereich nicht so genau definiert werden kann, wie es bei einer klaren Abgrenzung der Fall wäre.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in dieser Arbeit behandelten Sternzellen keine Aktivierung im Sinne einer Steigerung des intrazellulären Aktins durchlaufen haben und demnach auch keine Änderung der Morphologie aufzeigen dürften. Anhand der lichtmikroskopischen Bilder lässt sich diese Beobachtung ebenfalls erahnen. Die Morphologie der ruhenden Zelle zeichnet sich durch ihren spindelförmigen Zellkörper mit sternförmigen Zytoplasmaausläufern und runden Zellkern aus, wohingegen eine aktivierte Zelle ihren Phänotyp verändert und charakteristischerweise ein myofibroblastenähnliches Aussehen einnimmt (Friedman 2008). Die Aufnahmen in dieser Arbeit zeigen nach hypoxischem Reiz sowie nach Transfektion mit siCUX1 vorwiegend spindelförmige Zellen mit leichten Ausläufern, rundem Zellkern und Retinoideinschlüssen, was darauf hindeutet,

dass keine Aktivierung stattgefunden hat. Die Auflösung des Mikroskops reicht leider nicht aus, um einen möglichen Verlust der Retinoidtröpfchen bei Aktivierung ganz genau nachzuvollziehen oder detaillierte Änderungen in der Morphologie zu beschreiben. Elektronenmikroskopische Aufnahmen würden aussagekräftigere Bilder erzeugen.

Weitere Untersuchungen müssten folgen, um eine definitive Regulation des Transkriptionsfaktor CUX1 und eine Bindungsstelle an einem Promoter von *COL1A1* ausfindig zu machen und die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen. Hierfür würde sich eine CHIP- Sequenzierung (engl. Chromatin Immunoprecipitation DNA-Sequencing) zur Bestimmung von Protein-DNA-Interaktionen eignen, die eine Immunopräzipitation mit einer DNA-Sequenzierung kombiniert (Furey 2012).

### **4.3. Die Rolle von CUX1 bei der Zellzykluskontrolle**

Bekanntermaßen spielt CUX1 eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus in unterschiedlichsten Geweben. Zu den zellzyklusregulierenden Zielgenen von CUX1 zählen *CDKN1A* und *CDKN1B* (Coqueret et al. 1998; Ledford et al. 2002). In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass CUX1 als repressiver Transkriptionsfaktor die Expression von *CDKN1A* in hepatischen Sternzellen ebenfalls reguliert, jedoch keinen Einfluss auf die Expression von *CDKN1B* nimmt. Somit ist stark anzunehmen, dass CUX1 in hepatischen Sternzellen in seiner physiologischen Funktion eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhezustandes der Zellen und Unterdrückung der Proliferation einnimmt.

Vanden Heuvel et al. zeigt in einer vorangegangenen Studie bereits eine Korrelation einer ektopischen Expression von *CUX1* mit einer Herunterregulierung von *CDKN1A* in der Leber von transgenen Mäusen. Im Gegensatz dazu, ist die Expression von *CDKN1B* zwischen Wildtyp- und transgenen Lebern unverändert (Vanden Heuvel et al. 2005). In der Niere hingegen kann sowohl ein regulierender Einfluss von CUX1 auf *CDKN1A*, als auch auf *CDKN1B* nachgewiesen werden (Ledford et al. 2002). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sieht Vanden Heuvel et al. in einem

unterschiedlichen Regulationsmechanismus der Zellproliferation in Niere und Leber. Grund für diese Annahme stellt vor allem die Regenerationsfähigkeit und damit das proliferative Potenzial der Leber dar (Vanden Heuvel et al. 2005). Eine weitere Studie zeigt, dass *p21*- und *p27*-Cdk-Inhibitoren in Hepatozyten bei der Proliferation zumindest initial unterschiedliche Rollen spielen müssen (Ilyin et al. 2003). Ilyin et al. geht davon aus, dass die Expressionsmenge von *CDKN1A* in proliferierenden Hepatozyten den Zeitpunkt der Aktivierung des Cyclin-Cdk-Komplexes und den Eintritt in die S-Phase kontrolliert. Im Gegensatz dazu scheint das *p27*-Protein an der Beschränkung des Ausmaßes der DNA-Synthese beteiligt zu sein (Ilyin et al. 2003).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit weiteren Studienergebnissen ist von einer Beteiligung des durch CUX1 regulierten Cdk-Inhibitor *p21* an der Sternzellaktivierung- und Proliferation auszugehen. Denkbar wäre eine Beeinflussung von *p21* durch CUX1 über den *PI3K/AKT*-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B), da *PI3K* bekannterweise durch CUX1 aktiviert wird (Wong et al. 2014). Durch den *PI3K/AKT*-Signalweg ist CUX1 an Prozessen wie Metabolismus, Apoptose und Proliferation beteiligt. *AKT* codiert für eine Serin/Threonin-Kinase und hemmt die Expression von *CDKN1A* (Nicholson & Anderson 2002). Demnach lässt sich vermuten, dass eine *CUX1*-Überexpression durch Aktivierung des Signalwegs zu einer vermehrten Zellproliferation durch Herunterregulierung von *CDKN1A* führt.

Erwähnenswerterweise ist in dieser Arbeit eine Hochregulation von *CDKN1A* nach vierundzwanzigstündiger Inkubation der unbehandelten LX-2-Zellen in der Hypoxiekammer zu beobachten. Dies deutet somit auf eine mögliche, direkte Korrelation von Hypoxie und Zellzyklusarrest hin. Vor allem Untersuchungen an Krebszellen deuten auf eine induzierende Wirkung von HIF-1-alpha auf *CDKN1A* bei Hypoxie hin und erklären den hypoxieinduzierten Wachstumsstillstand (Kaidi et al. 2007; Koshiji et al. 2004). Eine Studie an Keratinozyten kann jedoch auch eine physiologische Funktion bei der Regulation des Zellzyklus von HIF-1-alpha nachweisen (Choa et al. 2008).

