

Aus dem Institut für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mathias Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR *CUX1* BEEINFLUSST  
EPIGENETISCH INDUZIERTE ZELLULÄRE  
STRESSREAKTIONEN IM HEPATOZELLULÄREN  
KARZINOM**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Giulia Metzger aus Nürnberg  
Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 04.03.2022  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.  
Dekan: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner  
Referent: PD Dr. med. Thaddäus Till Hippokrates Wisniowski  
1. Korreferent: PD Dr. Jörg Hänze

*Für Papa, Mamsel, Winniemann und Smelly*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 ABKÜRZUNGS-, ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
1.1. Abkürzungsverzeichnis .....	4
1.2. Abbildungsverzeichnis .....	7
1.3. Tabellenverzeichnis .....	9
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
2.1. <i>Das hepatozelluläre Karzinom</i> .....	10
2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie .....	10
2.1.2. Die Bedeutung molekularer Mechanismen zur Induktion und Progression der Hepatokarzinogenese .....	11
2.1.3. Präventive und therapeutische Strategien .....	13
2.2. <i>Histonmodifikation als epigenetischer Regulationsmechanismus</i> .....	17
2.2.1. Das Epigenom .....	17
2.2.2. Histone und Histondeacetylasen .....	18
2.2.3. Strukturelle Einteilung und Wirkprinzipien der Histondeacetylaseinhibitoren (DACis) .....	20
2.2.4. DACis in der klinischen Anwendung .....	24
2.3. <i>Alternative Mechanismen des Zelltodes: Autophagie und ER-Stress</i> .....	25
2.3.1. Funktion und Bedeutung der Autophagie .....	25
2.3.2. ER-Stress als Autophagieinduktor .....	26
2.3.3. Molekulare Mechanismen der Autophagie – Regulationen und Ablauf .....	28
2.3.4. Pathomechanismen und Einfluss der Autophagie auf ätiologische Faktoren des HCCs .....	30
2.3.5. Autophagie als zweischneidiges Schwert in der Hepatokarzinogenese .....	32
2.3.6. Strategien im Autophagie-bezogenen Therapieregime .....	34
2.4. <i>Der Transkriptionsfaktor Cut-like Homeobox 1 (CUX1)</i> .....	36
2.4.1. Struktur, Prozessierung und Funktion einzelner Isoformen .....	36
2.4.2. Die funktionelle Rolle von CUX1 in der Karzinogenese in vitro und in vivo .....	38
2.4.3. Gegenüberstellung tumorsuppressiver und onkogener Funktionen von CUX1 .....	39
2.4.4. CUX1 als therapeutischer Angriffspunkt? .....	42
<b>3 FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>43</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>44</b>
4.1. <i>Materialien</i> .....	44
4.1.1. Verwendete Geräte .....	44
4.1.2. Verwendete Software .....	46
4.1.3. Chemikalien und Reagenzien .....	46
4.1.4. Verbrauchsmittel .....	49

4.1.5. Fertigkits .....	50
4.1.6. Substanzen und Medikamente .....	51
4.1.7. siRNA`s, Primer und Antikörper .....	51
4.1.8. Medien, Puffer und Lösungen .....	55
4.2. Zellbiologische Methoden und Zellkultur .....	56
4.2.1. Charakterisierung verwendeter Tumorzelllinien .....	56
4.2.2. Kultivierungsbedingungen, Auftauen und Passagieren .....	56
4.2.3. Zellzahlbestimmung .....	58
4.2.4. Kryokonservierung von Kulturzellen .....	58
5.2.5. Transfektion .....	58
4.2.6. Beimpfen der Zellen mit DACis .....	61
4.3. Biochemische und molekularbiologische Methoden .....	63
4.3.1. Expressionsanalysen .....	63
4.3.2. Proteinbiochemie zur Bestimmung der Proteinexpression .....	67
4.4. Echtzeitzellanalysen mit xCELLigence RTCA (real time cell analyzer) .....	71
4.4.1. Komponenten des Systems und Messprinzip .....	71
4.4.2. Proliferationsmessung .....	72
4.5. Fluoreszenzmikroskopische Methoden .....	72
4.5.1. Charakterisierung verwendeter Zelllinien und Hintergrund .....	72
4.5.2. Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenz .....	73
4.5.3. Fluoreszenzmikroskopie .....	74
4.6. Quantifizierung und statistische Auswertung .....	75
<b>5 ERGEBNISSE .....</b>	<b>76</b>
5.1. CUX1-Knockdown - Transfektionsversuche mit den siRNAs 1,4,7 und 8 für CUX1 .....	76
5.2. Modulation der mRNA-Expression von ER-Stress- und Autophagie-Markern ohne Substanzbehandlung .....	76
5.3. Modulation der mRNA- und Proteinexpression der ER-Stress-Marker nach Substanzbehandlung .....	77
5.4. Modulation der mRNA- und der Proteinexpression der Autophagie-Marker nach Substanzbehandlung .....	83
5.5 xCELLigence® - CUX1-bedingte Regulation des Proliferationsverhaltens unter Substanzbehandlung .....	91
5.6. Fluoreszenzmikroskopie - die CUX1-bedingten Modulation der DACi-induzierten Autophagosomen-Reifung und Autolysosomen-Bildung .....	94
<b>6 DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
6.1. Onkogenes Potential von CUX1 .....	97
6.1.1. CUX1 fördert ER-Stress-vermittelte zelluläre Reparaturmechanismen – Beitrag zur multi drug resistance in Tumorzellen? .....	97
6.1.2. CUX1 begünstigt durch antiapoptotisches Potential die Zellproliferation ..	100
6.2. Tumorsuppressives Potential von CUX1 .....	101

6.2.1. CUX1 fördert die tumorsuppressive Rolle der Autophagie durch den autophagischen Zelltod .....	101
6.2.3. CUX1 reguliert die autophagische Proteinexpression .....	107
6.2.4. CUX1 fördert die Panobinostat-induzierte Biogenese des Autophagosoms	109
6.2.5. CUX1 als Interakteur zwischen Autophagie und Apoptose? .....	110
6.2.6. CUX1 begünstigt die CHOP-induzierte Apoptose-Induktion in p53-defizienten Zellen.....	113
<i>6.3. Die Rolle von CUX1- Ausblick und Realisierbarkeit therapeutischer Optionen im HCC.....</i>	<i>116</i>
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>118</b>
<b>8 ABSTRACT .....</b>	<b>120</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>122</b>
<b>10 ANHANG .....</b>	<b>138</b>

# 1 ABKÜRZUNGS-, ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

## 1.1. Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APAF1	<i>engl. Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATF4/6	<i>engl. activation transcription factor 4/6</i>
ATGs	<i>engl. autophagie related proteins</i>
ATP	Adeninriphosphat
Bax	<i>engl. Bcl-2-associated X protein</i>
Bak	<i>engl. Bcl-2 homologous antagonist/ killer</i>
BCL2	<i>engl. B-cell-lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>engl. B -cell lymphoma extra large</i>
BCLC	<i>engl. Barcelona-Clinic Liver Cancer</i>
BER	<i>engl. base excision repair</i>
BIP/GRP78	<i>engl. binding immunoglobulin protein/glucose related protein 78 kDa</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspasen	<i>engl. Cysteiny-aspartate specific protease</i>
CDKs	<i>engl. cyclin dependent kinases</i>
CHOP	<i>engl. C/EBP homologous protein</i>
CI	Zellindex
CKII	Casein-Kinase II
CLT	<i>engl. cadaveric liver transplant</i>
CMA	<i>engl. chaperone mediated autophagy</i>
CRs	<i>engl. cut repeats</i>
CUX1	<i>engl. Cut like homebox gene 1</i>
DACi	Histondeacetylaseinhibitor
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase

ECOG	<i>engl. Eastern Cooperative Oncology Group)</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF/ EGFR	<i>engl. epidermal growth factor / epidermal growth factor receptor</i>
EGFP/ERFP	<i>engl. enhanced green fluorescent protein / red fluorescent protein</i>
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>engl. endoplasmatic reticulum associated protein degradation</i>
FDA	<i>engl. food and drug administration</i>
FGFR	<i>engl. fibroblast growth factor receptor</i>
FiP200	<i>engl. focal adhesion kinase family interacting protein 200</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAT	Histonacetylase
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCQ	Hydroxychloroquin
HCV	Hepatitis C-Virus
HD	<i>engl. homeodomain</i>
HDAC	Histondeacetylase
HIF1 $\alpha$	<i>engl. hypoxia inducing factor 1<math>\alpha</math></i>
HRP	<i>engl. horse raddish peroxidase</i>
Hsp70	<i>engl. heat shock protein 70</i>
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IRE1	<i>engl. inositol requiring enzyme 1</i>
JAK2	Januskinase 2
LDLT	<i>engl. living-donor liver transplant</i>
MAMs	Mitochondrien-assozierte ER-Membranen
MAP1LC3B	<i>engl. microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
MDM2	<i>engl. mouse double minute two homologue</i>



MET/EMT	<i>engl. mesenchymal-epithelial transition/epithelial-mesenchymal transition</i>
MOMP	<i>engl. mitochondria outer membran polarization</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
miRNA	microRNA
mRNA	<i>engl. messenger RNA</i>
mTOR	<i>engl. mechanistic/mammalian target of rapamycin</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAFLD	<i>engl. non alcoholic fatty liver disease</i>
NTC	<i>engl. non template control</i>
OGG1	<i>engl. 8-oxoguanine DNA-glycosylase</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCAF/CBP	<i>engl. P300/CBP-associated factor / CREB-binding protein</i>
PD-1	<i>engl. programmed cell death-1</i>
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDGFR	<i>engl. platelet-derived growth factor receptor</i>
PEI	Perkutane Ethanol-Injektion
PERK	<i>engl. eucaryotic translation initiation factor 2<math>\alpha</math>-kinase</i>
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PTEN	<i>engl. phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>engl. quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RB	Retinoblastom-Protein
RFA	Radiofrequenzablation
RILD	<i>engl. radiation induced liver disease</i>
RISC	<i>engl. RNA-inducing silent complex</i>
ROS	<i>engl. reactive oxygen species</i>
rpm	<i>engl. rotations per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SAHA	<i>engl. suberoylanilidehydroxamic acid</i>
SBRT	<i>engl. stereotactic body radiation therapy</i>
SDS	<i>engl. sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis</i>

SHARP	<i>engl. Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assesment Randomized Protocoll</i>
siRNA	<i>engl. small interfering RNA</i>
SIRT	Selektive interne Radio-Therapie
SNAREs	<i>engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors</i>
STAT3	<i>signal transducers and activators of transcription 3)</i>
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS	<i>engl. Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>engl. Tris-buffered saline with Tween20</i>
TFEB	<i>engl. transcription factor EB</i>
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TGF- $\beta$	<i>engl. transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	<i>engl. tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRAIL	<i>engl. tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TSA	Trichostatin A
ULK	<i>engl. unc-51-like kinase</i>
UPR	<i>engl. unfolded protein response</i>
UVRAG	<i>engl. UV-radiation resistance-associated gene protein</i>
VEGF/VEGFR	<i>engl. vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor</i>

## 1.2. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Schematische Darstellung der humanen Hepatokarzinogenese. Stadien der Karzinogenese, einwirkende Stimuli und zugrunde liegende molekulare Mechanismen	11
2	Barcelona Clinic Liver Cancer Klassifikation zur Stadieneinteilung und Therapieentscheidung des HCCs	14
3	Überblick über molekulare Therapieansätze des fortgeschrittenen HCCs entsprechend den Zielstrukturen	16
4	Darstellung des Zusammenspiels aus genetischen Mutationen und epigenetischen Defekten hinsichtlich der Karzinogenese	17
5	Überblick der Wirkprinzipien der DACis	23
6	Chemische Struktur der Hydroxamsäure Panobinostat	25

7	Chemische Struktur der Hydroxamsäure Vorinostat ( <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> )	25
8	Chemische Struktur der Hydroxamsäure Trichostatin A (TSA)	25
9	Die UPR.	27
10	Zentrale molekulare Mechanismen der Autophagie in höherzelligen Eukaryonten	29
11	Die Implikation der Autophagie in den viralen Lebenszyklus des Hepatitis B und C Virus	32
12	Die Rolle der Autophagie in der Tumorinitiation, -promotion und -progression	33
13	Die multiplen Funktionen der Autophagie im Hepatozellulären Karzinom und autophagieinduzierte Medikamentenresistenzen	35
14	<i>CUX1</i> Isoformen, deren unterschiedliche DNA-Bindungskapazität und transkriptionelle Aktivität	37
15	Posttranslationale Modifikationen von <i>CUX1</i> beeinflussen die DNA-Bindungskapazität unterschiedlicher Isoformen	38
16	<i>CUX1</i> -vermittelte DNA-Reparaturmechanismen über die <i>8-oxoguanine glycosylase 1</i>	40
17	Gegenüberstellung der Funktion als Tumorsuppressorgen (rot) und der protumorigenen Eigenschaften (grün) des Transkriptionsfaktors <i>CUX1</i>	42
18	Darstellung des Messprinzips des xCELLigence	71
19	<i>CUX1-Knockdown</i> durch Transfektionsversuche mit den siRNAs 1,4,7 und 8	76
20	QRT-PCR Analyse der ER-Stress und Autophagie-Marker nach <i>CUX1-Knockdown</i>	77
21	Modulation der <i>BIP</i> -mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.	79
22	Modulation der Proteinexpression des ER-Stress-Markers BIP in der Zellreihe HepG2	80
23	Modulation der Proteinexpression des ER-Stress-Markers BIP in der Zellreihe Hep3B	81
24	Modulation der <i>ATF4</i> - und der <i>ATF6</i> -mRNA-Expression unter Substanzbehandlung	82
25	Modulation der <i>CHOP</i> -mRNA-Expression unter Substanzbehandlung	83
26	Modulation der <i>MAP1LC3B</i> -mRNA-Expression unter Substanzbehandlung	85
27	Modulation der Proteinexpression des Autophagie-Markers MAP1LC3B in der Zellreihe HepG2	86
28	Modulation der <i>BECN1</i> -mRNA-Expression unter Substanzbehandlung	87
29	Modulation der Proteinexpression des Autophagie-Markers Beclin1 in der Zellreihe Hep3B	88
30	Modulation der <i>UVRAG</i> -mRNA-Expression unter Substanzbehandlung	89
31	Modulation der <i>TFEB</i> -mRNA-Expression unter Substanzbehandlung	90

32	<i>CUX1</i> -bedingte Modulation der Zellproliferation unter Thapsigargin- und DACi-Behandlung	93
33	Einfluss auf die Autophagosomen-Biogenese durch <i>CUX1</i>	95
34	BIP als Regulator der <i>unfolded protein response</i>	99
35	Apoptose und Autophagie im Kontext des programmierten Zelltodes	102
36	Interaktionen zwischen p53 und der Autophagie	105
37	Tumorsuppressive Funktionen von <i>CUX1</i> in Abhängigkeit des p53-Status	107
38	Die wechselseitige Beziehung von Autophagie und Apoptose	111
39	BH3-Proteine und deren Auswirkungen auf die BCL2-Beclin1-Interaktion	112
40	Hypothese zur <i>CUX1</i> -bedingten Regulation der <i>CHOP</i> -mRNA-Expression	114
41	Die Rolle von <i>CHOP</i> in der extrinsischen und intrinsischen Apoptoseinduktion	115

### 1.3. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Schematische Darstellung der Histondeacetylasesubgruppen je nach Klasse I-IV, zellulärer Lokalisation und verwendetem Kosubstrat	19
2	Von der <i>FDA</i> zugelassene DACis zur Behandlung hämatologischer Neoplasien	22
3	Verwendete Zellzahl und Transfektionsreagenzien zur Evaluation der signifikantesten RNA Interferenz einzelner siRNAs	59
4	Eingesetztes Medienvolumen und Zellzahl der einzelnen Transfektionsversuche	60
5	Eingesetzte Menge siRNA bzw. NTC, serumfreies Medium und Transfektionsreagenz	60
6	Berechnung der Stocklösung der DACis und der Positivkontrolle in Abhängigkeit der Endvolumina	61
7	Inkubationsdauer der DACis je nach Methodik	62
8	Schema der zellbiologischen Methodik	62
9	Zeit- und Temperaturangabe der einzelnen Reaktionsschritte der qRT-PCR	66
10	Aufbau der <i>Chamber Slides</i>	73

## 2 EINLEITUNG

### 2.1. Das hepatozelluläre Karzinom

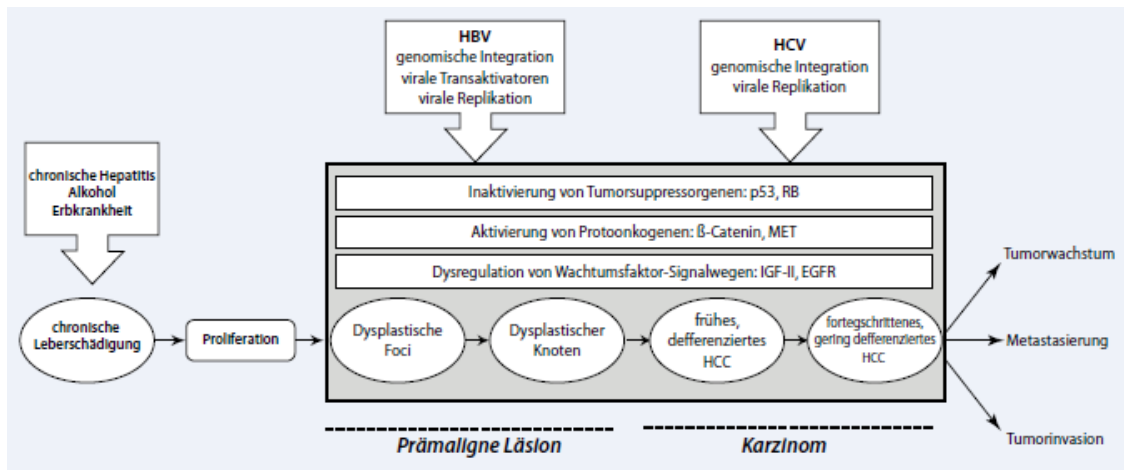
#### 2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Als weltweit zweithäufigste Todesursache infolge eines Krebsleidens steht das hepatozelluläre Karzinom (HCC) wie nie zuvor im Interesse der medizinischen Forschung (Couri und Pillai, 2019). Die Zahl der Neuerkrankungen beläuft sich derzeit auf circa 800.000 pro Jahr, die Bundesrepublik Deutschland nimmt hierbei eine Inzidenz von 4.000-6.000 Neuerkrankungen pro Jahr ein. Die Zahl der Neuerkrankungen variiert stark je nach ethnischer Zugehörigkeit und geographischer Region, sodass die europäischen Industrienationen und die USA im Vergleich zu Hochendemiegebieten wie Zentralafrika oder Südostasien deutlich seltener betroffen sind (Breuhahn, 2010). Bei zunehmender Prävalenz der HCV Infektionen und somit einem der wichtigsten ätiologischen Risikofaktoren in der Pathogenese des HCCs kann jedoch von einer global steigenden Inzidenz gesprochen werden (Ma, Chua, Andrisani und So, 2014). Ebenso sind geschlechtsspezifische Unterschiede von Männern und Frauen in einem Verhältnis von 2,4:1 zu beobachten. Der Häufigkeitsgipfel bezüglich des Alters befindet sich zwischen 30 und 50 Jahren (Ghour, Mian und Rowe, 2017). Neueste Studien zeigen eine 5-Jahres-Überlebensrate nach Durchführung einer stadiengerechten Therapie von durchschnittlich 42,4 % (Guan, Zhao und Li, 2017). Der zunächst symptomarme Krankheitsverlauf und eine mehrheitliche Diagnosestellung im fernmetastasierten Stadium erschweren eine potentiell kurative Behandlung und tragen zu einer hohen Gesamtmortalität bei (Breuhahn, 2010).

Die Hepatokarzinogenese stellt einen multimodalen, komplexen Prozess dar. Auf dem Boden diverser Risikofaktoren, welche eine chronische Leberschädigung begünstigen, führen letztendlich genetische und epigenetische Alterationen zur definitiven malignen Differenzierung der Hepatozyten (Zhang et al., 2015). Chronische Virushepatitiden, exzessiver Alkoholkonsum sowie Stoffwechselerkrankungen (wie zum Beispiel das metabolische Syndrom, der alpha-1-Antitrypsin Mangel oder die Hämochromatose) und Aflatoxin B1-Exposition führen über eine persistierende Hepatopathie und über inflammatorische Reaktionen zum zirrhotischen Umbau der Leber. Die *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) ist bei steigenden Inzidenzen des metabolischen Syndroms in den westlichen Industrienationen ebenfalls über die chronische Leberschädigung mit der Hepatokarzinogenese assoziiert (De Oliveira et al., 2018).

### 2.1.2. Die Bedeutung molekularer Mechanismen zur Induktion und Progression der Hepatokarzinogenese

Das HCC imponiert sowohl in pathologischer als auch in molekularbiologischer Hinsicht als sehr heterogener Tumor, welcher stark mit molekularen Alterationen onkogener Signalwege assoziiert wird. Daher ist es auch im Hinblick auf die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien von Relevanz, diese molekularbiologischen Aspekte genauer zu betrachten und in das klinische Wissen zu integrieren (Calderaro et al., 2017).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der humanen Hepatokarzinogenese. Stadien der Karzinogenese, einwirkende Stimuli und zugrunde liegende molekulare Mechanismen (aus Breuhahn, 2010). HBV= Hepatitis-B-Virus; HCV= Hepatitis-C-Virus; RB= Retinoblastom-Protein; IGF1R= engl. *insuline like growth factor receptor*; EGFR= engl. *epidermal growth factor receptor*

Die Hepatokarzinogenese ist ein mehrstufiger, meist jahrzehntelanger Prozess auf Basis einer chronischen Leberschädigung (siehe Abbildung 1). Ein in diesem Rahmen erhöhter Hepatozytenturnover kombiniert mit oxidativen DNA-Schäden kann zu diversen genetischen Alterationen wie chromosomalem Rearrangement, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen oder zu defekten DNA-Reparaturmechanismen führen (Allgaier, 2002). Auf dem Boden bereits bestehender Leberschädigungen sind diese Prozesse maßgeblich an der Initiation der malignen Transformation der Hepatozyten beteiligt. Breuhahn beschäftigte sich bereits 2010 mit zugrundeliegenden molekularbiologischen Vorgängen in Folge einer HBV-Infektion, welche als eine der Hauptrisikofaktoren der Entstehung des HCCs gilt. So führt einerseits die chronische Hepatitis über eine persistierende Leberzellschädigung mit anschließender Regeneration und damit assoziierter Proliferation hepatischer Zellen zu einem erhöhten HCC-Risiko. Andererseits erfolgt nach HBV-Infektion auf molekularer Ebene die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom, was häufig mit chromosomalen Rearrangements oder Deletionen im Bereich tumorrelevanter Gene (wie den Wachstumsfaktorrezeptoren oder Cyclinen) assoziiert sein kann (Schirmacher, Wang,

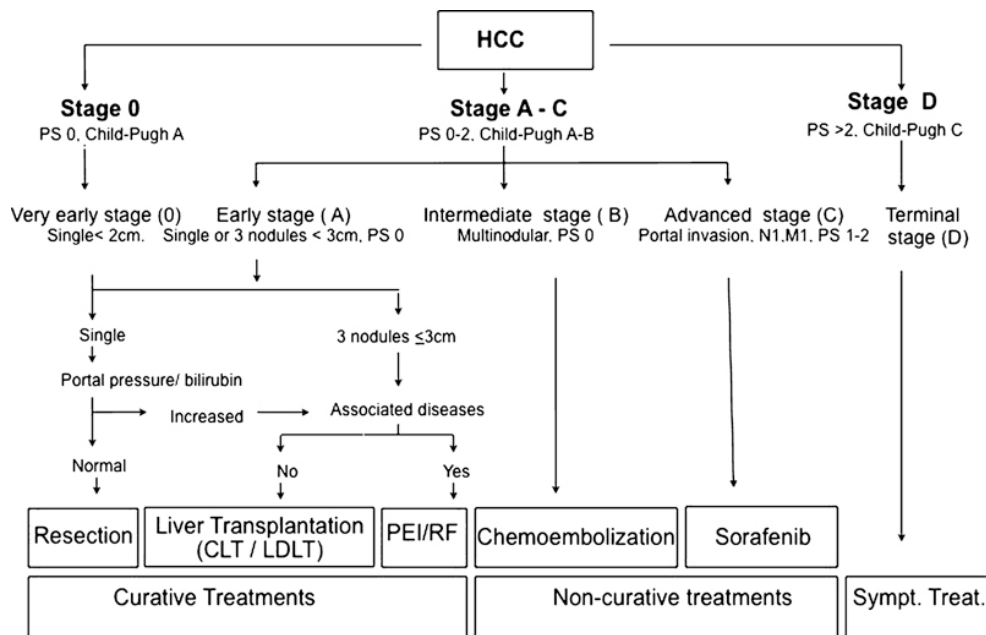
Stahnke, Will und Roger, 1995). Auch die eigenständige Induktion der Wachstumsfaktorrezeptoren *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und *insulin-like growth factor receptor* (IGFR1) ist durch diverse Oberflächenantigene des HBV möglich und trägt somit direkt zur Induktion von Angiogenese und Metastasierung bei (Tao et al., 2000). Das Tumorsuppressorgenprodukt p53 spielt als „Wächter des Genoms“ und seiner damit bezeichneten zentralen Funktion als Apoptose- und Zellzyklusregulator auch bei der Hepatokarzinogenese eine wichtige Rolle. So beschrieben Poole, Sorribes und Jain 2018 eine Vielzahl an molekularen Signalwegen, welche letztendlich zur Beeinflussung des Tumorsuppressorgens p53 und somit zur protumorigenen Entwicklung von HBV-infizierten hepatischen Zellen beitragen. Weiterhin gelten auch Tumoren unabhängig des ätiologischen Ursprungs mit nachgewiesener p53 Mutation als phänotypisch schlecht differenziert und zeigen prognostisch ungünstige Kernpolymorphismen sowie eine gesteigerte Angiogenese (Calderaro et al., 2018).

Das *telomerase-reverse-transcriptase* (TERT)-Enzym trägt wesentlich zum Erhalt der Telomeraseaktivität und somit zum unkontrollierten Zellwachstum bei. Über Exomsequenzierungen konnten Zuccmann-Rossi und dessen Kollegen 2015 eine Mutation im Bereich des TERT- Enzyms in 60 % der HCC-Fälle feststellen und beschrieben somit eine der häufigsten Genomaberrationen der Hepatokarzinogenese. Über die mögliche Integration viraler DNA nach HBV-Infektion in die TERT-Promotorregion ist auch die Assoziation zu den viralen Hepatitiden aus ätiologischer Sicht gegeben (Schulze et al., 2015). Das HCV als RNA-Virus trägt bei chronischer Infizierung ebenfalls zur Leberzellschädigung bei, es kommt im Gegensatz zum HBV jedoch nicht zur viralen Integration in das Wirtsgenom. In diesem Zusammenhang dysreguliert das HCV *core protein* Wachstumsfaktor-Signalwege wie TGF- $\beta$ , WNT/ $\beta$ -catenin oder VEGF (Mahmoudvand, Shokri, Taherkhani und Farshadpour, 2019). Durch Aktivierung entsprechender Signalkaskaden werden Neoangiogenese, Proliferation und Zellmotilität reguliert und so die Progression des HCCs vermittelt (Breuhahn, 2010). Eine häufig auftretende, jedoch noch unzureichend untersuchte ätiologische Grundlages des HCCs stellen die Histonmodifikationen dar. Die Acetylierung dieser zur Aufspiralisierung des Heterochromatins beitragenden Strukturen wird bei deren Dysregulation mit der Hepatokarzinogenese assoziiert. In 2-18 % der HCC-Fälle existieren nachweisbare Mutationen transkriptioneller Regulationsmechanismen hinsichtlich der Histonmodifikation (Zucman-Rossi, Villanueva, Nault und Llovet, 2015).

### 2.1.3. Präventive und therapeutische Strategien

Das hepatozelluläre Karzinom ist ein hochaggressiver Tumor mit unbehandelt infauster Prognose. Bei häufig symptomarmer Klinik in frühen Erkrankungsstadien und somit erschwerter Diagnosestellung in potentiell kurativen Stadien liegt auch besonderes Augenmerk auf Screeningverfahren bei chronischen Infektion mit viralen Hepatitiden oder bereits eingetretener Leberzirrhose. Die von der *American Association for the Study of the Liver Diseases* (AAFLD) anerkannten Richtlinien zum HCC-Screening bei chronischer Lebererkrankung schließen die Beurteilung des Tumormarkers  $\alpha$ -Feto Protein (AFP) im Serum sowie eine halbjährliche sonographische Kontrolluntersuchung der Leber mit ein (Heimbach et al., 2018). Eine adäquate Stadieneinteilung und Klassifizierung sind daher bei jedem Patienten essentiell. Während derzeit 18 verschiedene Stagingssysteme existieren, ist die *Barcelona-Clinic Liver Cancer* (BCLC) Klassifikation maßgeblich akzeptiert (Faria, Szklaruk, Kaseb, Hassabo und Elsayes, 2014). Berücksichtigt werden die zugrunde liegende Leberfunktion über den Child-Pugh Score, der Allgemeinzustand des Patienten anhand der Beurteilungskriterien der *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) sowie die radiologisch messbare Tumorausdehnung. Diese umfassen die morphologische Tumorgöße, die Anzahl der Tumorherde, die vaskuläre Infiltration sowie extrahepatische Metastasen und Lymphknotenmetastasen (Llovet, Brú und Bruix, 1999). Anhand dieser Kriterien werden verschiedene Subgruppen mit zugehörigen Therapieempfehlungen unterschieden (siehe Abbildung 2).

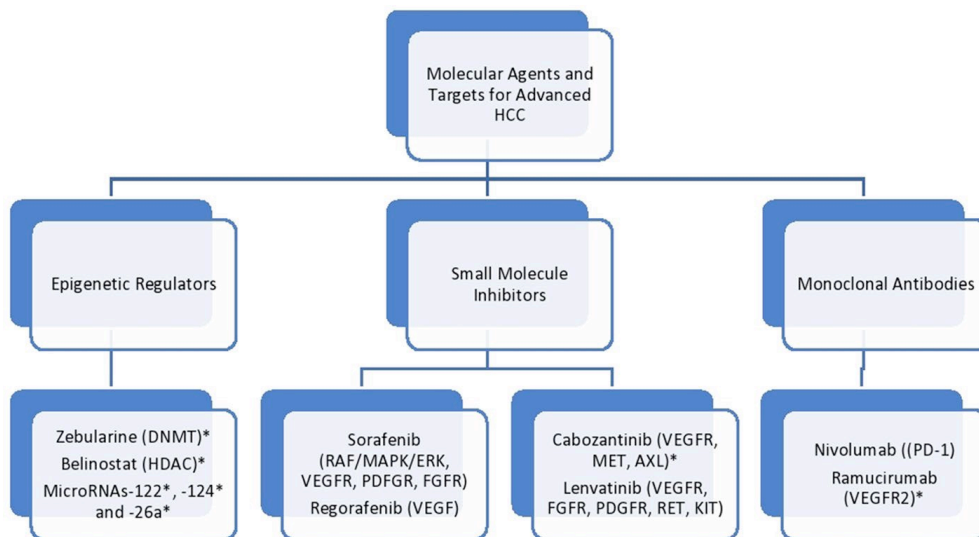




**Abb. 2:** Barcelona Clinic Liver Cancer Klassifikation zur Stadieneinteilung und Therapieentscheidung des HCCs (aus Forner, Reig, de Lope und Bruix, 2010). PS= engl. *ECOG Performance status*; CLT = engl. *cadaveric liver transplant*; LDLT= engl. *living-donor liver transplan*; PEI=engl. *percutan ethanol injection*; RF= engl. *radiofrequency ablation*

Therapeutische Schwierigkeiten stellen das oft bereits fortgeschrittene Tumorstadium sowie die hohe Komorbiditätsrate bei gleichzeitig vorliegender Leberinsuffizienz infolge der Leberzirrhose dar (Breuhahn, 2010). Zahlreiche Studien zur Evaluation der Überlegenheit der Lebertransplantation oder der Leberteileresektion als kurative Therapieoptionen zeigten eine geringere Rückfallwahrscheinlichkeit von nur 18 % sowie ein signifikant längeres, krankheitsfreies Überleben nach Transplantation (Saposichon et al., 2013). Auch wenn die Lebertransplantation den großen Vorteil hat, den ätiologischen Grund des Krebsleidens zu behandeln, qualifizieren sich jedoch nur ca. 30% für diesen chirurgischen Eingriff. Diverse Begleiterkrankungen und fortgeschrittene Tumorstadien limitieren dieses kurative Vorgehen. Die Knappheit an Spenderorganen stellt einen zusätzlich limitierenden Faktor dar (Fahrner et al., 2015). Die Radiofrequenzablation (RFA) als perkutanes Verfahren intendiert die Leberzellnekrose durch die sonographisch gesteuerte Insertion einer Nadel in den Tumor und die Gabe von elektrischen Impulsen. Bei einer 7-9 %igen Wahrscheinlichkeit des Auftretens von intraabdominellen Blutungen, Infektionen, Verletzungen der Gallengänge oder Tumorzellverschleppung zeigt auch dieser kurative Ansatz gewisse Restriktionen (Mulier et al., 2002). Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) macht sich als palliatives Verfahren die selektive arterielle Perfusion des HCCs aus der Arteria hepatica propria im Gegensatz zum restlichen Leberparenchym aus der Pfortader zu Nutze. Eine Emulsion oder Suspension aus Doxorubicin, Cisplatin oder Mitomycin C werden in den entsprechenden

Ast der Leberarterie injiziert. Die anschließende Applikation eines embolisierenden Agens reduziert die systemische Zytotoxizität und trägt durch Ischämie zusätzlich zur Tumornekrose bei (Facciorusso, Licino, Muscatillo, Di Leo und Barone, 2015). Die an diesem Prinzip angelehnte selektive interne Radiotherapie (SIRT) als nuklearmedizinisches Verfahren bedient sich radioaktiver Strahlung (meist Yttrium-90) zur Induktion einer strahlenbedingten Zellnekrose und bietet im Gegensatz zur TACE den Vorteil der Anwendbarkeit auch bei vorliegender Portalvenenthrombose (Sacco et al., 2016). Aufgrund schwerwiegender potentieller Komplikationen wie der *radiation induced liver disease* (RILD), Leberversagen und Gallengangskomplikationen hat sich die SIRT gegenüber der TACE nicht als palliatives Standardverfahren etabliert (Salem und Lewandowski, 2013). Insbesondere als vorübergehende Therapie bis zur Transplantation (*Bridging*) als auch zum *Downsizing* des initial irresektablen Karzinoms gilt die TACE... als ein häufig indiziertes Verfahren (Pompili, Francica, Ponziani, Iezzi und Avolio, 2013). Während bislang keine Studien zum Vergleich der *stereotactic body radiation therapy* (SBRT) und anderen palliativen Therapieoptionen existieren, zeigt diese Form der Teletherapie lediglich komplette Anspruchsraten von 20-60 % und ist für Patienten mit irresektablem HCC, Portalveneninfiltration und extrahepatischer Metastasierung indiziert (Meng et al., 2015). Randomisierte Studien zur systemischen zytostatischen Behandlung mit DNA-alkalierenden Substanzen (Doxorubicin), Nukleinsäurebasenanaloga (5-Fluorouracil, Gemcitabin) oder Platin-Derivaten (Oxaliplatin) ermittelten keinen signifikanten Überlebensvorteil (Lu et al., 2004, Patt et al., 2004 und Zaanen et al., 2013). Diese zusammenfassend ernüchternden Therapieoptionen erfordern neue Forschungsansätze in Richtung molekularer Initiations- und Progressionsmechanismen sowie die Identifikation möglicher therapeutischer Zielstrukturen (Breuhahn, 2010). Abbildung 3 präsentiert einen Überblick über derzeit in Studien untersuchte molekulare Therapieansätze mit je unterschiedlichen Ansatzpunkten in der humanen Hepatokarzinogenese.



**Abb. 3:** Überblick über molekulare Therapieansätze des fortgeschrittenen HCCs entsprechend den Zielstrukturen (in Klammern dargestellt). Nicht von der FDA zugelassene Therapien sind mit \* versehen. Derzeit sind lediglich Sorafenib, Regorafenib, Lenvatinib und Nivolumab als zugelassene Therapieformen von der FDA akzeptiert. DNMT=DNA-Methyltransferase, HDAC=Histondeacetylasen, PD-1= engl. *programmed death-1*, EGFR= engl. *epidermal growth factor receptor*, VEGFR= engl. *vascular endothelial growth factor receptor*, PDGFR= engl. *platelet-derived growth factor receptor*, FGFR= engl. *fibroblast growth factor receptor*, MET= engl. *mesenchymal epithelial transition* (aus Couri und Pillai, 2019)

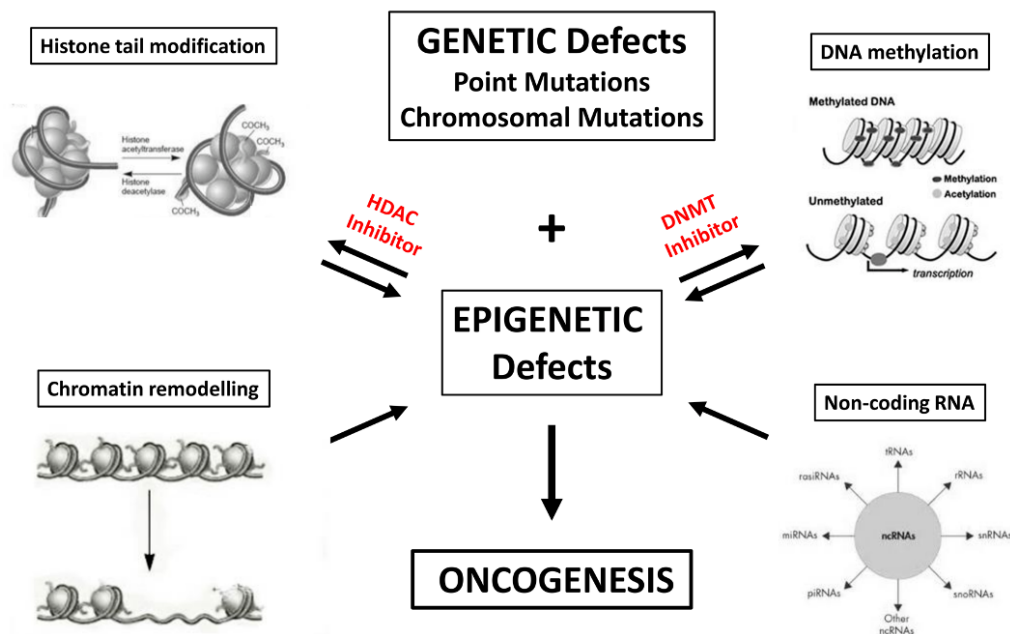
Erste Therapieerfolge auf molekularer Ebene wurden mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib (Nexavar®) erzielt. Die randomisierte SHARP-Studie zeigte die Effizienz von Sorafenib beim fortgeschrittenen HCC im Stadium BCLC C gegenüber einem Placebo als ein von 7,9 auf 10,7 Monate verlängertes medianes Überleben sowie als einen verlängerten Zeitraum von 2,8 auf 5,5 Monaten bis zum radiologisch diagnostizierbaren Progress. Sorafenib wurde 2007 als systemische Erstlinientherapie des fortgeschrittenen, irresektablen HCCs von der EMA zugelassen (Llovet et al., 2008). Lenvatinib, ein weiterer Tyrosinkinaseinhibitor erwies in der REFLECT-Studie ein vergleichbares medianes Überleben und erlangte vor Kurzem die europäische Zulassung als systemische Erstlinientherapie im metastasierten HCC (Bangaru, Marrero und Singal, 2020). Weitere kleinmolekulare Inhibitoren wie beispielsweise der FGFR- und VEGFR-Inhibitor Brivanib oder monoklonale Antikörper wie Ramucirumab befinden sich derzeit als *second line* Therapie in Prüfung. Eine Überlegenheit der kleinmolekularen Inhibitoren oder der monoklonalen Antikörper gegenüber Sorafenib oder Lenvatinib wurde bislang nicht erwiesen (Johnson et al., 2013 und Zhu et al., 2015). Epigenetische Modifikationen stellen im Rahmen der Therapieansätze auf molekularer Ebene ein weitgehend weniger erforschtes Gebiet dar. Die Epigenetik ist hierbei definiert als die Veränderungen der Genfunktion ohne die Abänderung von festen DNA-Sequenzen und beinhaltet genomische DNA-Modifikationen (Methylierung von Cytosinbasen), chemische

Modifikation an Histonenenden (Methylierung und Acetylierung) sowie die Regulation von nicht codierenden microRNAs (miRNAs) (Ma, Chua, Andrisani und So, 2014). Da diese epigenetischen Aberrationen maßgeblich zur Progression der Hepatokarzinogenese hinsichtlich der hämatologischen Dissemination beitragen, ist deren Detektion zur Früherkennung, Risikostratifizierung und Therapie des HCCs von enormer Bedeutung (Daher, Massarwa, Benson, Khouri, 2018 und Zhang, 2015).

## 2.2. Histonmodifikation als epigenetischer Regulationsmechanismus

### 2.2.1. Das Epigenom

Die Tumorentstehung und -progression darf nicht als Folge einer rein genetischen Aberration verstanden werden. Sie unterliegt vielmehr einem Zusammenspiel aus dysregulierten genetischen und epigenetischen Mechanismen. Das Epigenom fasst die drei Prozesse der DNA-Methylierung, die Histonmodifikation mit einer daraus resultierenden, veränderten Chromatinstrukturierung, und die Regulation nicht-codierender miRNAs als posttranslationale Modifikationen zusammen (siehe Abbildung 4) (Mrakovcic, Bohner, Hanisch und Fröhlich 2018).



**Abb. 4:** Darstellung des Zusammenspiels aus genetischen Mutationen und epigenetischen Defekten hinsichtlich der Karzinogenese (aus Mrakovcic et al., 2018). DNMT= DNA-Methyltransferase; HDAC=Histondeacetylase

Diese vererbaren Modifikationen besitzen phänotypische Auswirkungen, ohne die DNA-Sequenz zu verändern und betreffen unter anderem die Transkriptionsaktivität eines Genabschnittes. Dementsprechend wurden bereits in verschiedenen Tumorentitäten epigenetische Defekte wie beispielsweise die Hypermethylierung von DNA-Abschnitten mit Promotorregionen oder die Hypoacetylierung von Tumorsuppressorgenen

nachgewiesen (Ma, Chua, Andrisani und So, 2014). Im folgenden Abschnitt soll die Funktion der Acetylierung der Histone, welche als Strukturproteine der DNA fungieren, sowie anderer Enzyme im Hinblick auf die Karzinogenese erläutert werden.

### 2.2.2. Histone und Histondeacetylasen

Histone gehören zu einer Gruppe evolutionär hoch konservierter Proteine und ermöglichen die Aufspiralisierung des Heterochromatins innerhalb eines Chromosoms. Aus der engen Bindung zwischen den basischen Histonen und dem negativen Phosphatgerüst der Nukleinsäuren entsteht die repetitive Einheit des Nukleosoms. Dies bezeichnet die Aufwicklung von circa 145 Basenpaaren um ein Histonoktamer aus verschiedenen Histonklassen (H2A, H2B, H3 und H4) (Bashin, Reinherz und Reche, 2006). Die das Histonoktamer bildenden Untereinheiten werden der Gruppe der Kernhistone zugeteilt, während H1 und H5 als Verbindungshistone zwischen den Nukleosomen fungieren und in diesem Bereich die DNA-Kondensierung sicherstellen (Hammond, Stromme, Huang, Patel und Groth, 2017). Aus der Einheit des Nukleosoms herausragende *histon tails* am N-terminalen Ende der Histone bilden den Angriffspunkt für posttranslationale Modifikationen und damit epigenetische Regulationsmechanismen. Neben der Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten sowie der Ubiquitinierung wird insbesondere der Methylierung und Acetylierung von Lysin- und Argininresten eine große Bedeutung zugeschrieben (Petersen und Laniel, 2004). Diese chemischen Prozesse besitzen große Auswirkungen auf die Bindungsaffinität der Histone zu den Nukleinsäuren und üben somit direkten Einfluss auf die Transkriptionsaktivität und die daraus resultierende Genexpression aus (Cedar und Bergman, 2009). Die epigenetische Histonmodifikation wird in einem dynamischen Gleichgewicht durch zwei verschiedene Enzymklassen reguliert: den Histonacetyltransferasen (HATs), welche die positive Ladung der Histone weitgehend aufheben und so eine Lockerung in der Chromatinstruktur begünstigen und den entsprechenden Gegenspielern der Histondeacetylasen (HDACs). Durch katalytische Abspaltung der vorher an Lysinreste angehefteten Acetylgruppen sorgt diese Enzymklasse für eine engere Bindung und Aufwicklung der DNA um die Histone. Es zeigt sich demzufolge eine geschlossene Chromatinstruktur und Herunterregulation der transkriptionellen Aktivität (Shahbazian und Grunstein, 2007). Auch der Acetylierungsstatus anderer Proteine neben den Histonen modifiziert diverse zelluläre Vorgänge wie das mRNA Splicing, die Translation, die zelluläre Stabilität oder die Interaktion mehrerer Enzyme. Zu den entsprechenden weiteren Zielproteinen der HDACs zählen ebenso entscheidende Faktoren der

Zellzyklusregulation wie das Tumorsuppressorgen *p53* und dessen Repression (Quint et al., 2011). Überexprimierte HDACs bewirken einerseits durch vermehrt inaktiv vorliegendes Heterochromatin eine schlechtere Bindungsaffinität von *p53* zu dessen Zielgenen. Andererseits affektiert die direkte Deacetylierung von *p53* dessen Rekrutierung von Koaktivatoren bishin zum eigenständigen proteasomalen Abbau von *p53* durch die MDM2-Ubiquitinase (Mrakovcic, Bohner, Hanisch und Fröhlich, 2018). Dies ist nur eines der Beispiele, wie der Acetylierungsstatus die für die Karzinogenese entscheidenden Mechanismen wie Zellwachstum, Angiogenese und Metastasierung beeinflussen kann (Trisciuglio, Di Martile und Del Bufalo, 2018). Es existieren vier verschiedene Klassen der HDACs, deren Einteilung nach Struktur, enzymatischer Aktivität und Lokalisation in der Zelle entsprechend zu ihren Orthologen in Hefen erfolgt (siehe Tabelle 1) (Eckschlager, Striborova und Hrabeta, 2017).

