

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie  
Direktor: Prof. Dr. Thomas M. Gress  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



## **Die Rolle von CUX1 bei Hypoxie im hepatozellulären Karzinom**

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

Sophie Anna Blümel aus Freiburg im Breisgau  
Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
20.12.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr PD Dr. Till Wisniowski

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Thomas Worzfeld

*Für meine Eltern*

*Für Christian und Martha*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung und Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Das hepatozelluläre Karzinom .....</b>	<b>10</b>
2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie.....	10
2.1.2. Therapieoptionen.....	12
<b>2.2. Hypoxie im hepatozellulären Karzinom.....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Faktoren der Tumorphogenese.....	14
2.2.2. Bedeutung von Hypoxie in der Tumorphogenese .....	14
2.2.3. HIF-1 $\alpha$ als zentraler Mediator von Hypoxie im hepatozellulären Karzinom .....	15
2.2.4. Die HIF-1 $\alpha$ gesteuerte Hypoxieantwort der Zelle .....	16
<b>2.3. CUX1 wirkt als Transkriptionsfaktor auf eine         Vielzahl von Zellfunktionen .....</b>	<b>18</b>
2.3.1. CUX1: Struktur und Funktion .....	18
<b>2.3.2. 2.3.2 CUX1 hat eine widersprüchliche Rolle in der Tumorgenese.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Fragestellung .....</b>	<b>23</b>
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Material .....</b>	<b>24</b>
4.1.1. Geräte .....	24
4.1.2. Verbrauchsmaterial.....	26
4.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Medien.....	27
4.1.4. Puffer und Lösungen .....	29
4.1.5. siRNAs und Plasmid .....	29
4.1.6. Primer .....	30
4.1.7. Antikörper .....	31
4.1.8. Zelllinien .....	31
4.1.9. Kits .....	32
4.1.10. Software .....	33

<b>4.2.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>34</b>
4.2.1.	Zellkultur.....	34
4.2.2.	Transfektion.....	35
4.2.3.	Hypoxieinduktion mit CoCl <sub>2</sub> .....	36
4.2.4.	Hypoxieinduktion in der Hypoxiekammer.....	37
4.2.5.	RNA-Isolierung.....	37
4.2.6.	cDNA-Synthese.....	37
4.2.7.	Quantitative Echtzeit PCR.....	38
4.2.8.	Proteinisolierung.....	40
4.2.9.	Photometrische bestimmung der Proteinkonzentration.....	40
4.2.10.	Western Blot.....	40
4.2.11.	Zellstress Array.....	42
4.2.12.	Luciferase Assay.....	43
<b>4.2.13.</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1.</b>	<b>Transienter knock-down von CUX1 RNA in Hep3B und HepG2 Zelllinien wird nach Transfektion mit spezifischen siRNS beobachtet</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2.</b>	<b>Hypoxieinduktion mit CoCl<sub>2</sub> und Inkubation bei 0,5% Sauerstoff führen zu stärker veränderter Zellmorphologie nach knock-down von CUX1</b> .....	<b>51</b>
<b>5.3.</b>	<b>Hypoxieinduktion zeigt keinen Effekt auf CUX1 auf Proteinebene.</b>	<b>54</b>
<b>5.4.</b>	<b>CUX1 scheint einen Effekt auf HIF-1<math>\alpha</math> abhängige Faktoren der Hypoxieantwort auszuüben, ohne HIF-1<math>\alpha</math> auf mRNA Ebene direkt zu regulieren</b> .....	<b>57</b>
5.4.1.	Hypoxie zeigt keinen Einfluss auf die Modulation von CUX1.....	57
5.4.2.	CUX1 hat keinen Effekt auf die Expression des zentralen Hypoxiemodulators HIF-1 $\alpha$ , scheint jedoch dessen Gegenspieler FIH in HepG2 zu beeinflussen.....	59
5.4.3.	Zielgene von HIF-1 $\alpha$ werden CUX1 anhängig reguliert.....	62
5.4.4.	CUX1 zeigt unter Hypoxie eine Modulation des Zellzyklusarrest über die Cyclin-abhängige Kinasen Inhibitoren p21 und p27.....	66