Dabei wird von einer indirekten Modulation von *CDKN1A* durch HIF-1 ausgegangen. Ein Zielgen von HIF-1 stellt *c-myc* dar. Der Transkriptionsfaktor *c-myc* fungiert als Repressor von *CDKN1A*. Die hypoxische Induktion von *HIF1A* unterdrückt somit die Zellproliferation und führt durch Inhibition der *c-myc*-Transkriptionsaktivität und daraus folgender Hochregulierung der *CDKN1A*-Expression zum Zellzyklusarrest (Koshiji et al. 2004). Interessanterweise führt eine durch hypoxieinduzierte Akkumulation des Tumorsuppressors p53 nicht zu einem Anstieg der *CDKN1A*-Expression, obwohl *CDKN1A* eines der am häufigsten, als Reaktion auf die p53-Induktion, transaktivierten Gene ist (Koumenis et al. 2001).

#### 4.4. Fazit

Diese Arbeit trägt zu einem besseren Verständnis der komplexen Pathomechanismen im Rahmen der Leberfibrogenese bei. Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen stellt das Schlüsselereignis der Fibrogenese dar. Sie sind die Hauptquelle der exzessiv ausgebildeten Extrazellulärmatrix. CUX1 übernimmt paradoxe Aufgaben als Transkriptionsfaktor und ist nachweislich an Pathomechanismen wie der Karzinogenese beteiligt. Die Rolle von CUX1 in hepatischen Sternzellen ist bislang nicht untersucht worden und Gegenstand dieser Arbeit.

Durch in vitro Untersuchungen an der human hepatischen Sternzelllinie LX-2 unter Hypoxie kann durch Suppression die Rolle von CUX1 in hepatischen Sternzellen im Rahmen der Pathogenese einer Leberfibrose analysiert werden. Die Ergebnisse lassen auf physiologische Funktionen von CUX1 in hepatischen Sternzellen schließen. CUX1 ist nachweislich auf Grundlage dieser Arbeit an der Regulation der HIF-Kaskade und hypoxischen Adaptation der Sternzellen sowie an der Kontrolle von Zellproliferation und Kollagensynthese beteiligt.

Durch *CUX1*-Suppression wird *HIF1AN*, für den Gegenspieler von *HIF-1-alpha* codierend, sauerstoffunabhängig vermehrt exprimiert. CUX1 ist ein Repressor des HIF-1-Gens (*HIF1AN*). Somit nimmt CUX1 indirekten Einfluss auf die HIF-Kaskade. Da HIF-1 sauerstoffsensibel arbeitet, kommt dieser Mechanismus nur

bei Normoxie zum Tragen. Eine direkte Modulation von HIF-1-alpha kann nicht nachgewiesen werden.

Des Weiteren verstärkt eine *CUX1*-Suppression sauerstoffunabhängig die *CDKN1A*-Expression, das für den Zellzyklusinhibitor p21 codierende Gen. *CUX1* ist ein Repressor des p21-Gens und dementsprechend an der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt.

In Zusammenhang mit dem fibrogenen Stimulus Hypoxie kommt es zu vermehrter Expression von *COL1A1*, codierend für die Alpha-1-Kette des Kollagen-Typ-I. *CUX1* ist ein transkriptioneller Repressor des *COL1A1*-Gens und an der Regulation der Kollagensynthese beteiligt.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit können Rückschlüsse und Hypothesen zu möglichen Beteiligungen an Pathomechanismen gezogen werden. Diese *in vitro* Untersuchung stellt die Basis für künftige *in vivo* Versuche beispielsweise an transgenen oder *CUX1*-Knockout Mäusen dar.

Aufgrund der Versuche kann davon ausgegangen werden, dass eine Fehlfunktion oder Verlust von *CUX1* durch mögliche Mutationen zur Fibrogenese durch Beteiligung an der Sternzellaktivierung beitragen kann. Eine Überexpression von *CUX1*, wie sie bereits in Nierenkarzinomzellen (Li et al. 2007) beschrieben wird, wäre auch in hepatischen Sternzellen möglich. Denkbar wäre eine Beteiligung von *CUX1* an der Karzinogenese des Lebergewebes bei Überexpression durch Förderung der Zellproliferation bei starker Repression von *CDKN1A*. Zudem wäre bei vermehrtem *CUX1*-Vorkommen in den Zellen eine Beteiligung an der Intitiation von Pathologien durch Verstärkung und Einleitung einer hypoxischen Adaptation der Zelle durch fehlende Kontrolle der HIF-Kaskade zu vermuten. Neovaskularisation als Folge stellt ein Eckpunkt der Karzinogenese dar. Hypothesen, die in Versuchen, die auf dieser Arbeit aufbauen, erforscht werden könnten.

Der Transkriptionsfaktor *CUX1* ist wichtig für die Homöogenese der hepatischen Sternzellruhe. Diese Arbeit hat zu einem besseren Verständnis der

Funktion von CUX1 in hepatischen Sternzellen und Beteiligung an der Pathogenese einer Leberfibrose beigetragen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abukhdeir, Abde M.; Park, Ben Ho (2008): p21 and p27. Roles in carcinogenesis and drug resistance. In: *Expert Rev. Mol. Med.* 10, S. 1591. DOI: 10.1017/S1462399408000744.
- Anavi, S.; Madar, Z.; Tirosh, O. (2017): Non-alcoholic fatty liver disease, to struggle with the strangle: Oxygen availability in fatty livers. In: *Redox Biology* 13, S. 386-392: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.06.008>.
- Andres, V.; Chiara, M. D.; Mahdavi, V. (1994): A new bipartite DNA-binding domain. Cooperative interaction between the cut repeat and homeo domain of the cut homeo proteins. In: *Genes & Development* 8 (2), S. 245–257. DOI: 10.1101/gad.8.2.245.
- Ankoma-Sey, Victor; Wang, Yun; Dai, Zhihao (2000): Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 31 (1), S. 141–148. DOI: 10.1002/hep.510310122.
- Arthur, Michael J. P. (2000): Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. In: *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (2), S. 245-G249. DOI: 10.1152/ajpgi.2000.279.2.G245.
- Bataller, Ramón; Brenner, David A. (2005): Liver fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (2), S. 209–218. DOI: 10.1172/JCI24282.
- Baumeister, Sebastian E.; Völzke, Henry; Marschall, Paul; John, Ulrich; Schmidt, Carsten-Oliver; Flessa, Steffen; Alte, Dietrich (2008): Impact of fatty liver disease on health care utilization and costs in a general population. A 5-year observation. In: *Gastroenterology* 134 (1), S. 85–94. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.10.024.
- BelAiba, Rachida S.; Bonello, Steve; Zähringer, Christian; Schmidt, Stefanie; Hess, John; Kietzmann, Thomas; Görlach, Agnes (2007): Hypoxia Up-Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Transcription by Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nuclear Factor  $\kappa$ B in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. In: *Mol Biol Cell.* 18(12): S. 4691–4697. DOI: 10.1091/mbc.E07-04-0391.
- Benjamin L. Ebert; John D. Firth; Peter J. Ratcliffe (1995): Hypoxia and Mitochondrial Inhibitors Regulate Expression of Glucose Transporter-1 via Distinct Cis-acting Sequences. In: *J. Biol. Chem.* 270 (49), S. 29083–29089. DOI: 10.1074/jbc.270.49.29083.
- Blochlinger, Karen; Bodmer, Rolf; Jack, Joseph; Jan, Lily Yeh; Jan, Yuh Nung (1988): Primary structure and expression of a product from cut, a locus involved in specifying sensory organ identity in *Drosophila*. In: *Nature* 333 (6174), S. 629–635. DOI: 10.1038/333629a0.