Klasse der HDACs	Isoenzyme der HDACs	Zelluläre Lokalisation	Verwendetes Kosubstrat
<b>I</b>	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Nukleus	Zinkionen
<b>IIa</b>	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	Nukleus und Zytoplasma	Zinkionen
<b>IIb</b>	HDAC6, HDAC10	Zytoplasma	Zinkionen
<b>III</b>	Homologe des SIR2-Proteins in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , humane Sirtuine 1-7	Nukleus, Zytoplasma und Mitochondrien	Nikotinamidadenindinukleotid
<b>IV</b>	HDAC11	Nukleus und Zytoplasma	Zinkionen

**Tab. 1:** Schematische Darstellung der Histondeacetylasesubgruppen je nach Klasse I-IV, zellulärer Lokalisation und verwendetem Kosubstrat (Eckschlager, Plch, Striborova und Hrabeta 2017)

Zur Entfernung des Acetylrests bedienen sich diese Enzyme zweier unterschiedlicher Mechanismen. Einerseits finden sich im Nukleus und Zytoplasma die „klassischen“ HDACs, wobei Zinkionen das acetylierte Substrat im katalytischen Zentrum des Enzyms stabilisieren (Eckschlager, Pich, Striborova und Hrabeta, 2017). Andererseits nehmen NAD<sup>+</sup>-abhängige HDACs, die sogenannten Sirtuine, in dieser Enzymklasse eine Sonderstellung ein. Neben ihrem Vorkommen im Zytosol und im Nukleus der Zelle konnten diese Enzyme auch im Mitochondrium nachgewiesen werden. Sie beeinflussen hier den mitochondrialen Metabolismus und haben so positiven Einfluss auf die Verzögerung des zellulären Alterungsprozesses sowie auf die neuronale und zelluläre Protektion (Pereira, Lebedzinska, Wiechowski und Oliviera, 2012). Insbesondere durch Deacetylierung des Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptors- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) regulieren die Sirtuine die Fettmobilisierung und greifen in die Transkriptionsaktivität des Tumorsuppressorgens *p53* ein (Alcain und Villalba, 2009). Die Funktion aller HDACs bezüglich der Organogenese und der Gentranskription wurde anhand diverser Studien mit *Knock-out* Mäusen und entsprechender Gendeletion bestätigt. HDAC1-defiziente Mäuse verstarben bereits pränatal an gravierenden Proliferationsdefekten und Wachstumsretardierung. Weiterhin zeigten HDAC2-defiziente Mäuse letale Myokardvitien und verstarben bald nach der Geburt (Haberland, Montgomery und Olsen, 2009).

Im Gegensatz dazu legte der Nachweis einer vermehrten Expression diverser HDACs in unterschiedlichen Tumorentitäten den Grundstein neuer therapeutischer Forschungsansätze. Aus immunhistochemischen Analysen chirurgisch resezierter, primärer HCCs wurde eine positive Korrelation zwischen einer Überexpression von HDAC1-3 und dem Proliferationsmarker Ki-67 sowie einem fortgeschrittenen Tumorgrading nachgewiesen. Weiterhin wurde die Expression der HDAC2 als unabhängiger Prognosefaktor für das mediane Überleben von HCC-Patienten identifiziert (Quint et al, 2011).

### 2.2.3. Strukturelle Einteilung und Wirkprinzipien der Histondeacetylaseinhibitoren (DACis)

Ein aberranter Acetylierungsstatus eines Proteins und andere epigenetische Modifikationen finden sich gehäuft in unterschiedlichen Tumorentitäten und stellen aufgrund ihrer Reversibilität eine potentielle Zielstruktur hinsichtlich neuer, molekularer Therapieansätze dar. Das in der Karzinogenese gestörte Gleichgewicht der enzymatischen Gegenspieler HATs und HDACs sowie die Überexpression der HDACs

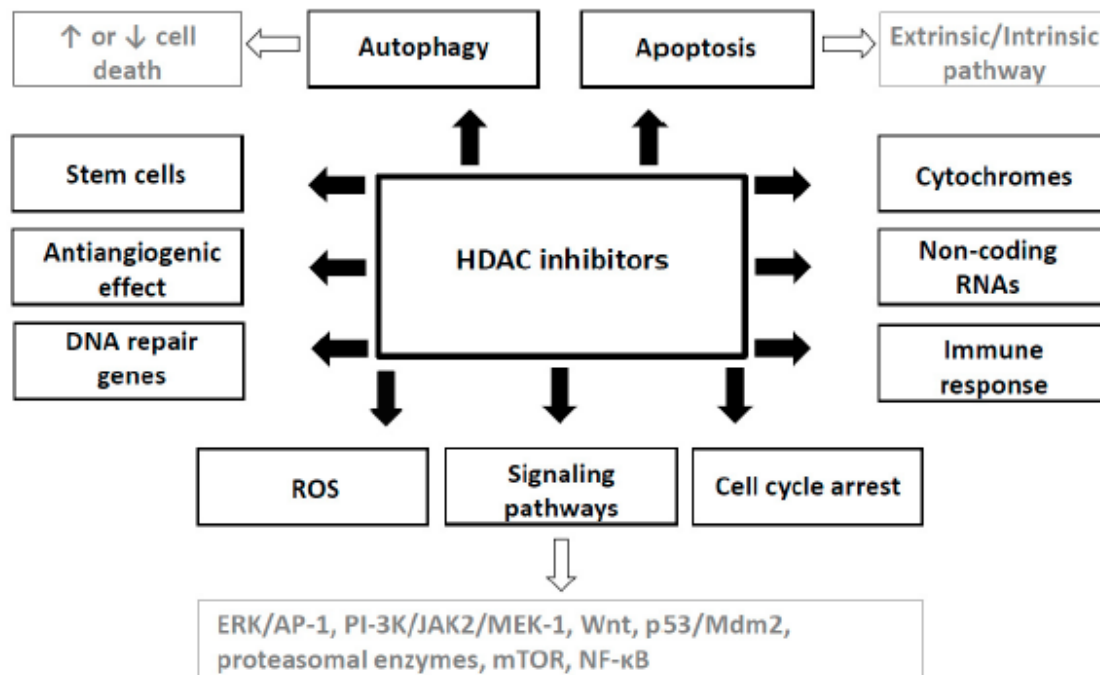
kann durch den Einsatz von Histondeacetylaseinhibitoren (DACis) beeinflusst werden. Diese Substanzklasse hat bereits in vielen präklinischen und klinischen Studien breitgefächerte antitumoröse Wirkung gezeigt (Miller, Singh, Rivera Del-Valle, Manton und Chandra, 2011). Entsprechend ihrer chemischen Struktur der Zink-bindenden Untereinheit werden die DACis in fünf Klassen eingeteilt: Hydroxamsäurederivate (Trichostatin A, Vorinostat, Panobinostat, Belinostat), zyklische Tetrapeptide oder Depsipeptide (Romidepsin), Benzamide (Etinostat, Chidamide), elektrophile Ketone und die aliphatischen Säurederivate (Phenylbutryat, Valproatsäure) (Mrakovic et al., 2018). Während Valproat als Antikonvulsivum in der Neurologie Gebrauch findet, gelten die restlichen DACis als potentielle Therapieoptionen vorrangig hämatologischer Neoplasien (Eckschlager et al., 2017). Aufgrund diverser synergistischer Effekte zwischen DNA-schädigenden Chemotherapeutika und den DACis stehen Kombinationstherapien derzeit im Interesse der medizinischen Forschung (Gahr et al., 2012). Ob hierbei eine selektive Hemmung einzelner Isoenzyme oder die Pan-DACis wie Panobinostat größeres therapeutisches und nebenwirkungsärmeres Potential besitzen, ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen (Suraweera, O'Byrne und Richard, 2018). Tabelle 2 zeigt einen Überblick der bisher von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen DACis, deren selektiver Zielstruktur und Indikationsstellung.



<b>DACi</b>	<b>Zielstruktur nach HDAC-Isoenzymen</b>	<b>FDA Zulassung</b>	<b>Zugehörigkeit zur Substanzklasse</b>	<b>Indikation</b>
<b>Belinostat [PXD-101]</b>	pan-DACi (HDAC1-3, 6, 9, 10, 11)	Juli 2014	Hydroxamsäure	Peripheres T-Zell Lymphom
<b>Panobinostat [LBH-589]</b>	pan-DACi (HDAC1-3, 6)	Februar 2015	Hydroxamsäure	Multiples Myelom (in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason)
<b>Romidepsin [FK228]</b>	HDAC1-3	November 2009	Depsipeptid	Kutanes T-Zell Lymphom Peripheres T-Zell Lymphom
<b>Vorinostat [suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]]</b>	pan-DACi (HDAC1-3, 6)	Oktober 2006	Hydroxamsäure	Kutanes T-Zell Lymphom
<b>Chidamide (strukturelles Analog von Entinostat)</b>	HDAC1-3, 10	-	Benzamid	Seit 2014 in China: peripheres T-Zell Lymphom

**Tab. 2:** von der *FDA* zugelassene DACis zur Behandlung hämatologischer Neoplasien (Shah, 2019)

Eine Hypothese der „epigenetischen Vulnerabilität“ kanzerogener Zellen zum Wirkprinzip der DACis formulierten bereits Dawson und Kouzarides 2012. Demnach sind die HDACs in tumorösem Gewebe essentiell zur Erhaltung diverser Schlüsselgene bezüglich ihres Wachstums und Überlebens während nicht mutierten Zellen viele andere Mechanismen zur Erhaltung der zellulären Homöostase zur Verfügung stehen. Die kleinste Imbalance in diesem System der HDACs führt somit zu irreparablen Schäden der Tumorzelle. Das antitumoröse Potential der DACis wirkt sich sehr pleiotrop auf die Zellhomöostase aus und unterscheidet sich je nach deren Selektivität, applizierter Dosis und vorliegender Tumorentität (Kretsovali, Hadjimichael und Charnpilas, 2012). Jedoch wurden aus vielen experimentellen Versuchen unterschiedlichster Krebszelllinien gemeinsame Wirkprinzipien der DACis ermittelt. Abbildung 5 zeigt einen Überblick der vielfältigen Auswirkungen dieser Substanzklasse.



**Abb. 5:** Überblick der Wirkprinzipien der DACis (übernommen aus Eckschlager et al., 2017). Erk/Ap1= engl. *extracellular-signal regulated kinase/activation protein 1*; PI-3K/JAK2/MEK-1= engl. *phosphatidylinositol-3-kinase/januskinase 2/MEK*; mTOR= engl. *mechanistic target of rapamycin*; NF-κB= engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*

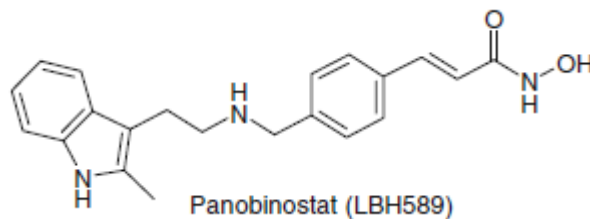
Die Induktion der Apoptose durch verschiedene Proteine und ihre zugehörigen Liganden stellt einen bislang sehr ausführlich erforschten Mechanismus dar. Demnach werden in kolorektalen Karzinomzellen sowohl proapoptotische Gene des intrinsischen Pfades (*Bax, Bak, APAF1*) als auch des extrinsischen Pfades (*TRAIL, DR5, FAS, FAS-L, TNFα*) überexprimiert, sowie antiapoptotische Gene wie das *Bcl-2*-Gen herunter reguliert (Zhu, Martin, Mengwasser, Schlag, Janssen und Göttlicher, 2004). Neben diesen klassischen Apoptosewegen konnten Di Fazio und seine Kollegen 2010 ebenfalls die Induktion alternativer Zelltodwege nachweisen, beispielsweise über die Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR) im Rahmen von Stresssituation des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Auch die Regulation des Zellzyklus obliegt den HDACs und kann durch deren Inhibitoren stark beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass die Hydroxamsäure Vorinostat (SAHA) eine *p53*-abhängige und -unabhängige Überexpression von  $p21^{cip1/waf1}$  vermittelt. Als Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen, welche maßgeblich an der Progression des Zellzyklus beteiligt sind, führt die Hochregulation von  $p21^{cip1/waf1}$  zum Zellzyklusarrest und Verhinderung der ungehemmten Tumorproliferation (Ocker und Schneider-Stock, 2007). Neben Veränderungen in der Expression nicht-kodierender miRNAs und immunmodulatorischen Effekten über eine erhöhte Stimulation von MHC-Molekülen und naiven T-Lymphozyten (Woan et al.,

2015) ist die antiangiogenetische Wirkung durch HDACs ebenfalls bedeutend: über eine verminderte Expression von VEGF und der *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) wird die Nährstoffzufuhr tumorösen Gewebes blockiert und in den Metastasierungsprozess eingegriffen (Zupkovitz et al., 2006). Es wurde ebenfalls eine Beeinflussung autophagischer Mechanismen durch DACis postuliert. So wurde gezeigt, dass die Applikation von SAHA in HCC-Zellen über reaktive Sauerstoffradikale (ROS) diesen selbstdegradierenden, zellulären Prozess induzieren kann (Park et al., 2010). Grundlage hierfür ist die Aktivitätsbeeinflussung der Autophagiegene (ATGs) über deren durch HATs und HDACs vermittelten Acetylierungsgrad (Zhang und Zhong, 2014). Die Rolle der Autophagie im Rahmen der Karzinogenese wird nach wie vor kontrovers diskutiert und zeigt je nach Entartungsgrad des Gewebes in Anfangsstadien protektive Eigenschaften zum Erhalt der zellulären Homöostase oder -bei bereits bestehendem Tumorleiden- eine erleichterte Tumorprogression und Medikamententoleranz (Huang, Wang und Wang, 2018). Auf genauere Auswirkungen der Autophagie soll in nachfolgenden Kapiteln eingegangen werden.

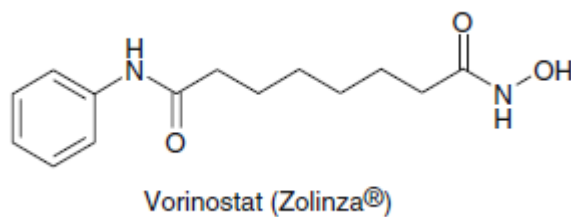
#### 2.2.4. DACis in der klinischen Anwendung

Der einzige derzeit in Europa von der *European Medicine Agency* (EMA) zur therapeutischen Anwendung beim Multiplen Myelom (in Kombination mit dem Proteasominhibitor Bortezomib und dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason) zugelassene DACi ist das oral applizierbare Panobinostat (Shah, 2019). In einem murinen Xenograftmodell zeigte Panobinostat antiangiogenetische Effekte über die Destabilisierung des Hypoxiesensors *HIF1 $\alpha$*  und führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumervaskularisierung im HCC. Auf dieser Grundlage wurde in einer klinischen Studie die Kombination des Multikinaseinhibitors Sorafenib und Panobinostat beim fortgeschrittenen, metastasierten HCC getestet. Bei verminderter radiologisch nachweisbarer Tumorprogression, schnellem Ansprechen prognostischer serologischer Parameter wie AFP oder der  $\gamma$ -GT und guter klinischer Verträglichkeit wurde die Effizienz dieser Kombinationstherapie deutlich (Gahr et al., 2012). Die Hydroxamsäure Vorinostat (SAHA) wurde im Oktober 2016 als erster DACi von der FDA in den USA zur Behandlung des refraktären kutanen T-Zell Lymphoms nach mindestens zwei nicht suffizienten systemischen Therapieversuchen zugelassen (Wagner, Hackanson, Lübbert und Jung, 2010). Auch SAHA reduziert über eine Hochregulation von p21<sup>cipl/waf1</sup> und einem G1-Zellzyklusarrest das Zellwachstum und die Tumorproliferation (Jones und Baylin, 2007). Die Effizienz der Hydroxamsäure Trichostatin A (TSA) hinsichtlich der

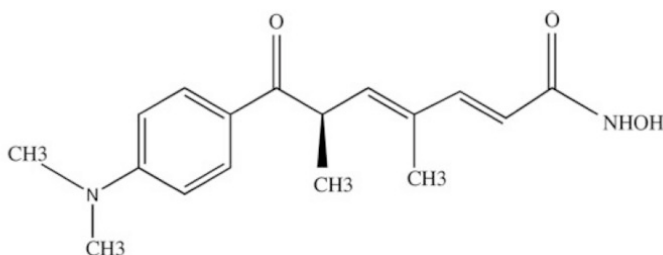
Anwendung in HCC-Zelllinien wird derzeit noch in präklinischen Studien analysiert. Die kombinierte Applikation von Sorafenib und TSA in den HCC-Zelllinien Huh7/*NF-κB-luc2* zeigte im Vergleich zur Monotherapie verstärkte antitumoröse Effekte über eine vermehrte Induktion des Transkriptionsfaktors *NF-κB* nach 48 Stunden (Chen et al., 2019). Als bereits gut untersuchte und teilweise klinisch erprobte DACis fanden Panobinostat, SAHA und TSA daher auch in dieser experimentellen Arbeit Anwendung. Die chemische Struktur der einzelnen Substanzen findet sich in den nachfolgenden Abbildungen 6,7 und 8.



**Abb. 6:** chemische Struktur der Hydroxamsäure Panobinostat (aus Wagner et al., 2010)



**Abb. 7:** chemische Struktur der Hydroxamsäure Vorinostat (*suberoylanilide hydroxamic acid*) [SAHA] (aus Wagner et al., 2010)



**Abb.8:** chemische Struktur der Hydroxamsäure Trichostatin A (TSA) (aus Kong et al., 2006)

## 2.3. Alternative Mechanismen des Zelltodes: Autophagie und ER-Stress

### 2.3.1. Funktion und Bedeutung der Autophagie

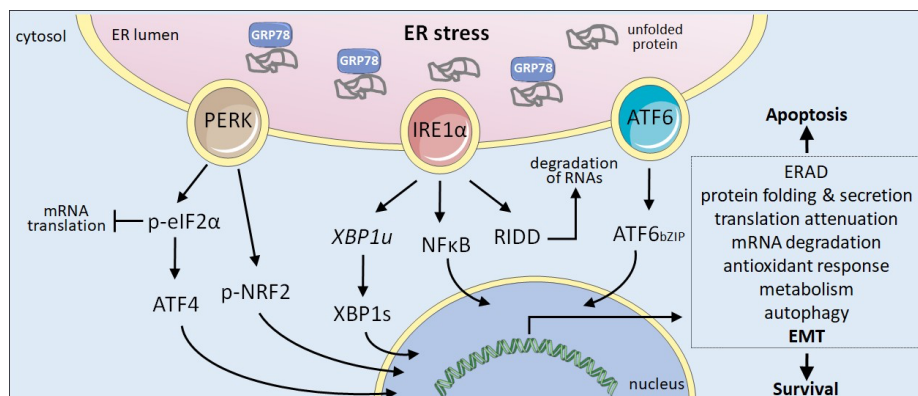
Spätestens seit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin an den Japaner Yoshinori Osumi im Jahr 2016 erlangte das Phänomen des körpereigenen Recyclingssystems die entsprechende Aufmerksamkeit, die es aufgrund seines multifunktionellen Charakters verdient (Levine und Klionsky, 2017). Die Autophagie beschreibt den Vorgang der eigenständigen Degradierung beschädigter und potentiell schädlicher Zellorganellen zur Erhaltung der zellulären Homöostase. Vorrangig unter Nährstoffmangel und im speziellen bei mangelnder Verfügbarkeit von Aminosäuren zur Proteinbiosynthese ermöglicht dieser katabole Prozess die Sicherstellung von Energieressourcen durch die Wiederverwertung langlebiger Makromoleküle und unbrauchbarer zytoplasmatischer

Organellen (Levine und Klionsky, 2004). Grundlegend ist das Zusammenspiel aus der Formation struktureller Komponenten des Autophagosoms und der Aktivierung der Autophagie Gene. Dies führt zu einer Fusion mit dem Lysosom und dem enzymatischen Abbau der im Autolysosom eingeschlossenen Komponenten (Yang und Klionsky, 2009). Dieser evolutionär hoch konservierte Mechanismus vereint drei intrazelluläre Signalwege in eukaryotischen Zellen: die Chaperon-vermittelte Autophagie oder *chaperone mediated autophagy* (CMA), die Mikroautophagie und die Makroautophagie (Klionsky und Emr 2000). Auf die Letztgenannte werden sich die nachfolgenden Erläuterungen primär beziehen. Mit der Identifikation des ersten ATGs 1996 (Kametaka, Matsuura, Wada und Ohsumi, 1996) begannen intensive experimentelle Arbeiten zur Autophagie, sodass aktuell über 40 ATGs benannt werden können (Weidberg, Shvets und Elazar, 2011). Unter den etabliertesten Versuchsmodellen finden sich noch heute hepatische Zelllinien oder transgene Mausmodelle mit hepatischen Pathologien. Nicht nur aufgrund des hohen Metabolismus der Hepatozyten, sondern auch durch den Nachweis einer engen Assoziation zwischen der Hepatokarzinogenese und der aberranten Expression zentraler Autophagie-Mediatoren (beispielsweise Beclin1/ATG6), stellt die Leber zu dieser Thematik eine vielversprechende Forschungsgrundlage dar (Ueno und Komatsu, 2017). Die Autophagie nimmt eine kritische Rolle in der Ätiopathogenese diverser Krankheitsentitäten ein, wie beispielsweise bezüglich der neuronalen Degeneration, inflammatorischer Prozesse, Schwächungen des Immunsystems oder der Karzinogenese im Allgemeinen (Chen und Karantza, 2011). Insbesondere bei der Entwicklung und Progression leberspezifischer Pathologien, wie der *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), Zirrhose, Fibrosierung sowie bei der HBV- und HCV-Infektion als ätiologische Grundlage einer malignen Transformation scheint die Autophagie entscheidend zu sein (Ke, 2019). Nicht zu vernachlässigen ist der enge Bezug der Autophagie zum Immunsystem. Einerseits durch direkte Erregerelimination, andererseits durch Kontrolle der erworbenen Immunität mittels Antigenpräsentation nach Degradation der infiltrierenden Pathogene trägt die Autophagie auch in diesem Kontext zum Schutz der Zelle bei (Netea-Maier et al., 2016). Das genaue Verständnis des Zusammenspiels aus den ATGs und weiteren modulierenden Regulatoren ist essentiell, um die Rolle dieses Recyclingprozesses in der Karzinogenese einzuordnen.

### 2.3.2. ER-Stress als Autophagieinduktor

Unter physiologischen Bedingungen treten Stressreaktionen des Endoplasmatischen Retikulums im Rahmen von Änderungen der intraluminalen Kalziumkonzentration und

des Redoxstatus oder bei einer steigenden Akkumulation fehlgefalteter Proteine auf. Hypoxie, metabolische Insuffizienzen oder ein geringfügiger Gehalt an intrazellulärem ATP gelten als Trigger beschriebener Umstände (Lindholm, Korhonen, Eriksson und Koks, 2017). Im Rahmen dieser Konditionen beschreibt der ER-Stress das zunehmende Unvermögen des Zellorganells seiner Funktion, der ko- und posttranskriptionellen Faltung neu synthetisierter, transmembranärer und sekretorischer Proteine, nachzukommen (Wang und Kaufmann, 2014). Im Sinne der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase wird unter anderem die *unfolded protein response* (UPR) aktiviert. Abbildung 9 zeigt schematisch den Ablauf der UPR und daraus resultierende Signalkaskaden, welche im Nachfolgenden erläutert werden sollen.



**Abb. 9: Die UPR.** Extrinsische oder intrinsische Stresstimuli resultieren in einer Überschreitung der zellulären

Kapazität einer korrekten Proteinsynthese. Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine mündet in der Aktivierung der drei für die UPR verantwortlichen Sensoren IRE1, PERK und ATF6. Diese werden durch die Inhibition von BIP aktiviert. Es sind weitere zelluläre Signalkaskaden dargestellt. Im Rahmen persistierenden ER-Stresses begünstigt die UPR die Apoptose. Karzinogene Zellen nutzen die UPR sowie auch die Autophagie zur Förderung des Zellüberlebens im Rahmen tumorassoziierter Stressbedingungen (aus Santamaría, Mazón, Eraso und Portillo, 2019).

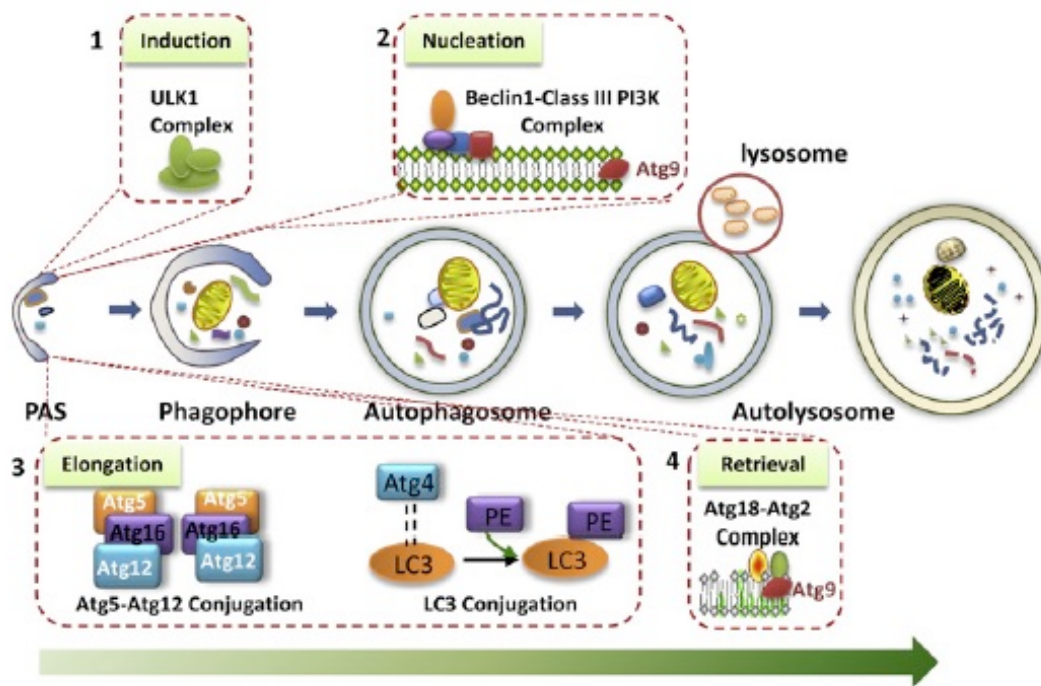
Das *binding immunoglobulin protein* (BIP, auch *heat shock protein A5* oder HSPA5) ist hierbei sowohl essentieller Bestandteil des Imports von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum als auch Regulator der Kalziumhomöostase des ERs. Zudem dient es als Vermittler der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) via des retrograden Transportes fehlgefalteter Proteine über die ER-Membran. Bei Übersteigen der Kapazität der Chaperon-vermittelten Reparatur fehlgefalteter Proteine, kann BIP die UPR aktivieren und in weiteren Schritten das Zellüberleben sichernde Maßnahmen, wie die Autophagie, initiieren (Wang, Lee, Liem und Ping, 2017). Ohne entsprechenden Stresstimulator aus dem ER inhibiert BIP die Aktivität der drei transmembranösen Sensorproteine *insitol requiring enzyme 1* (IRE1), *eucaryotic translation initiation factor 2α-kinase 3* (PERK) und *activating transcription factor 6* (ATF6) (Bertolotti, Zhang, Hendershot, Harding und Ron, 2000). Bei Aktivierung dieser Sensoren durch BIP wirkt

die UPR entweder durch Inhibierung der Translation weiterer fehlgefalteter Proteine oder durch vermehrte Expression der Chaperone den Stressbedingungen entgegen (Rashid, Yadav, Kim und Chae, 2015). Hieraus resultieren eine global erniedrigte Proteinsynthese sowie -transportrate in das Lumen des ERs sowie eine verstärkte Translation von *activating transcription factor 4* (ATF4). Dieses Protein ist seinerseits eng eingebunden in den Aminosäuremetabolismus, in die Reduktion oxidativen Stresses sowie in die zunehmende Expression des proapoptischen Proteins *c/EBP homologous protein* (CHOP) (Fusakio et al., 2016). Im Rahmen persistierenden ER-Stresses kann die UPR somit die Induktion apoptotischer Mechanismen begünstigen. Kanzerogene Zellen hingegen können die UPR sowie auch die Autophagie zur Förderung des Zellüberlebens im Rahmen tumorassoziierter Stressbedingungen nutzen (Santamaría, Mazón, Eraso und Portillo, 2019). Stressreaktionen des Endoplasmatischen Retikulums stellen somit neben einer primären Nährstoffdeprivation über die Akkumulation fehlgefalteter Proteine einen wichtigen ätiologischen Pfeiler in der Autophagieinduktion dar.

### 2.3.3. Molekulare Mechanismen der Autophagie – Regulationen und Ablauf

Die Autophagie soll als protektiver Mechanismus in Zuständen des Nährstoffmangels wie des Fastens, aber auch unter anderen Stressbedingungen wie der Hypoxie, oxidativem Stress, dem Vorhandensein freier Sauerstoffradikale und allen weiteren Formen der DNA-Schädigung die zelluläre Homöostase sicherstellen (Rubinsztein, Codogno und Levine, 2012). Die Autophagie verläuft als mehrstufiger Prozess bis zur vollständigen Bildung einer Vakuole und involviert die erstmalige Induktion der Phagophorenbildung (auch bezeichnet als Isolationsmembran), die Elongation dieser Isolationsmembran bis zur Formation des Autophagosoms und die letztendliche Fusion mit dem Lysosom (Carlsson und Simonson, 2015). Zahlreiche Zellorganellen, wie das Endoplasmatische Retikulum (Hayashi-Nishino et al., 2009), der Golgiapparat (Yen et al., 2010), die Mitochondrien (Reggiori, Shintani, Nair und Klionsky, 2005) und Mitochondrien-assoziierte ER-Membranen (MAMs) (Hamasaki et al., 2013) dienen als Quelle zur Bildung der initialen Phagophore oder Isolationsmembran. Diese stammt in der Mehrheit der Fälle vom Endoplasmatischen Retikulum und unterliegt ATG-vermittelten Wachstumsprozessen und Formationsänderungen bis zur Entstehung einer Doppelmembran und Fusion dieser beiden Enden zum geschlossenen Autophagosom (Zhao und Zhang, 2018). Nach der Fusion mit dem Lysosom zum Autolysosom werden die umschlossenen Bestandteile durch saure lysosomale Hydrolasen abgebaut und zur erneuten Nährstoffverwertung bereitgestellt (Nakamura und Yoshimori, 2017). Durch

Hungern, Fasten und insbesondere bei einem Mangel an Aminosäuren wird die Expression von *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) unterdrückt. Diese Serin/Threonin-Proteinkinase gilt einerseits als essentieller Bestandteil des Zellwachstums und andererseits als negativer Regulator der Autophagie (Saxton und Sabbatini, 2017). Die Repression von mTOR mündet in der Translokation des *unc 51-like kinase* (ULK) Komplexes (beinhaltet ULK1/2, *focal adhesion kinase family interacting protein 200* (FIP200), ATG13 und ATG101) vom Zytosol zur bereitgestellten Initiationsmembran (siehe Abbildung 10/1) (Mizushima, 2010). Anschließend wird hierdurch der *class III phosphatidylinositol-3OH-kinase* (PI3K) Komplex (beinhaltet Vsp34/PI3KC3, Vsp15, Beclin1 und ATG15) zu eben dieser Phagophore rekrutiert und fördert hier den *nucleation step* (Nukleierungsprozess/ Keimbildungsschritt) der Isolationsmembran und die Formation des Autophagosoms (Matsunaga et al., 2010) (siehe Abbildung 10/2).



**Abb. 10:** Zentrale molekulare Mechanismen der Autophagie in höherzelligen Eukaryoten (aus Cui, Gong und Shen, 2013).

Dieser Prozess impliziert das Zusammenspiel vieler weiterer, nicht-ATG-assoziierter Autophagie-Enzyme, wie beispielsweise das *UV-radiation resistance-associated gene protein* (UVRAG) (Cui, Gong und Shen, 2013). Der Prozess der Elongation und Schließung der Isolationsmembran zum vollständigen Autophagosom beruht auf den zwei *ubiquitin-like conjugation systems* ATG5/ATG12 und dem *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (MAP1LC3-PE oder MAP1LC3-II) (siehe Abbildung 10/3) (Suzuki et al., 2001). Durch Interaktion zwischen ATG8, LC3II und dem Genabschnitt



SQSTM1 ist nicht nur die unspezifische Degradierung beliebiger Zellkompartimente, sondern auch eine selektive, auf ausgewählte Zellorganellen abgestimmte Autophagie möglich (Noda et al., 2008). Die Bereitstellung von ATG9 zur weiteren Prozessierung des Autophagosoms involviert den Proteinkomplex aus ATG18- ATG2 (Mizushima, Yoshimori und Oshumi, 2011) (siehe Abbildung 10/4).

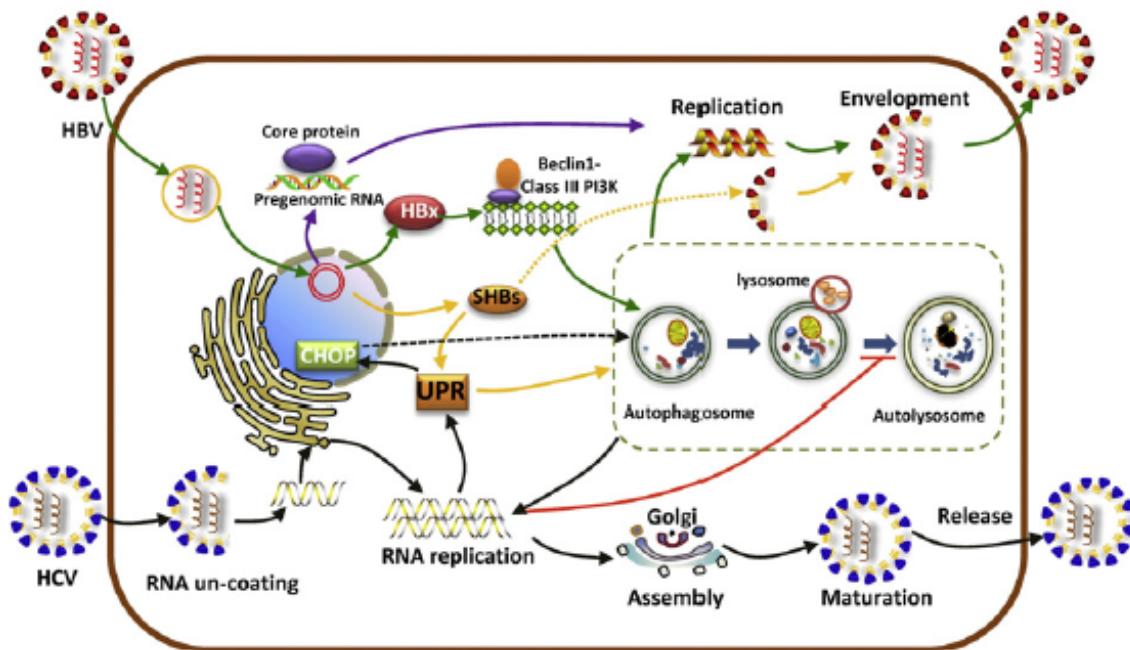
Das Autophagosom mit dem zu hydrolysierenden Inhalt bewegt sich entlang des Zytoskelettes aus den Mikrotubuli in Richtung des Lysosoms und entlädt die Ladung seines Lumens durch Fusion seiner äußeren Membran mit der des Lysosoms (Fass et al., 2006). Das Fusionspotential der beiden Komponenten beruht hierbei nicht auf den ATGs, sondern vielmehr auf der GTPase Rab7 (Gutierrez, Munafó und Berón, 2004) oder anderen Bindungsfaktoren wie den *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors* (SNAREs) (Itakura, Kishi-Itakura und Mizushima, 2012). Nach Fusion zum Autolysosom werden die innere Autophagosomenmembran und ihr Inhalt gespalten, durch lysosomale Protease hydrolysiert und für den neuen Energiemetabolismus zur Verfügung gestellt (Tsuboyama et al., 2016). TFEB (Transcription factor EB) bezeichnet ein Protein, welches bei Überexpression durch zelluläre Stressreaktionen an der Bildung von Lysosomen beteiligt ist. Da die Autophagie als ein zellulärer, kataboler Prozess aus einer Fusion aus Autophagosomen und Lysosomen verstanden wird, ist die Rolle von TFEB in der Autophagie nicht zu vernachlässigen (Settembre et al., 2011).

#### 2.3.4. Pathomechanismen und Einfluss der Autophagie auf ätiologische Faktoren des HCCs

Wie bereits beschrieben impliziert die Autophagie ein komplexes Zusammenspiel aus sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren, welche das zelluläre Überleben je nach Dosis und Art zellulärer Stressstimuli in zweierlei Hinsicht prägen. Einerseits können beschädigte Zellorganellen im Sinne eines Schutzmechanismus eliminiert werden. Eine Beeinträchtigung der Autophagie führt an dieser Stelle zur Akkumulation toxischer Substanzen und bildet den Boden für die Entstehung diverser Krankheiten, wie neurodegenerative Prozesse (Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson) (Esteves et al., 2018), lysosomale Speichererkrankungen (Seranova et al., 2017) und die Karzinogenese im Allgemeinen (Levine und Kroemer, 2008). Andererseits dient die Autophagie bei Überschreiten einer gewissen Schwellendosis zellulärer Stressoren als Mechanismus zur Induktion alternativer Zelltodewege und interagiert auf diesem Weg eng mit Apoptosemechanismen zur Verhinderung der malignen Entartung oder der Tumorprogression (Ke, 2019). Die Zusammenschau ätiologischer Grundlagen des HCCs

mit den autophagischen Mechanismen erscheint an dieser Stelle sinnvoll. Die HBV-Infektion gilt als eine der wichtigsten pathologischen Grundlagen der Hepatokarzinogenese (Farazi und DePinho, 2006). Eine gesteigerte T-Zell-vermittelte Immunreaktion nach HBV-Infektion führt zu einer chronischen Inflammation und somit einer konstanten Belastung der Hepatozyten durch Stressstimuli (Rehermann und Nascimbeni, 2005). Vermehrt anfallende freie Sauerstoffradikale und Stressreaktionen des Endoplasmatischen Retikulums führen nach erfolgter HBV-Infektion zur Induktion von Wachstumsfaktor-assoziierten Signalkaskaden, was in einer ungehemmten Zellproliferation resultieren kann (Wang, Huang, Lai und Su, 2006). Als doppelsträngiges DNA-Virus nutzt das HB-Virus die Autophagie zur Förderung der eigenen viralen Replikation (Li et al., 2011). Zur Unterstützung dieser These wiesen Tang und Kollegen 2009 eine HBV-induzierte Überexpression von *BECN1* und somit eine gesteigerte Autophagie-Induktion nach. Auch nach viraler Transfektion des HBV an Hepatozyten konnte über die Bindung von HBx an den PI3KC3-Komplex eine vermehrte Aktivierung von Autophagiemechanismen gezeigt werden (Sir et al, 2010). Das HCV als RNA-Virus trägt bei chronischer Infizierung ebenfalls zur Leberzellschädigung bei, es kommt im Gegensatz zum HBV jedoch nicht zur viralen Integration in das Wirtsgenom. Das HCV nimmt bei verstärktem zirrhotischen Umbau der Leber jedoch eine höhere Chronifizierungsrate als das HBV ein (Block, Mehta, Fimmel und Jordan, 2003). Hierbei sind diverse ATGs wie *BECN1*, *ATG4B*, *ATG5* und *ATG12* in die Translation der spezifischen viralen mRNA impliziert und fördern damit direkt die Replikation des HCV (Dreux, Gastaminza, Wieland und Chisari, 2009). Zuletzt wird durch die virale Replikation die Reifung des Autophagosoms zum Autolysosom verlangsamt, wodurch die Degradation der Viruspartikel nach Erkennung durch das Immunsystem verhindert wird (Alavian et al., 2011).

Einen Überblick der Interaktion viraler Pathomechanismen mit der Autophagie zeigt Abbildung 11.



**Abb. 11:** Die Implikation der Autophagie in den viralen Lebenszyklus des Hepatitis B und C Virus (aus Cui, Gong und Shen, 2013)

Auch Ethanol kann durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und weiteren Toxinen eine Hepatopathie bedingen (Comporti et al., 2005). Hierdurch wird deutlich, dass die Autophagie, die bei Überwiegen dieser freien Sauerstoffradikale den Zelltod zur Wahrung der Homöostase induzieren kann, mit dem ethanolbedingten HCC assoziiert ist. (Wang, Singh, Xiang und Czaja, 2010). Ding und Kollegen veranschaulichten 2010 die Assoziation zwischen Cytochrom-induzierter Freisetzung der ROS, anschließender mitochondrialer Schädigung und Aktivierung der Autophagie nach Ethanolabusus. Auch über die Überexpression von *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* und der konsekutiven Suppression des *mTOR-AKT-pathways*, welcher als negativer Regulator der Autophagie gilt, können Autophagiemechanismen induziert werden und eine protektive Rolle bezüglich ethanolbedingter Leberschäden einnehmen (Yeon, Califano, Wands und De La Monte, 2003). Die NAFLD bezeichnet die Hepatopathie aufgrund der Akkumulierung von Fettsäuren in den Hepatozyten unter der Ethanolabsenz (Angulo, 2002). Hierdurch kann die NAFLD bei gesteigerter Fibrosierung der Leber die Grundlage für eine weitere Progression hinsichtlich Zirrhose und Entwicklung des HCCs bilden. Die Autophagie nimmt hierbei über die Lipophagie, also der Degradation lipidhaltiger Partikel, eine protektive Rolle hinsichtlich der HCC-Entstehung ein (Singh et al., 2009).

### 2.3.5. Autophagie als zweiseitiges Schwert in der Hepatokarzinogenese

Die Rolle der Autophagie in der Karzinogenese ist umstritten. Durch die Eliminierung schädlicher mitochondrialer Komponenten oder die Induktion alternativer



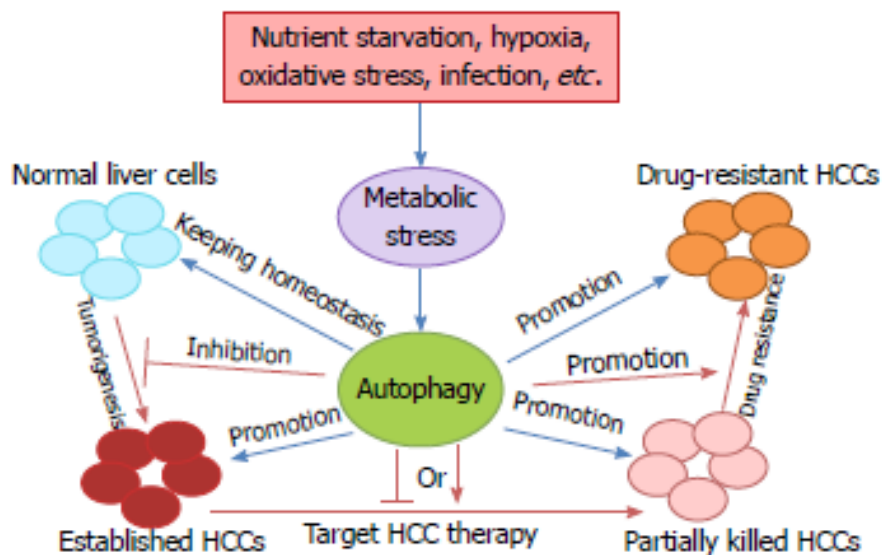
*BECN1* Expression und der sich verschlechternden Prognose für HCC-Patienten. Diese Nachweise charakterisieren *BECN1* einerseits als potenzielles Tumorsuppressorgen und zeigen andererseits die Möglichkeit eines prognostischen Biomarkers im HCC auf (Qiu et al., 2014). Auch nach Inhibition der Autophagie im hepatozytenspezifischen, transgenen Mausmodell wurde über die Akkumulation von ROS, p62 und mitochondrialer Schwellung die Tumorprogression gefördert (Tian et al., 2015).

Die ambivalente Rolle der Autophagie in der Karzinogenese wird in fortgeschrittenen Tumorstadien deutlich, wobei ihr hier eine fördernde Funktion hinsichtlich Metastasierung und therapeutischer Resistenzbildung zugesprochen wird (Huang, Wang und Wang, 2018). Gerade tumoröse Zellen verbessern über Autophagiemechanismen ihre zelluläre Homöostase und setzen über neu bereit gestellte Energieressourcen die Metastasierung in Gang (Sharifi et al., 2016). So konnten beispielsweise in metastatischen Läsionen eine weitaus höhere Konzentration des Autophagie-Proteins *microtubuli-associated protein 1 light chain 3B* (MAP1LC3B) als in primären HCC-Läsionen nachgewiesen werden, was eine enge Korrelation zwischen Metastasierung und autophagischen Mechanismen suggeriert (Peng et al., 2013). Li und Kollegen zeigten 2013 in einer weiteren experimentellen Arbeit die Assoziation zwischen dem *transforming growth factor*  $\beta$ -Smad3-Signalweg (TGF- $\beta$ -Smad3) und einer Autophagie-induzierten Verstärkung der *epithelial mesenchymal transition* (EMT). Nach fastenbedingter Autophagieinduktion mündet diese Signalkaskade in den protumorigenen TGF- $\beta$ -Signalweg. EMT markiert hierbei einen wichtigen Zwischenschritt im Metastasierungsprozess. Auch über die Affektion des EMT-Signalweges konnte nach Applikation des Autophagieinhibitors Hydroxychloroquin (HCQ) eine Reduktion der Invasion und Migration von HCC-Zellen beobachtet werden (Jian et al., 2017). Zuletzt können sich auch maligne Zellen im Rahmen chemo- oder strahlentherapeutisch induzierter Zellschäden autophagischer Reparaturmechanismen bedienen, sodass die Autophagie über therapeutische Resistenzen die Tumorprogression erleichtert (Cao et al., 2017).

#### 2.3.6. Strategien im Autophagie-bezogenen Therapieregime

In den frühen Stadien der Tumorentstehung wird ein Verlust der Autophagie mit der Tumorpromotion assoziiert, was bereits in zahlreichen experimentellen Studien belegt und beispielhaft im vorherigen Kapitel erläutert wurde. Es ist also naheliegend, die Autophagie vor einer malignen Entartung als tumorsuppressives Prinzip des Körpers zu charakterisieren.

In kanzerogenen Zellen erscheint die Funktion der Autophagie differenzierter. Einerseits kann die Autophagie als onkogener Selbsterhaltungsmechanismus tumoröser Zellen fungieren, der über autophagozytotische Prinzipien strahlen- oder chemotherapieinduzierte Schäden ausgleichen und somit einen Teil zur *multi-drug-resistance* beitragen kann (Petibone, Majeed und Casciano, 2016). Andererseits kann die Autophagie in fortgeschrittenen Tumorstadien über die Induktion alternativer Zelltodmechanismen als antitumorös charakterisiert werden und das Absterben von Krebszellen bewirken (Di Fazio und Matrood, 2018). Je nach Progressionsverhalten und Tumorstadium gilt es also zu beachten, ob eine pharmakologische Inhibition oder Induktion der Autophagie von Nutzen ist (siehe Abbildung 13).