5.5.	CUX1 ist am Erhalt der Zellstressreaktion beteiligt.....	69
5.6.	CUX1 kontrolliert die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 .....	72
6.	Diskussion.....	74
6.1.	Zu den verwendeten Methoden und Aussagekraft der Ergebnisse	74
6.2.	CUX1 führt über FIH-1 Repression zur Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$ abhängigen Hypoxieantwort der Zelle .....	76
6.3.	Der HIF-1 $\alpha$ Transduktionsweg ist in ein komplexes Regulierungsmuster eingebunden.....	77
6.4.	CUX1 verhindert Zellzyklusblockade in hepatozellulärem Karzinom p53 unabhängig durch Modulation der HIF-1 $\alpha$ Aktivität.....	78
6.5.	Unterschiede der p53 Wildtyp exprimierende Zelllinie HepG2 zur p53 negativen Hep3B der Hypoxieantwort .....	80
6.6.	CUX1 wirkt im hepatozellulären Karzinom als Onkogen durch Aufrechterhalten der Hypoxieantwort.....	81
6.7.	Ausblick.....	83
7.	Literaturverzeichnis .....	85
8.	Anhang .....	101
9.	Abbildungsverzeichnis .....	107
10.	Tabellenverzeichnis .....	108
11.	Abkürzungen .....	109
12.	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	112
13.	Danksagung .....	113

## 1. Zusammenfassung und Abstract

### 1.1. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom ist durch ein hypoxisches Milieu gekennzeichnet. Die Adaptationsvorgänge der Tumorzellen an Hypoxie, vermittelt über den zentralen Mediator HIF-1 $\alpha$ , sind gekennzeichnet durch gesteigerte Angiogenese, Anpassung des Stoffwechsels und Zellproliferation.

Der Transkriptionsfaktor CUX1 (CUTL1), Teil der Homöodomain Genfamilie, ist vielfältig in Vorgänge der Zellproliferation und –differenzierung eingebunden. In Tumorzellen wurde CUX1 mit vermehrter Invasion, Migration und Apoptoseresistenz in Verbindung gebracht, wobei seine genaue Rolle in der Tumorentstehung umstritten ist. Im hepatozellulären Karzinom ist CUX1 mit Erhöhung des Tumormarkers AFP assoziiert.

Ziel der Arbeit ist die Darstellung des Zusammenhangs zwischen CUX1 und den Anpassungsvorgängen von hepatozellulären Karzinomzellen an Hypoxie. Hierzu wurde versucht, die Expression von CUX1 mittels siRNA in HepG2 und Hep3B Zellen herunterzuregulieren. Ein Knock-down Effekt konnte auf RNA-Ebene mehrfach beobachtet, jedoch nicht endgültig mit statistischer Signifikanz und eindeutig im Western Blot bestätigt werden.

Hypoxie wurde in den Zellen mittels Behandlung mit 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> oder Inkubation mit 0,5% Sauerstoff induziert. CUX1, Hypoxiemarker und Zellstressfaktoren wurden mittels q-RT-PCR, Western Blot und einem Antikörper Array bestimmt. Zur Bestimmung des Einflusses von CUX1 auf die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 $\alpha$  erfolgte eine Analyse mittels Luciferase Reporter Vektor im Luciferase Assay. Hier korrelierte die gemessene Lichtintensität der HIF-1 $\alpha$ -Bindungssequenz HRE als Reporter mit der HIF1 $\alpha$  Aktivität, welche in Zellen mit und ohne CUX1 Herunterregulierung verglichen wurde.

Während kein direkter Einfluss von CUX1 auf die Expression von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie gezeigt werden konnte, konnten in der q-RT-PCR Analyse dessen Zielgene GLUT1 und VEGFA nach Herunterregulierung von CUX1 in ihrer Expression vermindert beobachtet werden. Der HIF-1 $\alpha$  Gegenspieler FIH-1 zeigte sich nach Herunterregulierung von CUX1 in HepG2 erhöht. Im Luciferase Assay zeigte CUX1 dann einen signifikanten Effekt auf die Transkription von HIF-1 $\alpha$ . Nach Transfektion mit Cux1-siRNA wurde zudem eine erhöhte Expression der Inhibitoren Cyklin-abhängiger Kinasen p21 (CDKNA1) und p27 (CDKNA2) beobachtet. Insgesamt scheint eine Verminderung von CUX1 zu einer Reduzierung der Zellstressreaktion der Zelllinien zu führen sowie zur Erhöhung der Vulnerabilität gegenüber hypoxischem Stress, besonders in der p53 negativen Hep3B Zelllinie.