- Blümel, S.; Metzger, G.; Hofmann, E.; Hänze, J.; Gress, T.; Bartsch, D. et al. (2015): CUX1 in liver cancer. Experimental study in hypoxia model. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 53 (12). DOI: 10.1055/s-0035-1568070.
- Boeckx, Roger L. (1984): Chemiluminescence. Applications for the clinical laboratory. In: *Human Pathology* 15 (2), S. 104–111. DOI: 10.1016/S0046-8177(84)80048-9.
- Borkham-Kamphorst, Erawan; van Roeyen, Claudia R.C.; Ostendorf, Tammo; Floege, Jürgen; Gressner, Axel M.; Weiskirchen, Ralf (2007): Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. In: *Journal of Hepatology* 46 (6), S. 1064–1074. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.01.029.
- Brahimi-Horn, M. Christiane; Chiche, Johanna; Pouysségur, Jacques (2007): Hypoxia signalling controls metabolic demand. In: *Current Opinion in Cell Biology* 19 (2), S. 223–229. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.02.003.
- Bracken, C. P.; Whitelaw, M. L.; Peet, D. J. (2003): The hypoxia-inducible factors. Key transcriptional regulators of hypoxic responses. In: *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 60 (7), S. 1376–1393. DOI: 10.1007/s00018-003-2370-y.
- Campana, Lara; Iredale, John P. (2017): Regression of Liver Fibrosis. In: *Seminars in liver disease* 37 (1), S. 1–10. DOI: 10.1055/s-0036-1597816.
- Campisi, J., d'Adda di Fagagna (2007): F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, S. 729-740. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cash, T.; Pan, Y.; Simon, M. (2007): Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. In: *Free Radic Biol Med.* 43(9): S. 1219–25. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.001
- Chamboredon, Sandrine; Ciais, Delphine; Desroches-Castan, Agnès; Savi, Pierre; Bono, Françoise; Feige, Jean-Jacques; Cherradi, Nadia (2011): Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. In: *Molecular biology of the cell* 22 (18), S. 3366–3378. DOI: 10.1091/mbc.E10-07-0617.
- Chen, C.; Pore, N.; Behrooz, A.; Ismail-Beigi, F.; Maity, A. (2001): Regulation of glut1 mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1. In: *J. Biol. Chem.* 276 (12), S. 9519–9525. DOI: 10.1074/jbc.M010144200.
- Choa, Young-Suk; Baeb, Jae-Moon; Chunc, Yang-Sook; Chung, Jin-Ho; Jeon, Yoon-Kyung; Kim, In-San; Kim, Myung-Suk; Park, Jong-Wan (2008): HIF-1 $\alpha$  controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783: S. 323-333. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.11.017.
- Coqueret, O; Bérubé, G; Nepveu, A (1998): The Mammalian Cut Homeodomain Protein Functions as a Cell-Cycle-Dependent Transcriptional Repressor Which Downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S Phase. In: *The EMBO journal* 17 (16). DOI: 10.1093/emboj/17.16.4680.



- Corpechot, C. (2002): Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. In: *Hepatology* 35 (5), S. 1010–1021. DOI: 10.1053/jhep.2002.32524.
- Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. In: *Genes Dev* 15(2): S. 188-200. DOI: 10.1101/gad.862301.
- Forsythe, J. A.; Jiang, B. H.; Iyer, N. V.; Agani, F.; Leung, S. W.; Koos, R. D.; Semenza, G. L. (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. In: *Molecular and cellular biology* 16 (9), S. 4604–4613. DOI: 10.1128/MCB.16.9.4604.
- Fragiadaki, M.; Ikeda, T.; Witherden, A.; et al. (2011): High doses of TGF- $\beta$  potently suppress type I collagen via the transcription factor CUX1. In: *Mol Biol Cell* 22, S. 1836-1844. DOI: 10.1091/mbc.E10-08-0669.
- Friedman, S. L.; Rockey, D. C.; McGuire, R. F.; Maher, J. J.; Boyles, J. K.; Yamasaki, G. (1992): Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. In: *Hepatology* 15(2): S. 234-43. DOI: 10.1002/hep.1840150211.
- Friedman, S. (1996): Hepatic stellate cells. In: *Prog Liver Dis* 14: S. 101-30.
- Friedman, Scott (1999): Cytokines and Fibrogenesis. In: *Semin Liver Dis* 19 (02), S. 129–140. DOI: 10.1055/s-2007-1007105.
- Friedman, Scott L. (2000): Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. In: *J. Biol. Chem.* 275 (4), S. 2247–2250. DOI: 10.1074/jbc.275.4.2247.
- Friedman, Scott L. (2003): Liver fibrosis – from bench to bedside. In: *Journal of Hepatology* 38, S. 38–53. DOI: 10.1016/S0168-8278(02)00429-4.
- Friedman, Scott L. (2008a): Hepatic stellate cells. Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. In: *Physiological reviews* 88 (1), S. 125–172. DOI: 10.1152/physrev.00013.2007.
- Friedman, Scott L. (2008b): Mechanisms of hepatic fibrogenesis. In: *Gastroenterology* 134 (6), S. 1655–1669. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003.
- Friedman, Scott Laurence (2012): Fibrogenic cell reversion underlies fibrosis regression in liver. In: *PNAS* 109 (24), S. 9230-9231. DOI: 10.1073/pnas.1206645109.
- Furey, Terrence S.(2012): ChIP-seq and Beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. In: *Nat Rev Genet.* 13(12): 840–852. DOI: 10.1038/nrg3306.
- Gehring, W. (1987): Homeo boxes in the study of development. In: *Science (New York, N.Y.)* 236 (4806), S. 1245–1252. DOI: 10.1126/science.2884726.
- Gibson, U. E.; Heid, C. A.; Williams, P. M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. In: *Genome research* 6 (10), S. 995–1001. DOI: 10.1101/gr.6.10.995.