**Abb. 13:** Die multiplen Funktionen der Autophagie im HCC und autophagieinduzierte Medikamentenresistenzen (übernommen aus Huang, Wang und Wang, 2018)

Diverse Studien belegen antikanzerogene Effekte eines autophagiebezogenen Therapieregimes. Dies wird zum Beispiel in Zusammenhang mit dem als erstes von der *FDA* zugelassenen Systemtherapeutikum Sorafenib deutlich (Chen et al., 2018). Als Multikinaseinhibitor bewirkt Sorafenib über die Hemmung des mTOR-Signalweges eine Induktion der Autophagie und kann durch einen protrahierten Zelltod eine weitere Zellprogression verhindern (Sun, Liu und Ming, 2017). Weitere Arbeiten zeigten via Autophagieinduktion synergistische, antitumoröse Effekte bei einer Kombinationstherapie aus Sorafenib und der Aktivierung von *BECN1* (Tai et al., 2013), Sorafenib und Vorinostat oder Metformin (Ling et al., 2017) oder Sorafenib und Permetrexed (Bareford et al., 2011). In weiteren experimentellen Studien erscheinen zusätzlich gesteigerte autophagische Mechanismen als attraktive Zielstruktur zur

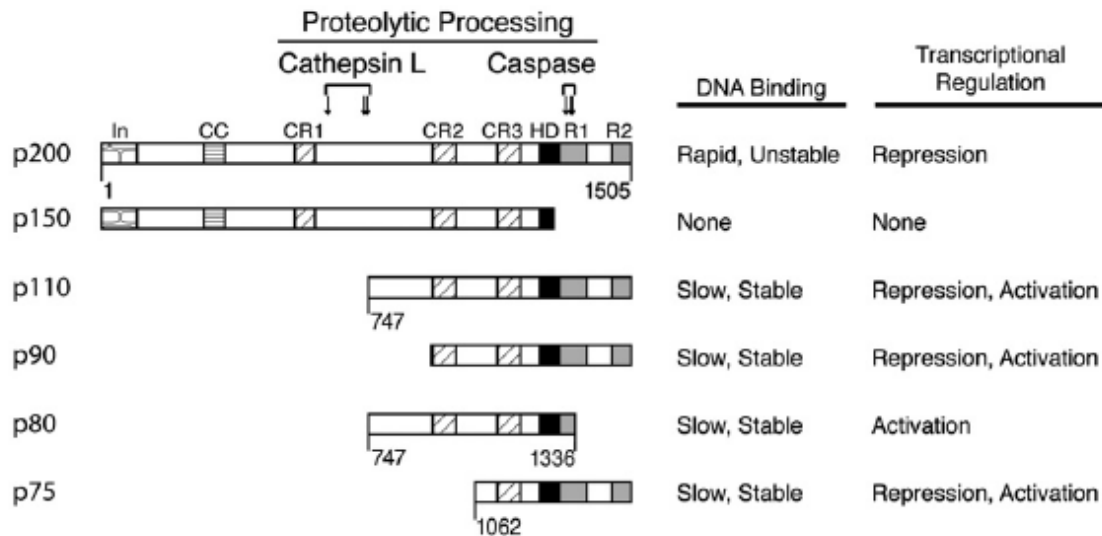
Promotion antitumoröser Effekte. Rapamycin und dessen Derivate induzieren als mTOR-Inhibitoren die Autophagozytose (Huang und Houghton, 2002). In klinischen Studien zeigten sich signifikant verlängerte Überlebensraten eines HCC-Patientenkollektivs nach Lebertransplantation (Ashworth und Wu, 2017). Hierbei konnten nach systemischer Behandlung mit Sirolimus (einem Rapamycin-Derivat) ähnliche Effekte auch ohne vorherige Lebertransplantation beobachtet werden (Decaens et al., 2012). Therapiestrategien, welche sich die antitumorösen Eigenschaften der Autophagie zu Nutze machen, erscheinen demnach vielversprechend und sollen in dieser Arbeit weiter diskutiert werden.

#### 2.4. Der Transkriptionsfaktor Cut-like Homeobox 1 (CUX1)

##### 2.4.1. Struktur, Prozessierung und Funktion einzelner Isoformen

Das CCAAT-*displacement protein* und die *Cux*-Gene gehören einer Gruppe evolutionär hoch konservierter Transkriptionsfaktoren an und sind in allen mehrzelligen Lebewesen exprimiert (Gingras, Cases, Krasilnikova und Nepveu, 2005). Der Name ist zurückzuführen auf die Gründungsmitglieder der Cuxfamilie, der sogenannten *cut*-Gene der *Drosophila melanogaster*. Diese sogenannten Homeoboxgene sind in nahezu allen Gewebsarten nachweisbar und nehmen bezüglich der Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung eine essentielle Rolle ein (Sansregret et al., 2006 und Heuver, Bodmer, McConell, Nagami und Igarashi, 1996). Die Namensgebung erfolgte aufgrund des Nachweises phänotypisch deformierter Flügel („*cut wings*“) in Folge einer *CUX1*-Mutation der *Drosophila melanogaster* (Jack, Dorsett, Delotto und Liu, 1991). Die *CUX1*-Gene exprimieren unterschiedliche Isoformen, welche entsprechend ihres spezifischen Molekulargewichts in p200, p150, p110, p90, p80 und p75 eingeteilt und benannt werden. Die vollständige, nicht modifizierte p200-Isoform beinhaltet vier DNA-Bindungsdomänen: die *Cut Repeats 1-3* (CT1-3) und die *Cut Homeodomäne* (HD) (Truscott et al., 2004). Während die p75-Isoform Produkt einer kürzeren mRNA im Rahmen eines alternativen Transkriptionsstartes ist, entstehen die restlichen Isoformen durch proteolytische Prozessierung durch Cathepsin L alleine (p110 und p90) oder in Kombination mit einer Caspase (p80) an der N- und C-terminalen Seite der nicht modifizierten p200-Isoform. Je nach Vorhandensein der vier Bindungsdomänen zeigen die einzelnen Isoformen verschiedene DNA- Bindungsaffinitäten und transkriptionelle Aktivitäten (Goulet et al., 2004 und Goulet, Truscott und Nepveu, 2006) (siehe Abb. 14). Da beispielsweise eine autoinhibitorische Domäne am N-terminalen Ende und CR1 von *CUX1*p200 erheblich die DNA-Bindungskapazität und somit die transkriptionelle

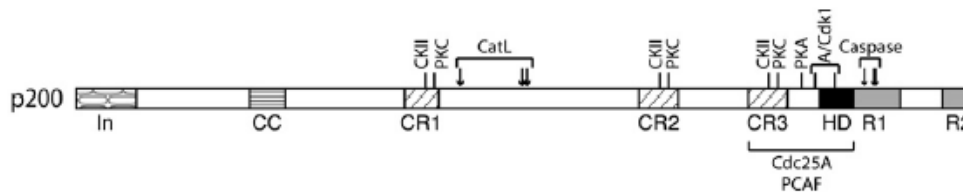
Aktivität reduziert, gilt diese Isoform als Repressor der Genexpression (Truscott et al., 2004). Im Gegensatz hierzu weisen die prozessierten, niedermolekularen Isoformen eine stabilere und langsamere Bindungskinetik auf und werden je nach Promotorkontext ihrer Zielgene als Aktivatoren der Transkription charakterisiert (Ramdzan und Nepveu, 2014). Dementsprechend wird zellzyklusabhängig am Ende der G1-Phase vermehrt *CUX1*p110 prozessiert, um den Eintritt in die S-Phase zu beschleunigen und somit die Zellproliferation zu stimulieren (Sansgeret und Nepveu, 2008).



**Abb. 14:** *CUX1* Isoformen, deren unterschiedliche DNA-Bindungskapazität und transkriptionelle Aktivität (aus Sansgeret und Nepveu, 2008).

Diverse Studien weisen auf weitere posttranslationale Modifikationen der einzelnen Isoformen hin, welche ebenfalls verantwortlich für deren DNA-Bindungsaffinität und deren regulatorische Funktion sind. Zu diesen Modifikationen zählen in erster Linie die Phosphorylierung durch diverse Kinasen (PKA, PKC, CKII), die Dephosphorylierung (Dephosphatase Cdc25A) und die Acetylierung (Sansgeret und Nepveu, 2008). So wiesen Li und Kollegen 2000 beispielsweise anhand elektrophoretischer *Shift Assays* auf die PCAF-Acetyltransferase hin, deren Zielsubstrate Lysinreste der Cut *Homeodomain* (HD) darstellen. Da die einzelnen Isoformen unter acetylierten oder phosphorylierten Konditionen vorrangig eine Inhibition der DNA-Bindung und transkriptioneller Aktivität zeigten, wird die Signifikanz dieser Modifikationen deutlich. Die Abbildung 15 veranschaulicht das komplexe Feld besagter Prozessierungsschritte.





**Abb. 15: Posttranslationale Modifikationen von *CUX1* beeinflussen die DNA-Bindungskapazität unterschiedlicher Isoformen.** Diese beinhalten Phosphorylierung (*PKC*: *Proteinkinase C*, *CKII*: *Casein Kinase II* an allen drei CRs (*Cut repeats*), *PKA*: *Proteinkinase A* am Verbindungsstück zwischen CR3 und HD (Homöodomäne)), proteolytische Prozessierung (*CatL*: *Cathepsin L* und *Caspase* am C-terminalen Ende), Acetylierung (*PCAF Acetyltransferase*) und Dephosphorylierung (*Cdc25A Dephosphatase*). Die CR3HD Region ist Zielpunkt der *PCFA* und der *Cdc25A*. (aus Sansgeret und Nepveu, 2008).

#### 2.4.2. Die funktionelle Rolle von *CUX1* in der Karzinogenese in vitro und in vivo

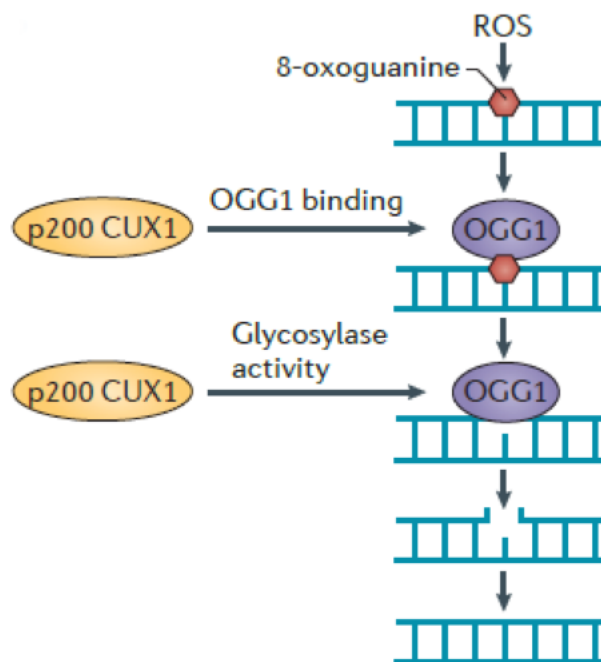
Eine Vielzahl von Studien bewies die enge Assoziation zwischen *CUX1* und den für die Tumorprogression essenziellen Bestandteilen der Zellmigration und- invasion sowie Zellmotilität und Apoptoseresistenzen (Liu, Lin, Zhao, Wang und Lan, 2013). Dieses Erkenntnis basiert auf experimentellen Arbeiten, welche die Involvierung von *CUX1* als *downstream effector* von protumorigenen Signaltransduktionswegen wie TGF- $\beta$  (Michl et al., 2005) oder PI3K/AKT (Ripka et al., 2010) nachweisen. Insbesondere im Prozess der Hepatokarzinogenese konnte *CUX1* als Ziel der leberspezifischen miRNA-122 identifiziert werden. Im transgenen Mausmodell zeigte sich nach Stilllegung des *miRNA-122*-Gens eine Überexpression von *CUX1*, was mit einem aggressiveren Tumorverhalten und erhöhten AFP-Serumwerten korrelierte (Kojima et al., 2011). Weiterhin konnte in diversen humanen soliden oder hämatologischen Neoplasien eine Überexpression von *CUX1* nachgewiesen werden. Michl und Kollegen zeigten hierbei 2005 mittels in-situ Hybridisierung eine positive Korrelation zwischen *CUX1* und dem Differenzierungsgrad in Brustkarzinomzelllinien. Weiterhin wies ein Vergleich zwischen normalen und malignen Plasmazellen eines multiplen Myeloms auf eine Überexpression der *CUX1*-mRNA im transformierten Gewebe hin (De Vos et al., 2002). Anhand weiterer transgener Mausmodelle zeigte sich eine erhöhte Anfälligkeit diverser Gewebsarten bezüglich einer ungehemmten Zellproliferation in Abhängigkeit der *CUX1*-Expression. Konstitutiv *CUX1*-exprimierende Mäuse zeigten eine signifikante Hepatomegalie in positiver Korrelation zu einer erhöhten Zellproliferation (Vandel Heuvel et al., 2005). Im Gegensatz hierzu wurde *CUX1* bereits in früherer Literatur auch eine tumorsuppressive Funktion zugesprochen. Unterstützend zu dieser These bewiesen Tsutsumi und Kollegen 2003 in einer Studie mit 21 ALL (akute lymphatische Leukämie)-Patienten und MLL (*mixed lineage leukemia*) - Genrearrangement eine positive Korrelation zwischen einer hohen *CUX1*-mRNA Expression und einer guten krankheitsbezogenen Prognose sowie fehlender, weiterer, klinisch-pathologischer Faktoren. Aufgrund des komplexen

Netzwerkes aus posttranslationalen Modifikationen und Beeinflussung unterschiedlichster Signalkaskaden sind die exakten Regulationsmechanismen des Homöoboxgens *CUX1* hinsichtlich seiner tumorsuppressiven und onkogenen Funktionen nicht eindeutig geklärt und sollen im weiterführenden Abschnitt diskutiert werden.

#### 2.4.3. Gegenüberstellung tumorsuppressiver und onkogener Funktionen von *CUX1*

Das *Cut-like-homeobox* Gen 1 ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 an Position 22q (7q22.1) lokalisiert (McNerney et al., 2013). Laut der 1971 ausformulierten Knudsonhypothese ist die Karzinogenese bedingt durch eine Aneinanderreihung von DNA-Schädigungen. Bei dem humanen diploiden Chromosomensatz wird zunächst ein Allel eines bestimmten Tumorsuppressorgens durch eine Keimzellmutation funktionsuntüchtig. Erst eine weitere somatische Mutation des verbleibenden zweiten Allels resultiert in der Tumorentstehung, was allgemein auch als „Verlust der Heterozygotie“ bezeichnet wird (Knudson, 1971). Am Beispiel von Brustkrebszellen wurde dieser Verlust der Heterozygotie mehrmals auf dem Genabschnitt 7q22.1 nachgewiesen, was auf die Präsenz eines Tumorsuppressorgens in genau dieser Region hindeutet (Zeng et al., 1999). Klampfl und Kollegen stellten 2011 demnach eine Assoziation zwischen einem Verlust der Heterozygotie auf 7q22.1 und der Progression einer Philadelphia-Chromosom negativen, myeloproliferativen Erkrankung zur manifesten AML her. Dennoch wurden genaue Mutationsmechanismen von *CUX1* noch nicht identifiziert. Ob das Homöoboxgen als haploinsuffizienter Tumorsuppressor der myeloiden Neoplasien oder lediglich als atypisches Tumorsuppressorgen fungiert, verbleibt zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Entgegen der Knudsonhypothese wurde bereits postuliert, dass auch eine singuläre Deletion von *CUX1* auf einem Allel bereits zur Karzinogenese führen könne. Die *Adams Group* des *Welcome Trust Sanger Institutes* in Cambridge untersuchten in diesem Zusammenhang 7651 Genomsequenzen maligner Neoplasien unterschiedlichsten Ursprungs und wiesen hierbei in 1-5% der Tumoren inaktivierende Mutationen des Homöoboxgens *CUX1* nach, hierunter vorrangig somatische *Nonsense*-Mutationen. Weiterhin zeigte besagte Studie, dass die Inaktivierung der *cut* Region in *D. melanogaster* oder die Deletion des gesamten *CUX1*-Gens in transgenen Mäusen die Tumorentwicklung fördert. Als wesentlicher molekularer Mechanismus wird die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges durch direkte transkriptionelle verminderte Expression des Inhibitors PIK3IP1 unter *CUX1*-Defizienz vermutet (Wong et al, 2014). Am Beispiel dieser Signalkaskade wird bereits die

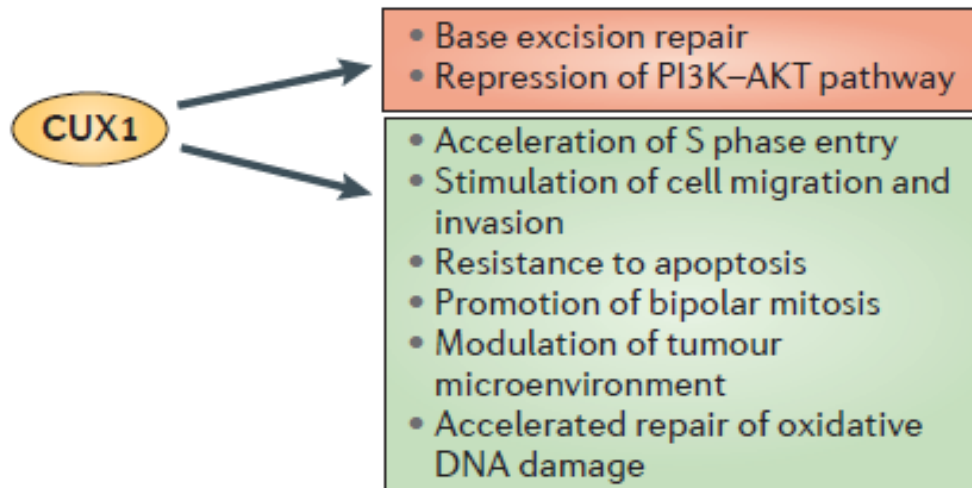
ambivalente und noch unzureichend erforschte Funktion des Homöoboxgens deutlich. Einerseits wird der PI3K/AKT-Signalweg von den Kollegen aus Cambridge zur Untermauerung der antitumorösen Eigenschaften von *CUX1* herangezogen. Andererseits charakterisierten Ripka und Kollegen 2010 das Homöoboxgen als *downstream effector* von PI3K/AKT und somit beitragend zur Tumordinvasivität und Apoptoseresistenz in pankreatischen Tumorzellen. Dies untermauert die Hypothese der protumorigenen Eigenschaften des Untersuchungs Transkriptionsfaktors. Ein weiterer, in seiner Funktion ambivalenter und situativ zu betrachtender Mechanismus von *CUX1* ist die *base excision repair* (BER). Der Isoform p200 wird über direkte Stimulation der DNA-Bindungsaffinität des Enzyms *8-oxoguanine DNA-glycosylase* (OGG1) eine essenzielle Funktion im Prozess der DNA-Reparatur zugesprochen (Ramdzan et al., 2014). Zum einen tragen homozygote *CUX1*-Defizienzen so im transgenen Mausmodell durch ein mangelndes Vermögen an Reparaturmechanismen zu einer erhöhten genomischen Instabilität und somit zur möglichen Tumoringenese bei (Vadnais et al., 2012). Andererseits kann *CUX1* als Onkogen iatrogene, strahlen-oder chemotherapieinduzierte DNA-Schäden im tumorösen Gewebe durch dessen DNA-Reparaturkapazitäten wieder ausgleichen und so zur therapeutischen Resistenzentwicklung beitragen (Ramdzan et al., 2017). Eine detaillierte Beschreibung der Interaktion zwischen *CUX1*p200 und der OGG1 findet sich in Abbildung 16.



**Abb. 16:** *CUX1*-vermittelte DNA-Reparaturmechanismen über die *8 oxoguanine glycosylase 1* (aus Ramdzan und Nepveu et al., 2014)

Zusätzlich zu den bereits aufgeführten onkogenen Eigenschaften von *CUX1* stützt sich die Literatur auf weitere Forschungen, die die protumoröse Wirkung von *CUX1* untermauern. Exemplarisch hierfür stehen die zellulären transkribierenden Aktivitäten der Isoformen p75 und p110. Ein geringer Anteil der nicht modifizierten p200-Isoform wird am Ende der G1-Phase durch Cathepsin L zu p110 prozessiert, beschleunigt hier maßgeblich den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und fördert hierdurch die Zellzyklusprogression (Sansregret et al., 2006). Nach Truscott und seinen Kollegen ist dies auf die unterdrückte Expression von p21 und p27 zurückzuführen, welche als Inhibitoren der *cyclin dependent kinases* (CDKs) selbst als Repressoren der Zellzyklusprogression bekannt sind (Truscott, Harada, Vadnais, Robert und Nepveu, 2008). Die Vermittlung der Zellmotilität sowie einer gesteigerten Invasivität tumoröser Zellen trägt ebenfalls zum onkogenen Potential von *CUX1* bei. Ursächlich hierfür ist unter anderem die kanzerogene Signalkaskade TGF- $\beta$ , welche durch Michl und Kollegen 2005 als *upstream-effector* von *CUX1* identifiziert wurde. Diese Studie postulierte erstmals, dass eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges einen erhöhten mRNA- und Proteingehalt von *CUX1* bewirke und demnach mit der TGF- $\beta$ -vermittelten, gesteigerten Zellmotilität und -invasivität assoziiert werden könne (Michl et al., 2005). Durch transkriptionelle Repression migrationshemmender Gene wie E-Cadherin und Occludin entstehen Dysbalancen in der Zell-Zell Interaktion und führen zu in einer erleichterten Zellmigration (Kedinger et al., 2009). Bei genauerer Betrachtung molekularer Pathomechanismen im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) wird die Rolle von *CUX1* hinsichtlich der Modulation der Tumorumgebung und damit der Tumorinvasivität deutlich. Die TGF- $\beta$ -bedingte *CUX1*-Überexpression wurde nicht nur in den PDAC-Zellen, sondern auch in Tumor-assoziierten-Makrophagen (TAMs) nachgewiesen, welche über infiltrative Stromareaktionen zur Ausbreitung tumorösen Gewebes beitragen. Über die direkte Interaktion von *CUX1*p200 mit dem *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) wird folglich die Zytokinausschüttung (beispielsweise CXCL10 und CCL5) in den TAMs supprimiert. Hieraus resultierend zeigt sich eine Antagonisierung der antiangiogenetischen und proinflammatorischen Eigenschaften der Zytokine in Makrophagen, was wiederum die tumorbegünstigende Immunsuppression und die Angiogenese fördert (Kühnemuth et al., 2015). Letztlich muss ebenfalls eine mögliche Tumorinitiation über die Entstehung eines aneuploiden Chromosomensatzes erwähnt werden. Mittels Zellkultur und transgener Mausmodelle wurde in Brustkrebszellen die *CUX1*-Expression mit erhöhter chromosomaler Instabilität assoziiert. Diese resultiert aus

einer Zytokin-vermittelten Entstehung supernumerischer Zentrosomen und einer dysregulierten Zellteilung, der sogenannten multipolaren Mitose (Sansregret et al., 2011). Eine Zusammenschau der anti- und protumorigenen Auswirkungen auf die Zelle zeigt Abbildung 17.



**Abb. 17:** Gegenüberstellung der tumorsuppressiven Funktionen (rot) und der protumorigenen Eigenschaften (grün) des Transkriptionsfaktors *CUX1* (aus Ramdzan und Nepveu, 2014)

#### 2.4.4. *CUX1* als therapeutischer Angriffspunkt?

DNA-Reparaturmechanismen sind in der Karzinogenese in widersprüchliche Ansätze involviert. Einerseits sind sie vor der Tumorentstehung essenziell zur Erhaltung der genomischen Integrität und Verhinderung chromosomaler Missregulationen, andererseits können sie in bereits entarteten kanzerogenen Zellen zur Resistenzbildung gegen Chemotherapeutika- und Strahlen-induzierte DNA-Schädigungen beitragen (Shaheen, Allen, Nickoloff und Hromas, 2011). Die enge Verknüpfung einer *CUX1*-Isoform mit essenziellen Enzymen, welche für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen verantwortlich sind, könnte hierbei als therapeutischer Ansatz dienen (Ramdzan und Nepveu, 2014). Analog zu neuen molekularen Therapieansätzen in der Behandlung des fortgeschrittenen HCCs kommt auch bei der Betrachtung möglicher therapeutischer Ansätze für *CUX1* der Begriff der personalisierten Medizin ins Spiel. Seien es individuelle genetische Mutationen als Ursache der Tumorinitiation oder unterschiedliche Resistenzbildungsmechanismen gegen etablierte Behandlungsversuche, der Trend geht hin zu einer speziell zugeschnittenen Systemtherapie und nimmt Abstand von der Chemotherapiekeule (Curtin, 2012). *CUX1* könnte somit ein vielseitiges Zielgen in zukünftigen Therapieansätzen darstellen (Michl et al., 2005).

### 3 FRAGESTELLUNG

Das Homöoboxgen *CUX1* gilt als bislang unzulänglich erforschter Bestandteil der Karzinogenese. Im Rahmen seiner multiplen Funktionen wird *CUX1* von dem Großteil der Literatur zwar als Onkogen charakterisiert, jedoch steht der Transkriptionsfaktor gerade wegen seiner ambivalenten Eigenschaften als potentieller Kandidat für zunehmend individualisierte Therapiestrategien im Interesse der medizinischen Forschung. Nachdem das Homöoboxgen bereits in mehreren Studien im duktalem Pankreaskarzinom sowie in neuronalen Strukturen untersucht wurde, sollen in dieser Arbeit als Grundlage die zwei HCC-Zelllinien Hep3B (TP53<sup>-/-</sup>) und HepG2 (TP53<sup>wt</sup>) dienen. Gerade bei mangelnden systemischen Therapieansätzen in den meistens fortgeschrittenen Stadien des HCCs bei Diagnosestellung gilt die Hepatokarzinogenese als wissenschaftlich relevanter Forschungsbereich. Ein möglicher Ansatz zur Identifizierung tumorsuppressiver Mechanismen im HCC stellt die Autophagie-Induktion dar. Obwohl die Autophagie selbst in der Hepatokarzinogenese eine duale Rolle einnimmt, konnte in zurückliegenden experimentellen Arbeiten ein protrahierter, autophagieassoziiertes Zelltod durch die Applikation des Pan-DACis Panobinostat nachgewiesen werden. Die Autophagie in diesem Sinne als tumorsuppressives Konzept verstanden, könnte somit eine Grundlage zur Entwicklung neuer palliativer Systemtherapien in fortgeschrittenen Stadien des HCCs darstellen. Auf dieser Annahme basierend wurde der Transkriptionsfaktor *CUX1* auf sein regulatorisches Potential bezüglich einer möglichen ER-Stress-getriggerten Autophagie-Induktion untersucht. Zur Analyse der Funktion von *CUX1* erfolgte ein transienter *Knockdown* des Transkriptionsfaktors. Die Zellen wurden mit verschiedenen DACis (Autophagie-Induktoren) und Thapsigargin (ER-Stress-Induktoren) behandelt. In den anschließenden Expressions-, Protein-, Proliferations- und fluoreszenzmikroskopischen Analysen sollte die Gegenüberstellung der *CUX1*-defizienten Gruppe mit einer negativ transfizierten Kontrollgruppe das regulatorische Potential von *CUX1* auf die ER-Stress-Mechanismen und die Autophagie beleuchten.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. Materialien

#### 4.1.1. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Absaugpumpe Vario Air	Dräger	Lübeck, Deutschland
Absaugpumpe VHC pro	Vaccubrand	Wertheim, Deutschland
Attune Acoustic Focusing Cytometer	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
Beckmann GS-15R Centrifuge	Beckman Coulter	Brea, USA
Biofuge Pico	Heraeus	Hanau, Deutschland
C1000 Thermal Cycler Model No.: CFX96™ Optics Module	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Centrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Combi Spin FVL-2400N (Vortexer)	Biosan Ltd.	Riga, Lettland
Eismaschine	Manitowoc GmbH	Herborn, Deutschland
Gefrierschrank -80°C: CVK-UB2	Sanyo	Osaka, Japan
Gefrierschrank -20°C: Liebherr Comfort	Liebherr	Bulle, Schweiz
Eppendorf Reference/ Eppendorf Research Pipette (100-1000µl 20-200µl, 10-100µl, 2-20µl, 0,5-10µl, 0,1-2,5µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Flex Cycler Block: Block assembly T48	Analytikjena	Jena, Deutschland
Fusion Chemilumineszenz	Viber Lourmat	Eberhardzell, Deutschland
IncuCyte® Zoom Live-Cell Analysis System	Essen BioScience, Inc.	Ann Arbor, USA
Integra Pipetboy	Integra Bioscience AG	Zizers, Schweiz

Laborfuge 400R Function Line	Heraeus	Hanau, Deutschland
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Messzylinder 1000ml, 500ml, 100ml	ISOLAB GmbH	Wertheim, Deutschland
Mikroskop DFC320	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DM 5500	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DM-IL LED	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Nikon TMS	Nikon Metrology NV	Tokio, Japan
Mikroskop Nikon TMS-F	Nikon Metrology NV	Tokio, Japan
Emax Preciscion Microplate Reader S/N E10643	Molecular Devices	Sunnyvale, USA
Nanodrop Lite Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter Accumet Basic	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte	Eierstadt, Deutschland
Power Pac 200	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Power Pac 3000	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Rolltaumelbrett CAT R5	Zittere GmbH	Staufen, Deutschland
RTCA SP Station, Analyzer	Roche Applied Science	Mannheim, Deutschland
Schüttler-, Rührplatte		
Secuflow Laborabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co.KG	Wangen, Deutschland
SNAP i.d. Protein Detection System	Millipore Corporation	Billerica, USA
SNAP i.d. Blot Holders	Millipore Corporation	Billerica, USA
Sterilwerkbank Herasafe (HS) 12	Heraeus	Hanau, Deutschland



Sterilwerkbank Telstar BIO-II-A	Telstar	Frankfurt, Deutschland
Thermocell Cooling& Heating Block CHB-202	Bioer	Hangzhou, China
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Waage Kern ABS 80-4N	Kern&Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Waage Kern PLS 4200-2F	Kern&Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Wasserbad Julabo TW20	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach, Deutschland
XCell SureLock Elektrophoresekammer	Invitrogen AG	Carlsbad, USA

#### 4.1.2. Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Bio-1D Version 15.01	Vilber Lourmat	Eberhardzell, Deutschland
Bio-Rad CFX Manager 2.0.	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Fusion Image Capture 15.15 für Windows	Vilber Lourmat	Eberhardzell, Deutschland
IncuCyte® S3 Base Software	Essen BioScience	Ann Arbor, Michigan
LAS AF	Leica	Wetzlar, Deutschland
Leica QGo Fluorooverlay	Leica	Wetzlar, Deutschland
Leica QWin Pro	Leica	Wetzlar, Deutschland
REST 2009 Relative Expression Software	Qiagen	Hilden, Deutschland
Tool V2.0 12		
RTCA 1.2.1	ACEA Bioscience Inc.	San Diego, USA
SOFTmax Pro 3.1.1.	Molecular Devices	Sunnyvale, USA

#### 4.1.3. Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/ Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
2-Mercaptoethanol 98+%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland

Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.		
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim, Deutschland
CryoSure DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH	Steinbach, Deutschland
Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X)	Gibco® by Life Technologies	Paisley, United Kingdom
Dulbecco's PBS (1X)	PAA Laboratories GmbH	Paschingen, Österreich
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
FBS- Fetal Bovine Serum	Gibco® by Life Technologies	Paisley, United Kingdom
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Formaldehyde, wt37%sol. In water, stab. 5-10% methanol	ACROS ORGANICS	New Jersey, USA
G-418 Solution 04727894001	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Glycerol 99+%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
HCl		
HEPES Pufferan® >99,5% p.a.	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
HiPerFect® Transfection Reagent 4x 1ml	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrate- 10mg/ml Solution in Water	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
MagicMark XP Western Standard	Invitrogen AG	Carlsbad, USA

Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
NuPAGE® LDS 4X LDS Sample Buffer	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin (100X)	PAA Laboratories GmbH	Paschingen, Österreich
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
ProSieve Quad Color Protein Marker	Lonza Rockland Inc.	Maine, USA
Red Alert (10X) Western Blot Stain	Novagen EMD Lilipore Corp.	Billerica, USA
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
SDS ultra pure >99%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
SsoFast EvaGreen Supermix	Biorad Laboratories	Hercules, USA
TBS 1x, pH 7,6	Th.Geyer&CO.KG	Renningen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100 pure	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Trypsin EDTA (1X) 0,5%/0,2%	Biochrome GmbH	Berlin, Deutschland
Tween 20®	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland

#### 4.1.4. Verbrauchsmittel

<b>Verbraucher</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
15ml- und 50ml-Röhrchen	Greiner Bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
96 Well und PCR Platte, Non-Skirted, Low- Profile Abdeckglas	STARLAB International GmbH	Hamburg, Deutschland
BD Microlance 3 19G x 1 ½'', 1,1 mmx40mm	Becton, Dickinson & Company	Franklin Lakes, USA
CyroPure Gefäß 1,8ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Deckel für Mikrottestplatte	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
E-Plate 96 (6 Plates)	ACEA Bioscience, Inc.	San Diego, USA
Extra thick blot paper/filter paper	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Feather Disposable Scalpel	Feather	Osaka, Japan
Kapillarspitzen 200µl	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
Microflex Xceed Powder-free Nitrile Examination Gloves	Microflex	Den Haag, Niederlande
Mikrottestplatte 96 Well, F	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membran	Amersham GE Health Life Science	Amersham, England
Nunc Chamber Slide System 177399- 4 Well Glas Silde	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm X 12 well	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
Parafilm Laboratory Film	American National Can	Oshkosh, USA
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tips 0,1µl- 10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Kimtech Science Präzisionswischtücher	Kimberley-Clark Professional	Roswell, Kanada

SafeSeal Micro Tube 1,5ml, 2ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serological Pipette 1, 2, 5, 10, 25, 50ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
StarSeal Advanced Polyolefin Film, 100	STARLAB International GmbH	Hamburg, Deutschland
Single Well Blot Spacers	Millipore Corporation	Billerica, USA
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 24 Well, Standard, F	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche TC Standard T 25 T75 T175	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

#### 4.1.5. Fertigkits

<b>Kit</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller/Ort</b>
GoTaq qPCR Master Mix	GoTaq qPCR Master Mix Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Promega, Madison, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	iScript Reaction Mix iScript Reverse Transcriptase Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Biorad Laboratories, Hercules, USA
Pierce BCA Protein Kit Assay	BCA Reagent A BCA Reagent B Albumin Standard Ampules	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pre-Diluted Protein Assay Standards; Bovine Serum Albumin (BSA) Set	BSA Component 1 of 7 – 125µg/ml BSA Component 2 of 7- 250µg/ml BSA Component 3 of 7 – 500µg/ml BSA Component 4 of 7- 750µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

	BSA Component 5 of 7- 1000µg/ml	
	BSA Component 6 of 7- 1500µg/ml	
	BSA Component 7 of 7- 2000µg/ml	
RNeasy Plus Mini Kit	RLT Plus Buffer RW1 Buffer RPE Buffer Nuclease-free H <sub>2</sub> O gDNA Eliminator Spin Column Collection Tubes	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Luminol/ Enhancer Solution Stable Peroxide Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### 4.1.6. Substanzen und Medikamente

<b>Substanz</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Angewandte Verdünnung</b>	<b>Hersteller/Ort</b>
Trichostatin A	#T8552	10µM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
SAHA	#SML0061	10µM	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Panobinostat		100nM	Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz
Thapsigargin	#T0933	100nM	Sigma Aldrich, Missouri, USA

#### 4.1.7. siRNA's, Primer und Antikörper

<b>Produktname</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller/Ort</b>
Hs_CUTL1_1FlexiTube siRNA	SI00357049	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

<b>Hs_CUTL1_4 FlexiTube siRNA</b>	SI00357070	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>Hs_CUTL1_7 FlexiTube siRNA</b>	SI04244009	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>Hs_CUTL1_8 FlexiTube siRNA</b>	SI004317999	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>AllStar Negative Control siRNA</b>	SI03650318	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

<b>Produktname</b>	<b>Katalognumme r</b>	<b>Amplikongröß e</b>	<b>Identitä t</b>	<b>Hersteller/Or t</b>
<b>Hs_ATF4_4_SG</b> QuantiTect Primer Assay <i>activating transcription factor 4</i>	QT01678523	117bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>Hs_ATF6_1_SG</b> QuantiTect Primer Assay <i>activating transcription factor 6</i>	QT00083370	110bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>Hs_BECL1_1_SG</b> QuantiTect Primer Assay <i>Beclin1, autophagy related</i>	QT0000421	150bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>Hs_HSPA5_1_SG</b> QuantiTect Primer Assay <i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose- regulated protein, 78kDa)</i>	QT00096404	88bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>Hs_DDIT3_1_SG</b> QuantiTect Primer Assay	QT00082278	90bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

<i>DNA damage</i>				
<i>inducible transcript 3</i>				
<b>Hs_CUX1_1_SG</b>	QT0069502	74bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay				
<i>cut-like homeobox1</i>				
<b>Hs_GAPDH_2_SG</b>	QT01192646	119bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay				
<i>glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase</i>				
<b>Hs_MAP1LC3B_1_S</b>	QT00055069	137bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>G</b>				
QuantiTect Primer Assay				
<i>microtubulus-associated protein 1</i>				
<i>light chain 3 beta</i>				
<b>Hs_TFEB_SG_1</b>	QT00069951	70bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay				
<i>transcription factor EB</i>				
<b>Hs_UVRAG_1_SG</b>	QT00034328	76bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay				
<i>UV radiation resistance associated</i>				

Alle verwendeten Primer wurden vom Hersteller validiert.

Ziel	Produktname	Spezies/ Katalognumm er	Spezies/ Isotyp/ Markierung	Verdünnun g	Hersteller/O rt
<b>Primärantikörper</b>					



ATF4	Rb mAb to ATF-4 [ERP18111] #ab184909	Kaninchen IgG	1:1000	RabMab® technology, Abcam, Cambridge, UK
Beclin1	Anti-Beclin1 polyclonal antibody #ab92389	Kaninchen IgG	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
β-Actin	Monoclonal Anti-β-Actin Clone AC-15 #A5441	Maus IgG	1:3000	Sigma-Aldrich GmbH, Missouri, USA
BIP	Anti-GRP78 BiP antibody #ab21685	Kaninchen IgG	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
CHOP	Anti-DDIT3 antibody [9C8] #ab11419	Maus IgG	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
CHOP	CHOP (L63F7) Mouse mAb #2895	Maus IgG	1:1000	Cell Signaling Technology, Leiden, Holland
MAP1LC3B	Anti-LC3B antibody #ab51520	Kaninchen IgG	1:3000	Abcam, Cambridge, UK
<b>Sekundärantikörper</b>				
Anti-Maus	Anti-Mouse IgG (Fab specific)- Peroxidase #A9917-1ML	Ziege/Peroxidase	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-Kaninchen	Anti-Rabbit IgG (whole	Ziege/Peroxidase	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

molecule)- Peroxidase #A0545-1ML	Steinheim, Deutschland
--	---------------------------

#### 4.1.8. Medien, Puffer und Lösungen

<b>Art des Mediums</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Wachstumsmedium für HepG2	500ml Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium 50ml Fetal Bovine Serum 5ml 10000 U/ml Penicillin/ 10mg/ml Streptomycin
Wachstumsmedium für Hep3B	500ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 50ml Fetal Bovine Serum 5ml 10000 U/ml Penicillin/ 10mg/ml Streptomycin
Einfriermedium für HepG2	35ml Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium 10ml Fetal Bovine Serum 5ml CryoSure DMSO
Einfriermedium für Hep3B	35ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 10ml Fetal Bovine Serum 5ml CryoSure DMSO

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
0,1%TBS-Tween20®	1000ml Aqua dest. 1ml Tween20® 2 Tabletten TBS 1x, pH 7,6
4% BSA/ TBS-Tween20®	4g Albumin Fraktion V, biotinfrei 100ml 0,1% TBS-Tween20®
Aceton/Methanol Fixierungslösung	5ml Aceton 10ml Methanol
Blue Sample Buffer	125mM Tris-HCl (pH 6,8) 2,5% SDS ultra pure >99% 0,04% Bromphenol Blau 25% Glycerol 99+%
Hepes Puffer pH 7,6	713mM 2-Mercaptoethanol 98+%
	10mM HEPES Pufferan® >99,5% p.a. 10ml Aqua dest. 1 Tablette Protease Inhibitor <i>complete mini</i> 1 Tablette Phosphatase Inhibitor <i>PhosphoSTOP</i>
MOPS Puffer	475ml Aqua dest.

	25ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)
Red Alert Staining Solution	9ml Aqua dest. 1ml Red Alert (10x) Western Blot Stain
Transfer Puffer	5ml NuPAGE® Transfer Buffer (20x) 10ml Methanol 100µl antioxidant 84,9ml Aqua dest.

## 4.2. Zellbiologische Methoden und Zellkultur

### 4.2.1. Charakterisierung verwendeter Tumorzelllinien

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um zwei verschiedene humane Zelllinien mit der Bezeichnung Hep3B und HepG2, welche ursprünglich aus verschiedenen Biopsaten der jeweiligen hepatozellulären Karzinome gewonnen waren. Diese beiden Zelllinien sind in der Forschung am HCC etabliert und entstammen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) aus Braunschweig (Deutschland).

Während die Zellen der Linie Hep3B ein integriertes Genom des Hepatitis B Virus enthalten, weisen die Zellen der Linie HepG2 dieses nicht auf. Zellen der Zelllinie Hep3B sind defizient bezüglich *TP53*, Zellen der Linie HepG2 sind unverändert in diesem Tumorsuppressorgen (*wildtype*).

Die genutzten Zelllinienstämme zeichnen sich beide durch ein epitheloides Wachstum in Monolayern aus, wobei Zellen der Linie HepG2 zusätzlich in kleinen Aggregaten adhären sind. Beide Zelllinienstämme sind laut Herstellerangaben frei von Mykoplasmenkontamination.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die oben beschriebenen Zelllinien in einem vorausgehenden Versuch von Di Fazio et al. mit einem Plasmid transfiziert. Sie exprimierten an den autophagieassoziierten Transfektionsfaktor MAP1LC3B gebundenes *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) als auch *red fluorescent protein* (mRFP) und fluoreszieren somit eigenständig in Abhängigkeit des Aktivitätsgrads der Autophagie (Di Fazio et al., 2016).

### 4.2.2. Kultivierungsbedingungen, Auftauen und Passagieren

#### *Kultivierungsbedingungen*

Beide Zelllinien wurden routinemäßig in Zellkulturflaschen verschiedener Größe je nach Wachstumsverhalten bei 37°C mit einem Anteil von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in begasbaren Brutschränken bebrütet. Zellen der Linie Hep3B erhielten für optimale Wachstumsbedingungen 85% des Zellkulturmediums Dulbecco's MEM versetzt mit 10%

fetalem Kälberserum und 5% Penicillin/Streptomycin. Zellen der Linie HepG2 wurden mit 85% des Zellkulturmediums RPMI 1640, 10% fetalem Kälberserum und 5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die am LC3B-Gen transfizierten Zelllinienstämme wurden analog zu den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert, wobei diese lediglich durch die Zugabe des Antibiotikums G418 in einer Konzentration von 500µg/ml optimiert wurde.

Alle durchgeführten Versuche in der Zellkultur wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, die zur Dekontamination stets mit Methanol desinfiziert wurde. Alle verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien wurden zuvor in einem Wasserbad bei 37°C aufgewärmt.

#### *Auftauen*

Die Aufbewahrung von Zellsuspensionen beider Zelllinien erfolgte bei -80°C in einem Kryotube. Da das Einfriermedium das Zellwachstum möglicherweise negativ beeinflussen könnte, galt es, die Zellen vor dem Ansetzen in Kulturflaschen zu pelletieren. Hierzu wurden die Zellen in dem Gefrierrohrchen bei Raumtemperatur erstmals aufgetaut, die Zellsuspension in ein 15ml fassendes Zentrifugenrohrchen überführt und mit dem Zelltyp entsprechenden Kulturmedium aufgefüllt. Nach zehnminütiger Zentrifugierung erfolgte das Absaugen des Überstandes und die Resuspension des erhaltenen Zellpellets mit dem entsprechenden Kulturmedium. Anschließend wurde die so erhaltene Zellsuspension in eine 25cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt.

#### *Passagieren*

Unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen hinsichtlich des Wachstums und des Adhäsionsverhaltens am Boden der Zellkulturflaschen beurteilt. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach circa 75% Konfluenz, welche im Schnitt nach drei bis fünf Tagen erreicht wurde. Das Medium der konfluenten Zellen wurde abgesaugt und verworfen, die in der Zellkulturflasche vorhandenen Zellen wurden mit PBS gewaschen, um Rückstände des verbrauchten Nährmediums zu entfernen. Anschließend erfolgte je nach Fläche der Kulturflaschen die Befeuchtung der Zellen mit 1 ml (25cm<sup>2</sup>), 2ml (75cm<sup>2</sup>), oder 5ml (175cm<sup>2</sup>) Trypsin. Durch die Zugabe des Trypsin/EDTA-Gemisches wird der Zell-Zell Adhäsionsapparat enzymatisch verdaut, wodurch eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden folgt. Währenddessen wurden optische Verlaufskontrollen unter dem Mikroskop durchgeführt. Nach ca. 5 Minuten zeigten sich in der Regel alle Zellen gelöst und die Trypsinaktivität wurde durch Hinzugabe des passenden

Nährmediums gestoppt. Es folgte die Auftrennung der Zellsuspension durch zehnminütige Zentrifugierung (1000 rpm, 4°C) und das Abpipettieren des Überstandes. Nun konnten die Zellen erneut mit dem entsprechenden Nährmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:2 oder 1:3 in neuen Zellkulturflaschen ausplattiert werden. Die verwendeten Zellen wurden bis zu einer Passage von 30 für die hier beschriebenen Methoden eingesetzt.

#### 4.2.3. Zellzahlbestimmung

Um die korrekte Zellzahl für definierte Experimente verwenden zu können, musste zunächst die Gesamtzahl der Zellen aus der gewonnenen Zellsuspension bestimmt werden. Hierfür wurden nach Ablösung und Resuspension der Zellen 10µl dieser Suspension in einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nach Auszählung der vitalen Zellen in allen vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer wurde der arithmetische Mittelwert der ausgezählten Zellen gebildet und die Zellmenge pro ml Zellsuspension nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### 4.2.4. Kryokonservierung von Kulturzellen

Für die langfristige Aufbewahrung passagierter Zelllinien erfolgte die Kryokonservierung bei -80°C. Die kultivierten Zellen wurden zunächst mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, gewaschen und pelletiert (vgl. 1.2.2.). Circa 1,5 Millionen Zellen wurden nach dem Pelletieren aus der vorherigen Zellsuspension mit einem entsprechenden Einfriermedium resuspendiert. 70% des entsprechenden Nährmediums der jeweiligen Zelllinie wurden mit 20% fetalem Kälberserum und 10% DMSO versetzt, was die Zellen vor der Ausbildung von Eiskristallen schützte. Im Anschluss wurde die Zellsuspension aus Einfriermedium und Zellbestandteilen portioniert und in speziellen Kryotubes von 2ml Volumen eingefroren.