Es lässt sich vermuten, dass CUX1 im hepatozellulären Karzinom für den Erhalt der Hypoxieantwort eine wichtige Rolle spielt. Dies geschieht möglicherweise über Aufrechterhalten der Transkriptionsfunktion von HIF-1 $\alpha$ , am ehesten durch Regulierung dessen Inhibitors FIH-1. Gleichzeitig scheint CUX1 in Hypoxie einem Zellzyklusarrest entgegenzuwirken und könnte so die Zellproliferation trotz des umgebenden toxischen Milieus fördern. Die Beobachtungen unterstützen die in der Literatur beschriebene onkogene Funktion von CUX1, bedürfen jedoch einer weiteren experimentellen Reproduktion und statistischer Bestätigung der beobachteten Effekte.

## **1.2. Abstract**

Hepatocellular carcinoma is characterised by a hypoxic environment. Adaption of tumor cells to hypoxia is mediated by the central transcription factor HIF-1 $\alpha$  that leads to angiogenesis as well as adaptation of metabolism and cellular proliferation.

The transcription factor CUX1 (CUTL1) is part of the homeodomain gene family. It is responsible for mechanisms of cellular proliferation and differentiation. In tumor cells, it has been linked to increased invasion, migration and resistance to apoptosis. Its exact role in tumorigenesis is not completely clarified yet.

The aim of this study is the demonstration of a link between CUX1 and the adaptation mechanisms to hypoxia in hepatocellular carcinoma cell lines. It was attempted to transiently knock down CUX1 by siRNA in HepG2 and Hep3B cells. A Knock down of CUX1 transcript was repeatedly observed by RNA analysis although not statistically confirmed and not supported by a clear Western Blot. Hypoxia was induced by treatment with 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> or incubation with 0.5% oxygen atmosphere. CUX1 as well as markers of hypoxia and cellular stress were detected by q-RT-PCR, western blot and antibody array. The influence of CUX1 on the transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  was analyzed by luciferase assay using co-transfected luciferase plasmid and CUX1-siRNA. Here, the measured light intensity of the HIF- $\alpha$  binding sequence HRE correlated with the activity of HIF1- $\alpha$ , which was compared in cells with and without CUX1 knock-down. Whilst no influence of CUX1 on HIF-1 $\alpha$  expression was detected, a decreased expression of HIF-1 $\alpha$  target genes GLUT1 and VEGFA after knock-down of CUX1 in RT-qPCR was observed. The antagonist to HIF-1 $\alpha$ , FIH-1, showed up-regulation after knock-down of CUX1 in HepG2 cells. CUX1 suppression impaired the transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  on its ectopic promoter sequence transfected in HCC cells. Moreover, after knock-down of CUX1, a heightened expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 (CDKN1) and p27 (CDKN2) was observed. Generally, CUX1 knock-down seemed to decrease the cell stress reaction in both cell lines and thus seemed to

lead to increased sensitivity to hypoxic cytotoxicity, especially in the p53-null Hep3B cell line.

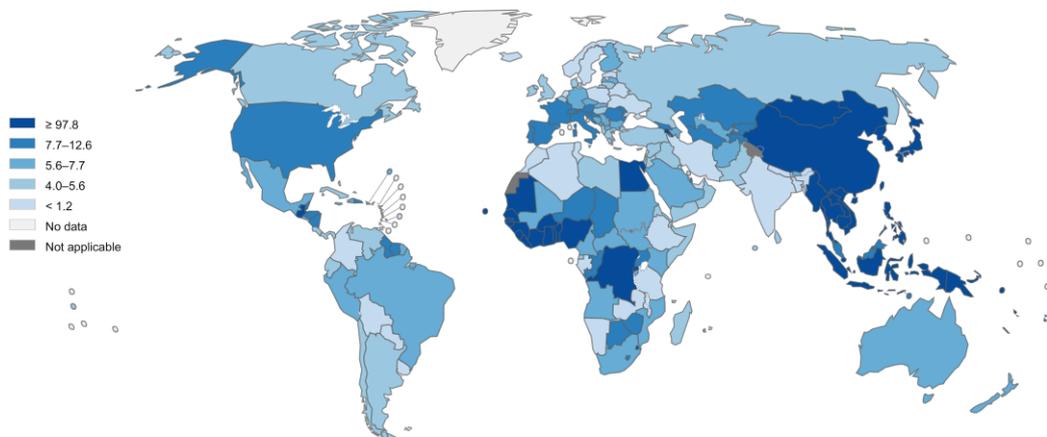
It can be speculated that CUX1 plays an important role during hypoxia response in hepatocellular carcinoma. This is probably achieved by sustaining the transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$ , most likely by regulation of its inhibitor FIH-1. At the same time, CUX1 seemed to counteract cell cycle inhibition and could then promote cell proliferation despite the toxicity caused by hypoxia. These results support the function of CUX1 as an oncogene, as discussed in literature. However further experimental reproduction and a statistical confirmation of the observed effects is needed.