Gressner, A. M.; Weiskirchen, R. (2006): Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  As major players and therapeutic targets. In: *J Cellular Mol Med* 10 (1), S. 76–99. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00292.x.

Guo, Jinsheng; Friedman, Scott L. (2007): Hepatic Fibrogenesis. In: *Semin Liver Dis* 27 (4), S. 413–426. DOI: 10.1055/s-2007-991517.

He, L.; He, X.; Lim, L. P.; De Stanchina, E.; Xuan, Z.; Liang, Y.; Xue, W.; Zender, L.; Magnus, J.; Ridzon, D.; Jackson, A. L.; Linsley, P. S.; Chen, C.; Lowe S. W.; Cleary, M. A. & Hannon, G. J. (2007): A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. In: *Nature* 447(7148), S. 1130-1134. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05939>

Hellerbrand, Claus; Stefanovic, Branko; Giordano, Frank; Burchardt, Elmar R.; Brenner, David A. (1999): The role of TGF $\beta$ 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. In: *Journal of Hepatology* 30 (1), S. 77–87. DOI: 10.1016/S0168-8278(99)80010-5.

Hernandez-Gea, Virginia; Friedman, Scott L. (2011): Pathogenesis of Liver Fibrosis. In: *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6 (1), S. 425–456. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130246.

Herold, Gerd (Hg.) (2017): *Innere Medizin 2017*. S. 547. Köln, Deutschland. ISBN: 978-3-97814660-6-5.

Hewitson, Kirsty S.; McNeill, Luke A.; Riordan, Madeline V.; Tian, Ya-Min; Bullock, Alex N.; Welford, Richard W. et al. (2002): Hypoxia-inducible Factor (HIF) Asparagine Hydroxylase Is Identical to Factor Inhibiting HIF (FIH) and Is Related to the Cupin Structural Family. In: *J. Biol. Chem.* 277 (29), S. 26351–26355. DOI: 10.1074/jbc.C200273200.

Heymann, Felix; Trautwein, Christian; Tacke, Frank (2009): Monocytes and Macrophages as Cellular Targets in Liver Fibrosis. In: *IADT* 8 (4), S. 307–318. DOI: 10.2174/187152809789352230.

Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. In: *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 10 (4), S. 413–417.

Hofmann, E.; Di Fazio, P.; Bartsch, D. K.; Gress, T. M.; Wissniowski, T. T. (2017): CUX1 führt in hepatozellulären Karzinomzellen zu einer Apoptoseresistenz. In: *Viszeralmedizin 2017*. Dresden: Georg Thieme Verlag KG (Zeitschrift für Gastroenterologie).

Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16), S. 7276–7280. DOI: 10.1073/pnas.88.16.7276.

Horev-Azaria, L.; Kirkpatrick, C. J.; Korenstein, R.; Marche, P. N.; Maimon, O.; Ponti, J. et al. (2011): Predictive toxicology of cobalt nanoparticles and ions. Comparative in vitro study of different cellular models using methods of

knowledge discovery from data. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 122 (2). DOI: 10.1093/toxsci/kfr124.

Hulett, H. R.; Bonner, W. A.; Barrett, J.; Herzenberg, L. A. (1969): Cell sorting. Automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. In: *Science (New York, N.Y.)* 166 (3906), S. 747–749. DOI: 10.1126/science.166.3906.747.

Ikeda, Tetsuro; Fragiadaki, Maria; Shi-wen, Xu; Ponticos, Markella; Khan, Korsia; Denton, Christopher; Garcia, Patricia; Bou-Gharios, George; Yamakawa, Akio; Morimoto, Chikao; Abrahama, David (2016): Transforming growth factor- $\beta$ -induced CUX1 isoforms are associated with fibrosis in systemic sclerosis lung fibroblasts. In: *Biochem Biophys Rep.* 7: 246–252. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.06.022.

Ilyin, Gennady P.; Glaise, Denise; Gilot, David; Baffet, Georges; Guguen-Guillouzo, Christiane (2003): Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285 : S. 115–G127. DOI: 10.1152/ajpgi.00309.2002.

Jaakkola, P.; Mole, D. R.; Tian, Y.-M.; Wilson, M. I.; Gielbert, J.; Gaskell, S. J. et al. (2001): Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O<sub>2</sub>-Regulated Prolyl Hydroxylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 292 (5516), S. 468–472. DOI: 10.1126/science.1059796.

James, Spencer L.; Abate, Degu; Abate, Kalkidan Hassen; Abay, Solomon M.; Abbafati, Cristiana; Abbasi, Nooshin et al. (2018): Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. In: *The Lancet* 392 (10159), S. 1789–1858. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.

Ju, Cynthia; Colgan, Sean P.; Eltzhig, Holger K. (2016): Hypoxia-inducible factors as molecular targets for liver diseases. In: *J Mol Med (Berl)* 94: S. 613–627. DOI: 10.1007/s00109-016-1408-1

Jungermann, K.; Kietzmann, T. (2000): Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. In: *Hepatology* 31(2): S. 255-60. DOI: 10.1002/hep.510310201.

Kaidi, A.; Williams, A.C.; Paraskeva, C. (2007): Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. In: *Nat. Cell Biol.*, 9: pp. 210-217. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb1534>.

Kedinger, Valerie; Sansregret, Laurent; Harada, Ryoko; Vadnais, Charles; Cadieux, Chantal; Fathers, Kelly et al. (2009): p110 CUX1 Homeodomain Protein Stimulates Cell Migration and Invasion in Part through a Regulatory Cascade Culminating in the Repression of E-cadherin and Occludin. In: *J. Biol. Chem.* 284 (40), S. 27701–27711. DOI: 10.1074/jbc.M109.031849.