#### 5.2.5. Transfektion

##### *Grundlagen der Methodik*

Die gentechnologische Methodik der Transfektion beschreibt die Einbringung fremder DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle. Chemisch synthetisierte siRNAs bewirken durch RNA Interferenz eine transiente Stilllegung bestimmter Genabschnitte. Die daraus resultierende Suppression entsprechender mRNAs bewirkt eine Inhibition der Translation und somit der Proteinbiosynthese. Mittels dieser Methode kann eine genauere Charakterisierung eben dieser Genabschnitte unter verschiedenen Bedingungen erfolgen.

Diese Methode wurde gemäß den Herstellerangaben von Qiagen der Fast Forward Transfection mit HiPerfect Transfektionsreagenz durchgeführt.

*Evaluation der signifikantesten RNA Interferenz*

In einmaliger Versuchsdurchführung sollte zunächst die signifikanteste siRNA bezüglich des Knockdowns des Transkriptionsfaktors CUX1 evaluiert werden. Es wurden die vier verschiedenen siRNAs in einer Konzentration von 20nM mit der Kennzeichnung CUX1\_1, CUX1\_4, CUX1\_7 und CUX1\_8 verwendet. Die lyophilisierte siRNA (20nmol) wurde mit 1ml RNase freiem Wasser in Suspension gebracht, sodass sie hier in einer Konzentration von 20µmol vorlag. Die gleichen Konzentrationsangaben galten auch für die Negativkontrolle des Transfektionsreagenzes, hier als NTC bezeichnet. Zellen der Reihe Hep3B und HepG2 wurden nach unter 2.2.2. beschriebenen Bedingungen in der Zellkultur angezchtet. Nach Aberntung der Zellen folgte das Ausplattieren als Suspension mit dem entsprechenden Nährmedium. Die Aussaat erfolgte in einer 6-Well Platte bei einem Gesamtvolumen von 2,3ml pro Well. Die weitere Versuchsdurchführung wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei erfolgte laut Protokoll der FastForward Transfection (Qiagen) auf die Aussaat der Zellen direkt am selben Tag die Transfektion. *Tabelle 12* liefert einen Überblick über die Konzentration verwendeter Reagenzien sowie die optimierte Zellzahl beider Zelllinien.

	Zellzahl pro Well	siRNA bzw. NTC	Serumfreies Medium	HiPerfect® Transfektionsreagenz
Hep3B	20.000	1,2µl (300ng)	100µl	12µl
HepG2	20.000	1,2µl (300ng)	100µl	12µl

**Tab. 3:** verwendete Zellzahl und Tranfektionsreagenzien zur Evaluation der signifikantesten RNA Interferenz einzelner siRNAs

Die siRNA der Kennzeichnung CUX1\_7 erwies sich als signifikanteste RNA Interferenz zur Herunterregulation des Zielgens CUX1 und wurde somit in allen weiteren Transfektionsversuchen genutzt.

*Darstellung verschiedener Versuchsanordnungen*

Die Transfektion der Zelllinien Hep3B und HepG2 sowie der gleichnamigen GFP/RFP LC3B-modifizierten Zelllinien erfolgte in vier verschiedenen Formaten mit einer siRNA\_7 des Zielgens CUTL1. Es wurden für die Western Blots und die qRT-PCRs 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen und für den xCELLigence Versuch eine 96-Well Platte eingesetzt. Für die Mikroskopie der Immunfluoreszenz erfolgte die Transfektion speziell

mit den GFP/RFP-LC3B transfizierten Zelllinien HepG2 und Hep3B in Kammerdeckgläsern. Je nach Wachstumsverhalten der Zellen wurden unterschiedliche Zellzahlen und Volumina an Transfektionsreagenz bei den einzelnen Versuchsanordnungen angewandt (Tabelle 4).

	25cm <sup>2</sup> Kulturflasche	96-Well- Platte	24-Well- Platte	Kammerdeckgläser (Chamber Slides)
Mediumvolumen	5ml	200µl	500µl	500µl
Zellzahl HepG2	2.000.000	10.000	-	150.000
Zellzahl Hep3B	1.500.000	2.500	10.000	100.000

**Tab. 4:** Eingesetztes Medienvolumen und Zellzahl der einzelnen Transfektionsversuche

Die Zellen wurden in oben angegebener Zahl als Suspension mit dem entsprechenden Nährmedium in die einzelnen Behältnisse ausplattiert. Nach Protokoll der Fast Forward Transfection von Qiagen erfolgte die Aussaat der Zellen und die Beimpfung mit dem Transfektionsgemisch am selben Tag. Die lypophilisierte siRNA (20nmol) wurde mit 1ml RNase freiem Wasser in Suspension gebracht, sodass sie hier in 20µM Konzentration vorlag. Die gleichen Konzentrationsangaben galten auch für die Negativkontrolle des Transfektionsreagenzes, hier als NTC bezeichnet. Es wurden die entsprechende Menge an siRNA bzw. NTC laut Herstellerangaben (20µmol siRNA/ NTC entsprechen 0,25µg/µl) berechnet und zunächst in serumfreiem Medium in einem Eppendorffröhrchen gelöst, vorsichtig gevortext und auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Transfektionsreagenz (HiPerFect Transfection Reagent) in entsprechender Konzentration hinzugegeben (Tabelle 5).

	25cm <sup>2</sup> Kulturflaschen	24- Well Platte	96-Well- Platte	Kammerdeckgläser
siRNA (NTC)	2,5µl (625ng)	0,6 µl (150 ng)	0,1µl (25ng)	0,25µl (62,5ng)
Serumfreies Medium	200µl	50µl	9µl	20µl
HiPerFect Transfektionsreagenz	24µl	12µl	1µl	2,4µl

**Tab. 5:** Eingesetzte Menge siRNA bzw. NTC, serumfreies Medium und Transfektionsreagenz

Die Eppendorffröhrchen mit dem Transfektionsgemisch wurden nochmals sanft gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Tropfenweise wurde es anschließend zu den Zellen gegeben und für 24 Stunden inkubiert.

#### 4.2.6. Beimpfen der Zellen mit DACis

Im Anschluss an die Transfektion wurden in den oben bereits beschriebenen Versuchsformaten (25cm<sup>2</sup> Kulturflaschen, 96-Well Platte und Kammerdeckgläser) die Zellen mit verschiedenen DACis (TSA, SAHA und Panobinostat) sowie einer Positivkontrolle zur Induktion von ER-Stress (Thapsigargin) beimpft. Je nach darauffolgender Methode (Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot, molekularbiologische Expressionsanalysen mittels qRT-PCR, Fluoreszenzmikroskopie oder Echtzeitanalysen anhand des xCELLigence-Systems) wurde die Stocklösung gemäß der entsprechenden Konzentration der jeweiligen DACis berechnet. Unabhängig von der weiteren Versuchsanordnung sollte die Konzentration von TSA und SAHA je 10µM und die von Panobinostat und Thapsigargin je 100nM betragen. Die Berechnung der in frischem Medium angesetzten Volumina der jeweiligen Inhibitoren erfolgte gemäß der Formel

$$(\text{SOLL Konzentration: Ausgangskonzentration}) \times \text{Endvolumen.}$$

Eine Übersicht liefert Tabelle 6.

	TSA	SAHA	Panobinostat	Thapsigargin
25cm <sup>2</sup> Kulturflasche (5ml Endvol.)	16,6µl <i>(Ausgangskonzentration 3mM)</i>	2,6µl <i>(Ausgangskonzentration 19mM)</i>	25µl <i>(Ausgangskonzentration 20µM)</i>	50µl <i>(Ausgangskonzentration 10µM)</i>
96-Well Platte (200µl Endvol.)	0,6µl <i>(Ausgangskonzentration s.o.)</i>	0,1µl <i>(Ausgangskonzentration s.o.)</i>	1µl <i>(Ausgangskonzentration s.o.)</i>	2µl <i>(Ausgangskonzentration s.o.)</i>
Kammerdeck gläser (500µl Endvol.)	-	-	2,5µl <i>(Ausgangskonzentration s.o.)</i>	5µl <i>(Ausgangskonzentration s.o.)</i>

**Tab. 6:** Berechnung der Stocklösung der DACis und der Positivkontrolle in Abhängigkeit der Endvolumina

Nach 48 Stunden Inkubation des Transfektionsgemisches wurde die Adhärenz und Vitalität der Zellen mikroskopisch überprüft. Das verbrauchte Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit der entsprechenden Menge PBS gewaschen. Aufgrund der hohen Toxizität dieser Substanzen handelte es sich wie aus Tabelle 6 ersichtlich teilweise um äußerst geringe zu pipettierende Volumina. Da je nach Methodik die Proben doppelt oder dreifach angesetzt wurden, konnte zunächst ein Mastermix mit dem den Zellen entsprechenden Nährmedium erstellt und so größere Mengen der DACis in das Medium



geträufelt werden. Dadurch wurden Ungenauigkeiten hinsichtlich des Pipettierens von sehr kleinen Volumina weitgehend vermieden. Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert des Stoffgemisches aus den Inhibitoren und serumhaltigen Nährmedium gebildet und die Zellen mit dem entsprechenden Nährmedium mit der oben genannten Menge an DACis und der Positivkontrolle beimpft. Die weitere Versuchsanordnung sah unterschiedliche Inkubationszeiten für diese Substanzen vor (siehe Tabelle 7).

	qRT-PCR	Western Blot	xCELLigence	Fluoreszenzmikroskopie
Hep 3B	6h und 24h	24h	gesamte Messdauer	-
Hep G2	6h und 24h	24h	gesamte Messdauer	-
Hep3B (- LC3B)	-	-	-	3h
HepG2 (- LC3B)	-	-	-	3h

**Tab. 7:** Inkubationsdauer der DACis je nach Methodik

Die zellbiologischen Methoden und insbesondere die Kombination aus der Transfektion und das Beimpfen mit unterschiedlichen DACis stellten die Grundlage für alle weiteren biochemischen und molekularbiologischen Analysen sowie die Fluoreszenzmikroskopie und die Echtzeitanalyse zur Zellproliferation dar. Somit konnte das Expressionsverhalten des Transkriptionsfaktors *CUX1* unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Es etablierte sich folgendes System für je beide Zelllinien Hep3B und HepG2 (sowie die GFP/RFP-LC3B transfizierten Zelllinien Hep3B und HepG2) (siehe Tabelle 8).

CUX1+TSA	NTC+TSA
CUX1+SAHA	NTC+SAHA
CUX1+Panobinostat	NTC+Panobinostat
CUX1+Thapsigargin	NTC+Thapsigargin
CUX1 ohne DACi	NTC ohne DACi

**Tab. 8:** Schema der zellbiologischen Methodik

Der Zusatz „CUX1“ beschrieb hierbei die mit der siRNA7 transfizierten Zellen, wobei ein Knockdown dieses Transkriptionsfaktors angestrebt wurde. NTC stellte die Negativkontrolle ohne *CUX1*-Defizienz dar. Es wurde ebenfalls eine jeweilige Kontrollgruppe der Zellen ohne Beimpfung mit einem DACi angesetzt.

### 4.3. Biochemische und molekularbiologische Methoden

Nach einer Inkubationszeit von 6 bzw. 24 Stunden wurden die Zellen in den 25cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mikroskopisch begutachtet, das verbrauchte Medium abgesaugt und mit 2ml PBS gewaschen. Es folgte die Loslösung der adhärenen Zellen mit 1ml des Trypsin/EDTA-Gemisches analog zum oben beschriebenen Vorgang des Passagierens. Die gewonnene Trypsin-Zellsuspension wurde in diesem Fall jedoch nicht resuspendiert, sondern in 1,5µl fassende Eppendorffröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 1000rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet nochmals mit 500µl PBS gewaschen, dieser Vorgang aus Zentrifugation, Waschen und Verwerfen des Überstandes wurde zweimal wiederholt. Das gewonnene Zellpellet konnte bei -80°C zur kurzfristigen Konservierung im Gefrierschrank verwahrt werden. Dieses Pellet diente sowohl als Ausgangspunkt für die Expressionsanalysen mittels qRT-PCR als auch für die biochemische Proteinbestimmung anhand des Western Blots.

#### 4.3.1. Expressionsanalysen

Es galt zunächst das Expressionsverhalten des Transkriptionsfaktors *CUX1* in Abhängigkeit unterschiedlicher DACis und somit nach Induktion von Autophagie und Stress des endoplasmatischen Retikulums zu untersuchen. Dies erfolgte in einem ersten Schritt anhand der qRT-PCR (quantitative Reverse-Transkriptase *polymerase chain reaction*).

##### 4.3.1.1. Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Die RNA Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Da beim Arbeiten mit RNA die ständige Gefahr der Degradation durch RNAsen besteht, wurde stets darauf geachtet, die Proben kontaminationsfrei zu halten. Die Zellpellets wurden zunächst auf Eis gelagert und mit 600µl eines denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffers lysiert und homogenisiert. Dies diente der Inaktivierung der RNAsen und der Isolation der intakten RNA. Das Lysat wurde anschließend in der gDNA Eliminator spin column für 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Filter ermöglichte so die Separation der RNA und der DNA sowie überschüssiger Zellreste, welche daraufhin verworfen wurden. 350µl 70%igen Alkohols wurden zum Durchfluss pipettiert, um optimale Bindungsbedingungen für die RNA zu schaffen. 700µl des vorher sorgfältig gevortexten Gemischs wurden in die RNeasy spin column gegeben und unter mehrmaliger Hinzugabe von 500µl ethanolhaltiger Puffer bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der erhaltene Durchfluss wurde verworfen. RNA Moleküle mit einer Länge über 200

Nukleotiden konnten so an die Membran der spin column binden, während sie durch dreimaliges Wiederholen des Vorganges effizient von kontaminierenden DNA- und Zellrückständen gereinigt wurden. Zum Schluss wurde der Filter mit der gebundenen RNA auf ein sauberes Eppendorffgefäß gesteckt und die RNA mit 20µl RNase freiem Wasser von der Membran gelöst. Der so erhaltene Durchfluss beinhaltet die gereinigte intakte RNA, welche bei -80 Grad aufbewahrt wurde.

#### 4.3.1.2. Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Über die Nutzung von mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen konnten die PCR-Produkte sowohl quantifiziert als auch in Kombination mit einer Schmelzkurvenanalyse qualitativ untersucht werden. Letztere gibt über die Relation mit standardisierten Schmelzkurven Aufschluss über den Grad der Verunreinigung und somit der Spezifität der PCR-Produkte. Die Konzentrationsbestimmung per Photometrie wurde mit dem Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, USA) durchgeführt. Die Messung diente demnach sowohl der Qualitätskontrolle als auch der Konzentrationsbestimmung der totalen RNA. Als Leerwert diente zunächst 1µl der Probe verdünnt mit 99µl RNase freiem Wasser. Anschließend wurde zur Messung je 1µl der Probe bei 260nm Wellenlänge bestimmt. Die Konzentrationsangabe erfolgte in ng/µl. Bei groben Abweichungen des aus dem oben genannten berechneten Extinktionskoeffizient (hier  $E_{260}/E_{280}$ ) von einem Wert über 2 wurde die Probe nicht weiter verwendet. Es folgte entweder die erneute Lagerung der isolierten RNA bei -80°C oder die direkte Weiterverarbeitung.

#### 4.3.1.3. cDNA Synthese

Komplementäre DNA („cDNA“) beschreibt das Produkt, das beim Vorgang der reversen Transkription mithilfe des gleichnamigen Enzyms aus RNA entsteht. cDNA weist im Vergleich zur fragilen RNA eine weitaus höhere Stabilität auf und ist zudem notwendig als Grundlage der qRT-PCR, da die hierbei verwendeten Polymerasen DNA abhängig sind und RNA somit nicht direkt amplifizierbar ist (Joppien, Maier und Wendling, 2011). Für die cDNA Synthese kam das iScript™ cDNA Synthesis Kit zum Einsatz, das Protokoll wurde nach Herstellerangaben befolgt. Die Proben sowie die Reverse Transkriptase und der Reaction Mix wurden auf Eis aufgetaut. Für die HepG2 Zellen wurde 400ng und für die Hep3B Zellen 300ng totale RNA eingesetzt. Die entsprechende Menge der isolierten RNA wurde berechnet, mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und vorsichtig gevortext. Anschließend wurde zu diesem Gemisch 4µl des primer- und oligonukleotidhaltigen iScript reaction mix pipettiert, erneut gevortext und auf Eis

gelagert. Es folgte die Zugabe von 1µl des Enzyms Reverser Transkriptase, einer RNA abhängigen DANN-Polymerase. Die RNA Überführung geschah bei folgenden Temperaturen in entsprechenden Zeitabschnitten:

5 Minuten bei 25°C

30 Minuten bei 42°C

5 Minuten bei 85°C

Nach Ablauf der Inkubation im Thermocycler wurden die Proben bei -20°C gelagert.

#### 4.3.1.4. quantitative RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction*) ermöglicht es, bereits kleine Sequenzen an cDNA durch verschiedene Primer je nach Bedarf sehr stark zu vervielfältigen und so bestimmte Genabschnitte genauer zu untersuchen und zu quantifizieren. Somit können auf die mRNA und auch auf den gesamten Genabschnitt Rückschlüsse gezogen werden. Sie ist deshalb essentieller Bestandteil im Bereich der Genforschung und kam auch hier zum Einsatz. Die Methode der PCR besteht aus den drei Schritten der Denaturierung, des *Annealing* (=Hybridisierung) und der Elongation (Verlängerung), welche stets wiederholt werden. Nach dem einmaligen Zyklus der Enzymaktivierung erfolgt die Denaturierung, wobei die beiden cDNA Stränge bei hohen Temperaturen aufgetrennt werden. Beim nachfolgenden *Annealing* lagern sich die Primer den aufgetrennten cDNA Strängen an. Im letzten Schritt der Elongation wird der DNA-Molekülstrang durch Anlagerung der Nukleotide unter sorgsam gewählter Temperatur für optimale Arbeitsbedingungen der Polymerase vervollständigt. In diesem Versuchsaufbau wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Dies bedeutet, dass nach jedem einzelnen Zyklus die Anzahl der neu gebildeten DNA-Moleküle in Echtzeit erfasst werden. Somit kann genau bestimmt werden, ob und in welcher Menge ein bestimmter DNA-Abschnitt in einer Probe vorliegt. Es wurde das GoTaq® qPCR Master Mix Kit eingesetzt. Dieses Kit beinhaltet den GoTaq® Master Mix mit den Nukleotiden und eine Abwandlung der hitzestabilen taq-Polymerase sowie nukleasefreies Wasser. Um ein Gesamtvolumen von 20µl zu erreichen, wurden 10µl des Supermix, 7µl nukleasefreies Wasser, 2µl des jeweiligen Primers und 1µl des cDNA-Templates in eine Vertiefung einer 96-Well Platte pipettiert. Die Proben wurden immer als Duplikate angesetzt. Als Kontrolle diente eine standardisierte Verdünnungsreihe nach dem Schema 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. Für eben diese wurde 1µl eines cDNA Templates aus der Kontrollgruppe hinzugezogen und nach oben beschriebenem Schema verdünnt. Als Reinheitskontrolle wurde ein Leerwert bestehend aus reinem nukleasefreiem Wasser gemessen. Die Platte wurde mit einer transparenten Abdeckfolie versehen, sanft gevortext

und in den PCR Thermocycler gegeben. Die drei Teilschritte aus Denaturierung, Annealing und Elongation wurden in 45 Zyklen in einem Thermocycler wiederholt, welcher die Reaktionsgefäße exakt auf jeweils benötigte Temperatur erhitzte oder kühlte. Eine genaue Übersicht der einzelnen Teilschritte unter entsprechenden Temperaturen liefert Tabelle 9.

Reaktionsschritt	Zeit- und Temperaturangabe	Durchläufe
Initiale Enzymaktivierung (einmalig)	30 Sekunden bei 95°C	1
Denaturierung	5 Sekunden bei 95°C	30
Annealing	5 Sekunden bei 55°C	30
Elongation	5 Sekunden bei 65°C	30
Schmelzkurve	5 Sekunden bei 65°C	1

**Tab. 9:** Zeit- und Temperaturangabe der einzelnen Reaktionsschritte der qRT-PCR

Im Anschluss an einen abgelaufenen PCR-Zyklus erfolgte je eine Schmelzkurvenanalyse. Je nach Amplikonlänge und Basenzusammensetzung ergibt sich für die PCR-Fragmente eine spezifische Schmelztemperatur sowie Schmelzkurve. Hierdurch ist eine Unterscheidung zu unspezifisch entstehenden Primerdimeren und somit eine qualitative Beurteilung des Reinheitsgrades der Probe möglich.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software CFX Manager™. Dieses Programm errechnete automatisch die Schwellenwert-Zyklus-Werte (C(t)) der einzelnen Proben. Aus den erhaltenen Werten wurde mithilfe der Software REST die relative Expression berechnet.

#### 4.3.1.5. Charakterisierung und Konzentration verwendeter Expressions- bzw.

##### Proteinmarker

Für alle qRT-PCR Versuche wurden Duplikate der Proben angelegt. Zur differenzierten Erfassung der zellulären Antwort wurden die Messungen zu einem frühen Zeitpunkt 6 Stunden nach Applikation der DACis und zu einem späten Zeitpunkt 24 Stunden nach Applikation der DACis durchgeführt.

Zur Quantifizierung der zellulären Reaktion hinsichtlich einer Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums wurde die Expression des mRNA-Gehalts der Transkriptionsfaktoren bzw. die Expression der Proteine BIP, CHOP, ATF4 und ATF6 verwendet.

Analog zu diesem Vorgehen stellten die Proteine Beclin1, MAP1LC3B, UVRAG und TFEB die zellulären Autophagiemechanismen dar.

Entsprechend einer Publikation von Di Fazio et al. aus dem Jahr 2010, gelten 100 nM als die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) des DACi Panobinostat. Die Behandlung der Zelllinie HepG2 mit einer Konzentration der Hydroxamsäure Vorinostat (SAHA) zwischen 6 und 12 µM zeigte bereits laut Yu et al. 2019 eine signifikante Suppression der Proliferationsrate der beschriebenen Zelllinie. Dementsprechend wurden beide Zellreihen mit SAHA in einer Konzentration von 10 µM behandelt. Nach einer Arbeit von Wächter und Kollegen in 2018 wurde zur suffizienten Behandlung der Zellen mit TSA eine Konzentration von 10 µM verwendet. Im Sinne einer Positivkontrolle zur ER-Stress-Induktion wurde die Zelllinien mit Thapsigargin in einer Konzentration von 100 nM beimpft (Zhao et al., 2017).

#### 4.3.2. Proteinbiochemie zur Bestimmung der Proteinexpression

##### 4.3.2.1. Proteinisolierung

Die gewonnenen Zellpellets wurden aufgetaut und mit 50µl des Extraktionspuffers HEPES Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 15 Sekunden gevortext und zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Das Zellgemisch wurde anschließend bei 4°C für 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorffgefäß pipettiert, das Pellet verworfen. Diese Zellysate konnten bei -20°C aufbewahrt werden es folgte direkt im Anschluss die Konzentrationsbestimmung des Proteingehalts.

##### 4.3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Bestimmung der Konzentration isolierter Proteinextrakte erfolgte mit dem Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Herstelleranweisung. Zunächst wurden die Proben in Form der Zellysate nochmals mit HEPES Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Zu 10µl dieser Verdünnung wurden in die entsprechenden Wells einer 96-Well Platte pipettiert und auf Eis gestellt. Der Working Mix, bestehend aus einem Teil einer kupfersulfathaltigen Lösung (B) und 50 Teilen einer bicinchoninhalten Pufferlösung (A), war entscheidend für die Reaktionsweise und die Möglichkeit der photometrischen Messung des Proteingehalts: Diese Methode kombiniert die Reduktion zwei-wertiger zu einwertiger Kupferionen durch Peptidbindungen in einem alkalischen Medium (Biuretreaktion) mit der photometrischen Messung dieser einwertigen Kupferionen mithilfe von Bicinchoninsäure. Hierfür wurde zu jeder Probe 200µl des Working Mix pipettiert, die gesamte Platte geschüttelt und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zur quantitativen Bestimmung der totalen Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve mit einer bekannten absteigenden Verdünnungsreihe von Bovinem Serum Albumin (BSA) pipettiert. Alle Proben wurden

als Duplikate angesetzt. Bei einer Wellenlänge von 562 nm wurde der violette Farbumschlag photometrisch gemessen und der totale Proteingehalt über die Software SOFTMax pro in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  berechnet.

#### 4.3.2.3. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung der einzelnen Bestandteile einer Proteinmischung nach der relativen Molekülmasse anhand eines elektrisch angelegten Spannungsfeldes. Das Gel wirkt hierbei wie ein molekulares Sieb.

Es wurde stets auf Eis gearbeitet. Diskontinuierliche NuPAGE® SDS 4-12% Bis-Tris Mini Gele der Firma inVitrogen von 1mm Dicke sowie verschiedene Puffersysteme zur Denaturierung und Optimierung des pH Niveaus (LDS Sample Buffer, Antioxidant, Reducing Agent, SDS Running Buffer) derselben Herstellermarke kamen zum Einsatz. Durch Zugabe dieser Puffersysteme wurden die Proteine in ihrer übergeordneten Struktur aufgelöst. Die *Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis-Page* (SDS-Page) basiert auf der Verwendung von Polyacrylamid und SDS. Ersteres fungiert als Trägermaterial und bestimmt durch den prozentualen Acrylamidanteil die Porengröße des Gels. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat denaturiert die Proteine und verleiht ihnen durch Komplexbildung eine negative Gesamtladung, was eine Auftrennung der Proteine unabhängig der Eigenladung ermöglicht.

Zunächst wurden die einzeln angesetzten Proben folgendermaßen vorbereitet und auf Eis gelagert:

2  $\mu\text{l}$  Reducing Agent  
5  $\mu\text{l}$  LDS Sample Buffer  
13  $\mu\text{l}$  Proteingemisch

Die 13  $\mu\text{l}$  des Proteingemischs beinhalteten das Volumen der Proteinlysate in Verdünnung mit HEPESpuffer. Es wurde mit einer Masse von je 20  $\mu\text{g}$  Protein gearbeitet und das benötigte Volumen anhand der Formel

$$\text{Volumen } [\mu\text{l}] = \text{Masse } [\mu\text{g}] / \text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

berechnet. Der Sample Buffer schuf hierbei optimale Bedingungen für die Reduzierung der Proteindisulfidbindung und der Denaturierung. Diese erfolgte bei 70°C für 10 Minuten, anschließend wurden die Proben wieder sofort auf Eis gelagert. Die xCell Sure Lock Elektrophoresekammer wurde auf Eis aufgebaut und das Gel in die Kammer eingebracht. Anschließend wurde folgende Pufferlösungen zusammengemischt:

(1) 475ml Aqua dest. mit 25ml MOPS SDS Running Buffer

(2) 200ml der oben entstandenen Lösung mit 500  $\mu\text{l}$  NuPAGE Antioxidant

Der aus (2) entstandene Puffer wurde in die innere Kammer gefüllt. Nach Prüfung der Dichtigkeit wurde die aus (1) entstandene Pufferlösung in die äußere Kammer gegeben. Die auf Eis gelagerten vorbereiteten Proben konnten nun mit einem Gesamtvolumen von 20 µl der Reihe nach in die Geltaschen gefüllt werden. Je 3µl eines lumineszierenden Größenstandards (MagicMark) und eines bereits vorgefärbten, nicht-lumineszierenden Größenstandards (ProSieve Quad Colour Protein Marker) wurden in die erste und die letzte Geltasche pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde je nach Lauffront für 60 min bei 200V durchgeführt.

#### 4.3.2.4. Blotting nach semi-dry Methode

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen wird die Methode des Western Blots eingesetzt. Diese beschreibt den Transfer von Proteinen auf eine Membran durch Anlegen eines Spannungsfeldes. Wird die verwendete Membran bei diesem Vorgang lediglich dezent mit Pufferlösung getränkt und nicht mit der gesamten Blotkassette in eine mit Puffer gefüllte Kammer eingebracht, bezeichnet man dies als *semi-dry* Methode.

Es wurden folgende Reagenzien als Transferpuffer angesetzt:

10ml Methanol  
100µl Antioxidans  
5ml Transfer Buffer Stock (10x)  
84,9ml Aqua dest.

Eine Membran aus Nitrozellulose sowie 4 Lagen Filterpapier wurden für 10 min im angesetzten Transferpuffer durchtränkt. Nach vorsichtiger Präparation des Gels wurde die Blotkassette aufgebaut. Es wurde darauf geachtet, Luftblasenbildung zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden. Anschließend wurde über 30 Minuten ein elektrisches Spannungsfeld von 25V angelegt. Um die Transfereffizienz zu beurteilen, wurde die Membran nach dem Blotten für 5 Minuten in eine Ponceau-Lösung eingelegt (Red Alert Staining Solution 10x). Bei erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran 10 Minuten auf einem Laborschüttler in TBST gewaschen, um eventuellen Verunreinigungen durch Rückstände vorzubeugen. Für die spätere Immundetektion bestimmter Proteine mussten zunächst alle noch freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Durch die Lagerung der Membran in 4% bovinem Serumalbumin gelöst in TBST wurde die unspezifische Antikörperbindung verhindert. Nach einem erneuten Waschvorgang konnte die Nitrozellulosemembran in TBS über Nacht im Kühlraum bei 4°C gelagert werden.



#### 4.3.2.5. Immundetektion

Zur Detektion verschiedener Proteine werden je ein Primärantikörper, welcher spezifisch an das zu detektierende Protein bindet und ein Sekundärantikörper verwendet, welcher wiederum an den Primärantikörper bindet. Die Visualisierung der Proteine erfolgt letztendlich über die Markierung des Sekundärantikörpers. Diese bestand aus dem Enzym *horse raddish peroxidase* (HRP). Die HRP Markierung katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion, deren emittiertes Licht nach der Belichtung eines entsprechenden Films sichtbar gemacht werden kann.

Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran wie oben beschrieben geblockt und im Anschluss dreimalig für 10 Minuten in einer Schale mit TBST auf einem Laborschüttler gewaschen. Der Primärantikörper wurde den Herstellerangaben entsprechend in 5ml 4% Bovinem Serumalbumin gelöst in TBST in einem 50ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. In dieser Suspension wurde die Membran 24 Stunden im Kühlraum bei 4°C auf einem Rolltaumelbrett gelagert. Wieder erfolgte dreimaliges Waschen mit TBST für je 10 Minuten. Der HRP markierte Sekundärantikörper wurde stets in 10ml 4% Bovinem Serum Albumin gelöst, in TBST im Verhältnis 1:10000 verdünnt und die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Rolltaumelbrett in dieser Lösung inkubiert. Es folgte wieder dreimaliges Waschen für 10 Minuten in TBST sowie die einmalige Reinigung in einem neuen Behältnis mit TBS auf dem Laborschüttler. Die Proteine wurden semiquantitativ anhand des Chemilumineszenzdetektors und der Software FUSION-CAPT 15.15 detektiert. Hierzu wurde die Membran mit einem Gemisch aus äquivalenten Teilen an Luminol/Enhancer und Stable Peroxide Buffer vollständig benetzt und je nach gemessener Signalstärke zwischen 5 Sekunden und 15 Minuten belichtet. Die Auswertung der optischen Dichte erfolgte dabei stets in Relation zu der  $\beta$ -Aktin Bande, die für jede Membran als Kontrolle mit detektiert wurde. Für die so beschriebene Densitometrie, also die quantitative Messung der Farbdichte der Banden, wurde die Software Bio-1D Version 15.01 verwendet.

#### 4.3.2.6. Versuchsaufbau und Methodik in dieser Arbeit

Anhand des Western Blots wurde die Proteinexpression von Markern der zellulären ER-Stress Reaktionen (BIP, CHOP und ATF4) und der Autophagie (Beclin1 und MAP1LC3B) nach Transfektion mit der siRNA für *CUX1* bzw. nach negativer Transfektion ausgewertet. Die relative Expression wurde aus der Signalstärke der jeweiligen Banden 1-10 in Relation zu der  $\beta$ -Aktin-Bande errechnet. Es wurde für die

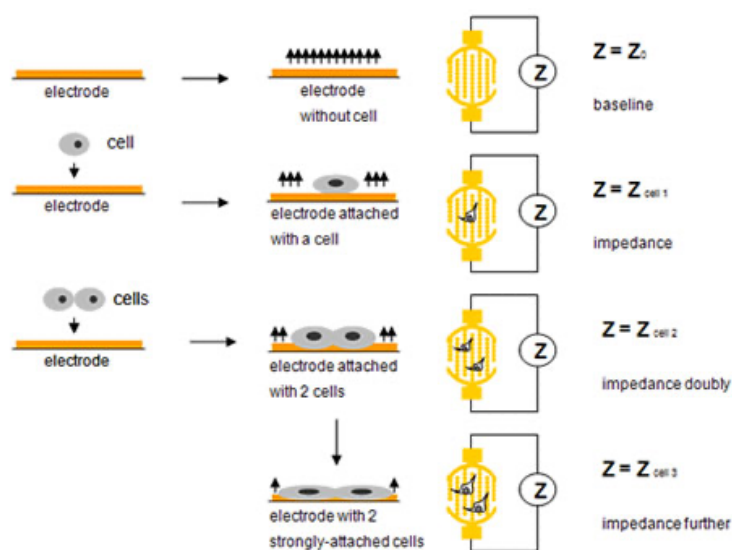
HepG2- und die Hep3B-Zellreihe je eine gemeinsame  $\beta$ -Aktin-Bande für Beclin1 und MAP1LC3B sowie für BIP, CHOP und ATF4 genutzt. Die Inkubationszeit mit den DACis betrug je 24 Stunden. Die einzelnen Banden der Western Blot entsprechen den unten stehenden Versuchsanordnungen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TSA + siCUX1	SAHA + siCUX1	Thap + siCUX1	Pano + siCUX1	TSA + NTC	SAHA + NTC	Thap + NTC	Pano + NTC	NTC	siCUX1

#### 4.4. Echtzeitzellanalysen mit xCELLigence RTCA (real time cell analyzer)

##### 4.4.1. Komponenten des Systems und Messprinzip

Der xCELLigence real time cell analyzer besteht aus einer im Zellinkubator bei 37°C angebrachten Analyseeinheit sowie aus einer Kontrolleinheit mit der entsprechenden Software zur Auswertung und einem dazugehörigen Laptop. In der Analyseeinheit können hierbei 96 Well Platten arretiert und so im Brutschrank gelagert werden. Der Boden dieser speziellen E-Platten ist mit Gold-Mikroelektrodensensoren beschichtet. Die Analyseeinheit misst hierbei nicht-invasiv den Wechselstromwiderstand (Impedanz) ausgehend vom unterschiedlichen Adhärenzverhalten der Zellen eines jeden Wells am Boden der speziellen Platte. Zeigen die Zellen ein stärkeres Adhärenzverhalten, äquivalent zu ihrer Wachstumsrate, so steigt die Impedanz an. Jegliche Wechselwirkungen der Zellen werden somit durch die elektronische Biosensoren am Plattenboden gemessen. Somit können durch Impedanzänderungen Rückschlüsse sowohl auf die Zellzahl als auch auf Zellvitalität und -morphologie gezogen werden. Eine schematische Darstellung der Funktionsweise liefert Abbildung 18.



**Abb. 18:** Darstellung des Messprinzips des xCELLigence Systems (Abbildung aus RTCA SP Instrument Operator's Manual, Roche Diagnostic GmbH, Penzberg)

Die relative Impedanzänderung im Vergleich zu einem vorher aufgenommenem Leerwert wird als dimensionsloser Parameter, der Zellindex (CI) angegeben und stellt ein Maß für die Zellproliferation dar. Ein Vorteil dieses Systems besteht in der Echtzeitanalyse. Über einen kontinuierlich Zeitraum können daher zeitlich exakte Informationen über den Zellstatus in Abhängigkeit vom experimentellen Versuchsaufbau gezogen werden.

#### 4.4.2. Proliferationsmessung

Anhand der Impedanzmessung wurde die Proliferation der Zellen unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Zunächst wurde mit 100 µl des entsprechenden Nährmediums der beiden Zelllinien ein Leerwert aufgenommen, um hieraus später den Zellindex zu berechnen. Es folgte die Aussaat der Zelllinien Hep3B und HepG2 entsprechend ihres unterschiedlichen Wachstumsverhaltens. Hierbei wurden pro Well 10000 HepG2-Zellen und 2500 Hep3B-Zellen bei einem Gesamtvolumen von 200µl in dem entsprechenden Medium ausplattiert. Die 96 Well Platte wurde 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde das Adhärenzverhalten und die Vitalität der Zellen geprüft. Waren diese anstandslos, erfolgte ein Mediumwechsel mit Zugabe neuen Kulturmediums versetzt mit Transfektionsreagenz, der Negativkontrolle bzw. mit den verschiedenen DACis. Die Transfektionsversuche und das Beimpfen der Zellen mit den DACis erfolgte nach oben beschriebenem Schema und angegebener Konzentrationen (siehe 4.2.5. und 4.2.6.) Alle Proben wurden dreifach angesetzt. Eine 30-minütige Inkubation der Zellen unter der Sterilbank sollte zu einer verbesserten Sedimentation der Zellen führen. Anschließend wurde die E-Platte in der Analyseeinheit arretiert und alle 30 Minuten die Impedanzänderungen über 5 Tage detektiert. Die graphische Auswertung erfolgte mit der RTCA Software Version 1.2.1.

#### 4.5. Fluoreszenzmikroskopische Methoden

##### 4.5.1. Charakterisierung verwendeter Zelllinien und Hintergrund

Für die Fluoreszenz wurde mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Di Fazio eine speziell transfizierte Zelllinie der Art Hep3B und HepG2 verwendet. Es wurde in vorherigen experimentellen Arbeiten eine Zellpopulation etabliert, die eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und RFP (*enhanced red fluorescent protein*) gebunden an MAP1LC3B exprimiert. MAP1LC3B ist hierbei ein Autophagie assoziierter Faktor im Zytosol, welcher strukturell maßgeblich an der Autophagosomenbildung beteiligt ist. Da die eigenständig fluoreszierenden Proteine GFP und RFP mittels Transfektion genetisch an das Autophagie assoziierte Protein MAP1LC3B gebunden wurden, konnten durch das

Fluoreszenzverhalten der Zellen Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten des Proteins sowie dessen Aufenthaltsort in der Zelle gezogen werden. Das grüne fluoreszierende Signal ist während der Bildung der Isolationsmembran verstärkt nachweisbar und kann so frühe autophagische Prozesse markieren. Mit der Fusion des Autophagosoms und des Lysosoms wird GFP zunehmend degradiert. Durch seine stabile Präsenz im Zytosol dient RFP als Marker des fortgeschrittenen Reifungsprozesses zum Autolysosom (Kaizuka et al., 2016). Durch die Verwendung von zwei Vektoren sollte eine dynamische Messung des autophagischen Flux während der Formation des Autophagosoms und der nachfolgenden Fusion zum Autolysosom sichergestellt werden.

#### 4.5.2. Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenz

Die Zelllinien Hep3B und HepG2 wurden mit den GFP- und dem RFP-gekoppelten Vektorplasmiden transfiziert und durch Anzucht in der Zellkultur unter Zugabe des Antibiotikums G418 etabliert. Die Zellen wurden zur längerfristigen Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -80°C verwahrt. Mit jedem Wechsel des verbrauchten Nährmediums wurde das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 500 µg/ml dazugegeben. Sobald die Zellen in entsprechender Zahl konfluieren, erfolgte die Ablösung der Zellen mithilfe eines Trypsin/EDTA-Gemisches. Mit dem zugehörigen Nährmedium wurden die Zellen in Suspension gebracht und bei einem Gesamtvolumen von 500µl in jede einzelne Kammer der Chamber Slides® (Lab-Tek, Scientific Fisher) pipettiert. Die Kammerdeckgläser wurden im Brutschrank bei 37°C für zwei Stunden inkubiert und die Adhärenz sowie die Vitalität der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde die Transfektion mit der siRNA und deren Zielgen *CUX1* sowie einer Negativkontrolle (NTC) durchgeführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und das Beimpfen der Zellen mit dem Pan-DACi Panobinostat sowie dem nichtkompetitiven Kalziumkanalblocker Thapsigargin. Dieser diente hier als Auslöser zellulären Stress des Endoplasmatischen Retikulums der Positivkontrolle. Tabelle 10 zeigt die verschiedenen Schemata der drei unterschiedlichen Kammerdeckgläser.

<b>HepG2</b>	<b>Hep3B</b>	<b>Kontrolle ohne Zugabe der DACis</b>
si <i>CUX1</i> +Panobinostat	si <i>CUX1</i> +Panobinostat	HepG2+si <i>CUX1</i>
si <i>CUX1</i> +Thapsigargin	si <i>CUX1</i> +Thapsigargin	HepG2+NTC
NTC+Panobinostat	NTC+Panobinostat	Hep3B+si <i>CUX1</i>
NTC+Thapsigargin	NTC+Thapsigargin	Hep3B+NTC

**Tab.10:** Aufbau der *Chamber Slides*

Die Inkubation nach Zugabe der DACis erfolgte für 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und jede Kammer einzeln in dreimaliger Wiederholung mit 500µl PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde eine 1:1 Mischung aus Ethanol und Aceton verwendet. Jede einzelne Kammer wurde vollständig mit der Lösung benetzt und für 60 Sekunden im Kühlschrank inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit PBS. Die Färbung nach Hoechst 33342 wurde zur Detektion von DNA- und chromatinhaltigen Strukturen in einer Verdünnung von 1:1000 angesetzt. Hierfür wurde 1µl des Hoechst Stains 33342 (Invitrogen) in 1ml PBS verdünnt und 250µl dieses Gemisches in jeder Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde jede einzelne Kammer dreimal mit 500µl PBS gespült. Zuletzt wurde vorsichtig das Kammersystem vom Objektträger entfernt und der Objektträger mit einem sterilen Skalpell von Rückständen gereinigt. Jeder einzelne Kammerabschnitt wurde mit einem Tropfen Fluoromount benetzt. Dieses Reagenz schützte die Zellen in Eigenfluoreszenz vor Bleicheffekten und ermöglichte die Fixierung des Objektträgers mit einem Deckglas. Die Objektträger wurden zum Lichtschutz mit Alufolie umwickelt und konnten so bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

#### 4.5.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse der Immunfluoreszenzpräparate erfolgte mit dem Leica Digitalkamerasystem DFC320. Hierbei handelt es sich um ein modulares Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskop mit Netzwerkanbindung und integrierter Digitalkamera. Zur Darstellung der Fluoreszenzfarbstoffe besitzt das Mikroskop drei unterschiedliche Filteransätze. Die Exzitations- und Emissionsrate bestimmt hierbei die jeweilige Spezifität für das verwendete Fluorophor. Für die Darstellung wurden folgende Filteransätze verwendet:

Kanal 1: Filteransatz zur Visualisierung von DAPI/Hoechst, 358nm Exzitation und 461 nm Emission

Kanal 2: Filteransatz zur Visualisierung von FITC, 490nm Exzitation und 520 nm Emission

Kanal 3: Filteransatz zur Visualisierung von Y3, 552nm Exzitation und 565nm Emission

Zur Erstellung, Modifizierung und weiteren Verarbeitung der Bilder wurde die Software Leica QGo Fluoroverlay sowie Leica QWin Pro verwendet. Die Beurteilung der Objektträger erfolgte zunächst getrennt anhand der einzelnen Filteransätze. Anschließend wurden modifizierte Kombinationsbilder der verschiedenen Fluorophore mit der

Digitalkamera erstellt. Die Bilder wurden je in 40facher und 63facher Vergrößerung erstellt.

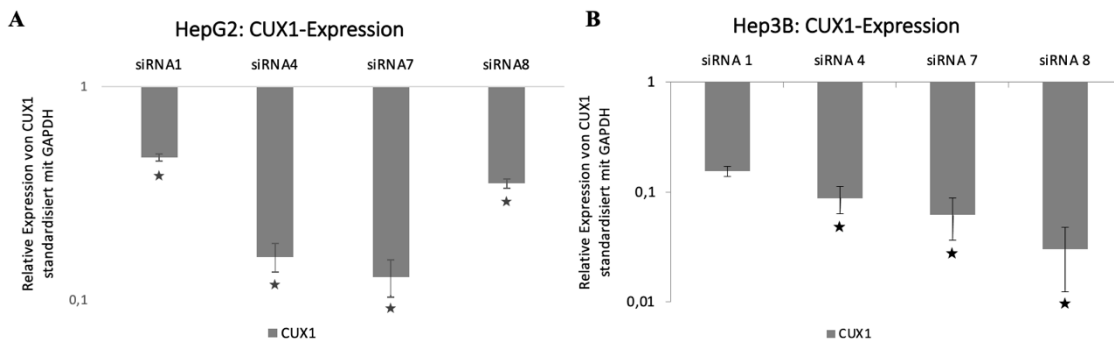
#### 4.6. Quantifizierung und statistische Auswertung

Für die in der Arbeit verwendeten messbaren Größen wie Gesamtzellzahl, Gesamtprotein und mRNA-Konzentration wurden zur Validierung stets mehrere Replikate verwendet. Die Auswertung wurde mithilfe der Software Excel 2016 durchgeführt. Neben Mittel-, und Standardabweichungsberechnungen wurden zur Signifikanzbestimmung der Student's t-Test angewandt. Die p-Werte wurden für ein 95%-iges Konfidenzintervall und unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz berechnet. Die Ergebnisse sind stets als relative Expression in Abhängigkeit einer Kontrollgruppe mit je unbehandelten Zellen angegeben. Die PCR-Analysen betreffend wurde neben einem im Student's t-Test nachgewiesenem p-Wert von  $<0,05$  auch eine relative Expression  $> 2$  (Mehrexpression) sowie eine relative Expression von  $< 0,5$  (Herunterregulation) als signifikant beschrieben. Der Vergleich der mRNA-Expression zwischen der siCUX1-transfizierten Gruppe und der Kontrollgruppe (*negativ template control*) erfolgte deskriptiv. Der Vergleich der Proteinexpression zwischen der siCUX1-transfizierten Gruppe und der Kontrollgruppe erfolgte anhand des Student's t-Test.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1. *CUX1*-Knockdown - Transfektionsversuche mit den siRNAs 1,4,7 und 8 für *CUX1*

Zunächst galt es, die geeignetste siRNA zum suffizienten *CUX1*-Knockdown zu identifizieren. Das Expressionsverhalten von *CUX1* der Zelllinien HepG2 und Hep3B wurde nach Beimpfen mit den vier unterschiedlichen siRNAs 1,4,7 und 8 quantifiziert. Die siRNA7 zeigte in der HepG2-Zelllinie nach 24-stündiger Inkubation die stärkste Inhibition der mRNA-Expression von *CUX1* (siehe Abb. 19, A). Die Zellreihe Hep3B wies nach Beimpfen mit der siRNA7 und der siRNA8 mit die ausgeprägteste und stets signifikante Minderexpression von *CUX1* auf (siehe Abb. 19, B). Da die siRNA7 in beiden Zellreihen im Durchschnitt den stärksten inhibitorischen Effekt der mRNA-Expression von *CUX1* präsentierte, wurde die siRNA7 für alle folgenden Versuchsanordnungen verwendet.

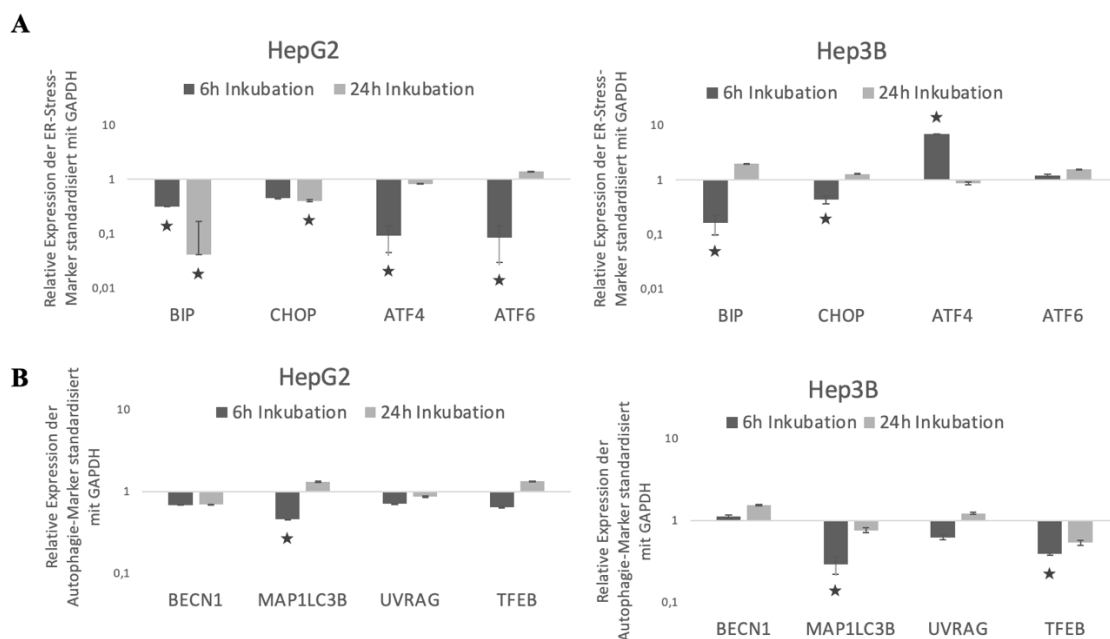


**Abb. 19: *CUX1*-Knockdown durch Transfektionsversuche mit den siRNAs 1,4,7 und 8.** Relative Expression von *CUX1* der HepG2-Zelllinie (A) und der Hep3B-Zelllinie (B) 24 Stunden nach Beimpfen mit den siRNAs 1,4,7 und 8 für *CUX1*. Ergebnisse mit einer Expression von  $<0,5$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

### 5.2. Modulation der mRNA-Expression von ER-Stress- und Autophagie-Markern ohne Substanzbehandlung

Zur differenzierten Analyse modulatorischer Fähigkeiten von *CUX1* auf zelluläre ER-Stress-Mechanismen und die Autophagie wurde zunächst der *CUX1*-Knockdown ohne die DACi-Applikation durchgeführt und dessen Effekt in ruhenden Zellen via qRT-PCR analysiert. Die Transfektion mit der siRNA für *CUX1* erfolgte für 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen in einem unbehandelten Nährmedium weitere 6 Stunden (früher Messzeitpunkt) bzw. 24 Stunden (später Messzeitpunkt) inkubiert. Auch ohne Induktion von ER-Stress und Autophagie zeigten sich vor allem zum frühen Messzeitpunkt Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und der *CUX1*-defizienten Versuchsreihe. In der Zellreihe HepG2 wurde unter *CUX1*-Knockdown eine signifikante

Minderexpression der ER-Stress-Marker *BIP*, *ATF4* und *ATF6* (siehe Abb. 20, A) sowie des Autophagie-Markers *MAP1LC3B* (siehe Abb. 20, B) zum frühen Messzeitpunkt nachgewiesen. Eine signifikante Inhibition der mRNA-Expression ließ sich zum späten Messzeitpunkt auch für *BIP* und *CHOP* nachweisen (siehe Abb. 20, A). Die p53-defiziente Zellreihe Hep3B zeigte in dieser Versuchsanordnung lediglich signifikante Effekte zum frühen Messzeitpunkt. Eine Inhibition der Transkriptexpression der ER-Stress-Marker *BIP* und *CHOP* sowie die Autophagie-Marker *MAP1LC3B* und *TFEB* konnten festgehalten werden (siehe Abb. 20, B). Zusammenfassend wurden in Abwesenheit von *CUX1* bereits ohne eine vorherige Substanzbehandlung zum frühen Messzeitpunkt Defizite in der mRNA-Expression zentraler ER-Stress- und Autophagie-Induktoren wie *BIP* und *MAP1LC3B* deutlich.



**Abb. 20: qRT-PCR Analyse der ER-Stress und Autophagie-Marker nach *CUX1*-Knockdown.** Expression der ER-Stress-Marker *BIP*, *CHOP*, *ATF4* und *ATF6* (A) sowie Expression der Autophagie-Marker *BECN1*, *MAP1LC3B*, *UVRAG* und *TFEB* (B) der Zelllinien HepG2 und Hep3B nach Transfektion mit der siRNA und *CUX1*-Knockdown und weiterer 6-stündiger bzw. 24-stündiger Inkubation. Ergebnisse mit einer Expression von  $<0,5$  oder  $>2,0$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

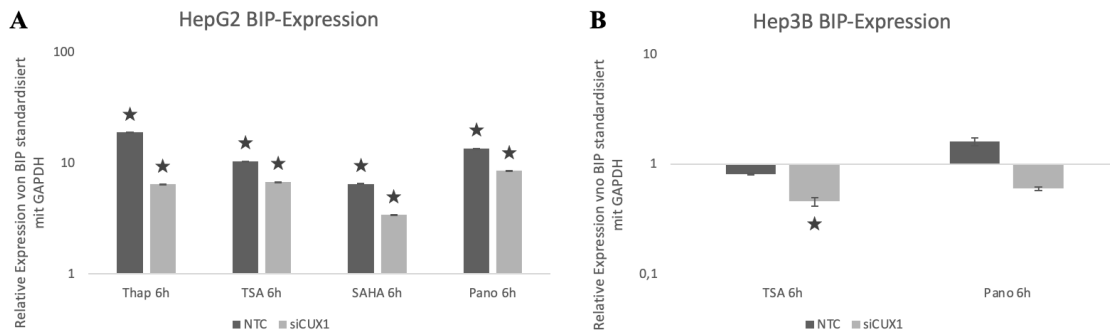
### 5.3. Modulation der mRNA- und Proteinexpression der ER-Stress-Marker nach Substanzbehandlung

ER-Stress-Reaktionen markieren erste Imbalancen in der zellulären Homöostase. Basierend auf den oben dargestellten Ergebnissen sollten weiterhin Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und der *CUX1*-defizienten (si*CUX1*-transfizierten) Gruppe nach Induktion dieser ER-Stress-Mechanismen durch das Beimpfen mit den DACis (10



µM TSA, 10 µM SAHA, 100 nM Panobinostat) und mit Thapsigargin (100 nM) erfolgen. Um diesen Sachverhalt näher zu analysieren, wurde die Modulation des mRNA-Gehaltes der ER-Stress-Marker *BIP*, *CHOP*, *ATF4* und *ATF6* durch die qRT-PCR-Methodik und die Modulation der Proteinexpression von BIP, CHOP und ATF4 durch den Western Blot untersucht.

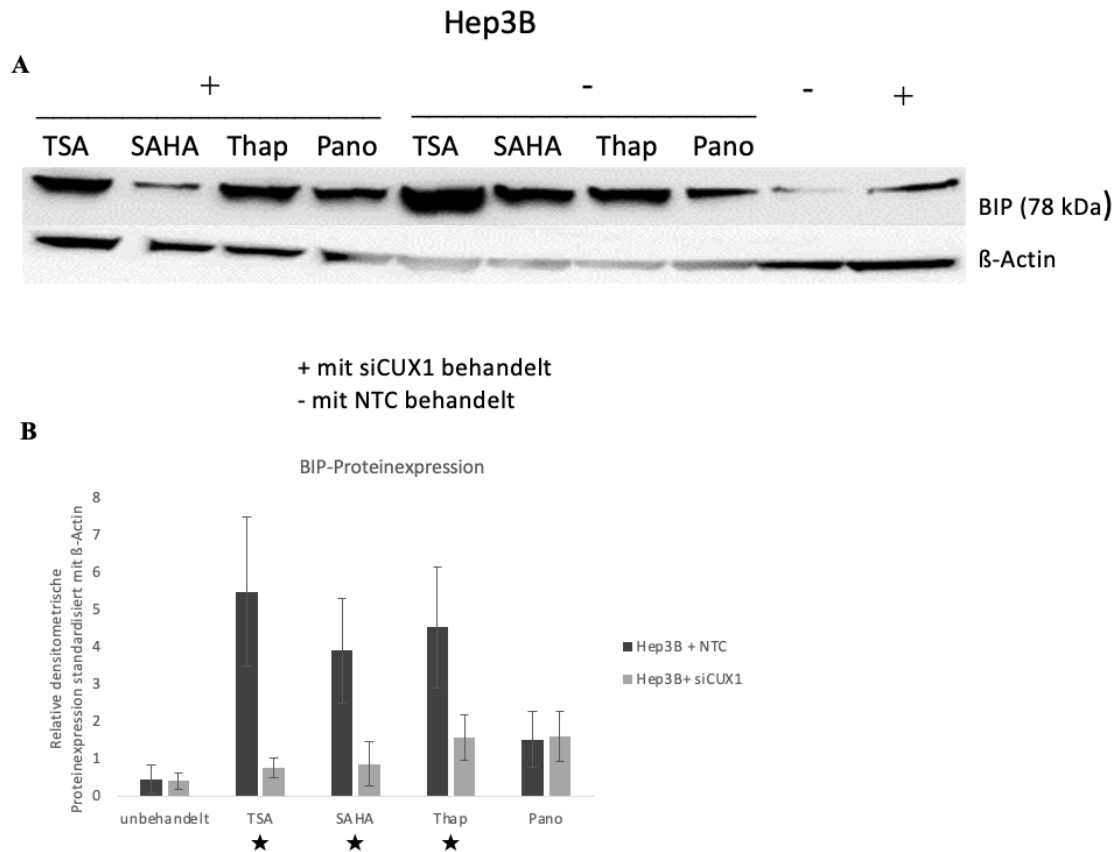
Die qRT-PCR-Analysen sowie die Western Blot-Untersuchungen unter Substanzbehandlung der zwei HCC-Zelllinien zeigten signifikante Unterschiede bezüglich des mRNA-Expressionsverhaltens und der Proteinsynthese der ER-Stress-Marker *BIP*, *CHOP*, *ATF4* und *ATF6* in Abhängigkeit der Prä- oder Absenz von *CUX1*. Interessante Ergebnisse zur Modulation der DACi- und Thapsigargin-getriggerten ER-Stress-Reaktionen lieferten vor allem die Analysen zu BIP (*binding immunoglobulin protein*). Bezüglich der mRNA-Expressionsanalysen von BIP wurden insbesondere zum frühen Messzeitpunkt nach 6-stündiger Inkubationsdauer der applizierten DACis und Thapsigargin signifikante Unterschiede zwischen siCUX1-transfizierter Gruppe und der Kontrollgruppe deutlich. Zum frühen Messzeitpunkt zeigten die HepG2-Zellen nach Thapsigargin und DACi-Behandlung insgesamt eine Hochregulation der *BIP*-Transkriptexpression, am ehesten im Sinne der eingetretenen Stressreaktionen nach entsprechender Substanzbehandlung (siehe Abb. 21, A-C). Auffallend war hierbei in allen vier Versuchsanordnungen die im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ verminderte mRNA-Expression von *BIP* unter Absenz von *CUX1* (Abb. 21, A). Die Modulation der *BIP*-mRNA-Expression in der Hep3B-Zellreihe zeigte nach kurzzeitiger Substanzbehandlung mit TSA und mit Panobinostat korrelierende Ergebnisse zur HepG2-Zellreihe (siehe Abb. 21, B). Auch hier wurde eine relativ geringe Expression von *BIP* unter *CUX1-Knockdown* verglichen mit der NTC-Gruppe gemessen, wobei sich im Gegensatz zur HepG2-Zellreihe eine absolute Herunterregulation der *BIP*-Transkriptexpression präsentierte. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beeinträchtigung der *BIP*-mRNA-Expression unter *CUX1-Knockdown* nach kurzzeitiger Substanzbehandlung schließen.



**Abb. 21: Modulation der *BIP*-mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.** qRT-PCR-Expressionsanalysen von *BIP* der HepG2-Zellen nach 6h Behandlung mit 100 nM Thapsigargin, 10  $\mu$ M TSA, 10  $\mu$ M SAHA und 100 nM Panobinostat (A) sowie der Hep3B-Zellen nach 6h Behandlung mit 10  $\mu$ M TSA und 100 nM Panobinostat (B). Ergebnisse mit einer Überexpression von  $> 2$  oder einer Herunterregulation von  $< 0,5$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

Die Western Blot-Analysen zeigten ebenfalls relevante Abweichungen in der Proteinexpression von BIP je nach Prä- oder Absenz von *CUX1*. Nach Behandlung mit dem Calcium-ATPase-Inhibitor Thapsigargin wurden signifikant unterschiedliche BIP-Proteinlevel zwischen Kontroll- und *CUX1*-defizienter Gruppe der HepG2-Zellen deutlich (siehe Abb. 22, A-B). Nach *CUX1*-Knockdown wurden in Relation zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte Proteinlevel in der HepG2-Zellreihe gemessen. Auch die Hinzugabe des potenten Pan-DACi Panobinostat lieferte korrelierende Ergebnisse: Nach *CUX1*-Knockdown wurden signifikant erniedrigte Proteinlevel von BIP verglichen mit der Kontrollgruppe detektiert (siehe Abb. 22, A-B).



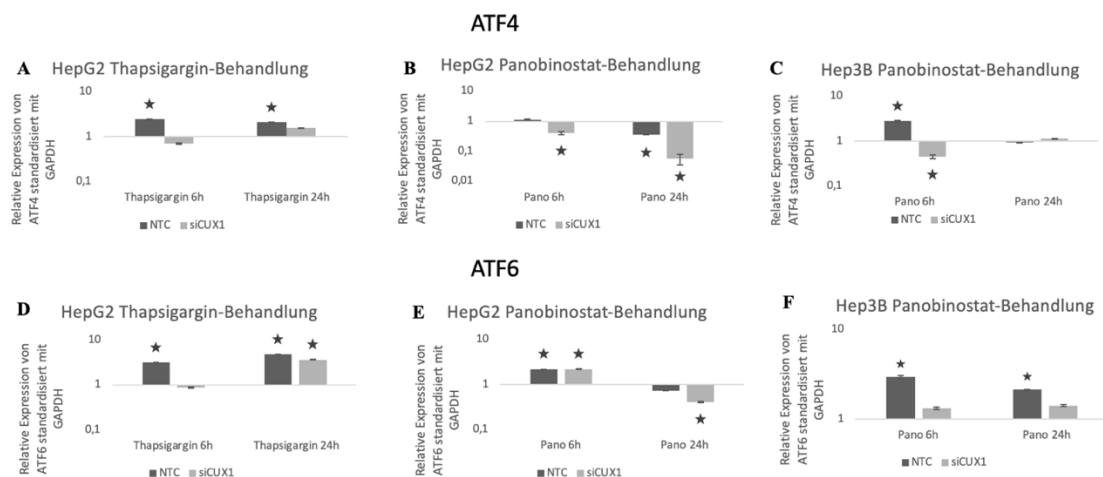


**Abb. 23: Modulation der Proteinexpression des ER-Stress-Markers BIP in der Zellreihe Hep3B. (A)** Western Blots zur Detektion der Proteinlevel von BIP nach Transfektion mit siCUX1 (+) bzw. nach negativer Transfektion mit der NTC (-) sowie ohne nachfolgende Substanzbehandlung (unbehandelt), nach Behandlung mit den DACis TSA (10  $\mu$ M), SAHA (10  $\mu$ M), Panobinostat (100 nM) und mit Thapsigargin (100 nM). **(B)** Graphische Darstellung der densitometrischen Ergebnisse der BIP-Expression in Relation zu den densitometrischen Ergebnissen von  $\beta$ -Actin. Signifikante Abweichungen zwischen der Kontrollgruppe (NTC) und der *CUX1*-Knockdown-Gruppe (siCUX1) mit  $p < 0,05$  im student's t-Test sind durch „\*“ gekennzeichnet. Dargestellt ist die mittlere Standardabweichung der durchgeführten Experimente.

Auch in den qRT-PCR-Versuchen zu *ATF4* (*activating transcription factor 4*) und *ATF6* (*activating transcription factor 6*) wurden relevante Abweichung der Transkriptexpression in Abhängigkeit des *CUX1*-Transfektionsstatus deutlich. In Abhängigkeit der applizierten Substanz (Kalzium-Kanal-Inhibitor und ER-Stress-Induktor Thapsigargin oder Pan-DACi Panobinostat) wurde eine absolute Hoch- oder Herunterregulation von *ATF6* und *ATF4* gemessen. Die mRNA-Expressionsanalysen zeigten dabei sowohl zum frühen als auch zum späten Messzeitpunkt Defizienzen in der Expression der ER-Stress-Indikatoren nach *CUX1*-Knockdown. In den HepG2-Zellen präsentierten *ATF4* und *ATF6* unter Thapsigargin-Behandlung und *CUX1*-Knockdown eine geringere mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (NTC). Dies konnte sowohl nach 6 als auch nach 24-stündiger Substanzbehandlung nachgewiesen werden (siehe Abb. 24, A und D). Unter Behandlung mit dem Pan-DACi Panobinostat wurde ein

deutlicher Einfluss auf die mRNA-Expression der ER-Stress-Induktoren nachgewiesen. In den HepG2-Zellen zeigte sich unter Panobinostat-Behandlung zu beiden Messzeitpunkten eine absolute Herunterregulation der *ATF4*-Expression, wobei sich diese unter *CUX1-Knockdown* noch ausgeprägter darstellte (Abb. 24, B). Auch die *ATF6*-Expression der HepG2-Zellen präsentierte sich unter 24-stündiger Panobinostat-Behandlung mit einer absoluten und relativen Herunterregulation unter *CUX1-Knockdown* im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 24, E). Eine herunterregulierte Transkriptexpression der Hep3B-Zellen unter *CUX1-Knockdown* zeigte die *ATF4*-Expression nach 6-stündiger Panobinostat-Behandlung (siehe Abb. 24, C) und die *ATF6*-Expression nach 6- und 24-stündiger Panobinostat-Applikation.

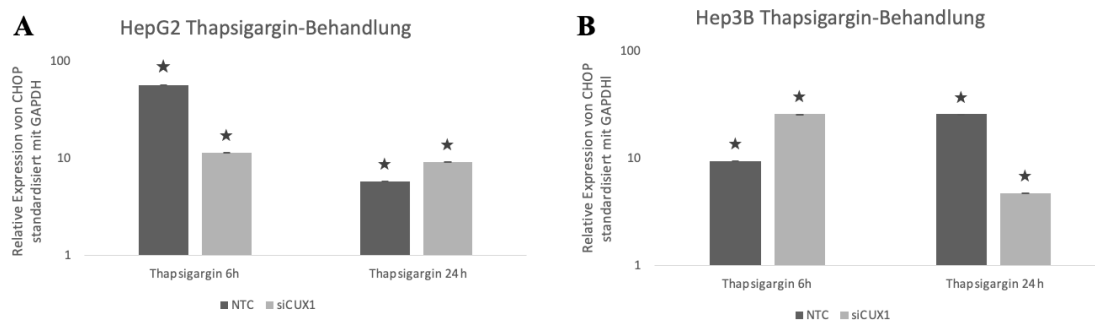
Die vorliegenden Ergebnisse lassen regulatorisches Potential von *CUX1* bezüglich der *ATF4*- und *ATF6*-vermittelten ER-Stress-Reaktionen, vor allem nach Panobinostat-Gabe, vermuten.



**Abb. 24: Modulation der *ATF4*- und der *ATF6*-mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.** qRT-PCR-Expressionsanalysen von *ATF4* in HepG2-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 100 nM Thapsigargin (A) oder 100 nM Panobinostat (B) sowie in den Hep3B-Zellen nach 6h und 24h Behandlung mit 100 nM Panobinostat (C) sowie von *ATF6* in den HepG2-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 100 nM Thapsigargin (D) oder 100 nM Panobinostat (E) sowie in den Hep3B-Zellen nach 6h und 24h Behandlung mit 100 nM Panobinostat (F). Ergebnisse mit einer Überexpression von > 2 oder einer Herunterregulation von < 0,5 sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

Signifikante Ergebnisse lieferten die mRNA-Expressionsanalysen zu *CHOP* unter Behandlung mit dem ER-Stress-Induktor Thapsigargin. In Abhängigkeit der behandelten Zellreihe präsentierte sich ein differenziertes Expressionsverhalten von *CHOP* unter *CUX1*-Defizienz. Insgesamt wurde zunächst eine absolute Hochregulation von *CHOP* im Sinne einer suffizienten ER-Stress-Induktion nach Behandlung mit dem kompetitiven Kalziumkanal-Blocker Thapsigargin deutlich (siehe Abb. 25, A und B). In den HepG2-Zellen wurde eine relative Minderexpression von *CHOP* unter *CUX1-Knockdown* zum

frühen Messzeitpunkt nachgewiesen (siehe Abb. 25, A). Im Gegensatz hierzu war in der Hep3B-Zellreihe unter *CUX1-Knockdown* eine relativ vermehrte Hochregulation der *CHOP*-Expression unter *CUX1-Knockdown* zum frühen Messzeitpunkt detektierbar (siehe Abb. 25, B). Nach 24-stündiger Thapsigargin-Gabe konnte eine relative Mehrexpression von *CHOP* unter *CUX1-Knockdown* in der HepG2-Zellreihe (siehe Abb. 25, A) und eine relative Minderexpression von *CHOP* in der Hep3B-Zelllinie (siehe Abb. 25, B) festgehalten werden.



**Abb. 25: Modulation der *CHOP*-mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.** qRT-PCR-Expressionsanalysen von *CHOP* in (A) HepG2-Zellen sowie den (B) Hep3B-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 100 nM Thapsigargin. Ergebnisse mit einer Überexpression von  $> 2$  oder einer Herunterregulation von  $< 0,5$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

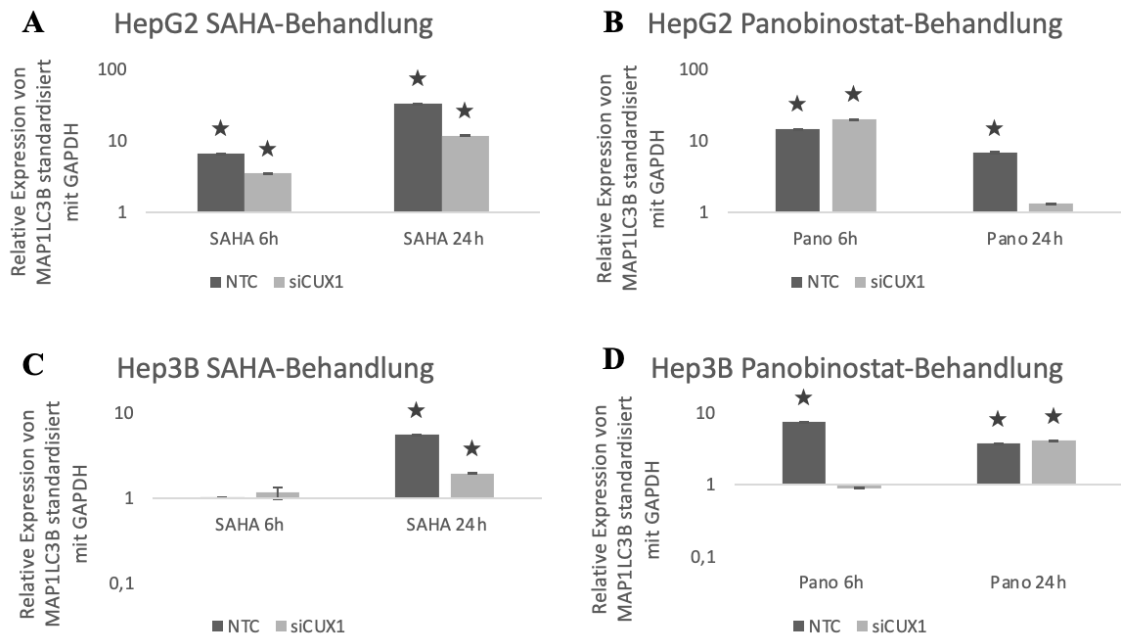
Zusammenfassend wurden regulatorische Fähigkeiten von *CUX1* bezüglich der Induktion Thapsigargin- und DACi-induzierten ER-Stress-Mechanismen deutlich. *CUX1*-bedingte Modulationen der BIP-Expression zeigten sich sowohl in den mRNA-Expressionsanalysen als auch in den Western Blot-Untersuchungen zur Proteinexpression. Defizitäre Transkriptexpressionen von *ATF4* und *ATF6* unter *CUX1-Knockdown* konnten nach Thapsigargin-Behandlung (HepG2-Zellen) und nach Panobinostat-Gabe (beide Zellreihen) sowohl nach 6- als auch nach 24-stündiger Inkubation nachgewiesen werden. In Abhängigkeit der behandelten Zelllinie und der Applikationsdauer von Thapsigargin wurden interessante Ergebnisse zur *CUX1*-vermittelten Regulation der *CHOP*-mRNA-Expression gewonnen. Nach effektiver ER-Stress-Induktion konnte eine geringere *CHOP*-mRNA-Expression nach 6-stündiger Thapsigargin-Behandlung der HepG2-Zellen und nach 24-stündiger Thapsigargin-Behandlung der Hep3B-Zellen nachgewiesen werden.

#### 5.4. Modulation der mRNA- und der Proteinexpression der Autophagie-Marker nach Substanzbehandlung

ER-Stress-Reaktionen können als Mediator zur Einleitung autophagischer Mechanismen charakterisiert werden (Di Fazio, 2016). Daher sollte in einem zweiten Schritt untersucht

werden, ob *CUX1* auch auf die Induktion von Autophagie nach Behandlung mit den DACis und Thapsigargin regulatorisches Potential besitzt. Es wurden, korrelierend zu den Versuchen des vorherigen Kapitels, Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der *CUX1*-defizienten Gruppe in der Expression der Autophagie-Indikatoren untersucht. Die Inkubation der Transfektionsreagentien „*NTC*“ (Kontrollgruppe) und „*siCUX1*“ (*CUX1*-defiziente Gruppe) erfolgte für 24 Stunden, die Behandlungsdauer mit den DACi-Inhibitoren und Thapsigargin für 6 und 24 Stunden, korrelierend zu den vorhergehenden Analysen der ER-Stress-Marker. Die Modulation des mRNA-Gehaltes der Autophagie-Marker *BECN1*, *MAP1LC3B*, *TFEB* und *UVRAG* wurde durch die qRT-PCR-Methodik untersucht. Es erfolgten anschließend Western Blot-Untersuchungen des Proteingehalts der autophagischen Schlüsselproteine BECN1 und MAP1LC3B. Der Vergleich der negativ transfizierten Kontrollgruppe (NTC) mit der *siCUX1*-transfizierten (und somit *CUX1*-defizienten) Gruppe sollte auch in dieser Versuchsanordnung die Rolle von *CUX1* während der induzierten Autophagie näher beleuchten und regulatorische Funktionen herausarbeiten.

In Abhängigkeit der behandelten Zellreihe und der Inkubationsdauer mit den DACis konnte ein von der NTC-Gruppe abweichendes Expressionsverhalten der Autophagie-Marker nachgewiesen werden. Zusammen mit den zwei *ubiquitin-like conjugation systems* ATG5/ATG12 ist das *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (MAP1LC3-PE oder MAP1LC3-II) maßgeblich an dem Reifungsprozess des Autophagosoms beteiligt. Die Behandlung der HepG2-Zellreihe mit SAHA resultierte in einer Hochregulation dieses Autophagie-Markers (siehe Abb. 26, A). Zu beiden Messzeitpunkten konnte ein im Vergleich zur negativ transfizierten Kontrollgruppe relativ verminderten mRNA-Gehalt für *MAP1LC3B* nach erfolgtem *CUX1-Knockdown* nachgewiesen werden (siehe Abb. 26, A). Die Hep3B-Zellen präsentierten eine defizitäre *MAP1LC3B*-Expression unter *CUX1*-Defizienz lediglich zum späten Messzeitpunkt nach 24-stündiger Inkubation mit SAHA (siehe Abb. 26, C) sowie zum frühen Messzeitpunkt nach 6-stündiger Inkubation mit Panobinostat (siehe Abb. 26, D). Eine im Vergleich zur NTC-Gruppe relativ verminderte *MAP1LC3B*-mRNA-Expression unter *CUX1-Knockdown* wurde weiterhin nach 24-stündiger Panobinostat-Applikation der HepG2-Zellen gemessen (siehe Abb. 26, B). In dem Kontext fiel eine diskret höhere *MAP1LC3B*-mRNA-Transkriptexpression der HepG2-Zellen zum frühen Messzeitpunkt unter Absenz von *CUX1* auf (siehe Abb. 26, B).

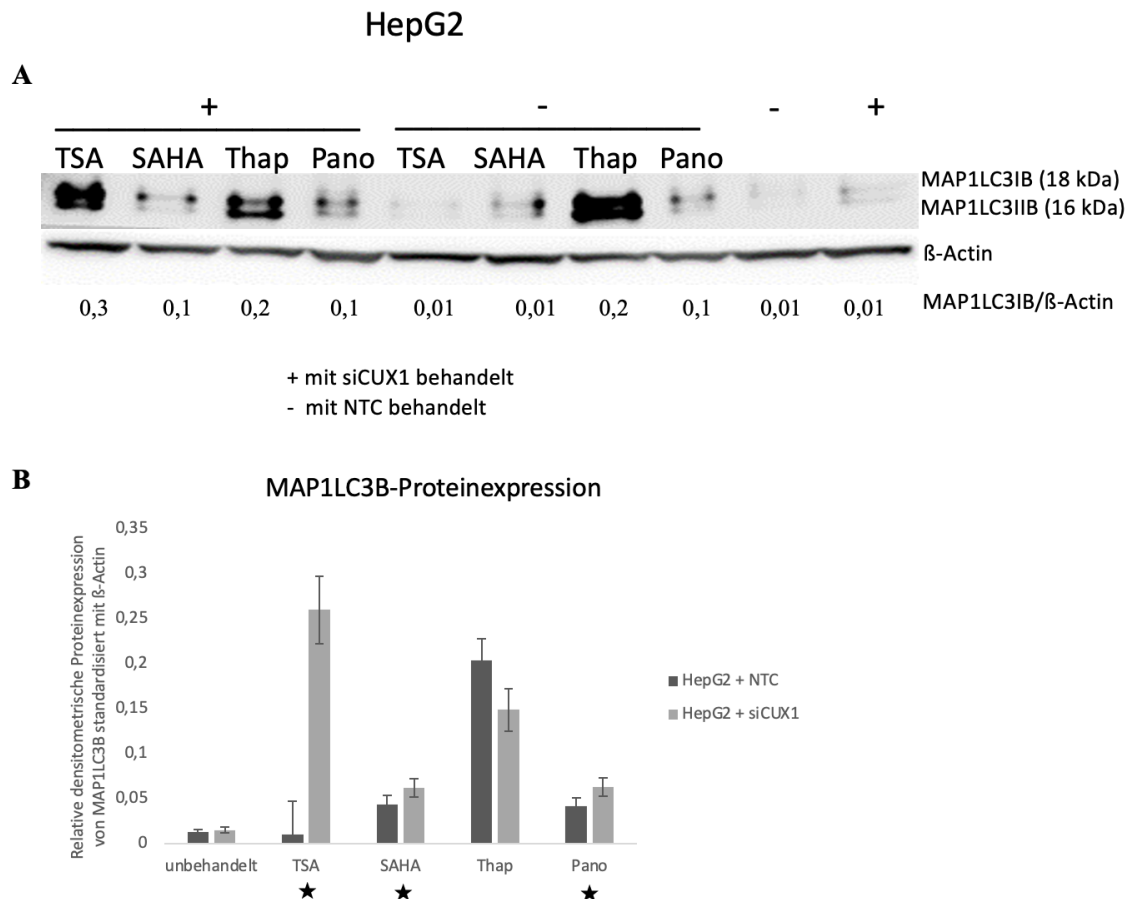


**Abb. 26: Modulation der *MAP1LC3B*-mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.** qRT-PCR-Expressionsanalysen von *MAP1LC3B* in HepG2-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 10  $\mu$ M SAHA(A) und 100 nM Panobinostat (B) sowie in den Hep3B-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 10  $\mu$ M SAHA (C) und 100 nM Panobinostat (D). Ergebnisse mit einer Überexpression von  $> 2$  oder einer Herunterregulation von  $< 0,5$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

Die Zusammenschau der Ergebnisse aus den qRT-PCR-Untersuchungen beider Zellreihen legt nahe, dass die jeweils untersuchte Zelllinie, der damit einhergehende p53-Status sowie die Behandlungsdauer mit der jeweiligen Substanz entscheidend zur CUX1-vermittelten Regulation der *MAP1LC3B*-mRNA-Expression beiträgt.

Versteht man die Autophagie als katabolen Prozess, zeichnet sich diese im physiologischen Zustand durch einen erhöhten Verbrauch funktioneller Proteine aus. Ein signifikanter Anstieg autophagischer Marker auf Proteinebene in Abwesenheit von *CUX1* würde somit auf die zunehmende Akkumulation entsprechender Proteine im Rahmen einer Beeinträchtigung autophagischer Mechanismen unter *CUX1*-Defizienz hinweisen. Diese Überlegung spiegelte sich in der Proteinanalyse zu MAP1LC3B in der HepG2-Zellreihe wider. Insgesamt zeigte sich nach TSA-, SAHA-, und Panobinostat-Behandlung eine signifikante Hochregulation MAP1LC3B-Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (siehe Abb. 27, A,B). Unter *CUX1*-Knockdown ist hierbei eine relative Mehrexpression von MAP1LC3B im Vergleich zur negativ transfizierten Kontrollgruppe (NTC) nach Behandlung mit TSA, SAHA und Panobinostat detektierbar (siehe Abb. 26, A,B).

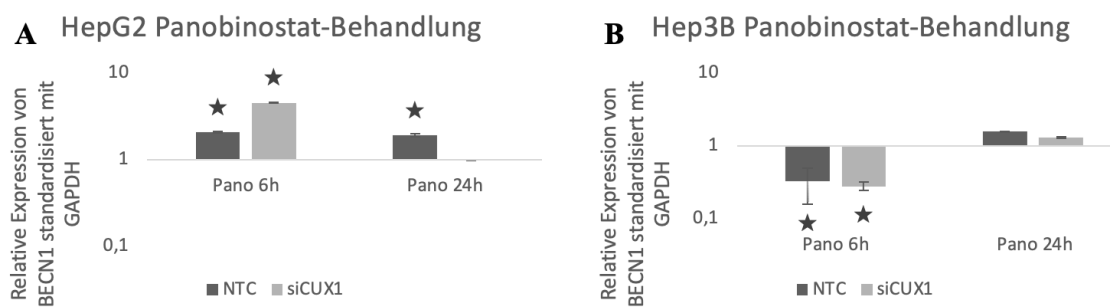




**Abb. 27: Modulation der Proteinexpression des Autophagie-Markers MAP1LC3B in der Zellreihe HepG2.** (A) Western Blots zur Detektion der Proteinlevel von MAP1LC3B nach Transfektion mit siCUX1 (+) bzw. nach negativer Transfektion mit der NTC (-) sowie ohne nachfolgende Substanzbehandlung (unbehandelt), nach Behandlung mit den DACis TSA (10  $\mu$ M), SAHA (10  $\mu$ M), Panobinostat (100 nM) und mit Thapsigargin (100 nM). Die densitometrischen Ergebnisse von MAP1LC3B-I wurden in Relation zu den densitometrischen Ergebnissen von  $\beta$ -Actin dargestellt. (B) Graphische Darstellung der densitometrischen Ergebnisse der MAP1LC3B-I-Expression in Relation zu den densitometrischen Ergebnissen von  $\beta$ -Actin. Signifikante Abweichungen zwischen der Kontrollgruppe (NTC) und der *CUX1*-Knockdown-Gruppe (siCUX1) mit  $p < 0,05$  im student's t-Test sind durch „\*“ gekennzeichnet. Dargestellt ist die mittlere Standardabweichung der durchgeführten Experimente.

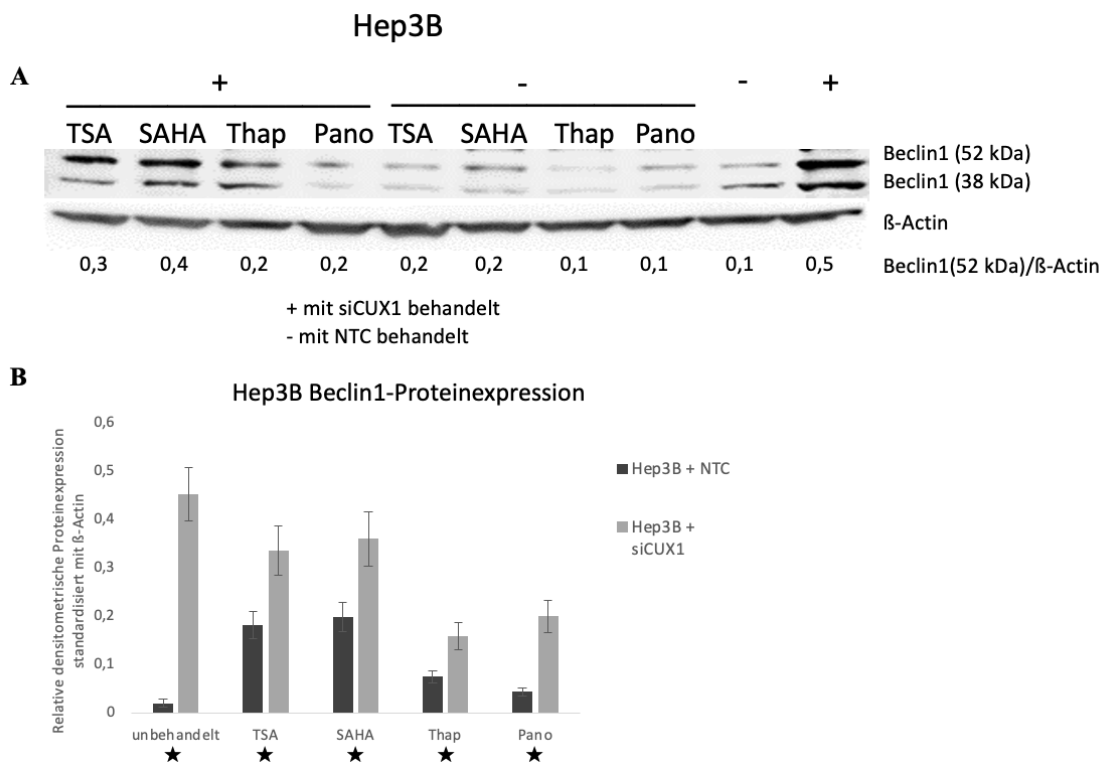
Beclin1 wird neben MAP1LC3B als zentraler Autophagie-assoziiertes Transkriptionsfaktor bzw. Autophagie-assoziiertes Protein charakterisiert und ist als Bestandteil des *class III phosphatidylinositol-3OH-kinase* (PI3K) Komplexes (beinhaltet Vsp34/PI3KC3, Vsp15, Beclin1 und ATG15) in den *nucleation step* (Nukleisierungsprozess/ Keimbildungsschritt) der zuvor bereitgestellten Isolationsmembran zur Bildung des Autophagosoms beteiligt. In den qRT-PCR-Analysen für die mRNA-Expression von *BECN1* konnten in Abhängigkeit der behandelten Zelllinie signifikante Unterschiede zwischen der *CUX1*-Knockdown-Gruppe und der negativ transfizierten Gruppe nachgewiesen werden. *CUX1* scheint diesen Vorgang insbesondere nach Autophagie-Induktion durch die Panobinostat-Behandlung zu beeinflussen. In den HepG2-Zellen wurde ein verminderter mRNA-Gehalt von *BECN1* unter Absenz von

*CUX1* insbesondere nach langer Inkubationsdauer mit Panobinostat (siehe Abb. 28, A) gemessen. Interessant ist hierbei, dass die kurzzeitige Panobinostat-Behandlung der HepG2-Zellen eher eine relativ erhöhte Expression von *BECN1* nach *CUX1-Knockdown* aufwies (siehe Abb. 28, A). Dies suggeriert, korrelierend zu den Untersuchungen des Autophagie-Markers *MAP1LC3B* der HepG2-Zelllinie, eine Abhängigkeit der *CUX1*-Regulation von der Applikationsdauer bei Panobinostat-Gabe (siehe im Vergleich mit Abb. 26, B). Die 6-stündige Panobinostat-Behandlung der Hep3B-Zellreihe resultierte in einer *BECN1*-Herunterregulation sowohl der NTC- als auch der siCUX1-Gruppe (siehe Abb. 28, B).



**Abb. 28: Modulation der *BECN1*-mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.** qRT-PCR-Expressionsanalysen von *BECN1* in HepG2-Zellen (A) und den Hep3B-Zellen (B) nach 6h und nach 24h Behandlung mit nM Panobinostat. Ergebnisse mit einer Überexpression von  $> 2$  oder einer Herunterregulation von  $< 0,5$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

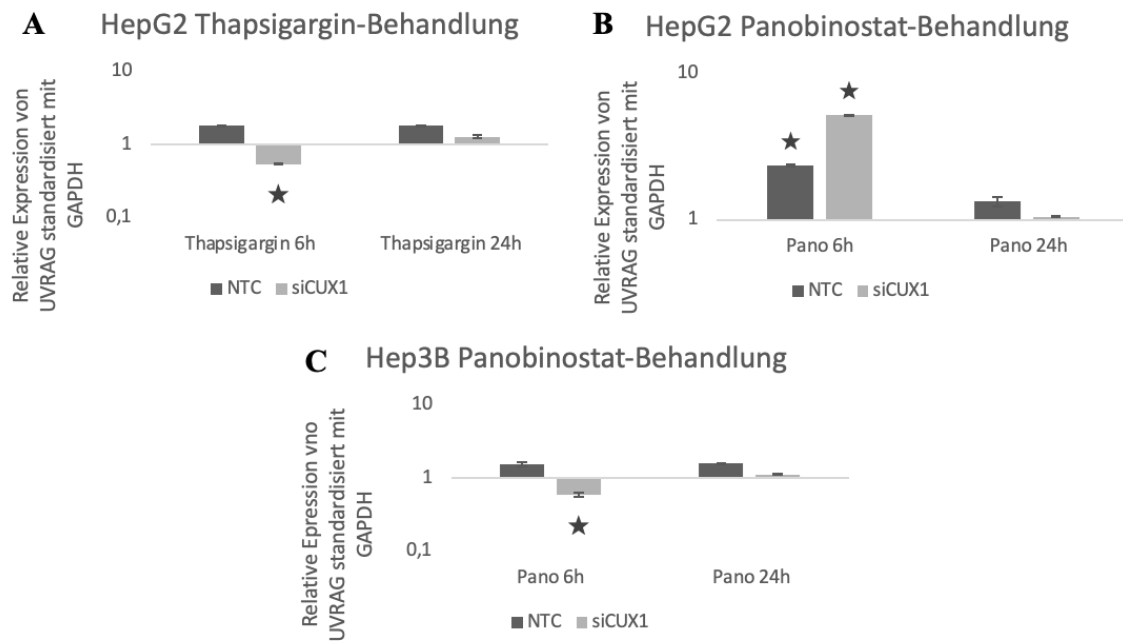
Auch die Western Blot-Analysen der Hep3B-Zelllinie untermauern die Vermutung regulatorischer Fähigkeiten von *CUX1* bezüglich der Autophagie und insbesondere des *nucleation steps* in Assoziation mit der *BECN1*-Expression. Korrelierend zu den Western Blot Analysen der Proteinexpression von *MAP1LC3B* in der HepG2-Zellreihe zeigten sich hier jeweils nach Behandlung mit sämtlichen DACis und nach Behandlung mit Thapsigargin deutlich erhöhte Proteinlevel von Beclin1 unter *Knockdown* von *CUX1* (siehe Abb. 29, A,B). Die Akkumulation von Beclin1 unter Absenz von *CUX1* selbst in der unbehandelten Gruppe sowie nach Autophagie-Induktion durch DACi-Behandlung weist somit auf Beeinträchtigungen des Verbrauchs von Beclin1 als autophagisches Protein hin.



**Abb. 29: Modulation der Proteinexpression des Autophagie-Markers Beclin1 in der Zellreihe Hep3B.** (A) Western Blots zur Detektion der Proteinlevel von Beclin1 nach Transfektion mit siCUX1 (+) bzw. nach negativer Transfektion mit der NTC (-) sowie ohne nachfolgende Substanzbehandlung (unbehandelt), nach Behandlung mit den DACis TSA (10  $\mu$ M), SAHA (10  $\mu$ M), Panobinostat (100 nM) und mit Thapsigargin (100 nM). Die densitometrischen Ergebnisse von Beclin1 wurden in Relation zu den densitometrischen Ergebnissen von  $\beta$ -Actin dargestellt. (B) Graphische Darstellung der densitometrischen Ergebnisse der Beclin1-Expression in Relation zu den densitometrischen Ergebnissen von  $\beta$ -Actin. Es erfolgte die densitometrische Quantifizierung der für Beclin1-spezifischen Bande bei einer Größe von 52 kDa (obere Bande in der Abbildung der Western Blots). Signifikante Abweichungen zwischen der Kontrollgruppe (NTC) und der *CUX1*-Knockdown-Gruppe (siCUX1) mit  $p < 0,05$  im student's t-Test sind durch „\*“ gekennzeichnet. Dargestellt ist die mittlere Standardabweichung der durchgeführten Experimente.