Kietzmann, T.; Görlach, A. (2005): Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. In: *Semin Cell Dev Biol* 16(4-5): S. 474-86. DOI: 10.1016/j.semcdb.2005.03.010.

Kietzman, T.; Dimova, E. Y.; Flügel, D.; Scharf, J-G. (2006): Oxygen: modulator of physiological and pathophysiological processes in the liver. In: *Z Gastroenterol* 44(1): S. 67-76. DOI: 10.1055/s-2005-858987.

Kim, KY; Rhim, T; Choi, I; Kim, SS (2001): N-acetylcysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing activity. In: *J Biol Chem* 276(44): 40591-8. DOI: 10.1074/jbc.M100975200.

Kim, Jung-whan; Tchernyshyov, Irina; Semenza, Gregg L.; Dang, Chi V. (2006): HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase. A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. In: *Cell Metabolism* 3 (3), S. 177–185. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.02.002.

Kisseleva, Tatiana; Cong, Min; Paik, YongHan; Scholten, David; Jiang, Chunyan; Benner, Chris; Iwaisako, Keiko; Moore-Morris, Thomas; Scott, Brian; Tsukamoto, Hidekazu; Evans, Sylvia M.; Dillmann, Wolfgang; Glass, Christopher K.; Brenner David A. (2012): Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. In: *PNAS* 109 (24), S. 9448-9453. DOI: 10.1073/pnas.120184010.

Koshiji, M.; Kageyama, Y.; Pete, E.A.; Horikawa, I.; Barrett, J.C.; Huang, L.E. (2004): HIF-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. In: *EMBO J.*, 23: S. 1949-1956. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600196.

Koumenis, Constantinos; Alarcon, Rodolfo; Hammond, Ester; Sutphin, Patrick; Hoffman, William; Murphy, Maureen; Derr, Jennifer; Taya, Yoichi; Lowe, Scott W.; Kastan, Michael; Giaccia, Amato (2001): Regulation of p53 by Hypoxia: Dissociation of Transcriptional Repression and Apoptosis from p53-Dependent Transactivation. In: *Mol Cell Biol.* 21(4): S. 1297–1310. DOI: 10.1128/MCB.21.4.1297-1310.2001.

Krizhanovsky, Valery; Yon, Monica; Dickins, Ross A.; Hearn, Stephen; Simon, Janelle; Miething, Cornelius; Yee, Herman; Zender, Lars; Lowe, Scott W. (2008): Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. In: *Cell.* 134(4): 657–667. DOI: 10.1016/j.cell.2008.06.049.

Krug, Sebastian; Weissbach, Julia; Blank, Annika; Perren, Aurel; Haybaeck, Johannes; Fendrich, Volker; Rinke, Anja; Gress, Thomas Mathias; Rosendahl, Jonas; Michl, Patrick (2020): CUX1-Transcriptional Master Regulator of Tumor Progression in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. In: *Cancers (Basel)* 12(7): S. 1957. DOI: 10.3390/cancers12071957.

Lademann, Julia; Kolip, Petra; Deitermann, Bernhilde; Bucksch, Jens; Schwarze, Monika (2005): *Gesundheit von Frauen und Männern im mittleren Lebensalter*. Berlin: Robert Koch-Inst (Gesundheitsberichterstattung des Bundes). Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:0257-1002087>.

Lando, D. (2002): FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. In: *Genes & Development* 16 (12), S. 1466–1471. DOI: 10.1101/gad.991402.

Ledford, Aric W.; Brantley, Jennifer G.; Kemeny, Gabor; Foreman, Tonia L.; Quaggin, Susan E.; Igarashi, Peter et al. (2002): Deregulated Expression of the

Homeobox Gene Cux-1 in Transgenic Mice Results in Downregulation of p27kip1 Expression during Nephrogenesis, Glomerular Abnormalities, and Multiorgan Hyperplasia. In: *Developmental Biology* 245 (1), S. 157–171. DOI: 10.1006/dbio.2002.0636.

Li, Jinping; Wang, Enfeng; Dutta, Shamit; Lau, Julie S.; Jiang, Shi-wen; Datta, Kaustubh; Mukhopadhyay, Debabrata (2007): Protein kinase C-mediated modulation of FIH-1 expression by the homeodomain protein CDP/Cut/Cux. In: *Molecular and cellular biology* 27 (20), S. 7345–7353. DOI: 10.1128/MCB.02201-06.

Lison, D. (2001): Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. In: *Occupational and Environmental Medicine* 58 (10), S. 619–625. DOI: 10.1136/oem.58.10.619.

Liu, N.; Sun, Q.; Wan, L.; Wang, X.; Feng, Y.; Luo, J.; Wu, H. (2020): CUX1, A Controversial Player in Tumor Development. In: *Front Oncol.* 10, S. 738. DOI: 10.3389/fonc.2020.00738.

Mahon, PC; Hirota, K; Semenza, GL (2001): FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. In: *Genes Dev.* 15(20): S. 2675-86. DOI: 10.1101/gad.924501.

Mailly, F.; Bérubé, G.; Harada, R.; Mao, P. L.; Phillips, S.; Nepveu, A. (1996): The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms. Active repression and competition for binding site occupancy. In: *Mol. Cell. Biol.* 16 (10), S. 5346–5357. DOI: 10.1128/MCB.16.10.5346.

Malec, Viktor; Gottschald, Oana R.; Li, Shu; Rose, Frank; Seeger, Werner; Hänze, Jörg (2010): HIF-1  $\alpha$  signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells. In: *Free radical biology & medicine* 48 (12), S. 1626–1635. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.008.

Maxwell, Patrick H.; Wiesener, Michael S.; Chang, Gin-Wen; Clifford, Steven C.; Vaux, Emma C.; Cockman, Matthew E. et al. (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. In: *Nature* 399 (6733), S. 271–275. DOI: 10.1038/20459.

Metzen, Eric; Ratcliffe, Peter J. (2004): HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. In: *Biological chemistry* 385 (3-4), S. 223–230. DOI: 10.1515/BC.2004.016.