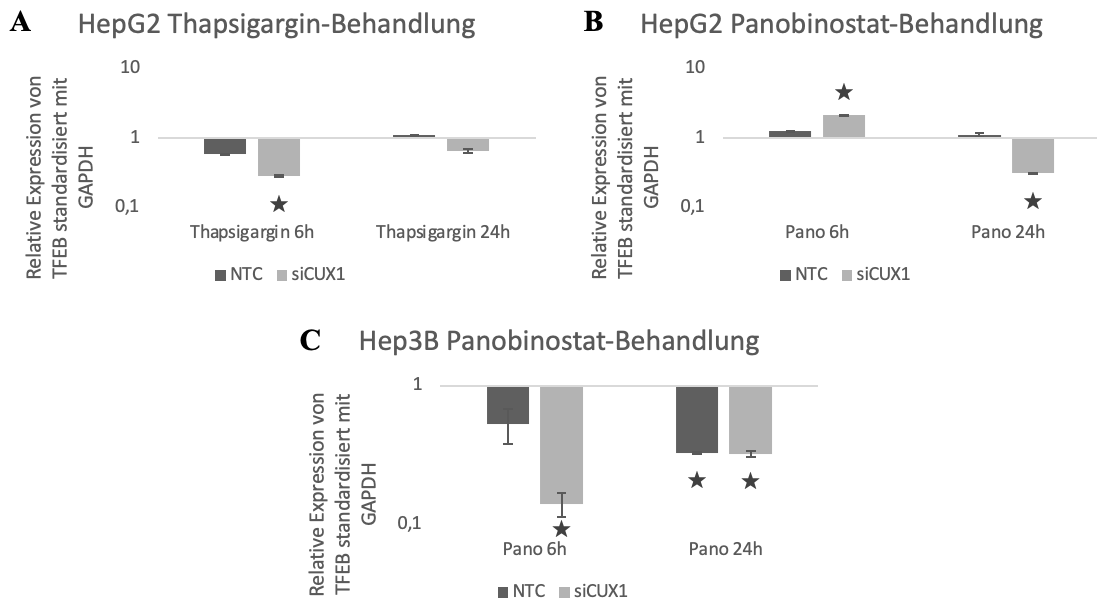
In den komplexen Vorgang des Keimbildungsschrittes bis hin zur letztendlichen Formation des Autophagosoms ist ebenfalls das *UV-radiation resistance-associated gene protein* UVRAG eingebunden. Nach ER-Stress-Induktion durch Thapsigargin-Gabe wurde in der HepG2-Zellreihe nach kurzzeitiger Inkubation eine signifikante Herunterregulation von UVRAG nach *CUX1*-Knockdown gemessen (siehe Abb. 30, A). Auch in der Hep3B-Zellreihe konnte eine signifikante Minderexpression des *UV-radiation resistance-associated gene protein* unter *CUX1*-Defizienz nach kurzzeitiger Inkubation mit Panobinostat nachgewiesen werden (siehe Abb. 30, C). Interessanterweise zeigt die p53-wildtype-Zellreihe HepG2 korrelierend zu den qRT-PCR-Analysen von *MAP1LC3B* und *BECN1* auch in dieser Versuchsanordnung nach kurzzeitiger Panobinostat-Behandlung eine signifikante, relative Hochregulation des Autophagie-Markers UVRAG nach *CUX1*-Knockdown (siehe Abb. 30, B). Auch die Modulation der

*UVRAG*-Expression durch Panobinostat-Behandlung sollte also stets im Kontext des p53-Status sowie der Inkubationsdauer betrachtet werden.



**Abb. 30: Modulation der *UVRAG*-mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.** qRT-PCR-Expressionsanalysen von *UVRAG* in HepG2-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 100 nM Thapsigargin (A) und mit 100 nM Panobinostat (B) sowie in Hep3B-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 100 nM Panobinostat (C). Ergebnisse mit einer Überexpression von  $> 2$  oder einer Herunterregulation von  $< 0,5$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

Nach abgeschlossenem Reifungsprozess und vollständiger Bildung des Autophagosoms ist die TFEB-vermittelte Fusion mit dem Lysosom der letzte Schritt zur erfolgreichen Elimination der im Autolysosom eingeschlossenen Zellbestandteile (Settembre et al., 2011). Die Thapsigargin-Behandlung zeigte nach 6-stündiger Messung eine signifikante Herunterregulation von *TFEB* unter *CUX1-Knockdown* (siehe Abb. 31, A). Korrelierend zu den qRT-PCR-Analysen von *UVRAG* stellte sich in der p53-wildtype-HepG2-Zellreihe auch nach *CUX1-Knockdown* eine signifikante Hochregulation von *TFEB* nach 6-stündiger Panobinostat-Behandlung und eine signifikante Herunterregulation nach 24-stündiger Panobinostat-Behandlung dar (siehe Abb. 31, B). Die Panobinostat-Behandlung der p53-defiziente Hep3B-Zellreihe resultierte insgesamt in einer Herunterregulation des Autophagie-Markers *TFEB* sowohl zum frühen als auch zum späten Messzeitpunkt. Eine signifikant stärkere Herunterregulation von *TFEB* ist hierbei nach 6-stündiger Panobinostat-Beimpfung unter *CUX1-Knockdown* messbar (siehe Abb. 31, C).



**Abb. 31: Modulation der *TFEB*-mRNA-Expression unter Substanzbehandlung.** qRT-PCR-Expressionsanalysen von *TFEB* in HepG2-Zellen nach 6h und nach 24h Behandlung mit 100 nM Thapsigargin (**A**) und 100 nM Panobinostat (**B**) sowie in den Hep3B-Zellen nach 6h und 24h Behandlung mit 100 nM Panobinostat (**C**). Ergebnisse mit einer Überexpression von  $> 2$  oder einer Herunterregulation von  $< 0,5$  sind mit „\*“ gekennzeichnet. Die mRNA-Expression wurde mit GAPDH standardisiert und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es wird der Standardfehler der durchgeführten Ergebnisse angegeben.

Zusammenfassend wurden anhand der oben aufgeführten Analysen relevante Abweichungen der mRNA-Expression sämtlicher Autophagie-Indikatoren insbesondere nach Panobinostat-Behandlung beider Zellreihen nachgewiesen. Die Inkubationsdauer mit dem potenten Pan-DACi schien hier von Bedeutung zu sein: Es ließen sich nach kurzzeitiger Behandlung der Hep3B-Zellen und nach langfristiger Behandlung der HepG2-Zellen ein verminderter mRNA-Gehalt aller Autophagie-Marker unter *CUX1-Knockdown* nachweisen. Interessanterweise wurde nach kurzzeitiger Panobinostat-Behandlung eine signifikant höhere Expression aller Autophagie-Marker, allerdings nur der HepG2-Zellen, nach *Knockdown* von *CUX1* gemessen. Für die Regulation zentraler Schlüsselprozesse der Autophagie spielte neben der Inkubationsdauer der DACis somit auch der p53-Status der behandelten Zellreihe eine Rolle. Die Western Blot-Analysen der Proteinlevel von Beclin1 und MAP1LC3B zeigten eine Akkumulation dieser Autophagie-Marker nach Substanzbehandlung und *CUX1-Knockdown* und deuten auf einen verminderten Verbrauch dieser Proteine unter beeinträchtigten Autophagie-Mechanismen hin.

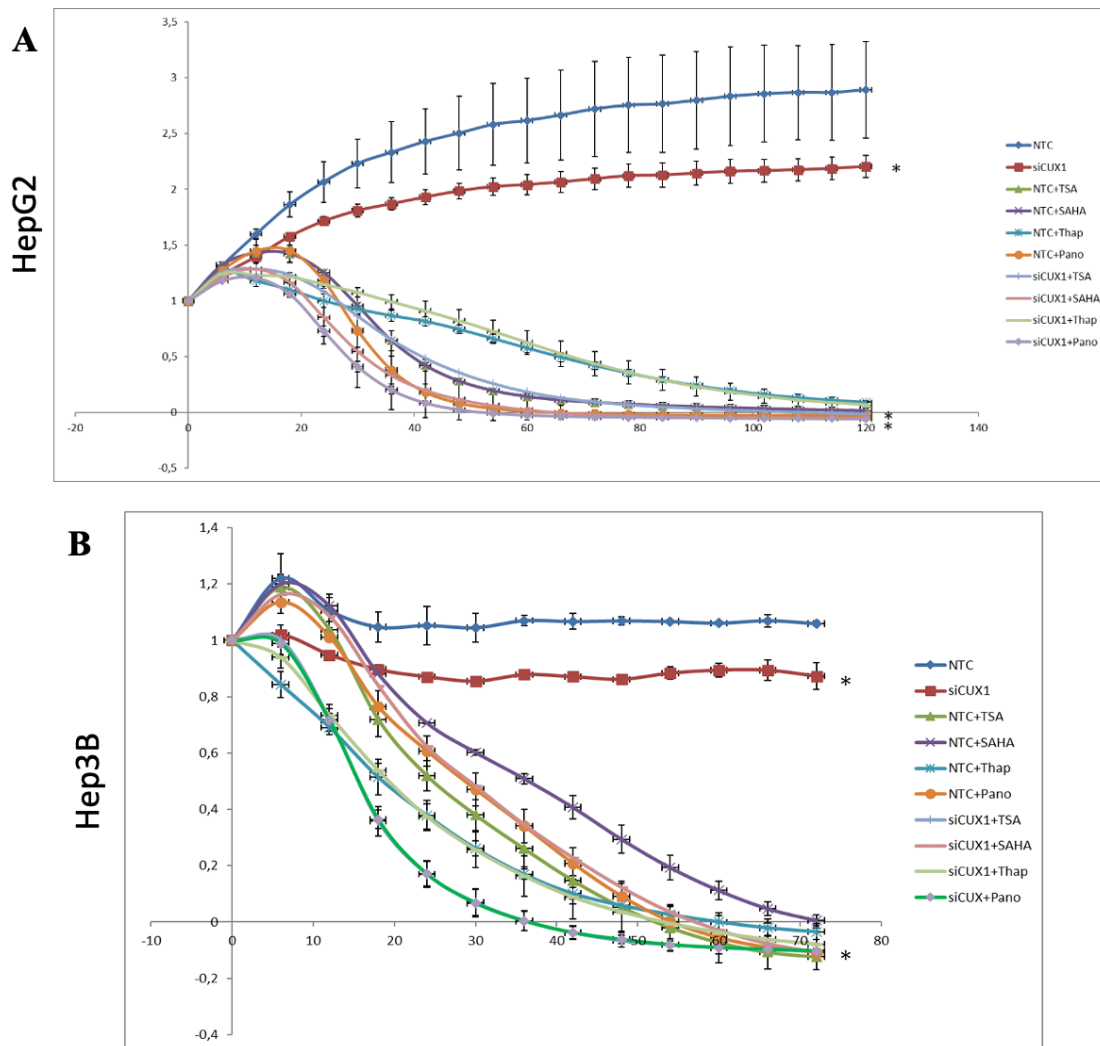
## 5.5 xCELLigence® - CUX1-bedingte Regulation des Proliferationsverhaltens unter Substanzbehandlung

Mit der Echtzeitzellanalyse können über das xCELLigence®-Messsystem anhand von gemessenen Impedanzänderungen der Zellen sowohl die Zellproliferation als auch die Zellvitalität und -morphologie unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Durch die Kenntnis des Vitalitätszustandes der Zellen können Rückschlüsse auf z.B. eine mögliche Zytotoxizität unter der Substanzbehandlung mit den DACis und Thapsigargin gezogen werden. Es galt, einen etwaigen Einfluss des *CUX1*-Transfektionsstatus auf die DACi-induzierte Autophagie bezüglich des Proliferationsverhaltens der HCC-Zellen zu untersuchen. Auch ohne eine vorhergehende Substanzbehandlung waren bereits signifikante Unterschiede der Proliferation von HepG2- und Hep3B-Zellen nach *CUX1-Knockdown* messbar. Die HepG2-Zellreihe präsentierte hierbei in der unbehandelten Kontrollgruppe nach negativer Transfektion ohne Substanzbehandlung eine exponentielle Wachstumskurve insbesondere in den ersten 20 Stunden mit anschließendem Übergang in eine Plateau-Phase (siehe Abb. 32, A „NTC“). Ohne additive DACi-Behandlung war nach *CUX1-Knockdown* zunächst ein Abflachen der Wachstumskurve bei erhaltener positiver Zellproliferation festzuhalten (\*,  $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 32, A „siCUX1“). Korrelierende Ergebnisse konnten in den Hep3B-Zellen beschrieben werden. Nach negativer Transfektion stellte sich ohne Substanzbehandlung in der Hep3B-Zelllinie nach 5 Stunden ein lineares Wachstumsverhalten mit anschließendem Kurvenmaximum nach 7 Stunden dar, gefolgt von einem Abfall der Zellproliferation und Übergang in eine annähernde Konstante (siehe Abb. 32, B „NTC“). Nach *CUX1-Knockdown* zeigte sich die Proliferationskurve weitgehend parallel bei niedrigerem CI ohne den anfänglichen Wachstums-Peak (\*,  $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 32, B, „siCUX1“).

Unter Substanzbehandlung zeigt sich in beiden Zellreihen eine lineare bis exponentielle Abnahme des Zellindex CI. Nach negativer Transfektion sowie Beimpfen der HepG2-Zellen mit Thapsigargin und dem TSA zeigt sich bereits eine deutliche Abnahme der Zellproliferation nach lediglich 10 Stunden positiven Zellwachstums (siehe Abb. 32, A „NTC + TSA“, „NTC+ Thap“). Einen noch rascheren bis exponentiellen Abfall der Wachstumskurve und eine tangentiale Annäherung zur x-Achse präsentierte die negativ transfizierte Gruppe nach SAHA- und Panobinostat-Gabe und die siCUX1-transfizierte Gruppe in Kombination mit der Applikation sämtlicher DACis und Thapsigargin (siehe Abb. 32, A). Eine signifikante Abnahme des Zellwachstums wurde also in der HepG2-

Zellreihe nach *CUX1-Knockdown* und unter Thapsigargin- und TSA-Behandlung deutlich (\*,  $p < 0,05$ ). Auch die Hep3B-Zellreihe zeigte einen Rückgang der Zellproliferation unter *CUX1-Knockdown* und Substanzbehandlung.

Nach Applikation sämtlicher Substanzen in der NTC-Gruppe (siehe Abb. 32, B „NTC + Thap“, „NTC + TSA“, „NTC + SAHA“, „NTC + Pano“) und nach Gabe von TSA, SAHA und Thapsigargin in der siCUX1-Gruppe (siehe Abb. 32, B „siCUX1 + TSA“, „siCUX1 + SAHA“, „siCUX1 + Thapsigargin“) wurde je eine lineare, kontinuierliche Abnahme ohne signifikanten Unterschied innerhalb der beschriebenen Versuchsanordnungen gemessen. Nach Beimpfen mit Panobinostat bildete die Kurve der Zellvitalität unter *CUX1*-Defizienz visuell eindeutig schneller eine Tangentiale zur x-Achse und lässt sich als umgekehrte exponentielle Funktion beschreiben. Der Effekt der rasch exponentiell abnehmenden Zellzahl nach bereits circa 10 Stunden ist somit unter *CUX1*-Defizienz und Panobinostat-Behandlung in der Hep3B-Zellreihe am stärksten ausgeprägt (\*,  $p < 0,05$ ) und weist eine signifikante Abweichung zur negativ transfizierten Gruppe auf.



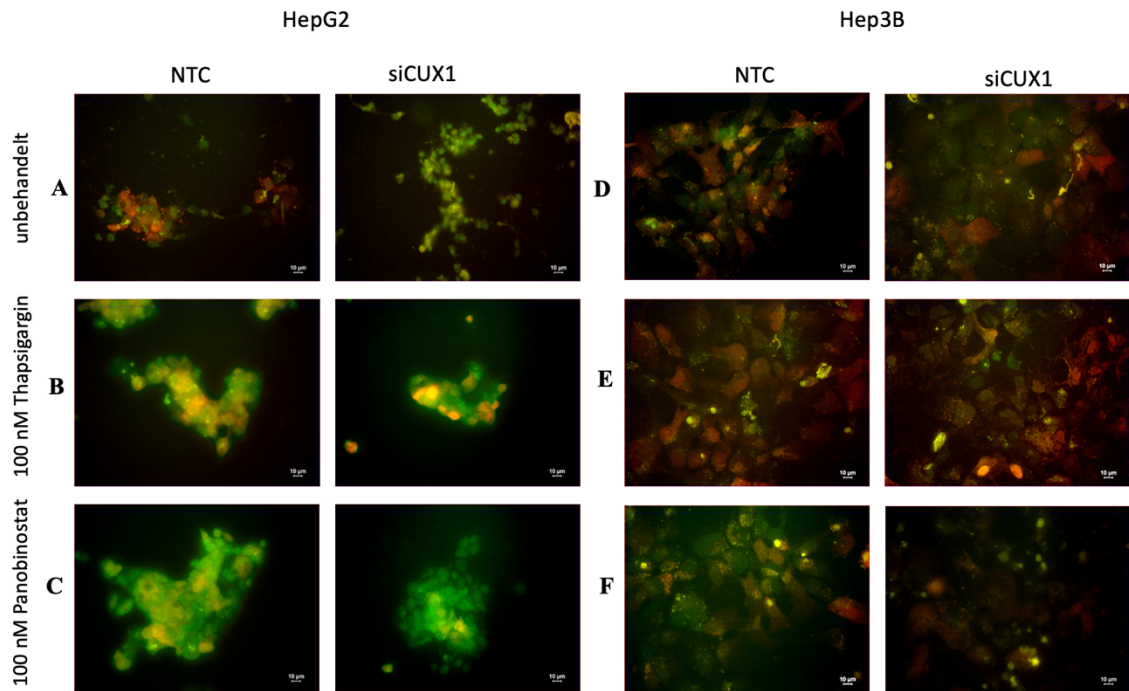
**Abb. 32: *CUX1*-bedingte Modulation der Zellproliferation unter Thapsigargin- und DACi-Behandlung.** Darstellung der Zellproliferation der Zelllinie HepG2 (**A**) und der Zelllinie Hep3B (**B**) anhand des normalisierten Zellindex (CI) entlang der x-Achse in Abhängigkeit der Zeit (h) entlang der y-Achse. Der positive sowie negative Fehlerindikator ist zu jedem Messzeitpunkt mit angegeben. Die Markierung \* zeigt signifikante Abweichungen mit einem p-Wert  $<0,05$  zwischen einer negativ transfizierten Probe und der zugehörigen si*CUX1*-transfizierten Probe, welche mit entweder unbehandelt sind oder mit der gleichen, additiven Substanz (10  $\mu$ M TSA, 10  $\mu$ M SAHA, 100 nM Panobinostat oder 100 nM Thapsigargin) behandelt wurden.

Zusammenfassend präsentierte sich in der HepG2-Zellreihe unter *CUX1*-*Knockdown* und TSA- und Thapsigargin-Behandlung eine signifikant schnellere Abnahme der Zellproliferation. Korrelierend hierzu wies die Hep3B-Zellreihe unter Panobinostat-Applikation und *CUX1*-*Knockdown* eine signifikante Abnahme der Zellproliferation im Vergleich zur negativ transfizierten Kontrollgruppe auf.



## 5.6. Fluoreszenzmikroskopie - die *CUX1*-bedingten Modulation der DACi-induzierten Autophagosomen-Reifung und Autolysosomen-Bildung

Die Fluoreszenzmikroskopie sollte durch die Mehrfachmarkierung des Autophagie-Markers MAP1LC3B über die Kopplung mit den zwei Vektorplasmiden *green fluorescent protein* (GFP) und *red fluorescent protein* (RFP) den autophagischen Flux visualisieren. Zur dynamischen Beurteilung dieser zellulären Vorgänge wurden zwei Vektoren verwendet, wobei grüne Fluoreszenzen (GFP) den „frühen“ Reifungsprozess des Autophagosoms und rote Fluoreszenzen (RFP) die „spätere“, nachfolgende Fusion zum Autolysosom markieren. Nach *CUX1-Knockdown* war in der HepG2-Zellreihe bereits ohne Substanzbehandlung eine Abnahme insbesondere des rot fluoreszierenden Signals (*RFP-MAP1LC3B*) zu erkennen (siehe Abb. 33, A). Dieser Sachverhalt ließ sich in der Hep3B-Zelllinie weniger deutlich nachvollziehen (siehe Abb. 33, D). Das Beimpfen der HepG2-Zellen mit Thapsigargin resultierte zunächst unabhängig des *CUX1*-Transfektionsstatus in einer höheren Dichte aus insbesondere den grün fluoreszierenden Strukturen im Sinne einer gesteigerten Autophagosomen-Reifung (siehe Abb. 33, B). Hierbei wurde das grün fluoreszierende *GFP-MAP1LC3B* unter *CUX1-Knockdown* sowie Thapsigargin-Applikation vermindert nachgewiesen werden, sodass hier eine reduzierte Autophagosomen-Reifung vermutet werden konnte (siehe Abb. 33, B). Nach Thapsigargin-Behandlung der Hep3B-Zellen war rein visuell keine signifikante Änderung der Fluoreszenzen in Anbetracht des *CUX1*-Transfektionsstatus erkennbar (siehe Abb. 33, D). Die Behandlung beider Zellen mit Panobinostat zeigte nach negativer Transfektion ein deutlich gesteigertes grün fluoreszierendes Signal (siehe Abb. 33, C und F, jeweils „NTC“). Eine Panobinostat-getriggerte Steigerung der Autophagosomen-Reifung wurde somit deutlich. In der HepG2-Zellreihe war das rot fluoreszierende *RFP-MAP1LC3B* nach Panobinostat-Behandlung unter *CUX1-Knockdown* fast nicht mehr visuell abgrenzbar (siehe Abb. 33, C). Defizite der „späten“ Autolysosomen-Bildung in der HepG2-Zellreihe im Rahmen der Panobinostat-getriggerten Autophagie lagen somit nahe. In den Hep3B-Zellen erschien jedoch der visuelle Nachweis von *GFP-MAP1LC3B* nach additiver Applikation von Panobinostat unter *CUX1*-Defizienz um ein Vielfaches vermindert dargestellt (siehe Abb. 33, F). Die Panobinostat-getriggerte Autophagosomen-Reifung in der Hep3B-Zellreihe schien durch die Absenz von *CUX1* stark beeinträchtigt.



**Abb. 33: Einfluss auf die Autophagosomen-Biogenese durch *CUX1*.** (A) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von RFP-MAP1LC3B und GFP-MAP1LC3B der Zelllinie HepG2 24 Stunden nach Transfektion mit dem Negativreagenz bzw. nach Transfektion mit der siRNA für *CUX1* ohne additive DACi-Behandlung sowie (B) nach 3-stündiger Panobinostat-Applikation in einer Konzentration von 100 nM und (C) nach 3-stündiger Thapsigargin-Applikation in einer Konzentration von 100 nM (C). (D) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von RFP-MAP1LC3B und GFP-MAP1LC3B der Zelllinie Hep3B 24 Stunden nach Transfektion mit dem Negativreagenz bzw. nach Transfektion mit der siRNA für *CUX1* ohne additive DACi-Behandlung sowie (E) nach 3-stündiger Panobinostat-Applikation in einer Konzentration von 100 nM und (F) nach 3-stündiger Thapsigargin-Applikation in einer Konzentration von 100 nM. Dargestellt ist eine 40-fache Vergrößerung, der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . Chromatinhaltige Strukturen wurden mit Hoechst gefärbt.

## 6 DISKUSSION

Das HCC wird derzeit als die zweithäufigste Todesursache auf Basis einer kanzerogenen Ätiologie angesehen (Afify, Sanchez und Hassan, 2020). Die Diagnosestellung im Frühstadium und somit Chance auf eine kurative Behandlung sind bei Symptomarmut häufig erschwert. In Kombination mit den ernüchternden Therapieoptionen fortgeschrittener Krankheitsstadien ist es naheliegend, bislang unbekannte molekulare Zielstrukturen zu erforschen und diese perspektivisch in Ansätze für neue Therapiestrategien zu integrieren (Breuhahn, 2010). So galt es als Ziel, regulatorische Funktionen des Transkriptionsfaktors *CUX1* nach DACi-getriggelter Induktion von ER-Stress-Reaktionen und Autophagie anhand der zwei humanen HCC-Zelllinien Hep3B und HepG2 zu untersuchen und *CUX1* auf dessen tumorsuppressive und onkogene Eigenschaften zu analysieren.

Es wurden neue Erkenntnisse über *CUX1*-bedingte Modulationen der DACi-getriggerten ER-Stress- und Autophagie-Mechanismen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der applizierten Substanzen und der behandelten Zelllinie gewonnen.

Die qRT-PCR-Analysen zeigten bereits ohne Substanzbehandlung eine Herunterregulation der Transkript-Expression einiger ER-Stress- und Autophagie-Marker unter *CUX1-Knockdown*. Auch nach Aktivierung dieser zellulären Stressmechanismen durch die Substanzbehandlung wurde modulatorisches Potential von *CUX1* nachgewiesen. Insbesondere die 6-stündige Gabe von Thapsigargin und Panobinostat resultierte in beiden Zelllinien in einer Abnahme der transkriptionellen Aktivität von *BIP*, *ATF4* und *ATF6* unter *CUX1-Knockdown*. Die Western Blot-Analysen beider Zelllinien zeigten eine Beeinträchtigung insbesondere der BIP-Proteinsynthese unter *CUX1-Knockdown*.

Die qRT-PCR-Ergebnisse zur Thapsigargin-getriggerten *CHOP*-Expression lieferten neue Erkenntnisse über regulatorische Fähigkeiten von *CUX1*. Bei langfristiger Exposition insbesondere der p53-mutierten Hep3B-Zellen mit Thapsigargin wurde eine defizitäre Expression der *CHOP*-mRNA deutlich.

Die Applikation von Panobinostat resultierte in einer signifikanten Abweichung der mRNA-Expression der Autophagie-Indikatoren. In Abhängigkeit der behandelten Zelllinie und der Dauer der Inkubationszeit vermittelte Panobinostat eine aberrante Expression von *MAP1LC3B*, *BECN1*, *UVRAG* und *TFEB* unter *CUX1-Knockdown*. Hierbei wurde nach 6-stündiger Panobinostat-Behandlung der HepG2-Zellreihe eine Hochregulation der Autophagie-Marker unter *CUX1-Knockdown* gemessen. Dahingegen

ließ sich eine herunterregulierte Transkript-Expression von *MAP1LC3B*, *BECN1*, *UVRAG* und *TFEB* nach 24-stündiger Panobinostat-Behandlung in der HepG2-Zellreihe und nach 6-stündiger Panobinostat-Behandlung in der Hep3B-Zellreihe nachweisen.

In den Western Blot Analysen deutete die Akkumulation von Beclin1 (in der Hep3B-Zellreihe) und MAP1LC3B (in der HepG2-Zellreihe) unter *CUX1-Knockdown* auf eine Beeinträchtigung der Autophagie durch den fehlenden Verbrauch dieser Proteine hin.

In den xCELLigence-Analysen zur Zellvitalität und – proliferation wurde eine signifikante Proliferationsabnahme nach Panobinostat-Behandlung der Hep3B-Zellen und nach TSA- und Thapsigargin-Behandlung der HepG2-Zellen unter *CUX1-Knockdown* deutlich.

Die Herunterregulation von *CUX1* zeigte eine Beeinträchtigung des Fluoreszenzverhaltens der mit den zwei Vektorplasmiden transfizierten Zelllinien *eGFP-/RFP-MAP1LC3B-HepG2* und – *Hep3B* nach Panobinostat-Behandlung. Unter Absenz von *CUX1* wurden in der Hep3B-Zellreihe ein vermindertes *eGFP*-Signal und in den HepG2-Zellen ein vermindertes *RFP*-Signal detektiert. Nach Herunterregulation von *CUX1* erscheinen demnach frühe autophagische Prozesse, wie die Autophagosomen-Reifung in der Hep3B-Zellreihe, oder fortgeschrittene autophagische Mechanismen, wie die Fusion zum Autolysosom in der HepG2-Zellreihe, defizitär.

Im Nachstehenden soll eine Gegenüberstellung der protumorigenen und der antitumorösen Eigenschaften von *CUX1* anhand der gewonnenen Daten erfolgen. ,

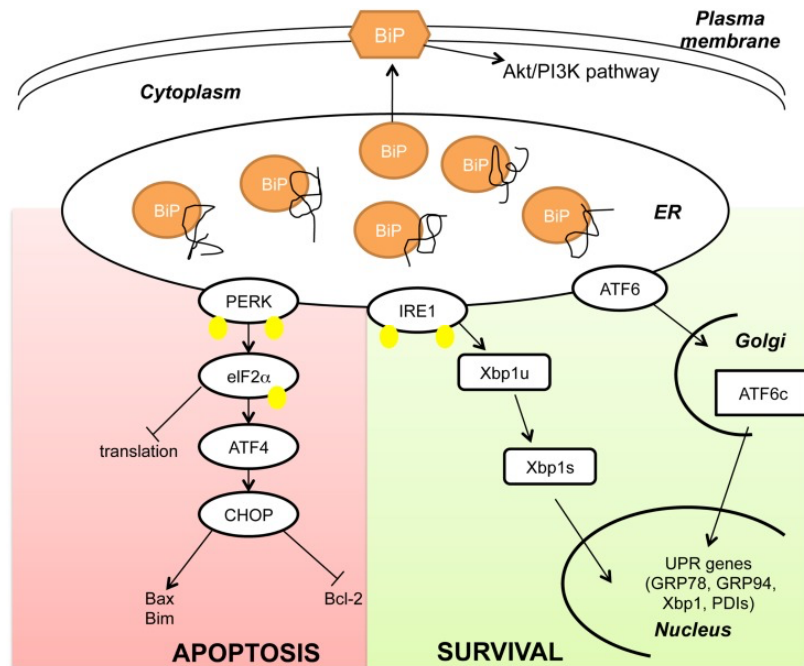
## 6.1. Onkogenes Potential von *CUX1*

### 6.1.1. *CUX1* fördert ER-Stress-vermittelte zelluläre Reparaturmechanismen – Beitrag zur multi drug resistance in Tumorzellen?

Unter Akkumulation von zellulären Stressoren, wie Hypoxie und Nährstoffdeprivation sowie damit verbundene metabolische Insuffizienzen sind ER-Stress-Mechanismen, wie zum Beispiel die *unfolded protein response (UPR)* oder die *endoplasmatic-reticulum-associated protein degradation (ERAD)* evolutionär hochkonservierte Mechanismen zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. In kanzerogenen Zellen sind Genmutationen und erschwerte metabolische Bedingungen wie Hypoxie verantwortlich für ein erhöhtes Maß fehlgefalteter Proteine (Kania, Pająk und Orzechowski, 2015). Primär maligne transformierte Zellen weisen daher verstärkt hochregulierte ER-Stress-Mechanismen verglichen mit gesundem Gewebe auf (Shuda et al., 2003). Eine Literaturrecherche zur *CUX1*-vermittelten Modulation von ER-Stress-Mechanismen in kanzerogenen Zellen bleibt bislang weitgehend ergebnislos.

Die qRT-PCR-Analysen zur Expression der ER-Stress-Marker unter *CUX1-Knockdown* zeigten bereits ohne eine vorherige Substanzbehandlung signifikante Abweichung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Transkript-Expression von *BIP*, *ATF4* und *ATF6* der Zelllinie HepG2 sowie von *BIP* der Zelllinie Hep3B wies unter Absenz von *CUX1* eine Herunterregulation auf (siehe Abb. 20). Eine transkriptionale Modulation der ER-Stress-Marker durch *CUX1* unter ruhenden Bedingungen der Zelle ohne Stimulation der *UPR* durch entsprechende Substanzbehandlung könnte hier von Bedeutung sein.

Ein abweichendes Expressionsverhalten der ER-Stress und Autophagie-Marker wurde auch unter DACi- und Thapsigargin- Behandlung der HepG2- und Hep3B-Zellen nach *CUX1-Knockdown* deutlich. Die Absenz von *CUX1* resultierte nach DACi- und Thapsigargin-getriggerten ER-Stress-Mechanismen in einer signifikant erniedrigten Proteinbiosynthese von BIP, insbesondere in der Hep3B-Zellreihe (siehe Abb. 22, 23) und in einer erniedrigten mRNA-Expression von *BIP* insbesondere in der HepG2-Zellreihe nach 6-stündiger Inkubationsdauer (siehe Abb. 21). Um Umkehrschluss können begünstigende Effekte von *CUX1* bezüglich der *BIP*-Expression angenommen werden. BIP ist als eines der wichtigsten *UPR*-assoziierten Proteine in die korrekte Proteinfaltung sowie den transmembranösen Proteintransport, in die Regulation der Tumorprogression und -proliferation, in die Angiogenese und letztendlich auch in die Induktion der Autophagie eingebunden (Luo und Lee, 2013). Diverse Studien assoziieren eine erhöhte *BIP*-Expression mit Resistenzbildung gegen eine chemotherapeutische Behandlung maligner solider Neoplasien. Erklärungsansätze hierfür bieten mögliche synergistische Effekte von BIP bezüglich der Aktivierung der *UPR* sowie des protumorigenen AKT/PI3K-Signalweges zur Förderung des weiteren Tumorüberlebens. Die Initiation des AKT/PI3K-Signalweges durch BIP erfolgt hierbei nach Translokation des Proteins in die Plasmamembran maligner Zellen. Währenddessen wird die apoptotische Signalkaskade nach ER-Stress-Induktion bei vorliegender Chemotherapie-Resistenz inaktiviert, was das Absterben der Tumorzellen verhindert (siehe Abb. 34) (Roller und Maddalo, 2013).



**Abb. 34.: BIP als Regulator der unfolded protein response.** Bei Akkumulierung fehlgefalteter Proteine im ER kommt es zur Dissoziation der drei transmembranären Sensorproteine PERK, IRE1 und ATF6 von BIP. PERK homodimerisiert, autophosphoryliert und phosphoryliert anschließend eine Untereinheit von eIF2 $\alpha$ . Dies aktiviert ATF4 sowie sein Zielgen *CHOP*. *CHOP* kann u.a. durch die Suppression von Bcl-2 und durch die Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bim und Bax die Apoptose induzieren. Korrelierend zu PERK bildet auch die Kinase/Endonuklease IRE1 ein Homodimer und autophosphoryliert bevor sie Xbp1-mRNA spaltet. Der dritte Zweig der UPR wird aktiviert durch den Transport von ATF6 in den Golgi-Apparat. ATF6 und Xbp1 regulieren die Transkription von überlebensfördernden Genen wie BIP und GRP94 und PDIs. BIP kann weiterhin in die Plasmamembran maligne transformierter Zellen migrieren und hier den für die Tumorzelle überlebensfördernden Akt/PI3K-Signalweg aktivieren (aus Roller und Maddalo, 2013).

*CUX1* könnte durch Stimulation der *BIP*-Expression an den oben genannten Vorgängen beteiligt zu sein und kanzerogenen Zellen zum Erhalt ihres metabolischen Gleichgewichts im Rahmen der *UPR* und der Beseitigung iatrogen verursachter Zellschäden verhelfen. Durch die mögliche Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen kann *CUX1* in diesem Zusammenhang eine onkogene Funktion zugeschrieben werden.

Regulatorische Funktionen durch *CUX1* sind auch bei der Modulation der *ATF4*- und *ATF6*-mRNA-Expression gegeben. Zwar ist dieser Effekt nicht auf Proteinebene nachzuvollziehen, jedoch zeigte sich vor allem nach 6-stündiger DACi-Behandlung eine signifikante Herunterregulation der mRNA-Transkript-Expression von *ATF4* und *ATF6* in Abwesenheit von *CUX1*. Diese wurde insbesondere nach Panobinostat-Behandlung in den Hep3B-Zellen und nach Thapsigargin-Behandlung in den HepG2-Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 24). In einem meist hypoxischen, nährstoffarmen Milieu kanzerogener Zellen kann *ATF4* über Herstellung einer metabolischen Homöostase, über Regulation der Aminosäurebiosynthese und der Angiogenese die Tumorprogression sicherstellen (Singleton und Harris, 2012). Korrelierend hierzu können auch *ATF6* onkogene Eigenschaften zugeschrieben werden. Im Falle der Behandlung mit beispielsweise

Chemotherapeutika kann die Hochregulation von *ATF6* die weitere Tumorproliferation über die Induktion von ER-Stress und Beseitigung dieser akkumulierenden, toxischen Substanzen garantieren. Anhand einer Studie an Ovarialkarzinomzellen wurde die Mehrexpression von *ATF6* als Downstream-Effektor einer protumorigenen Signalkaskade von u.a. *STAT3* (*signal transducers and activators of transcription 3*) nach Behandlung mit Cisplatin und Paclitaxel beschrieben und mit der Bildung von Chemotherapie-Resistenzen assoziiert (Meng et al., 2020). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten belegen eine Beeinträchtigung dieser Mechanismen durch *CUX1-Knockdown*. Im Umkehrschluss könnte *CUX1* die Expression von *ATF4* und *ATF6* begünstigen und somit die Resistenzbildung gegenüber iatrogen verursachten Zellschäden fördern. Die Charakterisierung von *CUX1* als Onkogen liegt in diesem Kontext nahe. Bezüglich der Chemoresistenz-Bildung besitzt *CUX1* nicht nur regulatorische Funktionen. Wie in der Einleitung beschrieben kann *CUX1* iatrogene, Strahlen-oder Chemotherapie-induzierte DNA-Schäden in tumorösem Gewebe durch dessen direkte DNA-Reparaturkapazitäten über Interaktion mit dem Enzym OGG1 (*8-oxoguanine-DNA-glycosylase*) wieder ausgleichen und so zur therapeutischen Resistenzentwicklung beitragen (Ramdzan et al., 2017). *CUX1* könnte also neben eigenständigen DNA-Reparaturkapazitäten auch die ER-Stress-vermittelte Chemoresistenz-Bildung über Regulation von *ATF4* und *ATF6* fördern. Um diese Arbeitshypothese zu vertiefen, erscheinen beispielsweise *Knockdown*-Versuche sowie Western Blot-Untersuchungen zur mRNA- und Proteinexpression von *ATF4* und *ATF6* essenziell.

#### 6.1.2. *CUX1* begünstigt durch antiapoptotisches Potential die Zellproliferation

Anhand des durchgeführten *real time cell viability assays* (xCelligence ®) wurden Beeinträchtigungen der Zellproliferation unter *CUX1*-Defizienz deutlich. Eine in Abhängigkeit von der untersuchten Zellreihe signifikante Proliferations- und Vitalitätsabnahme wurde vor allem nach 10-stündiger Panobinostat-Behandlung in den Hep3B-Zellen nach *CUX1-Knockdown* nachgewiesen (siehe Abb. 32). Wie kann dieser Einbruch im Proliferationsverhalten der Tumorzellen unter *CUX1*-Defizienz erklärt werden? Neben zahlreichen protumorigenen Effekten, wie z.B. einer gesteigerten Motilität und Invasivität kanzerogener Zellen als *downstream-effector* von TGF- $\beta$  (Michl et al., 2005), einer Hochregulation insbesondere der aktiven, prozessierten Isoformen in mehreren entarteten Zellen wie beispielsweise malignen Plasmazellen (De Voos et al., 2002) oder einer positiven Korrelation entdifferenzierter Mammakarzinom-Zellen mit

dem Level an *CUX1*-mRNA (Michl et al., 2005) führt auch die *CUX1*-vermittelte Apoptoresistenz zu dem Konsens einer Charakterisierung von *CUX1* als Onkogen (Liu, Lin, Zhao, Wang und Lan, 2013).

Mehrere experimentelle Arbeiten belegen antiapoptotische Effekte von *CUX1*. Dies wurde beispielsweise durch Überexpressionsversuche von *CUX1* in Pankreaskarzinomzellen untersucht. Ripka et al. wies 2010 unter anderem eine TRAIL-induzierte *CUX1*-Überexpression sowohl *in vitro* als auch in einem murinen Xenograft-Modell *in vivo* und eine hieraus resultierende Herunterregulation von *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) sowie eine Hochregulation von *B-cell-lymphoma 2* (Bcl-2) nach. Die in dieser Arbeit gemessene rasche Abnahme der Zellproliferation in den xCELLigence®-Analysen unter *CUX1-Knockdown* belegt eine Begünstigung der protumorigenen Zellproliferation durch *CUX1*, möglicherweise im Rahmen einer erniedrigten Apoptose-Rate in Präsenz von *CUX1*. Durchflusszytometrische Untersuchungen, wie beispielsweise eine *Fluorescence-activated-cell-sorting* (FACS)-Analyse mit einer Annexin V-Färbung könnten helfen, eine erhöhte Apoptose- oder Nekrose-Rate der Zellen zu visualisieren und sollten in weiterführenden Arbeiten Berücksichtigung finden. Über Nutzung von Biolumineszenzen könnten ATP-Assays zur Darstellung der Zellviabilität genutzt werden, die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützen und das onkogene Potential von *CUX1* untermauern.

## 6.2. Tumorsuppressives Potential von *CUX1*

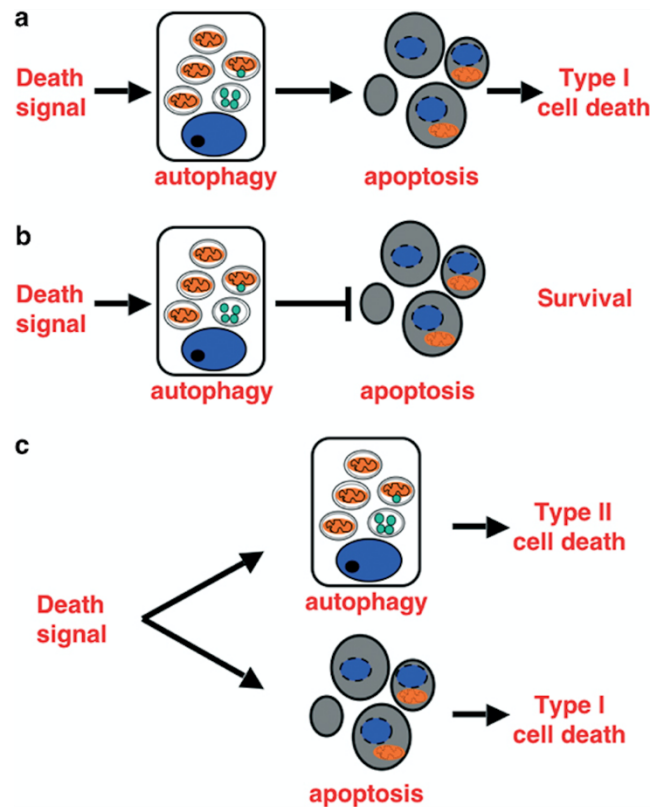
### 6.2.1. *CUX1* fördert die tumorsuppressive Rolle der Autophagie durch den autophagischen Zelltod

#### 6.2.1.1. *Type-I und type-II-cell death* – der Autophagie-bedingte Tod kanzerogener Zellen

Es wurde bisher erwiesen, dass die Panobinostat-Behandlung von HCC-Zellen via Initiation von ER-Stress und einer anschließenden Überexpression von *MAP1LC3B* und *BECN1* die Autophagie triggern kann und hierdurch das Zellsterben bewirkt (Di Fazio et al., 2016). In diesem Kontext können zwei unterschiedliche Zelltodarten voneinander abgegrenzt werden. Einerseits kann im Rahmen ausgedehnter autophagozytischer Prozesse die Mehrheit der Zellorganellen und des Zytosols eliminiert werden und eine irreversible Zellatrophie mit konsekutivem Untergang vitaler zellulärer Funktionen eintreten (*typ-II-cell-death*). Der *typ-II-cell-death* stellt also das Resultat einer überproportionalen Degradierung beschädigter Zellorganellen dar, was in einer irreversiblen Zellatrophie resultieren würde. Ein solch hoher Grad an Selbstzerstörung,



welcher das Maß an gesunden Zellorganellen enorm schrumpfen lässt, mündet im Zelltod (Baehrecke, 2005). Andererseits kann die Autophagie direkt auf Stressstimuli reagieren und so den apoptotischen oder nekrotischen Zelltod induzieren (*typ-I-cell-death*) (Maiuri, Zalckvar, Kimchi und Kroemer, 2007) (siehe Abb. 35).



**Abb. 35: Apoptose und Autophagie im Kontext des programmierten Zelltodes.** (a) Die Autophagie leistet einen wesentlichen Beitrag zur Apoptose-Induktion und dem *type-I-cell-death* (b) Die Autophagie kann die Apoptose inhibieren und ein vorübergehendes Zellüberleben sichern (c) Autophagie und Apoptose können unabhängig voneinander stattfinden und das Zellsterben über den *type-II-cell-death* (Autphagie-vermittelt) oder den *type-I-cell-death* (letztendlich über die Apoptose/Nekrose vollzogen) hervorrufen. (aus Gozuacik und Kimchi, 2004)

Dies wurde bereits anhand von Tiermodellversuchen nachgewiesen. So zeigte eine Studie an den Speicheldrüsen der *Drosophila melanogaster* im Rahmen einer Überexpression autophagischer Proteine eine zunehmende Apoptose-typische DNA-Fragmentierung. In einer weiteren Versuchsanordnung konnte ein *Knockdown* des proapoptotischen Proteins APAF1 und diverser Caspasen den *type-I-cell death* verzögern (Martin und Baehrecke, 2004). Die Nekrose als weitere Möglichkeit des Autophagie-vermittelten *type-I-cell death* sollte ebenfalls in diesen Kontext miteinbezogen werden. So zeigte sich unter starker Autophagie-Induktion eine selektive Eliminierung von Katalasen, den Schlüsselenzymen antioxidanter Abwehrmechanismen der Zelle. Im Gegenzug daraus resultierte eine Abschwächung der Katalase-Aktivität im nekrotischen Zelltod,

welcher wiederum durch Autophagie-Inhibitoren sowie Antioxidantien verhindert werden konnte (Yu et al., 2006). Zusammenfassend kann eine Autophagie-bedingte Induktion verschiedener Zelltodmechanismen je nach zu Grunde liegender zellulärer Homöostase beschrieben werden. Das tumorsuppressive Potential der Autophagie steht dabei im Vordergrund.

#### 6.2.1.2. *CUX1*-bedingte Modulation der mRNA-Expression autophagischer Marker in Abhängigkeit des p53-Status und der DACi-Inkubationsdauer

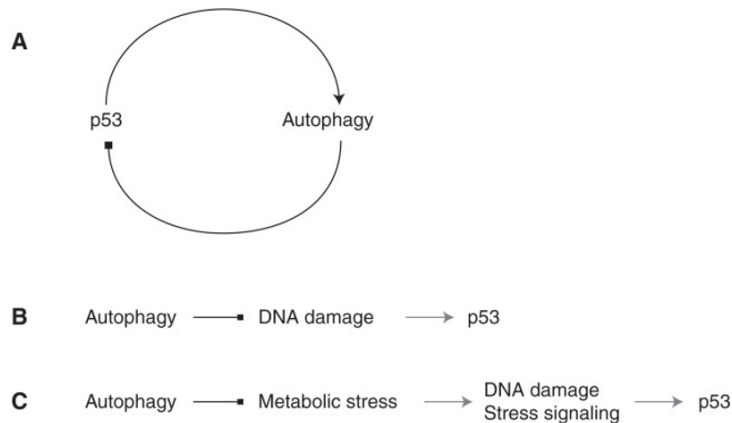
Die Zusammenschau des noch unerforschten Transkriptionsfaktors *CUX1* mit tumorsuppressiven Autophagie-Mechanismen ist in der Literatur bislang eine Rarität. El-Aarag und Kollegen charakterisierten *CUX1* 2017 anhand einer breit aufgestellten Genomanalyse exemplarisch als einen von 12 Transkriptionsfaktoren, welcher an der Entstehung nikotininduzierter Lungenkarzinome beteiligt sei. Parallel hierzu wurde die aberrante Regulation der Autophagie als einer von 18 Schlüsselprozessen der Lungenkarzinogenese identifiziert. Etwaige Wechselwirkungen oder gar ein Zusammenhang verbleiben unklar. Im obigen Abschnitt wurde erläutert, inwiefern die Autophagie über den *autophagic cell death type I* oder *type II* tumorsuppressives Potential besitzt. Diese Ausführungen werden in Anbetracht der gewonnenen Daten zur *CUX1*-bedingten Modulation der Autophagie-Marker-Expression relevant.