Michl, Patrick; Ramjaun, Antoine R.; Pardo, Olivier E.; Warne, Patricia H.; Wagner, Martin; Poulson, Richard et al. (2005): CUTL1 is a target of TGF $\beta$  signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. In: *Cancer Cell* 7 (6), S. 521–532. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.05.018.

Minet, E.; Ernest, I.; Michel, G.; Roland, I.; Remacle, J.; Raes, M.; Michiels, C. (1999): HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR. In:

Biochem. Biophys. Res. Commun. 261: S. 534–540. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0995.

Moon, Andrew M.; Singal, Amit G.; Tapper, Elliot B. (2019): Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. In: Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. DOI: 10.1016/j.cgh.2019.07.060.

Moon, J; Welch, T; Gonzalez, F; Copple, B. (2009): Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. In: Am.J Physiol Gastrointest. Liver Physiol. 296(3): S. 582–592. DOI: 10.1152/ajpgi.90368.2008.

Mormone, Elisabetta; George, Joseph; Nieto, Natalia (2011): Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. In: Chemico-Biological Interactions 193 (3), S. 225–231. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.07.001.

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro. The Polymerase Chain Reaction. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51 (0), S. 263–273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.

Muñoz-Sánchez, Jorge; Chánez-Cárdenas, María E. (2018): The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. In: J Appl Toxicol 39 (4), S. 556–570. DOI: 10.1002/jat.3749.

Nepveu, Alain (2001): Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. In: Gene 270 (1-2), S. 1–15. DOI: 10.1016/S0378-1119(01)00485-1.

Neubauer, Katrin; Knittel, Thomas; Armbrust, Thomas; Ramadori, Giuliano (1995): Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during shortterm and longterm rat liver injury. In: Gastroenterology 108 (4), S. 1124–1135. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90211-2.

Neufeld, Ellis J.; Skalnik, David G.; Lievens, Patricia M-J.; Orkin, Stuart H. (1992): Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, cut. In: Nat Genet 1 (1), S. 50–55. DOI: 10.1038/ng0492-50.

Nicholson, Karleen M; Anderson, Neil G (2002): The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. In: Cell Signal 14(5): S. 381-95. DOI: 10.1016/s0898-6568(01)00271-6.

Nieto, Natalia (2006): Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells on stellate cells. In: Hepatology 44 (6), S. 1487–1501. DOI: 10.1002/hep.21427.

Novo, Erica; Cannito, Stefania; Zamara, Elena; Di Bonzo, Lorenzo Valfrè; Caligiuri, Alessandra; Cravanzola, Carlo et al. (2007): Proangiogenic Cytokines as Hypoxia-Dependent Factors Stimulating Migration of Human Hepatic Stellate Cells. In: The American Journal of Pathology 170 (6), S. 1942–1953. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060887.

Pan, Tao; Jin, Zhijian; Yu, Zhenjia; Wu, Xiongyan; Chang, Xinyu; Fan, Zhiyuan; Li, Fangyuan; Wang, Xiaofeng; Li, Zhen; Zhou, Quan; Li, Jianfang; Liu, Bingya;

Su, Liping (2020): Cathepsin L promotes angiogenesis by regulating the CDP/Cux/VEGF-D pathway in human gastric cancer. In: *Gastric Cancer*. 23(6): S. 974-987. DOI: 10.1007/s10120-020-01080-6.

Pfaffl (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. In: *BIOspektrum* 10. Jahrgang (1), S. 92–95. Online verfügbar unter <https://www.gene-quantification.de/pfaffl-biospektrum-2004.pdf>, zuletzt geprüft am 05.05.2020.

Poitz, David M.; Augstein, Antje; Hesse, Kathleen; Christoph, Marian; Ibrahim, Karim; Braun-Dullaeus, Rüdiger C.; Strasser, Ruth H.; Schmeißer, Alexander (2014): Regulation of the HIF-system in human macrophages--differential regulation of HIF- $\alpha$  subunits under sustained hypoxia. In: *Mol. Immunol.* 57(2): S.226-35. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.10.001.

Ramdzan, Z., Nepveu, A. (2014): CUX1, a haploinsufficient tumour suppressor gene overexpressed in advanced cancers. In: *Nat Rev Cancer* 14, S. 673–682. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3805>.

Ramadori, G.; Veit, T.; Schwögler, S.; Dienes, H. P.; Knittel, T.; Rieder, H.; Zum Meyer Büschenfelde, K.-H. (1990): Expression of the gene of the  $\alpha$ -smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. In: *Virchows Archiv B Cell Pathol* 59 (1), S. 349–357. DOI: 10.1007/BF02899424.

Ripka, S.; König, A.; Buchholz, M.; Wagner, M.; Sipos, B.; Kloppel, G. et al. (2007): WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. In: *Carcinogenesis* 28 (6), S. 1178–1187. DOI: 10.1093/carcin/bgl255.

Rojkind, M.; Giambrone, M.; Biempica, L. (1979): Collagen types in normal and cirrhotic liver. In: *Gastroenterology*. Apr. 76(4): S.710-719.

Sansregret, Laurent; Nepveu, Alain (2008): The multiple roles of CUX1. Insights from mouse models and cell-based assays. In: *Gene* 412 (1-2), S. 84–94. DOI: 10.1016/j.gene.2008.01.017.

Semenza, G. L.; Agani, F.; Booth, G.; Forsythe, J.; Iyer, N.; Jiang, B. H.; Leung, S.; Roe, R.; Wiener, C.; Yu, A. (1997): Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. In: *Kidney Int.* 51: S. 553–555. DOI: 10.1038/ki.1997.77.

Schrade, J.; Fallowfield, J.; Iredale, J.P. (2009): Senescence of Activated Stellate Cells: Not Just Early Retirement. In: *HEPATOLOGY*, Vol. 49, S. 1045-1047. DOI 10.1002/hep.22832.

Serocki, Marcin; Bartoszewska, Sylwia; Janaszak-Jasiecka, Anna; Ochocka, Renata J.; Collawn, James F.; Bartoszewski, Rafał (2018): miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. In: *Angiogenesis* 21(2): S. 183–202. DOI: 10.1007/s10456-018-9600-2.

Schuppan, Detlef; Ashfaq-Khan, Muhammad; Yang, Ai Ting; Kim, Yong Ook (2018): Liver fibrosis. Direct antifibrotic agents and targeted therapies. In: *Matrix Biology* 68-69, S. 435–451. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.04.006.

- Schuppan, Detlef; Ruehl, Martin; Somasundaram, Rajan; Hahn, Eckhart G. (2001): Matrix as a Modulator of Hepatic Fibrogenesis. In: *Semin Liver Dis* 21 (03), S. 351–372. DOI: 10.1055/s-2001-17556.
- Sheflin, L.G.; Zou, A.P.; Spaulding, S.W. (2004): Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 322: S. 644–51. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.173.
- Shi, Yue-Feng; Fong, Chi-Chun; Zhang, Qi; Cheung, Pik-Yuen; Tzang, Chi-Hung; Wu, Rudolf S. S.; Yang, Mengsu (2007): Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF-beta signaling pathway. In: *FEBS letters* 581 (2), S. 203–210. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.12.010.
- Tacke, F.; Weiskirchen, R. (2010): Pathophysiologie der Leberfibrose. Aktuelle Aspekte und neue Ansätze für antifibrotische Therapien. In: *Der Internist* 51 (1), S. 21–29. DOI: 10.1007/s00108-009-2419-6.
- Tapper, Elliot B.; Parikh, Neehar D. (2018): Mortality due to cirrhosis and liver cancer in the United States, 1999-2016. Observational study. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 362, k2817. DOI: 10.1136/bmj.k2817.
- Tiselius, Arne (1938): Elektrophoretische Messungen am Eiwei. In: *Kolloid-Zeitschrift* 85 (2-3), S. 129–137. DOI: 10.1007/BF01519260.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Truscott, M; Raynal, L; Wang, Y; Berube, G; Leduy, L; Nepveu, A (2004): The N-terminal region of the CCAAT displacement protein. (CDP)/Cux transcription factor functions as an autoinhibitory domain that modulates DNA binding. In: *J Biol Chem.* 279: 49787–94. DOI: 10.1074/jbc.M409484200.
- Tsuchida, Takuma; Friedman, Scott L. (2017): Mechanisms of hepatic stellate cell activation. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14 (7), S. 397–411. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.38.
- Uchida, T.; Rossignol, F.; Matthay, M.A.; Mounier, R.; Couette, S.; Clottes, E.; Clerici, C. (2004): Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. In: *J Biol Chem.* 279: S. 14871–8. DOI: 10.1074/jbc.M400461200.
- Vanden Heuvel, Gregory B.; Bodmer, Rolf; McConnell, Kevin R.; Nagami, Glenn T.; Igarashi, Peter (1996): Expression of a cut-related homeobox gene in developing and polycystic mouse kidney. In: *Kidney International* 50 (2), S. 453–461. DOI: 10.1038/ki.1996.336.
- Vanden Heuvel, Gregory B.; Brantley, Jennifer G.; Alcalay, Neal I.; Sharma, Madhulika; Kemeny, Gabor; Warolin, Joshua et al. (2005): Hepatomegaly in Transgenic Mice Expressing the Homeobox Gene Cux-1. In: *Molecular carcinogenesis* 43 (1), S. 18–30. DOI: 10.1002/mc.20091.



- Wang, G. L.; Semenza, G. L. (1993): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (9), S. 4304–4308. DOI: 10.1073/pnas.90.9.4304.
- Weiskirchen, Ralf; Tacke, Frank (2016): Neue Therapieoptionen für die Leberfibrose. In: *Gastroenterologie* 11 (1), S. 40–46. DOI: 10.1007/s11377-015-0026-8.
- Weiskirchen, Ralf; Weimer, Jörg; Meurer, Steffen K.; Kron, Anja; Seipel, Barbara; Vater, Inga et al. (2013): Genetic characteristics of the human hepatic stellate cell line LX-2. In: *PloS one* 8 (10), e75692. DOI: 10.1371/journal.pone.0075692.
- Wenger, Roland H. (2002): Cellular adaptation to hypoxia. O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (10), S. 1151–1162. DOI: 10.1096/fj.01-0944rev.
- Wenger, Roland H.; Kvietikova, Ivica; Rolfs, Andreas; Gassmann, Max; Martin, Hugo H. (1997): Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is regulated at the post-mRNA level. In: *Kidney international*, Vol. 51, S. 560-563. DOI: 10.1038/ki.1997.79
- Wet, J. R. de; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinski, D. R.; Subramani, S. (1987): Firefly luciferase gene. Structure and expression in mammalian cells. In: *Molecular and cellular biology* 7 (2), S. 725–737. DOI: 10.1128/mcb.7.2.725.
- Wiener, C. M.; Booth, G.; Semenza, G. L. (1996): In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: S.485–488. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1199.
- Wong, C.; Martincorena, I.; Rust, A. et al. (2014): Inactivating CUX1 mutations promote tumorigenesis. In: *Nat Genet* 46, S. 33–38. DOI: 10.1038/ng.2846.
- Wu, Danli; Yotnda, Patricia (2011): Induction and testing of hypoxia in cell culture. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (54). DOI: 10.3791/2899.
- Xu, L.; Hui, A. Y.; Albanis, E.; Arthur, M. J.; O'Byrne, S. M.; Blaner, W. S. et al. (2005): Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2. New tools for analysis of hepatic fibrosis. In: *Gut* 54 (1), S. 142–151. DOI: 10.1136/gut.2004.042127.
- Yuan, Yong; Hilliard, George; Ferguson, Tsuneo; Millhorn, David E. (2003): Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- $\alpha$ . In: *J. Biol. Chem.* 278 (18), S. 15911–15916. DOI: 10.1074/jbc.M300463200.
- Zeng, Wendy Rong; Watson, Peter; Lin, Jenny; Jothy, Serge; Lidereau, Rosette; Park, Morag; Nepveu, Alain (1999): Refined mapping of the region of loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 7 in human breast cancer defines the location of a second tumor suppressor gene at 7q22 in the region of the CUTL1 gene. In: *Oncogene* 18 (11), S. 2015–2021. DOI: 10.1038/sj.onc.1202519.

Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, Gesundheitsbericht des Bundes – gemeinsam getragen von RKI und DESTATIS;

[http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD\\_PROC?XWD\\_1060/1/XWD\\_CUBE.DRILL/XWD\\_1088/D.946/14499](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD_PROC?XWD_1060/1/XWD_CUBE.DRILL/XWD_1088/D.946/14499)

(Zugriffsdatum 09.04.2020)

Gesundheitsbericht für Deutschland, 1998, Kurzfassung, herausgegeben vom Statistischen Bundesamt, Seite 37, Punkt 58.

<http://www.gbe-bund.de/pdf/GBFD98KD.pdf>

(Zugriffsdatum 23.02.2020)

Krankheitskostenrechnung 2015, statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, Gesundheitsberichterstattung des Bundes – gemeinsam getragen von RKI und statistischem Bundesamt

[http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=i&p\\_aid=39790374&nummer=63&p\\_sprache=D&p\\_indsp=-&p\\_aid=76447530](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=39790374&nummer=63&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=76447530)

(Zugriffsdatum 09.04.2020)

## 6 Anhang

### Ergebnisse – Rohdaten

Die Rohdaten werden bei Interesse auf Nachfrage gerne zur Verfügung gestellt.

#### Publizierte Abstracts:

E Becker, P Di Fazio, J Hänze, DK Bartsch, T Gress, TT Wisniowski: Hypoxia causes hepatic stellate cells activation in the absence of CUX1. In: Z Gastroenterol 2016; 54(12):1343 -1404. DOI: 10.1055/s-0036-1597365.

Becker EM, Di Fazio P, Hänze J, Bartsch DK, Gress TM, Wisniowski TT: Hypoxia causes hepatic stellate cells activation in the absence of CUX1. In: United European Gastroenterology Journal 2017, Vol. 5(5S) A161–A836.

*“Background and Aim: CUX1 (CUTL1) is a transcription factor belonging to homeobox proteins. It is responsible of driving the transcription of genes deputed to many cellular functions like proliferation, differentiation and cell death.*

*It has been shown that its role can change and drive tumorigenesis. Up to now, its role is unknown in hepatic stellate cells. We focused on CUX1 activity in hepatic stellate cells undergoing hypoxic stress.*

*Methods: LX-2 cells were treated with 100 ng/ml CoCl<sub>2</sub> or kept at 37 ° C at low oxygen (< 0.5%). Expression of hypoxia markers and activation markers was performed by RT-qPCR. Western blotting was performed to analyze the protein level of CUX1 and HIF-1alpha.*

*Results: LX-2 cells treated for 6 hours with CoCl<sub>2</sub> or low oxygen showed an over-expression or a restoration of COL1A1 and ACTA2 after knock down of CUX1. Additionally, CDKN1A, CDKN1B, VEGFA and HIF1alpha were up-regulated in LX.2 cells previously transfected with siCUX1. Protein level of CUX1 was significantly down-regulated, whereas HIF1alpha protein was strongly up-regulated by hypoxia condition.*

*Conclusion: CUX1 controls the activation of hepatic stellate cells. Its knock down promotes the hypoxia response. CUX1 could represent a key factor for controlling liver fibrogenesis. Its role in a liver fibrosis scenario needs to be further investigated.”*

### **Meine akademischen Lehrenden in Marburg waren die Damen und Herren:**

Adamkiewicz, Adarkwah-Yiadom, Balz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Becker A., Becker S., Bender, Berger, Bertoune, Bette, Bien, Bösner, Bonaterra, Braun, Brehm, Bücking, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Dettmeyer, Dietz, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Fendrich, Feuser, Frink, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Geraedts, Göbert, Görg, **Gress**, Grosse, Grundmann, Hegele, Hertl, Hildebrand, Höffken, Hofmann, Holst, Hoyer, Hundt, Jerrentrup, Kalder, Kampmann, Kann, Kanngießler, Kim-Berger, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Knake, Köhler U., Köhler S., König, Kolb-Niemann, Koolmann, Krieg, Kruse, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Maisner, Milani, Mirow, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberkircher, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Patrascan, Peter, Peterlein, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Printz, Quint, Reese, Renz, Rost, Rothmund, Ruchholtz, Rust, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schu, Schütz, Schwarz, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steininger, Stuck, Suske, Tackenberg, Thieme, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin.

### **Meine akademischen Lehrenden in Frankfurt waren die Damen und Herren:**

Booke, Horas, Jaeger, Kacapor, Kramer, Mosch, Müller, Seelig, Vollmann, Wagner, Wölfl

## **Danksagung**

Diese Arbeit ist zwar mein eigenes Werk, dennoch haben viele Menschen zum Gelingen beigetragen. An dieser Stelle wird es deshalb Zeit DANKE zu sagen.

An erster Stelle möchte ich Dr. Pietro Di Fazio und PD Dr. Till Wissniowski nennen, durch die diese Dissertation erst zustande gekommen ist. Vielen Dank für eure Unterstützung, Geduld und Motivation. Danke für die Erfahrung auf nationalen und internationalen Wissenschaftskongressen, auf denen ich Wissenschaftsluft schnuppern durfte. Ihr standet mir immer mit kompetentem Rat und Hilfe zur Seite und habt stets an das Gelingen dieser Arbeit geglaubt.

Nicht unerwähnt bleiben darf das viszeralchirurgische und urologische Laborteam, die mir einen Platz in ihrem Labor zur Verfügung gestellt und mit guten Ratschlägen zur Seite gestanden haben. Ein riesiges Dankeschön an meine Kolleginnen der FDL-AG Isabel, Elena, Giulia und Sophie. Ihr seid mein Anker in CUXhafen gewesen. Mit euch habe ich nicht nur ein Forschungsgebiet geteilt, auch die konstruktiven AG-Treffen haben zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Kein Tag ist vergangen, an dem ich nicht von meiner Familie und meinem geliebten Ehemann unterstützt worden bin. Das ist sicherlich keine Selbstverständlichkeit. Ich danke euch sehr für eure Ausdauer und Geduld. Ihr habt mit mir sämtliche Emotionszustände beim Verfassen dieser Dissertation durchlebt, mich motiviert und unterstützt. Ihr steht immer hinter mir und dafür möchte einfach DANKE sagen.

Ein großer Dank auch an meine Freunde. Insbesondere möchte euch allen für eure moralische Unterstützung und Freundschaft danken. Euren Rückhalt schätze ich sehr.