Die qRT-PCR-Analysen der Autophagie-Indikatoren unter *CUX1-Knockdown* zeigten bereits ohne eine vorherige Substanzbehandlung signifikante Abweichung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der mRNA-Gehalt von *MAP1LC3B* in den HepG2-Zellen und sowie von *MAP1LC3B* und von *TFEB* in den Hep3B-Zellen wies unter Absenz von *CUX1* eine Herunterregulation auf (siehe Abb. 20). Eine transkriptionale Modulation durch *CUX1* unter ruhenden Bedingungen der Zelle ohne Stimulation autophagischer Mechanismen durch entsprechende Substanzbehandlung könnte auch hier, deckungsgleich zur Analyse der ER-Stress-Indikatoren, von Bedeutung sein.

Unter Panobinostat-Applikation wurden korrelierende Ergebnisse zur mRNA-Expression aller Autophagie-Marker in Abhängigkeit der behandelten Zelllinie und der Inkubationsdauer gewonnen. Es konnte eine herunterregulierte mRNA-Expression von *BECN1*, *UVRAG*, *TFEB* und *MAP1LC3B* nach 6-stündiger Panobinostat-Inkubation der Hep3B-Zellen und nach 24-stündiger Panobinostat-Inkubation der HepG2-Zellen gemessen werden (siehe Abb. 26, 28, 30 und 31). Interessanterweise zeigte sich in den HepG2-Zellen nach kurzzeitiger, also 6-stündiger Gabe von Panobinostat und *CUX1-Knockdown* eine Hochregulation sämtlicher Autophagie-Indikatoren (siehe Abb. 26B,

28A, 30B, 31B). Die Art der behandelten Zelllinie und die Dauer der DACi-Inkubation scheint sich auf das regulatorische Potential von *CUX1* auszuwirken. Wie könnte das Zusammenspiel aus diesen Faktoren vor dem Hintergrund der tumorsuppressiven Funktion von *CUX1* aussehen?

Zunächst sollten Unterschiede der HepG2- und der Hep3B-Zellreihe betrachtet werden. Die untersuchten HCC-Zelllinien präsentieren hierbei einen unterschiedlichen p53-Status, wobei die HepG2-Zellen einen p53-*wildtyp* und die Hep3B-Zellen eine p53-Defizienz aufweisen. Unter *CUX1-Knockdown* wurden in den p53-mutierten Hep3B-Zellen nach kürzerer Panobinostat-Expositionszeit und in den p53-*wildtype*-HepG2-Zellen nach längerer Panobinostat-Expositionszeit eingeschränkte Autophagie-Mechanismen nachgewiesen. *CUX1* könnte in seiner Funktion als Tumorsuppressorgen in p53-defizienten Zellen nach moderater Dosis zellulärer Noxen (kurzzeitige Exposition) und in den p53-*wildtype*-Zellen nach Überschreiten einer gewissen Schwellendosis zellulären Schadens (langfristige Exposition) den *autophagic cell death* beeinflussen. Mögliche Interaktionen zwischen dem Tumorsuppressorgen *TP53* und der Autophagie könnten relevant sein. Regulatorische Feedback-Mechanismen zwischen p53 und der Autophagie sind bereits aus einigen experimentellen Arbeiten bekannt. Das Tumorsuppressorgen *TP53* kann durch direkte Aktivierung Autophagie-assoziiierter Gene wie *ULK1* und *ATG7* oder über die transkriptionelle Hochregulation von z.B. *DRAM* (*damage regulated autophagy modulator*) als direktes Zielgen einerseits Autophagie-Mechanismen stimulieren. Andererseits kann die Autophagie gegenüber p53 eine inhibitorische Funktion einnehmen. Die Herunterregulation der p53-Expression beruht dabei auf der autophagischen Elimination ROS-produzierender Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen oder dem frühzeitigen Abwenden entstehender DNA-Schädigungen durch das Bereitstellen von Komponenten des DNA-Reparatursystems. Da die Autophagie durch das zelleigene Recycling-System die auftretende DNA-Schäden bereits beseitigt, bleibt die im Rahmen zellulären Schadens auftretende p53-Aktivierung daher aus. (siehe Abb. 36) (White, 2016).

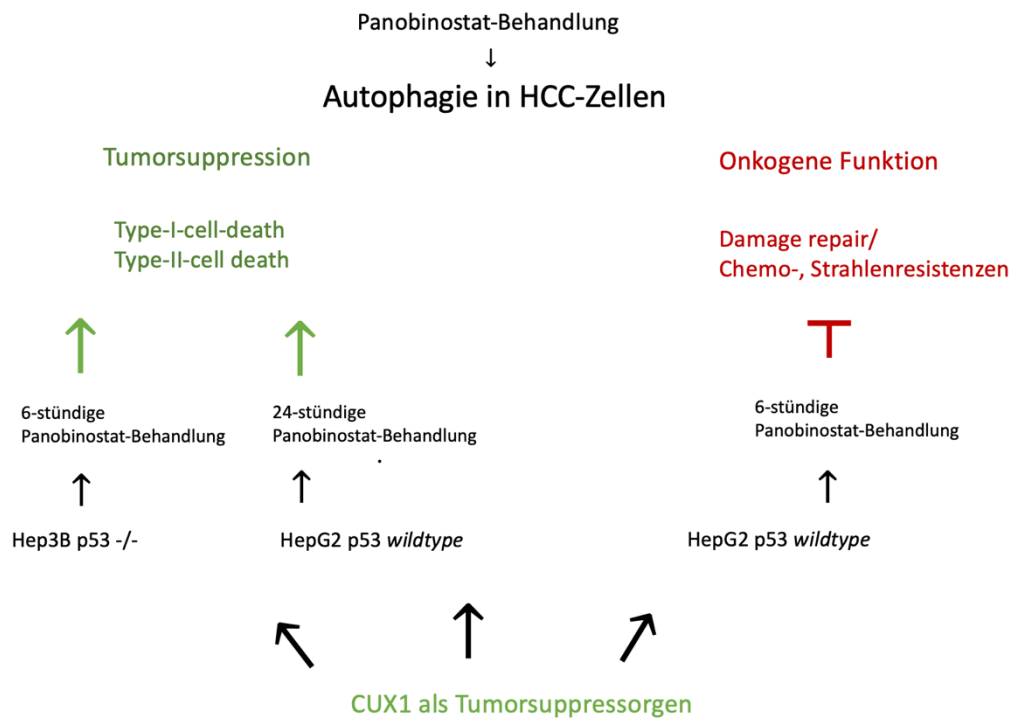


**Abb. 36: Interaktionen zwischen p53 und der Autophagie.** (A) p53 kann die Autophagie aktivieren, während diese die p53-Proteinexpression inhibiert. (B) Die Autophagie kann als zelleigenes Recycling-System auftretende DNA-Schäden beseitigen. Die im Rahmen von zellulärer Schädigung auftretende p53-Aktivierung bleibt daher aus. (C) Metabolische Stressbedingungen (z.B. bedingt durch zelluläre Bestandteile und deren Produktion von *ROS* oder Hypoxie) können durch die Autophagie beseitigt werden. Die konsekutive Aktivierung von p53 und diverser *stress signaling* – Signalkaskaden als Antwort auf die DNA-Schädigung bleibt daher aus. (aus White, 2016).

Der p53-Status sollte also bei der Interpretation modulatorischer Fähigkeiten von *CUX1* bezüglich der Autophagie Beachtung finden. Direkte transkriptionelle Regulationen zwischen *CUX1* und *TP53* sind allerdings noch nicht bekannt. Eine *CUX1*-vermittelte indirekte Inhibition von p53 im Rahmen akkumulierender DNA-Schäden in Tumorzellen und deren Beseitigung durch DNA-Reparaturmechanismen, wie z.B. durch das direkt *CUX1*-stimulierte Enzym OGG1 (*8-oxoGuanin-DNA glycosylase*) sei jedoch denkbar (Ramdzan et al., 2014).

Neben dem p53-Status scheint sich die Dauer der Panobinostat-Exposition auf die Expression der autophagischen Marker unter *CUX1-Knockdown* auszuwirken. So wurde in der p53-*wildtype*-HepG2-Zelllinie eine Hochregulation aller Autophagie-Indikatoren nach kurzzeitiger Panobinostat-Behandlung deutlich, während sich eine verminderte Expression sämtlicher Autophagie-Marker nach kurzfristiger Panobinostat-Behandlung der p53-mutierten Hep3B-Zellen und nach langfristiger Panobinostat-Behandlung der p53-*wildtype*-HepG2-Zellen zeigte (siehe Abb. 26, 28, 30 und 31). Inwiefern kann dieser Sachverhalt zur tumorsuppressiven Wirkung von *CUX1* beitragen? Die Betrachtung der dualen Rolle der Autophagie in kanzerogenen Zellen ist hierfür notwendig. Die Induktion des *autophagic cell death type I/II* verdeutlicht einerseits das tumorsuppressive Potential der Autophagie: eine Hochregulation autophagischer Mechanismen, beispielsweise durch die Behandlung der Zellen mit Panobinostat, mündet in einem vermehrten Zellsterben und kann hierdurch das Tumorwachstum begrenzen. Andererseits können sich tumoröse Zellen im Rahmen chemo- oder strahlentherapeutisch induzierter Zellschäden

autophagischer Reparaturmechanismen bedienen, sodass die Autophagie über therapeutische Resistenzen die Tumorprogression erleichtert (Cao et al., 2017). In diesem Sinne besitzt die Autophagie insbesondere bei moderater Dosis oder kurzer Expositionszeit zellulärer Noxen onkogene Eigenschaften. Dieses protumoröse Potential wird als *damage repair* bei iatrogen induzierten, therapieassoziierten Zellschäden deutlich und steht in dieser Arbeit nach der 6-stündigen Panobinostat-Behandlung der p53-*wildtype*-HepG2-Zellen im Vordergrund. In Präsenz von p53 könnte hierbei der onkogene Selbsterhaltungsmechanismus der HepG2-Zellen greifen. Dieser gleicht unter kurzzeitiger Exposition mit Panobinostat über autophagozytotische Prinzipien Dysbalancen in der metabolischen Homöostase aus und trägt somit einen Teil zur *multi-drug-resistance* in den HCC-Zellen bei (Petibone, Majeed und Casciano, 2016). Nach dem *CUX1-Knockdown* kann eine Mehrexpression sämtlicher Autophagie-Indikatoren und somit eine Hochregulation dieser autophagischen *damage repair* nachgewiesen werden. Die p53-*wildtype*-HepG2-Zellen könnten somit in Absenz von *CUX1* vermehrte Resistenzen gegen iatrogen zugeführten Zellschäden durch gesteigerte autophagische Mechanismen zeigen. Durch die Inhibition dieser tumorösen Überlebensstrategie könnte *CUX1* auch in den p53-*wildtype*-Zellen nach kurzzeitiger Panobinostat-Behandlung als Tumorsuppressoren fungieren. Das antikanzerogene Potential von *CUX1* beruht also in Abhängigkeit des p53-Status einerseits auf der Inhibition einer möglichen *multi drug resistance* in iatrogen behandelten HCC-Zellen (kurzzeitige Panobinostat-Exposition der p53-*wildtype*-HepG2-Zellen) und andererseits auf der Förderung des Autophagiebedingten Zelltodes nach Überschreiten einer Schwellendosis zellulären Schadens (langfristige Panobinostat-Exposition p53-*wildtype*-HepG2-Zellen und kurzfristige Panobinostat-Exposition p53-defizienter Hep3B-Zellen) (siehe Abb. 37).



**Abb. 37:** Tumorsuppressive Funktionen von *CUX1* in Abhängigkeit des p53-Status bezüglich der Panobinostat-getriggerten Autophagie-Modulation in HCC-Zellen.

Welcher regulatorische Mechanismus nach Panobinostat-Behandlung der HCC-Zellen im Vordergrund steht, muss also stets im Kontext des Maßes oder des Fortschreitens homöostatischer Dysbalancen und dem Expressionsstatus anderer Tumorsuppressorgene, wie *TP53*, interpretiert werden.

### 6.2.2. *CUX1* reguliert die autophagische Proteinexpression

Das tumorsuppressive Potential von *CUX1* spiegelte sich weiterhin in den Western Blot-Untersuchungen der Autophagie-Marker Beclin1 und MAP1LC3B wider. Unter *Knockdown* von *CUX1* konnten signifikante Abweichungen der Proteinexpression dieser beiden zentralen Autophagie-Indikatoren gemessen werden. In der Hep3B-Zellreihe zeigte sich ohne Substanzbehandlung sowie nach Gabe sämtlicher DACis und Thapsigargin eine signifikante Mehrexpression von Beclin1 unter *CUX1-Knockdown* (siehe Abb. 29). Beclin1 gilt als Schlüsselprotein der Vesikelkeimbildung und nimmt als Bestandteil des *class III phosphatidylinositol-3OH-kinase* (PI3K) Komplexes (beinhaltet Vsp34/PI3KC3, Vsp15, Beclin1 und ATG15) eine entscheidende Rolle im *nucleation step* (Nukleierungsprozess/ Keimbildungsschritt) der zuvor bereitgestellten Isolationsmembran ein. Die Formation dieses Proteinkomplexes resultiert in der Elongation der Isolationsmembran und ist Grundlage für die spätere Formation des Autophagosoms (Matsunaga et al., 2010).

In der HepG2-Zelllinie zeigte MAP1LC3B, korrelierend zur Beclin1-Proteinexpression der Hep3B-Zellen unter Behandlung mit den DACis TSA, SAHA und Panobinostat einen erhöhten Proteingehalt unter *CUX1-Knockdown* (siehe Abb. 27). MAP1LC3B ist maßgeblich an dem Reifungsprozess des Autophagosoms beteiligt. Die zwei Enden der vorher bereitgestellten Isolationsmembran werden nach erfolgter Elongation mithilfe von MAP1LC3B fusioniert und bilden so die Formation des Autophagosoms (Suzuki et al., 2001). Da die Autophagie als kataboler Prozess gilt, ist eine Hochregulation autophagischer Proteine wie Beclin1 oder MAP1LC3B als Akkumulation bei funktioneller Beeinträchtigung dieses Prozesses zu verstehen und spiegelt das Unvermögen der Zelle des Recyclings zelleigener Bestandteile wider. Auch in dieser Versuchsanordnung kann der p53-Status der untersuchten Zelllinie unterschiedliche modulatorische Fähigkeiten von *CUX1* bezüglich der Proteinexpression der Autophagie-Indikatoren bedingen. So wurden signifikante Abweichungen des Proteingehaltes von Beclin1 lediglich in den p53-defizienten Hep3B-Zellen nachgewiesen. Wechselwirkungen zwischen p53 und Beclin1 sind bereits bekannt und sollten in diesem Kontext Beachtung finden. So zeigten Liu und Kollegen 2011 eine Interaktion von Beclin1 mit USP10 und USP13, zweier Ubiquitin-spezifischer Peptidasen, welche wiederum die Protein-Deubiquitinierung von p53 bedingen. Inwiefern sich modulierende *feedback*-Mechanismen bei p53-defizienten Zellen auf die *CUX1*-vermittelte Beclin1-Proteinexpression auswirken, ist jedoch noch nicht vollends geklärt und könnte durch *Knockdown*-Versuche an Beclin1 vervollständigt werden.

In den p53-*wildtype*-HepG2-Zellen präsentierte sich nach *CUX1-Knockdown* eine aberrante Proteinexpression für MAP1LC3B nach Behandlung mit den TSA, SAHA und Panobinostat (siehe Abb. 27). Auch an dieser Stelle kann ein Einfluss von p53 auf die *CUX1*-bedingte Modulation der MAP1LC3B-Proteinexpression vermutet werden. Beispielsweise wurde bereits eine Stimulation der Autophagosomen-Formation und somit möglicherweise auch der MAP1LC3B-Expression durch einen *upstream*-Effektor von TP53, nämlich TP53INP2/DOR (*tumor protein p53-inducible nuclear protein 2*), nachgewiesen (You et al., 2019). Der genaue molekulare Mechanismus des Zusammenspiels aus *CUX1*, p53 und MAP1LC3B liegt noch im Dunkeln und könnte zum Beispiel durch Überexpressionsanalysen an *CUX1* in Kombination mit *Knockdown*-Versuchen an MAP1LC3B weiter untersucht werden.

### 6.2.3. CUX1 fördert die Panobinostat-induzierte Biogenese des Autophagosoms

In den Expressionsanalysen erfolgte der Nachweis *CUX1*-vermittelter regulatorischer Fähigkeiten auf den mRNA- und Proteingehalt von MAP1LC3B. Anhand der Fluoreszenzmikroskopie sollte ein möglicher Einfluss von *CUX1* auf die Panobinostat-getriggerte Biogenese des Autophagosoms visualisiert werden. Durch die Verwendung von zwei Vektorplasmiden, dem *eGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) und dem *RFP* (*red fluorescent protein*) sollte eine dynamische Messung des autophagischen Flux während der Formation des Autophagosoms (markiert durch *eGFP*) und der nachfolgenden Fusion zum Autolysosom (markiert durch *RFP*) sichergestellt werden. Auch in dieser Versuchsanordnung zeigten sich Differenzen in der modulatorischen Fähigkeit von *CUX1* zwischen den beiden untersuchten HCC-Zelllinien. In der Hep3B-Zellreihe wurde nach *CUX1-Knockdown* und Panobinostat-Behandlung das grün fluoreszierende Signal vermindert gemessen und lässt Defizite im Frühstadium der Autophagosomen-Reifung vermuten (siehe Abb. 33). Die Fusion der beiden Enden der Elongationsmembran könnte somit Beeinträchtigungen aufweisen. Währenddessen zeigten die HepG2-Zellen insbesondere bezüglich der nachfolgenden Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom zum Autolysosom Einschränkungen – markiert durch eine verminderte rote Fluoreszenz (*RFP*) unter Panobinostat-Behandlung und *CUX1-Knockdown*.

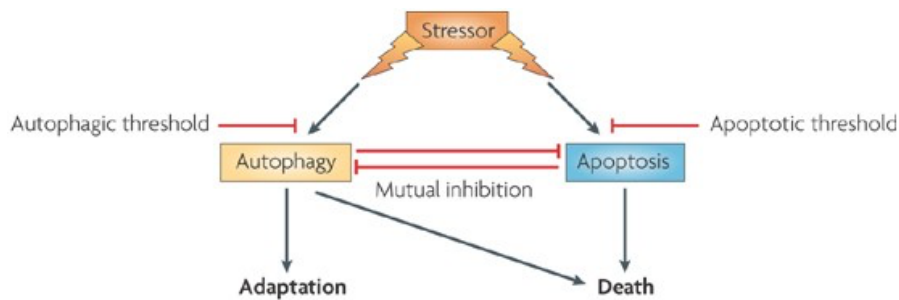
Die Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Daten bringt dennoch Schwierigkeiten in der objektiven Interpretation mit sich. In Kenntnis möglicher Fehlerquellen bei der vorliegenden Mehrfachmarkierung wurde auf Genauigkeit bei der deskriptiven Auswertung geachtet. So gestaltete sich beispielsweise die eindeutige visuelle Abgrenzung der beiden fluoreszierenden Signale nicht immer eindeutig. Die Überlagerung von Fluoreszenzen, in diesem Zusammenhang auch als *crossstalk* bezeichnet, kann hier beispielsweise als Ursache in Frage kommen. Aber auch ohne Eintreten des *crossstalk*-Effekts besteht die Gefahr einer ungenauen Bestimmung des autophagischen Flux durch fehlende quantitative Messmethoden (du Toit, Hofmey, Gniadek und Loos, 2018). Um ein valides Ergebnis zu erhalten und ein frühes Zellsterben im Rahmen der Substanzbehandlung zu vermeiden, musste der Versuchsaufbau und insbesondere die Inkubationsdauer der *eGFP-RFP-MAP1LC3B*-transfizierten Zelllinien mit Thapsigargin und Panobinostat mehrmals verändert und verkürzt werden. Schon nach 6-stündiger Inkubation mit 100 nM Panobinostat konnten fluoreszenzmikroskopisch keine vitalen Zellen nachgewiesen werden, sodass von einer bereits eingetretenen



Zytolyse ausgegangen werden muss. Di Fazio und Kollegen gelang es 2016 anhand der HepG2-/Hep3B-*eGFP-RFP-MAP1LC3B*-transfizierten Zelllinie die Beeinflussung der Autophagosomen-Reifung durch 6-72-stündige Panobinostat-Beimpfung (in einer Konzentration von 100 nM) fluoreszenzmikroskopisch festzuhalten. Eine entsprechend längere Verlaufsbeobachtung zur validen Beurteilung der genauen Kinetik in der Autophagosomen-Reifung und Autolysosomen-Fusion unter *CUX1-Knockdown* wäre auch hier sinnvoll.

#### 6.2.4. *CUX1* als Interakteur zwischen Autophagie und Apoptose?

Die antiapoptotische Aktivität und das somit protumorigene Potential von *CUX1* wurden unter 6.1. diskutiert und durch antiproliferative Effekte in den xCELLigence-Analysen unter *CUX1-Knockdown* belegt. In diesem Zusammenhang werden onkogene Eigenschaften von *CUX1* beschrieben. Gibt es neben einer Proliferationsförderung durch *CUX1* eine andere Möglichkeit, wieso die *CUX1*-defizienten Zellen unter Panobinostat-Behandlung einen rascheren Proliferationsstopp aufweisen als die *CUX1*-kompetenten Zellen? Bei dieser Überlegung steht das tumorsuppressive Potential des Transkriptionsfaktors im Vordergrund. Aus den Expressionsanalysen, den Western Blots und den fluoreszenzmikroskopischen Analysen ließen sich repressive Autophagie-Mechanismen unter *CUX1-Knockdown* nachweisen. Überwiegen die antikanzerogenen Eigenschaften der Autophagie durch die Begünstigung des *autophagic cell death type I* oder *type II*, so wird aus den *Knockdown*-Versuchen das tumorsuppressive Potential von *CUX1* deutlich: die Herunterregulation der *CUX1*-Expression scheint den *autophagic cell death* nach langer DACi-Gabe in den HepG2 und nach kurzer DACi-Gabe in den Hep3B-Zellen zu unterdrücken. Wird der *autophagic cell death* diskutiert, sollten stets die synergistischen und teils entgegengesetzten Wirkprinzipien der Autophagie und der Apoptose beachtet werden. Die Beziehung zwischen Autophagie und Apoptose ist hierbei insofern komplex, als dass die Autophagie einerseits durch Adaption an zelluläre Stressoren den Zelltod vermeiden und so die Apoptose umgehen kann oder andererseits, gegebenenfalls unter erschwerten metabolischen Bedingungen, das Zellsterben fördert (Baehrecke, 2005). Die Autophagie nimmt hierbei die Rolle eines molekularen *gatekeepers* ein: Bei Überschreiten eines bestimmten Schweregrades zellulärer Schädigung mündet die anfängliche Schutzfunktion der Zelle vor zytotoxischen Effekten in der Initiierung alternativer Zelltodmechanismen (Maiuri, Zalckvar, Kimchi und Kroemer, 2007) (siehe Abb. 38).



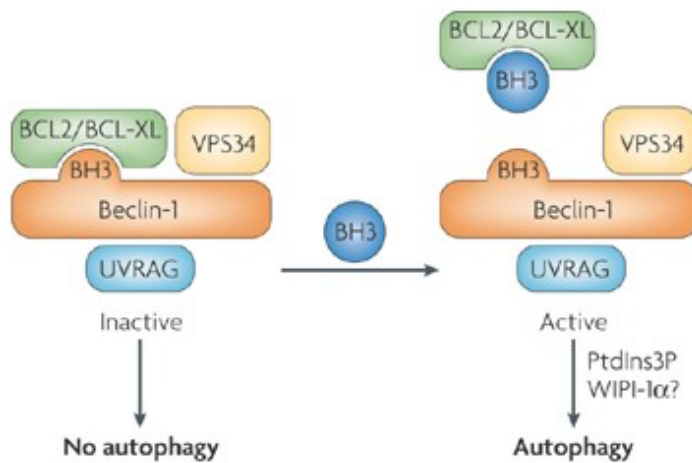
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Abb. 38: Die wechselseitige Beziehung der Apoptose und der Autophagie.** Bei Überschreiten einer bestimmten Schwelle zellulärer Stressoren werden autophagische oder apoptotische Mechanismen induziert, welche sich gegenseitig inhibieren können. Bei Ineffizienz einer Adaption an Nährstoffdeprivation oder anderer Stressstimuli kann auch die Autophagie über alternative Zelltodmechanismen und ausgedehnte autophagische Selbstdegradation im Zelltod münden. (aus Maiuri, Zalckvar, Kimchi und Kroemer, 2007).

Eine inhibitorische Beziehung zwischen Autophagie und Apoptose wird auch in anderen Zelllinien beschrieben. HeLa- oder HCT116-Zellen zeigten zum Beispiel unter Nährstoffdeprivation und anschließender Autophagie-Blockade durch *BECN1*-Inhibition Kennmerkmale der Apoptose wie die Chromatin-Kondensierung, die Induktion der *mitochondria outer membrane polarization* (MOMP) und die Aktivierung von Caspasen (Gonzalez-Polo et al., 2005). Eine Beeinträchtigung der Autophagie durch *CUX1*-*Knockdown* könnte also durch mangelnde Anpassung an vital bedrohliche Umstände in einer Induktion der Apoptose münden und, wie in den hier durchgeführten xCELLigence®-Analysen, zu einem raschen Proliferationsstopp durch einen protrahierten Zelltod führen.

Mögliche Interaktionen von Autophagie und Apoptose lassen sich weiterhin am Beispiel des Proteins Beclin1 veranschaulichen, welches vom Tumorsuppressorgen *BECN1* codiert wird. Beclin1 wurde kürzlich als Mitglied der BH3(*BCL2-homology-3-domain*) - only-Protein-Familie identifiziert. Über die Bindung ihrer BH3-Domäne an den BH3-Rezeptor, welcher in sämtlichen Vertretern der BCL2-Familie vorhanden ist, gelten diese Proteine als Vermittler der mitochondrialen Apoptose. Dies geschieht entweder über die Aktivierung der MOMP (*mitochondrial outer membrane polarization*) durch die proapoptotischen Proteine BAX oder BAD oder über die Inhibition antiapoptotischer Peptide wie BCL2 oder BCL-XL. Je nach ihrer subzellulären Lokalisation können die BH3-only Proteine neben der Apoptose-Induktion auch die Autophagie stimulieren. Die antiapoptotischen Peptide BCL2/BCL-XL bilden hierbei über die BH3-only-Domäne mit Beclin1 einen geschlossenen, inaktiven Komplex. Durch die Bindung anderer BH3-only-Proteine an der BH3-Domäne, wie beispielsweise das proapoptotische Bad, dissoziiert Beclin1 durch kompetitive Hemmung aus dem geschlossenen Komplex. Es liegt nun frei

zur Aktivierung von VPS34 und UVRAG und somit zur Autophagie-Induktion vor (Maiuri, Zalckvar, Kimchi und Kroemer, 2007) (siehe Abb. 39).



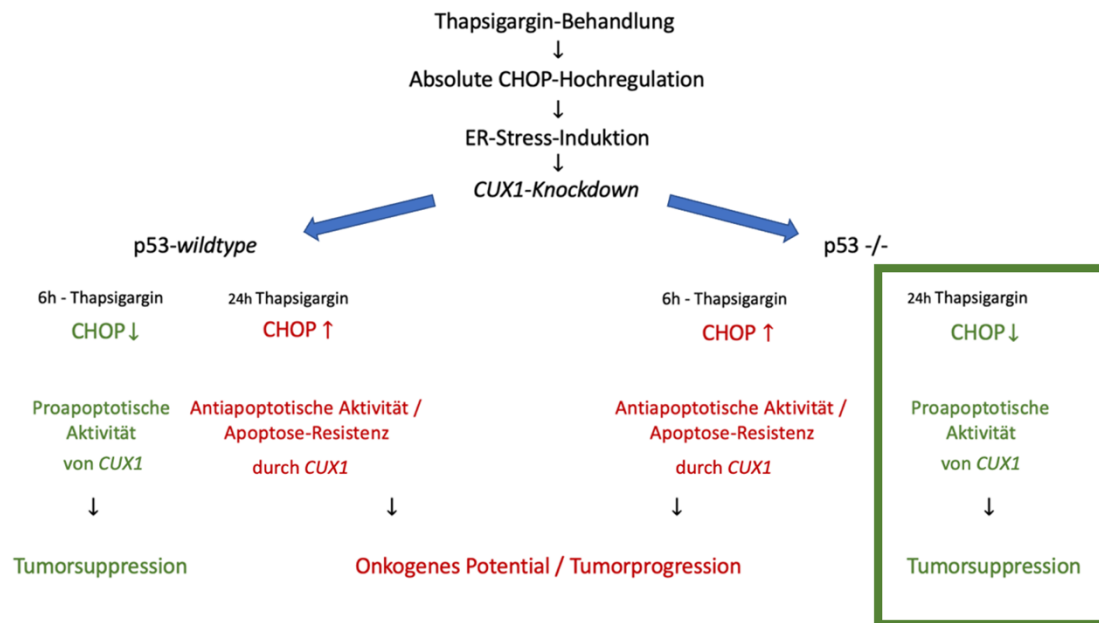
**Abb. 39: BH3-Proteine und deren Auswirkungen auf die BCL2-Beclin1-Interaktion.**

Die antiapoptotischen Proteine BCL2/BCL-XL bilden über die BH3-only-Domäne mit Beclin1 einen geschlossenen, inaktiven Komplex. Durch Bindung weiterer, proapoptotischer kleinmolekularer Strukturen an dieser Domäne wird Beclin1 kompetitiv verdrängt und der Komplex dissoziiert, was zur Aktivierung der VPS34 und UVRAG sowie zur konsekutiven Vesikelmembran-Bildung und Initiierung der Autophagie führt (Maiuri, Zalckvar, Kimchi und Kroemer, 2007).

Das regulatorische Potential von *CUX1* auf die *BECN1*-Expression schafft eine mögliche Assoziation zu diesen molekularen Mechanismen. Auf Proteinebene resultierte *der CUX1-Knockdown* in den p53-mutierten Hep3B-Zellen in einer Akkumulation von Beclin1. Dies ist am ehesten als fehlender Verbrauch des Proteins aufgrund einer Herunterregulation der Autophagie unter *CUX1*-Defizienz zu werten (siehe Abb. 29). Unter Beachtung der Abbildungen 38 und 39 könnte *CUX1* als Tumorsuppressorgen die wechselseitige Beziehung aus Apoptose und Autophagie im Rahmen der DACi-vermittelten Zellschädigung über die Modulation der Beclin1-Proteinexpression beeinflussen. Wie jedoch aus den oben aufgeführten Beispielen der gegenseitigen Regulation der Autophagie und der Apoptose zu schließen ist, existiert kein deterministisches, starres Schema einer Tumorzelle, nach welchem sie ihr Schicksal anhand entweder des Einen oder des Anderen dieser beiden Prozesse festlegt. Trotz vieler gemeinsamer Initiatoren und gemeinsamer Stressstimuli wie beispielsweise freier Sauerstoffradikale oder einer erhöhten intrazytosolischen Kalziumkonzentration durch Thapsigargin-Behandlung (Zhao et al., 2017) können Autophagie und Apoptose also je nach Schwellendosis dieser Stimuli, je nach der intrazellulärer Lokalisation der an Signalkaskaden beteiligten molekularen Strukturen oder je nach der chronologischen Abfolge verursachter Zellschäden sich gegenseitig unterstützen oder inhibieren (Cao et al., 2017).

### 6.2.5. CUX1 begünstigt die CHOP-induzierte Apoptose-Induktion in p53-defizienten Zellen

Sollte die kanzerogene Zelle bei metabolischen Insuffizienzen trotz Hochregulation der Reparaturmechanismen via der *UPR* oder der *ERAD* die Akkumulation fehlgefalteter Proteine oder der *reactive oxygen species (ROS)* nicht bewältigen, kann die Apoptose über das proapoptotische Protein *CHOP* eingeleitet werden. Das Überführen der Zelle in den programmierten Zelltod kann die initiale maligne Transformation oder die Tumorprogression verhindern. In dieser Arbeit wurden auf mRNA-Ebene regulatorische Effekte von *CUX1* bezüglich der *CHOP*-Expression unter ER-Stress-Induktion mit Thapsigargin nachgewiesen. Die modulatorischen Fähigkeiten von *CUX1* bezüglich der *CHOP*-mRNA-Expression schienen sich hier zwischen den beiden untersuchten HCC-Zellreihen je nach Dauer der Thapsigargin-Applikation grundlegend zu unterscheiden. Während in den HepG2-Zellen die 6-stündige Thapsigargin-Behandlung in einer relativen Minderexpression von *CHOP* unter *CUX1-Knockdown* resultierte (siehe Abb. 25, A), konnte in den Hep3B-Zellen nach 6-stündiger Thapsigargin-Behandlung eine relative Mehrexpression von *CHOP* unter *CUX1-Knockdown* nachgewiesen werden (siehe Abb. 25, B). Anschließend zeigte die 24-stündige Thapsigargin-Behandlung der HepG2-Zellen eine Mehrexpression von *CHOP* in der *CUX1-Knockdown*-Gruppe, während die 24-stündige Thapsigargin-Behandlung der p53-defizienten Hep3B-Zellen eine geringere *CHOP*-Transkript-Expression in Absenz von *CUX1* präsentierte (siehe Abb. 25 A,B). Wie sind diese gegensätzlichen Ergebnisse zu interpretieren? Der in den beiden untersuchten HCC-Zelllinien differente p53-Status kann eine mögliche Begründung darstellen. In den p53-kompetenten HepG2-Zellen könnte *CUX1* bei moderater Dosis zellulärer Noxen die *CHOP*-bedingte Apoptose-Induktion fördern und eine weitere Ausbreitung der Tumorsaat abwenden. Die Daten zur *CHOP*-Expression der HepG2-Zellen nach 24-stündiger Thapsigargin-Exposition suggerieren den Umschlag in antiapoptotische Aktivität von *CUX1* bei langfristiger Akkumulation toxischer Substanzen. In den p53-mutierten Hep3B-Zellen könnte *CUX1* nach kurzfristiger Thapsigargin-Exposition Resistenzen gegenüber der *CHOP*-vermittelten Apoptose-Induktion begünstigen. Auch hier schlägt das regulatorische Potential von *CUX1* nach Überschreiten einer Schwellendosis der Thapsigargin-Behandlung um, sodass *CUX1* in den p53-defizienten Zellen die *CHOP*-vermittelten Apoptose-Induktion nach langer Inkubationsdauer mit Thapsigargin zu begünstigen scheint (siehe Abb. 40).

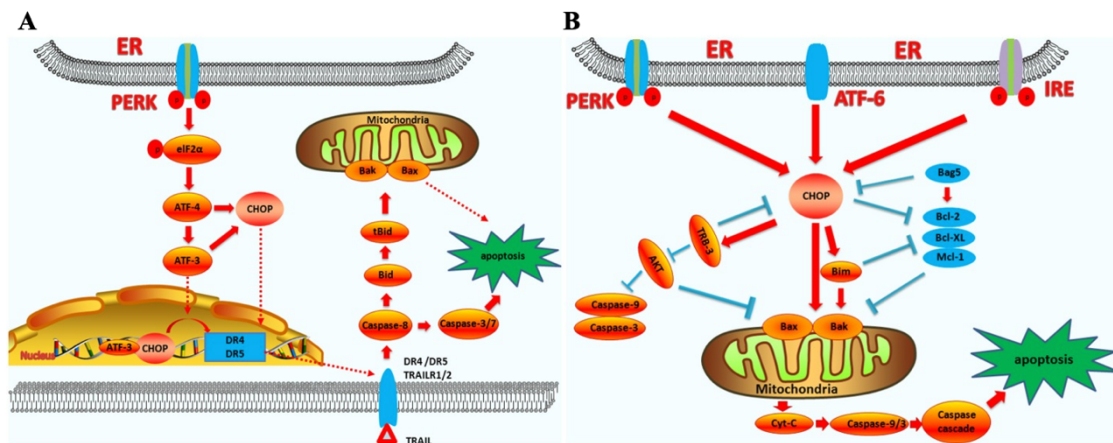


**Abb. 40: Hypothese zur *CUX1*-bedingten Regulation der *CHOP*-mRNA-Expression unter Thapsigargin-Behandlung in Abhängigkeit des p53-Status der untersuchten Zelllinie und der Thapsigargin-Applikationsdauer.** Grün eingerahmt hervorgehoben ist die hier diskutierte Hypothese zur proapoptotischen und somit tumorsuppressiven Aktivität von *CUX1* in p53-defizienten Hep3B-Zellen, vermittelt durch die Herunterregulation von *CHOP* unter *CUX1*-Knockdown und 24-stündiger Thapsigargin-Behandlung

Diese Interpretation der hier gewonnenen Daten lässt einen grundlegenden Einfluss der Dosis zellulärer Noxen und der p53-Kompetenz von tumorösen Zellen vermuten und beleuchtet die facettenreiche Rolle von *CUX1* im Rahmen seiner pro- und antikanzerogenen Eigenschaften. Entgegen der bislang in der Literatur beschriebenen „strikten“ antiapoptotischen Rolle von *CUX1* und der damit einhergehenden Förderung der Apoptoseresistenz, werden hier die modulatorischen Fähigkeiten von *CUX1* auf die *CHOP*-vermittelte Apoptose in einen situativen Kontext gesetzt. *Knockdown*-Versuche zu *CHOP* sollten diese Arbeitshypothese weiter vertiefen.

Antiapoptotisches Potential von *CUX1* wurde u.a. in bisherigen experimentellen Arbeiten unter Behandlung mit TRAIL nachgewiesen (Ripka et al., 2010). Die hier aufgestellte Hypothese zur *CUX1*-vermittelten Regulation der *CHOP*-induzierten Apoptose und das in der Literatur anerkannte onkogene Potential von *CUX1* durch die Apoptoseresistenz muss nicht zwangsläufig widersprüchlich sein. Der Einfluss von *CUX1* auf den programmierten Zelltod könnte in Abhängigkeit der vorhergehenden Signalkaskade zur Apoptose-Induktion variieren. Beispielsweise beruht die vermehrte Expression proapoptotischer Proteine in Absenz von *CUX1* unter TRAIL-Behandlung auf der Bindung von TRAIL an die transmembranären Rezeptoren *death receptor 4* (DR4) und *death receptor 5* (DR5). Die an diesen *death receptors* vorhandene cytoplasmatische

„Todesdomäne“ ermöglicht die Aktivierung einer Caspase-Kaskade durch autokatalytischer Proteolyse und die Initiierung eines eigenständigen Apoptose-Signals (Hofmann, 2019). Eine Assoziation von TRAIL mit dem extrinsischen Weg der Apoptose-Induktion ist an dieser Stelle gegeben. Im Gegensatz hierzu kann *CHOP* sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen *pathway* die Apoptose begünstigen (siehe Abb. 41).



**Abb. 41 (A) Die Rolle von CHOP in der extrinsischen Apoptoseinduktion.** CHOP triggert die extrinsische Apoptose-Induktion durch die Hochregulation von *DR4* und *DR5*. *PERK* kann die *ATF4*-Expression induzieren, was in einer Hochregulation von *CHOP* und *ATF3* resultiert. *CHOP* und *ATF3* binden ihrerseits an die Genpromotoren von *DR4* und *DR5* und bewirken so eine Hochregulation dieser Gene. *TRAIL* sowie *DR4* und *DR5* regulieren die Caspase-8-vermittelte Kaskade, die wiederum die Caspase 3/7 aktiviert und die Apoptose fördert. Weiterhin wird durch die Caspase-8 Bid zu tBid transformiert. tBid reguliert anschließend den *BAX-BAK*-vermittelten mitochondrialen Apoptose-Weg. **(B) Die Rolle von CHOP in der intrinsischen Apoptose-Induktion.** *CHOP* triggert den intrinsischen Apoptose-Weg über Inhibition von *BCL-2*, *BCL-XL*, *MCL-1* und die Hochregulation von *BIM*, was wiederum die *BAX-BAK*-vermittelte Permeabilisationssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran reguliert. Das führt zu Freisetzung von Cytochrom C und der Einleitung der Caspase-Kaskade. Weiterhin vermag *CHOP* die Apoptose durch die Mehrexpression von *TRB-3* Genen zu regulieren. Hierdurch wird die Akt-Phosphorylierung und die Aktivität von Caspase 3/9 inhibiert (aus Hu, Tian, Ding und Yu, 2019).

Tumorsuppressives Potential von *CUX1* könnte in p53-mutierten tumorösen Zellen durch Modulation der *CHOP*-induzierte Apoptose relevant werden. Nach langfristiger Thapsigargin-Exposition könnte in Anwesenheit von *CUX1* eine konsekutive Hochregulation der *CHOP*-induzierten Apoptose die weitere Tumorprogression durch das Absterben der HCC-Zellen verhindern. Überexpressionsversuche zu *CUX1* in Kombination mit Apoptose-Arrays könnten dazu beitragen, diese Arbeitshypothese zu untermauern.

Interessant ist dieser Gesichtspunkt bei der Frage nach Beseitigung von Apoptoseresistenzen in der medikamentösen HCC-Therapie. Diese werden bei der Sorafenib-Therapie, einem im metastasierten Stadium angewandten Multikinase-Inhibitor und Apoptose-Induktor, relevant. Durch Hypoxie-induzierte Signaltransduktionswege oder die epithelial-mesenchymale Transition nehmen

Apoptoseresistenzen gegen Sorafenib zu und machen diese Therapieform des HCCs unwirksam (Zhu, Zheng, Wang und Chen, 2017). *CUX1* könnte in Anbetracht der häufigen p53-Mutationen multipler Tumorentitäten die *CHOP*-vermittelte Apoptose-Induktion über die Thapsigargin-Behandlung begünstigen und Sorafenib-assoziierte Apoptose-Resistenzen umgehen.

### 6.3. Die Rolle von *CUX1*- Ausblick und Realisierbarkeit therapeutischer Optionen im HCC

Das wissenschaftliche Streben, bestimmte Genabschnitte, entsprechende Transkriptionsfaktoren sowie deren Genprodukte als die Tumorentwicklung fördernd oder hemmend zu charakterisieren, ist angesichts unserer teils noch limitierten therapeutischen Möglichkeiten im Großen und Ganzen täglich präsent. Die kontroverse Diskussion um die Rolle von *CUX1* in kanzerogenen Zellen sollte im Hinblick auf die bereits erläuterten Punkte also stets kontextabhängig betrachtet werden. Galt der Transkriptionsfaktor bisher in einem Großteil der Literatur und insbesondere in Zusammenhang mit der nachgewiesenen Apoptoseresistenz vornehmlich als Onkogen (Ripka et al., 2010), zeigten sich in dieser Arbeit durch eingeschränkte Autophagie-Mechanismen bezüglich des *autophagic cell death* unter *CUX1*-Defizienz auch tumorsuppressive Eigenschaften des Transkriptionsfaktors. Eine mögliche Förderung der *CHOP*-induzierten Apoptose unterstreicht weitere antitumoröse Eigenschaften von *CUX1*. Onkogenes Potential von *CUX1* wurde bezüglich des Einflusses auf ER-Stress-Mechanismen und die Chemoresistenzbildung kanzerogener Zellen deutlich. Das regulatorische Potential von *CUX1* sollte in theoretische Überlegungen bezüglich der Interaktion von ER-Stress, Autophagie und Apoptose zur Entwicklung antitumoröser Therapiestrategien miteinfließen. Sorafenib ist derzeit in fernmetastasierten Stadien des HCCs zur Erstlinientherapie zugelassen und entfaltet sein Wirkungspotential über die Apoptoseinduktion durch Inhibition multipler Kinasen. Hieraus wird die notwendige Betrachtung des komplexen *crossstalks* aus ER-Stress, Autophagie und Apoptose im HCC deutlich. *CUX1* könnte als multifunktionaler Transkriptionsfaktor an der Schnittstelle dieser Prozesse stehen. Über die Regulation der ER-Stress-vermittelten Apoptose-Induktion könnten bisher bekannte Resistenzen gegen die Sorafenib-induzierte Apoptose umgangen und potentere medikamentöse Therapiestrategien entwickelt werden.

Natürlich basieren diese Zukunftsperspektiven noch auf größtenteils theoretischen Überlegungen und müssen durch weitere Experimente *in vivo* und auch *in vitro*, zum Beispiel mittels Überexpressionsversuchen von *CUX1* oder Mausmodellen, erweitert

werden. Nachfolgende Arbeiten zur Charakterisierung von *CUX1* könnten sich dabei intensiver mit Wechselwirkungen einzelner Isoformen des Transkriptionsfaktors und den DACis, mit der proteolytischen Prozessierung einzelner Unterformen von *CUX1* und deren abweichender DNA-Bindungskapazität oder auch mit der *CUX1*-Expression von HCC-Zellen unter einer kombinierten Substanzbehandlung auseinandersetzen. Gerade letztgenannter Punkt hat in klinischen Studien an HCC-Patienten mit Fernmetastasierung in Form einer simultanen Behandlung mit Sorafenib und dem Pan-DACi Panobinostat bereits Einzug in die Klinik gefunden (Gahr et al., 2012). Die Tatsache, dass man durch diese Behandlung eine partielle Remission von 5 Monaten erreichen konnte, lässt auf versprechende Ergebnisse künftiger Studien in Kombination mit dem vielseitigen Transkriptionsfaktor *CUX1* hoffen.



## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Das hepatozelluläre Karzinom rangiert hinsichtlich der malignomassoziierten Mortalität auf Platz zwei weltweit und zeigt im Rahmen ernüchternder systemischer Therapieoptionen bei fortgeschrittenem Krebsleiden die Grenzen bislang erforschter Therapieansätze auf. Ein zunächst eher symptomarmer Krankheitsverlauf und eine somit mehrheitliche Diagnosestellung in fortgeschrittenen Krankheitsstadien erschweren eine kurative Behandlung. In lokoregionär fortgeschrittenen oder fernmetastasierten Krankheitsstadien des HCCs der Child-Pugh-Klassifikation A gelten die Multikinaseinhibitoren Sorafenib (Nexavar®) und Lenvatinib (Lenvima®) als bislang einzige von der *European Medicines Agency* (EMA) zugelassene, medikamentöse Therapieoptionen der Erstlinientherapie. Eine Überlegenheit anderer molekularer, therapeutischer Ansätze gegenüber diesen Multikinaseinhibitoren konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Induktion epigenetischer Modifikation in Krebszellen stellt währenddessen einen neuen Ansatz bezüglich der Systemtherapie des metastasierten HCCs dar. Die Applikation von Histondeacetylaseinhibitoren (DACis) führt zu vermehrten Stressreaktionen des Endoplasmatischen Retikulums und einer konsekutiven Induktion autophagischer Prozesse, welche die HCC-Zellen in einen protrahierten Zelltod senden. Basierend auf dieser Grundlage wurde in dieser experimentellen Arbeit der evolutionär hoch konservierte und bislang unzureichend erforschte Transkriptionsfaktor *CUX1* auf sein etwaiges regulatorisches Potential hinsichtlich der ER-Stress- und Autophagie-Induktion nach DACi-Behandlung von HCC-Zellen untersucht. Bisher werden *CUX1* in maligne transformierten Zellen regulatorische Fähigkeiten bezüglich der Zellzyklusprogression, Zellmotilität und Zellinvasion sowie Induktion einer Apoptoseresistenz attestiert. Es galt als Ziel dieser Arbeit, das onkogene aber auch das tumorsuppressive Potential von *CUX1* in HCC-Zellen unter Substanzbehandlung zu analysieren. Anhand zweier humaner HCC-Zelllinien mit p53-*wildtyp* Status (HepG2) und p53-defizientem Status (Hep3B) wurde über die Transfektion mit einer siRNA für *CUX1* ein *Knockdown* erzielt. Nach 6- und nach 24-stündiger Applikation der DACis TSA, SAHA und Panobinostat sowie des Kalziumkanal-Inhibitors Thapsigargin wurde in Gegenüberstellung der *CUX1-Knockdown*-Gruppe und einer Kontrollgruppe die Expression der ER-Stress-Indikatoren *BIP*, *CHOP*, *ATF4* und *AT6* sowie die Expression der Autophagie-Marker *BECN1*, *MAP1LC3B*, *TFEB* und *UVRAG* durch qRT-PCR-Versuche und Western Blot-Analysen untersucht. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Effekts eines *CUX1-Knockdowns* auf die Autophagosomen-Reifung

sowie die Echtzeit-Analyse der Zellproliferation unter *CUX1*-Defizienz nach ER-Stress- und Autophagie-Induktion sollten die Experimente vervollständigen. Die Ergebnisse der genannten Versuche lassen regulatorisches Potential von *CUX1* bezüglich Thapsigarin- und DACi-getriggertem ER-Stress und Autophagie-Mechanismen vermuten. Onkogene Eigenschaften des Transkriptionsfaktors werden einerseits durch eine defizitäre Expression der ER-Stress-Marker *BIP*, *ATF4* und *ATF6* unter *CUX1*-*Knockdown* und kurzzeitiger Substanzbehandlung deutlich. *CUX1* könnte die Bildung von Chemo- oder Strahlenresistenzen durch die Stimulation des ER-Stresses als Initiator zelleigener Reparaturmechanismen begünstigen. Andererseits wird onkogenes Potential von *CUX1* in den Zellproliferationsmessungen deutlich. Die Hep3B-Zelllinie wies hierbei unter *CUX1*-*Knockdown* und Panobinostat-Behandlung eine signifikante Abnahme der Zellproliferation auf. Die Förderung von Apoptose-Resistenzen durch *CUX1* könnte diesen Proliferations-Stopp in den xCELLigence®-Analysen begründen. Tumorsuppressive Eigenschaften von *CUX1* wurden durch den Nachweis defizitärer Autophagie-Mechanismen und einer möglichen Verzögerung des *autophagic cell death* als antikanzergener Mechanismus deutlich. In Abhängigkeit des p53-Status der untersuchten Zelllinie sowie der Inkubationsdauer mit den DACis konnte dabei eine herunterregulierte Transkript-Expression der Autophagie-Marker nachgewiesen werden. Die Akkumulation der autophagischen Proteine MAP1LC3B und Beclin1 in den Western Blot Analysen sowie Defizite der Autophagosomen-Formation und der Autolysosomen-Bildung in der Fluoreszenzmikroskopie stützten die These defizitärer Autophagie-Mechanismen unter *CUX1*-*Knockdown*. Bezüglich jüngster Erkenntnisse zur *CUX1*-vermittelten Resistenzentwicklung gegen die Apoptose erscheint die Zusammenschau des programmierten Zelltodes und des Autophagie-bedingten Zelltodes sinnvoll. Durch ein komplexes Netzwerk an Signalkaskaden können sich Apoptose und Autophagie gegenseitig verstärken, hemmen oder wechselseitig bedingen, sodass *CUX1* als multifunktionaler Transkriptionsfaktor und regulatorischer Mediator agieren könnte. Dabei soll die mehrheitliche Auffassung von *CUX1* als Onkogen keineswegs negiert werden, sondern vielmehr das Potential einer simultanen tumorsuppressiven Wirkung im Autophagie-bezogenen Therapieregime im HCC betont werden. Bereits initiierte klinische Studien zur Kombinationstherapie aus Sorafenib und Panobinostat im metastasierten Krankheitsstadium des HCCs bilden eine Grundlage für klinische Forschungsansätze unter Einbezug von *CUX1*.

## 8 ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is the second most worldwide cancer-related death. Due to the absence of symptoms in the early stage of the disease and the late diagnosis, a curative treatment seems to be mostly ineffective. The multi-kinase-inhibitors Sorafenib (Nexavar®) and Lenvatinib (Lenvima®) are the only evidence-based drugs with a first-line use approved by the *European Medicines Agency (EMA)* for systemic treatment of advanced local or even metastatic stage of hepatocellular carcinoma within the Child-Pugh-Score A. Despite many attempts of the current investigations to identify molecular-targeting drugs beside sorafenib, the results have been unsatisfying so far. Hopefully, the induction of epigenetic modifications could represent a promising approach for the development of a new systemic therapy. The application of deacetylase inhibitors (DACis) results in an increase of endoplasmic-reticulum stress and autophagic process, which trigger liver cancer cell death. The study here proposed focused on the role exerted by the highly evolutionary conserved transcription factor *CUX1* in DACi-mediated endoplasmic reticulum stress/autophagic mechanisms in HCC cells. *CUX1* is responsible for promoting cell motility, invasion and cell cycle progression as well as for causing cell death resistance. Clinical studies associate a high level of *CUX1* transcript in several cancers. The aim of this study was to elucidate the oncogenic and/or tumor suppressive potential of *CUX1* in HCC cells. *CUX1* transient knockdown was performed in two human HCC-cell lines Hep3B (p53-deficient) and HepG2 (p53-wildtype). After a 6 hour treatment (RT-qPCR) and 24 hour treatment (RT-qPCR and Western Blot) with Thapsigargin and the DACis Trichostatin A (TSA), SAHA and Panobinostat the expression of autophagic markers was detected by RT-qPCR and Western Blot. Fluorescent microscopy was performed to visualize the autophagosome maturation after autophagy induction via Panobinostat-treatment in the absence of *CUX1*. The effect of transient *CUX1*-knockdown on cell proliferation was detected by real time cell viability assays. *CUX1* transient knockdown reduced the efficacy of short-term (6h) administration of especially thapsigargin and panobinostat in promoting the expression of ER-stress-markers. These findings could reveal oncogenic potential of *CUX1*-regulation regarding ER-Stress-mediated drug resistance. The real time cell viability assay pointed out an altered cell proliferation with the most significant effect in the absence of *CUX1* and the administration of panobinostat in Hep3B cells. Regarding a possible resistance to apoptosis, *CUX1* exerts an oncogenic function. Decreased mRNA-expression of autophagic markers after *CUX1*-Knockdown suggests impaired autophagic

mechanism, depending on the time of administration with the DACis and the p53-levels of the examined cell lines. The measurement of increased Beclin1 and MAP1LC3B protein levels in the Western Blot analysis contributed to a reduced efficacy of the compounds to perform autophagy after *CUX1*-silencing. Autophagy, as a catabolic process, leads to a massive protein degradation. An increase of the protein levels within a reduction of the mRNA expression of autophagic markers therefore supports an impairment of autophagy in the absence of *CUX1*. A reduced maturation of the autophagosome vesicles (Hep3B-cells) as well as impaired autophagosome-lysosome-fusion (HepG2-cells) was observed under fluorescence microscopy in the absence of *CUX1* after the administration of panobinostat. These findings suggest a tumor suppressive potential of *CUX1* on HCC cells performing autophagic cell death after DACi treatment. Regarding to current studies implicating the contribution of *CUX1* to resistance towards apoptosis highlights a possible interaction between autophagic-related cell death and apoptosis. *CUX1* could either inhibit, promote or necessitate apoptosis and autophagy. While showing its pro-tumorigenic potential in HCC, *CUX1* simultaneously promotes autophagy-related cell death and therefore exerts anti tumorigenic role too. Clinical studies analysing the effect of a combined treatment of sorafenib and panobinostat in metastatic stage of HCC and might provide a base for further clinical investigations regarding the influence of *CUX1*.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Afify SM, Sanchez Calle A, Hassan G. (2020). A novel model of liver cancer stem cells developed from induced pluripotent stem cells. *Br J Cancer* (2020). doi: 10.1038/s41416-020-0792-z
- Alavian SM, Ande SR, Coombs KM, Yeganeh B, Davoodpour D, Hashemi M, Los M, Ghavami S. (2011). Virus-triggered autophagy in viral hepatitis — possible novel strategies for drug development, *J. Viral Hepat*; 18 821–830 doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01530.x
- Alcain FJ, Villalba, JM (2009). Sirtuin activators. *Expert Opin. Ther. Pat.* 19, 403–414. doi: 10.1517/13543770902762893.
- Allgaier HP (2002). Das hepatocelluläre Carcinom. *UNI-MED Verlag AG*, p 32. Bremen.
- Ashworth RE, Wu J. (2014). Mammalian target of rapamycin inhibition in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*; 6: 776-782. doi: 10.4254/wjh.v6.i11.776
- Bachrecke EH. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Rev. Mol. Cell Biol*; 6, 505–510. doi: 10.1038/nrm1666
- Bangaru S, Marrero JA, Singal AG. (2020). Review article: new therapeutic interventions for advanced hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 51(1):78-89. doi: 10.1111/apt.15573
- Bareford MD, Hamed HA, Tang Y, Cruickshanks N, Burow ME, Fisher PB, Moran RG, Nephew KP, Grant S, Dent P. (2011). Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy-dependent mechanism in cancer cells. *Autophagy*; 7: 1261-1262. doi: 10.4161/auto.7.10.17029
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*; 2:326-32; doi: 10.1038/35014014
- Bhasin M, Reinherz EL, Reche PA. (2006). Recognition and classification of histones using support vector machine. *J Comput Biol*; 13: 102-112. doi: 10.1089/cmb.2006.13.102
- Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. (2003). Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22 5093–5107. doi: 10.1038/sj.onc.1206557
- Breuhahn K. (2010). Molekulare Progressionsmechanismen der humanen Hepatocarcinogenese. *Copyright Shaker Verlag*. Heidelberg.
- Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc JF, Laurent C, Hajji Y, Azoulay D, Bioulac-Sage P, Nault JC, Zucman-Rossi J. (2017). Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumor classifications. *J Hepatol*; 67(4):727-738. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.014

- Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017 Jun 15;169(7):1327-1341.e23. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.046
- Cao Z, Zhang H, Cai X, Fang W, Chai D, Wen Y, Chen H, Chu F, Zhang Y. (2017). Luteolin Promotes Cell Apoptosis by Inducing Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*; 43: 1803-1812. doi: 10.1159/000484066
- Carlsson SR, Simonsen A. (2015). Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci*. 128, 193–205. doi: 10.1242/jcs.141036
- Cedar H, Bergman Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*; 10:295-304. doi:10.1038/nrg2540
- Chen J, Lu S, Zhang Y, Xu L, Chen J, Wang J, Chen M, Zhang R, Zhou Z. (2018). Sorafenib Monotherapy Versus Sorafenib Combined with Regional Therapies for Hepatocellular Carcinoma Patients with Pulmonary Oligometastases: A Propensity Score-matched Analysis. *J Cancer*; 9: 1745-1753. doi: 10.7150/jca.24568
- Chen JC, Chuang HY, Liao YJ, Hsu FT, Chen YC, Wang WH, Hwang JJ. (2019). Enhanced cytotoxicity of human hepatocellular carcinoma cells following pretreatment with sorafenib combined with trichostatin A. *Oncol Lett*; Jan;17(1):638-645. doi: 10.3892/ol.2018.9582
- Chen N, Karantza V. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cancer, *Cancer Biol Ther* 11 157. doi: 10.4161/cbt.11.2.14622
- Comporti M, Arezzini B, Signorini C, Sgherri C, Monaco B, Gardi C. (2005). F-2-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? *Lab. Invest.* 85 1381–1391.
- Couri T, Pillai A. (2019). Goals and targets for personalized therapy for hcc. *Hepatology International*, p1-13. doi: 10.1007/s12072-018-9919-1
- Cui J, Gong Z, Shen HM. (2013). The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta*. Aug;1836(1):15-26. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.02.003.
- Curtin NJ. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Rev. Cancer* 12, 801–817. doi: 10.1038/nrc3399.
- Decaens T, Luciani A, Itti E, Hulin A, Roudot-Thoraval F, Laurent A, Zafrani ES, Mallat A, Duvoux C. (2012). Phase II study of sirolimus in treatment-naïve patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*; 44: 610-616. doi: 10.1016/j.dld.2012.02.005
- Daher S, Massarwa M, Benson AA, Khoury T. (2018). Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: an updated comprehensive review. *J Clin Transl Hepatol*; 6(1):69-78. doi: 10.14218/JCTH.2017.00031

- Dawson MA, Kouzarides T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*; 150(1): 12-27 doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
- Di Fazio P, Matrood S. (2018). Targeting autophagy in liver cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*; 3:39. doi: 10.21037/tgh.2018.06.09
- Di Fazio P, Schneider-Stock R, Neureiter D, Okamoto K, Wissniowski T, Gahr S, Quint K, Meissnitzer M, Alinger B, Montalbano R, Sass G, Hohenstein B, Hahn EG, Ocker. (2010). The pan-deacetylase inhibitor panobinostat inhibits growth of hepatocellular carcinoma models by alternative pathways of apoptosis. *M. Cell Oncol*; Jan 1;32(4):285-300. doi: 10.3233/CLO-2010-0511.
- Di Fazio P, Waldegger P, Jabari S, Lingelbach S, Montalbano R, Ocker M, Slater EP, Bartsch DK, Illig R, Neureiter D, Wissniowski TT. (2016). Autophagy-related cell death by pan-histone deacetylase inhibition in liver cancer. *Oncotarget*; 7:28998-9010. doi: 10.18632/oncotarget.8585.
- De Oliveira S, Houseright RA, Graves AL, Golenberg N, Korte BG, Miskolci V, Huttenlocher A. (2018). Metformin modulates innate immune-mediated inflammation and early progression of NAFLD-associated hepatocellular carcinoma in zebrafish. *J Hepatol*; 17 pii: S0168-8278(18)32622-9. doi: 10.1016/j.jhep.2018.11.034
- De Vos J, Thykjaer T, Tarte K, Ensslen M, Raynaud P, Requirand G, Pellet F, Pantesco V, Rème T, Jourdan M, Rossi JF, Ørntoft T, Klein B. (2002). Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene* 21, 6848–6857. doi: 10.1038/sj.onc.1205868
- Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 14046–14051. doi: 10.1073/pnas.0907344106
- Du Toit A, Hofmeyr JS, Gniadek TJ, Loos B. (2018). Measuring autophagosome flux. *Autophagy*, 14(6), 1060–1071. doi:10.1080/15548627.2018.1469590
- Eckschlager T, Plch J, Striborova M, Hrabeta J. (2017). Histone Deacetylase inhibitors as anticancer drugs; *Int J Mol Sci.* 18(7) pii: e1414. doi: 10.3390/ijms18071414.
- El-Aarag SA, Mahmoud A, Hashem MH, Abd Elkader H, Hemeida AE, ElHefnawi M. (2017). In silico identification of potential key regulatory factors in smoking-induced lung cancer. *BMC medical genomics*; 10(1), 40. doi:10.1186/s12920-017-0284-z
- Esteves AR, Palma AM, Gomes R, Santos D, Silva DF, Cardoso SM. (2018). Acetylation as a major determinant to microtubule-dependent autophagy: Relevance to Alzheimer's and Parkinson disease pathology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*; Dec 17. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.11.014
- Facciorusso A, Licinio R, Muscatiello N, Di Leo A, Barone M. (2015). Transarterial chemoembolization: evidences from the literature and applications in hepatocellular carcinoma patients. *World J Hepatol*; 7(16):2009–2019. doi: 10.4254/wjh.v7.i16.2009

- Fahrner R, Dondorf F, Ardelt M, Dittmar Y, Settmacher U, Rauchfuß F. (2015). Liver transplantation for hepatocellular carcinoma- factors influencing outcome and disease-free survival. *World J Gastroenterol*; 21(42): 12071-12082. doi: 10.3748/wjg.v21.i42.12071
- Farazi PA, DePinho RA. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment, *Nat. Rev. Cancer* 6; 674–687. doi: 10.1038/nrc1934
- Faria SC, Szklaruk J, Kaseb AO, Hassabo HM, Elsayes KM. (2014). TNM/Okuda/Barcelona/UNOS/CLIP international multidisciplinary classification of hepatocellular carcinoma: concepts, perspectives and radiologic implications. *Abdom Imaging*; 39(5):1070-1087. doi: 10.1007/s00261-014-0130-0
- Fass E, Shvets E, Degani I. (2006). Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem*; 281:36303-16. doi: 10.1074/jbc.M607031200
- Fornier A, Reig ME, de Lope CR. (2010). Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Semin. Liver Dis*; 30 (01): 61-74. doi:10.1055/s-0030-1247133
- Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM, Wek RC. (2016). Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Molecular biology of the cell*; 27(9), 1536–1551. doi:10.1091/mbc.E16-01-0039
- Gahr S, Wissniowski T, Zopf S, Strobel D, Pustowka A, Ocker M. (2012). Combination of the Deacetylase Inhibitor Panobinostat and the Multi-Kinase Inhibitor Sorafenib for the Treatment of Metastatic Hepatocellular Carcinoma – Review of the Underlying Molecular Mechanisms and First Case Report. *Journal of Cancer*; 3: 158-165. doi: 10.7150/jca.4211
- Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. (2017). Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology and carcinogenesis. *J Carcinogenesis*; 16(1). doi: 10.4103/jcar.JCar\_9\_16
- Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S, Eskelinen EL, Saftig P, Kroemer G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J. Cell Sci*; 118, 3091–3102 (2005). doi: 10.1242/jcs.02447
- Goulet B, Baruch A, Moon NS, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A, Bogoy M, Nepveu A. (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol. Cell*. 14, 207–219. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00209-6



- Goulet B, Truscott M, Nepveu A. (2006). A novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L. *Biol. Chem*; 387, 1285–1293. doi: 10.1515/BC.2006.159
- Gozuacik D, Kimchi A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 12;23(16):2891-906. doi: 10.1038/sj.onc.1207521
- Guan CT, Zhao H, Li XQ, Qu CX, Cai JQ, Wei WW, Qiao YL. (2017). Basic characteristics and survival analysis of patients with hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*; 39(3):231-235. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2017.03.015
- Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W. (2004). Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci*; 117:2687-97. Doi: 10.1242/jcs.01114
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet*; (10) 32–42. doi: 10.1038/nrg2485
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*; 495, 389–393. doi: 10.1038/nature11910
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol*; 11, 1433–1437. doi: 10.1038/ncb1991
- Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, Zhu AX, Murad MH, Marrero JA. (2018). AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*;67(1): 358-380. doi: 10.1002/hep.29086
- Hoffmann, E. (2019). CUX1 führt in Hepatozellulären Karzinomzellen zu einer TRAIL-Resistenz und verhindert die Apoptoseinduktion. Marburg
- Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. (2019). The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol*. 4;9:3083. doi: 10.3389/fimmu.2018.03083
- Huang S, Houghton PJ. (2002). Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. *Curr Opin Investig Drugs*; 3: 295-304. PMID: 12020063
- Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*; 151:1256-69. Doi: 10.1016/j.cell.2012.11.001.
- Jack J, Dorsett D, Delotto Y, Liu S. (1991). Expression of the cut locus in the *Drosophila* wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer. *Development* 113, 735–747.

- Jian Z, Lai WJ, Qiang LI, Jin J, Xiao BD, Wan G, Wang YG. (2017). Inhibition of Hepatocellular Stem Cells by Oncolytic Virus Targeting Wnt Signaling Pathway. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan*; 44: 326-337. Doi: 10.16476/j.pibb.2016.0380
- Jones PA, Baylin SB. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128:683–692. Doi: 10.1016/j.cell.2007.01.029
- Johnson PJ, Qin S, Park JW, Poon RT, Raoul JL, Philip PA, Hsu CH, Hu TH, Heo J, Xu J, LU L, Chao Y, Boucher E, Han KH, Paik SW, Robles-Avina J, Kudo M, Yan L, Sobhonslidsuk A, Komoy D, Decaens T, Tak WY, Jeng LB, Liu D, Ezzeddine R, Walter I, Cheng AL. (2013). Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol*; 31(28):3517–3524. Doi: 10.1200/JCO.2012.48.4410
- Joppien S, Maier SL, Wendling DS. (2011). Basics – Experimentelle Doktorarbeit. *Elsevier* (1). 54 -61
- Kaizuka T, et al. (2016). An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol Cell*. 17;64(4):835-849. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.037.
- Kametaka S, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y. (1996). Structural and functional analyses of APG5 a gene involved in autophagy in yeast. *Gene*; 178 139–143.
- Kania, E., Pająk, B., & Orzechowski, A. (2015). Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *BioMed research international*. doi: 10.1155/2015/352794
- Ke PY. (2019). Diverse Functions of Autophagy in Liver Physiology and Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci*; 20(2), 300. doi: 10.3390/ijms20020300
- Kedinger V, Sansregret L, Harada R, Vadnais C, Cadieux C, Fathers K, Park M, Nepveu A. (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. *J. Biol. Chem.* 284, 27701–27711. Doi: 10.1074/jbc.M109.031849
- Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T, Gisslinger B, Schalling M, Bagiński K, Olcaydu D, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Jäger R, Pieri L, Guglielmelli P, Iacobucci I, Martinelli G, Cazzola M, Vannucchi AM, Gisslinger H, Kralovics R. (2011). Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood* 118, 167–176. Doi: 10.1182/blood-2011-01-331678
- Klionsky DJ, Emr SD. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, *Science*; 290 1717–1721. Doi: 10.1126/science.290.5497.1717
- Knudson AG Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Apr;68(4):820-3. Doi: 10.1073/pnas.68.4.820

- Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. (2011). MicroRNA122 is a key regulator of  $\alpha$ -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* Jun 7;2:338. doi: 10.1038/ncomms1345
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 169: 425-434 doi: 10.1083/jcb.200412022
- Kong Y, Tannous P, Lu G, Berenji K, Rothemel BA, Olson EN, Hill JA. (2006). Suppression of Class I and II Histone Deacetylases Blunts Pressure-Overload Cardiac Hypertrophy. *Circulation.* Jun 6; 113(22): 2579–2588. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.625467.
- Kretsovali A, Hadjimichael C, Charmpilas N. (2012). Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Stem Cells Int.*; 2012, 184154. doi: 10.1155/2012/184154.
- Kühnemuth B, Mühlberg L, Schipper M, Griesmann H, Neesse A, Milosevic N, Wissniowski T, Buchholz M, Gress TM, Michl P. (2015). CUX1 modulates polarization of tumor-associated macrophages by antagonizing NF- $\kappa$ B signaling. *Oncogene.* Jan 8;34(2):177-87. doi: 10.1038/onc.2013.530
- Levine B, Klionsky DJ. (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004;6:463-77. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00099-1
- Levine B, Klionsky DJ. (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114: 201-205 doi: 10.1073/pnas.1619876114
- Levine B, Kroemer G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132:27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Li JH, Liu YH, Wang ZK, Liu KC, Wang YH, Liu JX, Ding HP, Yuan ZH. (2011). Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J. Virol.* 85; 6319–6333. doi: 10.1128/JVI.02627-10
- Lindholm D, Korhonen L, Eriksson O, Koks S. (2017) Recent insights into the role of unfolded protein response in ER stress in health and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 48. doi: 10.3389/fcell.2017.00048.
- Ling S, Song L, Fan N, Feng T, Liu L, Yang X, Wang M, Li Y, Tian Y, Zhao F, Liu Y, Huang Q, Hou Z, Xu F, Shi L, Li Y. (2017). Combination of metformin and sorafenib suppresses proliferation and induces autophagy of hepatocellular carcinoma via targeting the mTOR pathway. *Int J Oncol.* 50: 297-309. doi: 10.3892/ijo.2016.3799

- Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, Cai Y, Norberg HV, Zhang T, Furuya T, Jin M, Zhu Z, Wang H, Yu J, Li Y, Hao Y, Choi A, Ke H, Ma D, Yuan J. (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*. Sep 30;147(1):223-34. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.037
- Liu KC, Lin BS, Zhao M, Wang KY, Lan XP. (2013). Cutl1: A potential target for cancer therapy. *Cellular Signaling*; (25): 349-354. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.10.008.
- Llovet JM, Brú C, Bruix J. (1999). Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin. Liver Dis*;19 (03): 329-38. doi:10.1055/s-2007-1007122
- Llovet JM, et al. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*; 359(4):378–390. doi: 10.1056/NEJMoa0708857
- Lu YS, Hsu C, Li CC, Kuo SH, Yeh KH, Yang CH, Hsu CW, Wu CY, Cheng AL. (2004). Phase III study of combination doxorubicin, interferon-alpha and high dose tamoxifen treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Anticancer drugs*; 15: 439-452 PMID: 15143923
- Luo B, Lee AS. (2013). The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. vol. 32, no. 7, pp. 805–818, 2013. doi: 10.1038/onc.2012.130
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal*; 26(10), 2527–2539. doi:10.1038/sj.emboj.7601689
- Maiuri M, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 8 741–752 doi: 10.1038/nrm2239
- Martin DN, Baehrecke EH. (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development*; 131, 275–284. doi: 10.1242/dev.00933
- McNerney ME, Brown CD, Wang X, Bartom ET, Karmakar S, Bandlamudi C, Yu S, Ko J, Sandall BP, Stricker T, Anastasi J, Grossman RL, Cunningham JM, Le Beau MM, White KP. (2013). CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood*. Feb 7;121(6):975-83. doi: 10.1182/blood-2012-04-426965
- Meng J, Liu K, Shao Y, Feng X, Ji Z, Chang B, Wang Y, Xu L, Yang G. (2020). ID1 confers cancer cell chemoresistance through STAT3/ATF6-mediated induction of autophagy. *Cell Death Dis*. Feb 20;11(2):137. doi: 10.1038/s41419-020-2327-1
- Meng M, Wang H, Zeng X, Zhao L, Yuan Z, Wang P, Hao X. (2015). Stereotactic body radiation therapy: a novel treatment modality for inoperable hepatocellular carcinoma. *Drug Discov Ther*; 9(5):372–379. doi: 10.5582/ddt.2015.01056.

- Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulosom R, D'Arrigo C, Ryer K, Menke A, Gress T, Downward J. (2005). CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 7, 521–532. doi: 10.1016/j.ccr.2005.05.018
- Miller CP, Singh MM, Rivera-Del Valle N, Manton CA, Chandra J. (2011). Therapeutic strategies to enhance the anticancer efficacy of histone deacetylase inhibitors. *J Biomed Biotechnol*; 514261. doi: 10.1155/2011/514261
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol*; 22, 132–139. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.004
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*; 27 107–132. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- Mrakovec M, Bohner L, Hanisch M, Fröhlich LF. (2018). Epigenetic targeting of autophagy via HDAC inhibition in tumor cells: role of p53. *Int J Mol*; 19(12) doi: 10.3390/ijms19123952.
- Mulier S, Mulier P, Ni Y, Miao Y, Dupas B, Marchal G, De Wever I, Michel L. (2002). Complications of radiofrequency coagulation of liver tumors. *Br J Surg*; 89(10):1206-1222. doi: 10.1046/j.1365-2168.2002.02168
- Nakamura S, Yoshimori T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J. Cell Sci*; 130, 1209–1216. doi: 10.1242/jcs.196352
- Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H. (2008). Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells*; 13:1211-8. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x
- Ocker M, Schneider-Stock R. (2007). Histone deacetylase inhibitors: Signalling towards p21cip1/waf1. *Int. J.Biochem. Cell Biol*; 39, 1367–1374. doi: 10.1016/j.biocel.2007.03.001
- Park MA, Reinehr R, Haussinger D, Voelkel-Johnson C, Ogretmen B, Yacoub A, Grant S, Dent P. (2010). Sorafenib activates CD95 and promotes autophagy and cell death via Src family kinases in gastrointestinal tumor cells. *Mol. Cancer Ther*; 9, 2220–2231. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0274.
- Patt YZ, Hassan MM, Aguayo A, Nooka AK, Lozano RD, Curley SA, Vauthey JN, Ellis LM, Schnirer II, Wolff RA, Charnsangevej, Brown TD. (2004). Oral capecitabine for the treatment of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and gallbladder carcinoma. *Cancer*; 101(3):578–586. doi: 10.1002/cncr.20368
- Peng YF, Shi YH, Shen YH, Ding ZB, Ke AW, Zhou J, Qiu SJ, Fan J. (2013). Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy. *PLoS One*; 8: e74407. doi: 10.1371/journal.pone.0074407

- Pereira CV, Lebedzinska M, Wiechowski MR, Oliviera PJ. (2012). Regulation and protection of mitochondrial physiology by sirtuins. *Mitochondrion*; 12(1): 66-76. doi: 10.1016/j.mito.2011.07.003
- Petersen CL, Laniel MA. (2004). Histones and histone modification. *Curr Biol*; 14(14): 546-551 doi: 10.1016/j.cub.2004.07.007
- Petibone DM, Majeed W, Casciano DA. (2016). Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity. A Review. *Journal of Applied Toxicology*. doi: 10.1002/jat.3393
- Pompili M, Francica G, Ponziani FR, Iezzi R, Avolio AW. (2013). Bridging and downstaging treatments for hepatocellular carcinoma in patients on the waiting list for liver transplantation. *World J Gastroenterol*; 19(43):7515–7530. doi: 10.3748/wjg.v19.i43.7515
- Poole M, Sorribes I, Jain HV. (2018). Modeling hepatitis C virus protein and p53 interactions in hepatocytes: Implications for carcinogenesis. *Math Biosci*; 306:186-196. doi: 10.1016/j.mbs.2018.10.003.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin1 autophagy gene. *J Clin Invest*; 112: 1809-1820 doi: 10.1172/JCI20039
- Qiu DM, Wang GL, Chen L, Xu YY, He S, Cao XL, Qin J, Zhou JM, Zhang YX, E Q. (2014). The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance. *BMC Cancer*; 14: 327 doi: 10.1186/1471-2407-14-327]
- Quint K, Agaimy A, Di Fazio P, Montalbano R, Steindorf C, Jung R. (2011). Clinical significance of histone deacetylases 1, 2, 3, and 7: HDAC2 is an independent predictor of survival in HCC. *Virchows Arch* 459: 129-139. doi: 10.1007/s00428-011-1103-0
- Ramdzan ZM, Ginjala V, Pinder JB, Chung D, Donovan CM, Kaur S, Leduy L, Dellaire G, Ganesan S, Nepveu A. (2017). The DNA repair function of CUX1 contributes to radioresistance. *Oncotarget*; Mar 21;8(12):19021-19038. doi: 10.18632/oncotarget.14875.
- Ramdzan ZM, Nepveu A. (2014). CUX1, a haploinsufficient tumour suppressor gene, is overexpressed in advanced cancers. *Nat Rev Cancer*. Oct;14(10):673-82. doi: 10.1038/nrc3805
- Ramdzan ZM, Vadnais C, Pal R, Vandal G, Cadieux C, Leduy L, Davoudi S, Hulea L, Yao L, Karnezis AN, Paquet M, Dankort D, Nepveu A. (2014). RAS transformation requires CUX1-dependent repair of oxidative DNA damage. *PLoS Biol*. 12 doi: 10.1371/journal.pbio.1001807
- Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ. (2005). Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*; 1, 101–109. doi: 10.4161/auto.1.2.1840

- Rehermann B, Nascimbeni M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5; 215–229. doi: 10.1038/nri1573
- Ripka S, Neesse A, Riedel J, Bug E, Aigner A, Poulson R, Fulda S, Neoptolemos J, Greenhalf W, Barth P, Gress TM, Michl P. (2010). CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Gut*; Aug;59(8):1101-10. doi: 10.1136/gut.2009.189720.
- Roller C, Maddalo D. (2013). The Molecular Chaperone GRP78/BiP in the Development of Chemoresistance: Mechanism and Possible Treatment. *Frontiers in pharmacology*, 4, 10. doi: 10.3389/fphar.2013.00010
- Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 709–730. doi: 10.1038/nrd3802.
- Sacco R, Conte C, Tumino E, Parisi G, Marceglia S, Metrangolo S, Eggenhoffner R, Bresci G, Cabibbo G, Giacomelli L. (2016). Transarterial radioembolization for hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*; 3:25–29. doi: 10.2147/JHC.S50359
- Salem R, Lewandowski RJ. (2013). Chemoembolization and radioembolization for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 11(6):1–16. doi: 10.1016/j.cgh.2012.12.039
- Sansregret L, Goulet B, Harada R, Wilson B, Leduy L, Bertoglio J, Nepveu A. (2006). The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase. *Mol Cell Biol.* Mar;26(6):2441-55. doi: 10.1128/MCB.26.6.2441-2455.2006
- Sansregret L, Vadnais C, Livingstone J, Kwiatkowski N, Awan A, Cadieux C, Leduy L, Hallett MT, Nepveu A. (2011). Cut homeobox 1 causes chromosomal instability by promoting bipolar division after cytokinesis failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*; Feb 1;108(5):1949-54. Doi: 10.1073/pnas.1008403108.
- Santamaría PG, Mazón MJ, Eraso P, Portillo F. (2019). UPR: An Upstream Signal to EMT Induction in Cancer. *J Clin Med.* 2019;8(5):624; doi:10.3390/jcm8050624
- Saxton RA, Sabatini DM. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*; 169, 361–371. Doi: 10.1016/j.cell.2017.03.035.
- Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Meiller C, Shinde J, Soysouvanh F, Calatayud AL, Pinyol R, Pelletier L, Balabaud C, Laurent A, Blanc JF, Mazzaferro V, Calvo F, Villanueva A, Nault JC, Bioulac-Sage P, Stratton MR, Llovet KM, Zucman-Rossi J. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*; 47(5):505–511. Doi: 10.1038/ng.3252

- Seranova E, Connolly KJ, Zatyka M. (2017). Dysregulation of autophagy as a common mechanism in lysosomal storage diseases. *Essays Biochem*; 61:733-49. Doi: 10.1042/EBC20170055.
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Ballabio A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*; 332(6036), 1429–1433. Doi:10.1126/science.1204592
- Shah RR. (2019). Safety and Tolerability of Histon Deacetylase (HDAC) Inhibitors in Oncology. *Drug Saf*; doi: 10.1007/s40264-018-0773-9
- Shahbazian MD, Grunstein M. (2007). Functions of sitespecific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*; 76:75-1008. Doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114
- Shaheen M, Allen C, Nickoloff JA, Hromas R. (2011). Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* 117, 6074–6082. doi: 10.1182/blood-2011-01-313734
- Sharifi M, Mowers E, Drake L, Collier C, Hong C, Zamora M, Mui S, Macleod K. (2016). Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Rep*; 15: 1660-1672 doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.065
- Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O. (2003). Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in Human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis, *J. Hepatol.* 38 (5) (2003) 605–614. doi: 10.1016/s0168- 8278(03)00029-1
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458 1131–1135. Doi: 10.1038/nature07976.
- Singleton DC, Harris AL. (2012). Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. Dec;16(12):1189-202. doi: 10.1517/14728222.2012.728207
- Sir D, Tian Y, Chen WL, Ann DK, Yen TS, Ou JH. (2010). The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 4383–4388. Doi: 10.1073/pnas.0911373107
- Sun T, Liu H, Ming L. (2017). Multiple Roles of Autophagy in the Sorafenib Resistance of Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*; 44: 716-727. Doi: 10.1159/000485285
- Suraweera A, O’Byrne JK, Richard DJ. (2018). Combination therapy with Histone Deacetylase (HDACi) Inhibitors fort he treatment of Cancer: Achieving the full therapeutic potential of HDACi. *Front Onco*; 8: 92. Doi: 10.3389/fonc.2018.00092



- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*; 20, 5971–5981. Doi: 10.1093/emboj/20.21.5971
- Tai WT, Shiau CW, Chen HL, Liu CY, Lin CS, Cheng AL, Chen PJ, Chen KF. (2013). Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis*; 4: e485. doi: 10.1038/cddis.2013.18
- Tang H, Da L, Mao Y, Li Y, Li D, Xu Z, Li F, Wang Y, Tiollais P, Li T, Zhao M. (2009). Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology*; 49 60–71. doi: 10.1002/hep.22581.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*; 25: 795-800 doi: 10.1101/gad.2016211
- Tian Y, Kuo CF, Sir D, Wang L, Govindarajan S, Petrovic LM, Ou JH. (2015). Autophagy inhibits oxidative stress and tumor suppressors to exert its dual effect on hepatocarcinogenesis. *Cell Death Differ*; 22: 1025-1034 doi: 10.1038/cdd.2014.201
- Trisciuglio D, Di Martile M, Del Bufalo D. (2018). Emerging role of histone acetyltransferase in stem cells and cancer. *Stem Cells Int*; 2018: 8908751 doi: 10.1155/2018/8908751
- Truscott M, Harada R, Vadnais C, Robert F, Nepveu A. (2008). p110 CUX1 cooperates with E2F transcription factors in the transcriptional activation of cell cycle-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 28 3127–3138. doi: 10.1128/MCB.02089-07
- Truscott M, Raynal L, Wang Y, Bérubé 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. *J Biol Chem.* Nov 26;279(48):49787-94. doi: 10.1074/jbc.M409484200
- Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, Mizushima N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science*; 354:1036-41. doi: 10.1126/science.aaf6136
- Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K, Ge X, Taki T, Sugita K, Ishii E, Hanada R, Ohki M, Aburatani H, Hayashi Y. (2003). Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res.* 63, 4882–4887.
- Ueno T, Komatsu M. (2017). Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* Mar;14(3):170-184. doi: 10.1038/nrgastro.2016.185.

- US Food and Drug Administration. (2018). FDA approves lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma. *Silver Spring*: US Department of Health and Human Services
- US Food and Drug Administration Home Page, Center for Drug Evaluation and Research. (2017). Approved drugs - FDA grants accelerated approval to nivolumab for HCC previously treated with sorafenib. *Center for Drug Evaluation and Research*. <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm577166.htm>
- US Food and Drug Administration Home Page, Center for Drug Evaluation and Research. (2017). Approved Drugs - Regorafenib. *Center for Drug Evaluation and Research*, <https://www.fda.gov/Drugs/Informationondrugs/ApprovedDrugs/ucm555548.htm>
- Vadnais C, Davoudi S, Afshin M, Harada R, Dudley R, Clermont PL, Drobetsky E, Nepveu A. (2012). CUX1 transcription factor is required for optimal ATM/ATR-mediated responses to DNA damage. *Nucleic Acids Res*; 40, 4483–4495. doi: 10.1093/nar/gks041
- Vanden Heuvel GB, Brantley JG, Alcalay NI, Sharma M, Kemeny G, Warolin J, Ledford AW, Pinson DM. (2005). Hepatomegaly in transgenic mice expressing the homeobox gene Cux-1. *Mol Carcinog*. May;43(1):18-30. doi: 10.1002/mc.20091.
- Wächter S, Damanakis AI, Elxnat M M, Roth S, Wunderlich A, Verburg FA, Fellinger SA, Bartsch DK, Di Fazio P. (2018). Epigenetic Modifications in Thyroid Cancer Cells Restore NIS and Radio-Iodine Uptake and Promote Cell Death. *J Clin Med*. Mar 21;7(4). pii: E61. doi: 10.3390/jcm7040061.
- Wagner JM, Hackanson B, Lübbert M, Jung M. (2010). Histon deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenet* 1; :117–136. doi: 10.1007/s13148-010-0012-4
- Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ. (2006). Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci*. 97; 683–688. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00235.x
- Wang J, Lee J, Liem D, Ping P. (2017). HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. *Gene*; 618, 14–23. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.005
- Wang M, Kaufman RJ. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*. 14(9): 581±597. doi:10.1038/nrc3800
- Wang YJ, Singh R, Xiang YQ, Czaja MJ. (2010). Macroautophagy and chaperonemediated autophagy are required for hepatocyte resistance to oxidant stress. *Hepatology*; 52 266–277. doi: 10.1002/hep.2364
- Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. (2011). Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes, *Annu. Rev. Biochem.* 80 125–156. doi: 10.1146/annurev-biochem-052709-094552.

- White E. (2016). Autophagy and p53. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Apr 1;6(4):a026120. doi: 10.1101/cshperspect.a026120.
- Woan KV, Lienlaf M, Perez-Villaroel P, Lee C, Cheng F, Knox T, Woods DM, Barrios K, Powers J, Sahakian E. (2015). Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. *Mol. Oncol*; 9, 1447–1457 doi: 10.1016/j.molonc.2015.04.002
- Wong CC, Martincorena I, Rust AG, Rashid M, Alifrangis C, Alexandrov LB, Tiffen JC, Kober C, Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium, Green AR, Massie CE, Nangalia J, Lempidaki S, Döhner H, Döhner K, Bray SJ, McDermott U, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Adams DJ. (2014). Inactivating CUX1 mutations promote tumorigenesis. *Nat Genet*; Jan; 46(1). doi: 10.1038/ng.2846
- Yang Z, Klionsky DJ. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Autophagy Infect. Immun.* 1–32. doi: 10.1007/978-3-642-00302-8\_1.
- Yen WL, Shintani T, Nair U, Cao Y, Richardson BC, Li Z, Hughson FM, Baba M, Klionsky DJ. (2010). The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J. Cell Biol*; 188, 101–114. doi: 10.1083/jcb.200904075.
- Yeon JE, Califano S, Xu J, Wands JR, De la Monte SM. (2003). Potential role of PTEN phosphatase in ethanol-impaired survival signaling in the liver. *Hepatology* 38 703–714. doi: 10.1053/jhep.2003.50368
- You Z, Xu Y, Wan W, Zhou L, Li J, Zhou T, Shi Y, Liu W. (2019). TP53INP2 contributes to autophagosome formation by promoting LC3-ATG7 interaction. *Autophagy*. Aug;15(8):1309-1321. doi: 10.1080/15548627.2019.1580510
- Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4952–4957. doi: 10.1073/pnas.0511288103
- Yu L, Xie R, Tian T, Zheng L, Tang L, Cai S, Ma Z, Yang T, Han B, Yang Q. (2019). Suberoylanilide hydroxamic acid upregulates histone acetylation and activates endoplasmic reticulum stress to induce apoptosis in HepG2 liver cancer cells. *Oncol Lett.* Oct;18(4):3537-3544. doi: 10.3892/ol.2019.10705
- Zaanan A, Williet N, Hebbar M, Dabakuyo TS, Fartoux L, Mansourbakht T, Dubreuil O, Rosmorduc O, Cattan S, Bonnetain F, Boige V, Taieb J. (2013). Gemcitabine plus oxaliplatin in advanced hepatocellular carcinoma: a large multicenter AGEO study. *J Hepatol*; 58(1):81–88. doi: 10.1016/j.jhep.2012.09.006.
- Zeng WR, Watson P, Lin J, Jothy S, Lidereau R, Park M, Nepveu A. (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. *Oncogene* 18, 2015–2021.

- Zhang J, Zhong Q. (2014). Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell. Mol. Life Sci.*; 3885–3901. doi: 10.1007/s00018-014-1656-6
- Zhang Y. (2015). Detection of epigenetic aberrations in the development of hepatocellular carcinoma. *Methods in Molecular Biology*. 1238, 709-731. doi: 10.1007/978-1-4939-1804\_37
- Zhao YG, Zhang H. (2018). Formation and maturation of autophagosomes in higher eukaryotes: A social network. *Curr. Opin. Cell Biol*; 53, 29–36. doi: 10.1016/j.ceb.2018.04.003
- Zhu AX, Rosmorduc O, Evans TR, Ross PJ, Santoro A, Carrilho FJ, Bruix J, Qin S, Thuluvath PJ, Llovet JM, Leberre MA, Jensen M, Meinhardt G, Kang YK. (2015). SEARCH: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sorafenib plus erlotinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*; 33(6):559–566. doi: 10.1200/JCO.2013.53.7746.
- Zhu AX, Park JO, Ryoo BY, Yen CJ, Poon R, Pastorelli D, Blanc JF, Chung HC, Baron AD, Pfiffer TE, Okusaka T, Kubackova K, Trojan J, Sastre J, Chau I, Chang SC, Abada PB, Yang L, Schwartz JD, Kudo M. (2015). Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib (REACH): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*; 16(7):859–870. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00050-9
- Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*; 5, 455–463. doi: 10.1016/S1535-6108(04)00114-X
- Zhu YJ, Zheng B, Wang HY, Chen L. (2017). New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta pharmacologica Sinica*, 38(5), 614–622. doi:org/10.1038/aps.2017.5
- Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. (2015). Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 149(5): 1226-1239. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.061
- Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G, Grausenburger R, Schweifer N, Chiocca S, Decker T. (2006). Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol. Cell Biol*; 26, 7913–7928. doi: 10.1128/MCB.01220-06

## 10 ANHANG









## VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER\*INNEN

Die nachfolgende Auflistung beinhaltet meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer der Philipps-Universität Marburg. Ich möchte an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

### Vorklinischer Studienabschnitt:

Adamkiewicz, Bauer, Bette, Bonaterra, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Grundmann, Hildebrandt, Kinscherf, Koolmann, Lill, Löffler, Luers, Milani, Mueller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Patrascan, Preisig-Müller, Rost, Schratt, Schütz, Schwarz, Steiniger, Stiewe, Thieme, Weihe, Westermann, Wrocklage

### Klinischer Studienabschnitt:

Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Best, Bien, Burchert, Czubayko, Damanakis, Dettmeyer, Donner-Banzhoff, Duda, Fendrich, Fritz, Geks, Görg, Gress, Grimm, Hertl, Hofmann, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kill, Kirschbaum, Klose, Köhler, König, Kruse, Kühnert, Lechler, Librizzi, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Metzelder, Moll, Mossdorf, Mueller, Mutters, Nenadić, Neubauer, Nimsky, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Renz, Richter, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schu, Schüttler, Seifert, Seipelt, Sekundo, Sommer, Tackenberg, Timmermann, Vogelmeier, Wagner, Wilhelm, Wissniowski, Wulf

## DANKSAGUNG

Mein Dank gebührt unserer Arbeitsgemeinschaft FDL, den Freunden der Leber.