## 2. Einleitung

### 2.1 Das hepatozelluläre Karzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das hepatozelluläre Karzinom macht annähernd 90 Prozent aller primären malignen Neubildungen der Leber aus (Khemlina et al. 2017). Es stellt global ein bedeutendes Problem dar. Weltweit ist es die fünfthäufigste bei Männern und neunthäufigste bei Frauen diagnostizierte Krebserkrankung. Dabei ist es jedoch die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache mit annähernd 746.000 Todesfällen weltweit im Jahr 2012 (Ferlay et al. 2013). Die höchsten Inzidenzraten finden sich in Ost- und Südostasien sowie in den Subsaharastaaten, in welchen die Erkrankung mit der hohen Zahl chronischer Hepatitis B und Hepatitis C Fälle assoziiert ist (Jemal et al. 2011). Während der Hauptteil der Erkrankungen deutlich in diesen weniger entwickelten Ländern liegt (siehe Abbildung 1), ist in den letzten Jahrzehnten ein Anstieg der Inzidenz auch in hochentwickelten Regionen wie Europa, Nordamerika, Australien und Japan zu beobachten (El-Serag 2007). Gründe hierfür werden sowohl in der Verbreitung des Hepatitis C Virus, als auch in der steigenden Zahl nichtalkoholassoziierter Fettlebererkrankungen (NAFLD) gesehen (Bugianesi 2007).

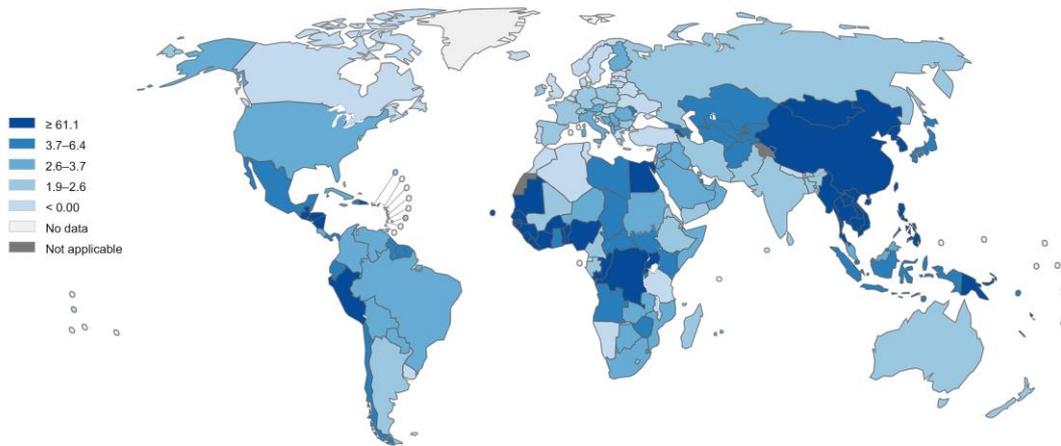


All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Data source: GLOBOCAN 2012  
Graph production: IARC  
(<http://gco.iarc.fr/today>)  
World Health Organization

 World Health Organization  
© International Agency for Research on Cancer 2016

**Abbildung 1:** Weltweite Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms bei Männern pro 100.000. Die Grafik wurde entnommen aus: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality, International Agency for Research on Cancer IARC, Lyon, Frankreich.



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Data source: GLOBOCAN 2012  
Graph production: IARC  
(<http://gco.iarc.fr/today>)  
World Health Organization

 World Health Organization  
© International Agency for Research on Cancer 2016

**Abbildung 2:** Weltweite Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms bei Frauen pro 100.000. Die Grafik wurde entnommen aus: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality, International Agency for Research on Cancer IARC, Lyon, Frankreich.

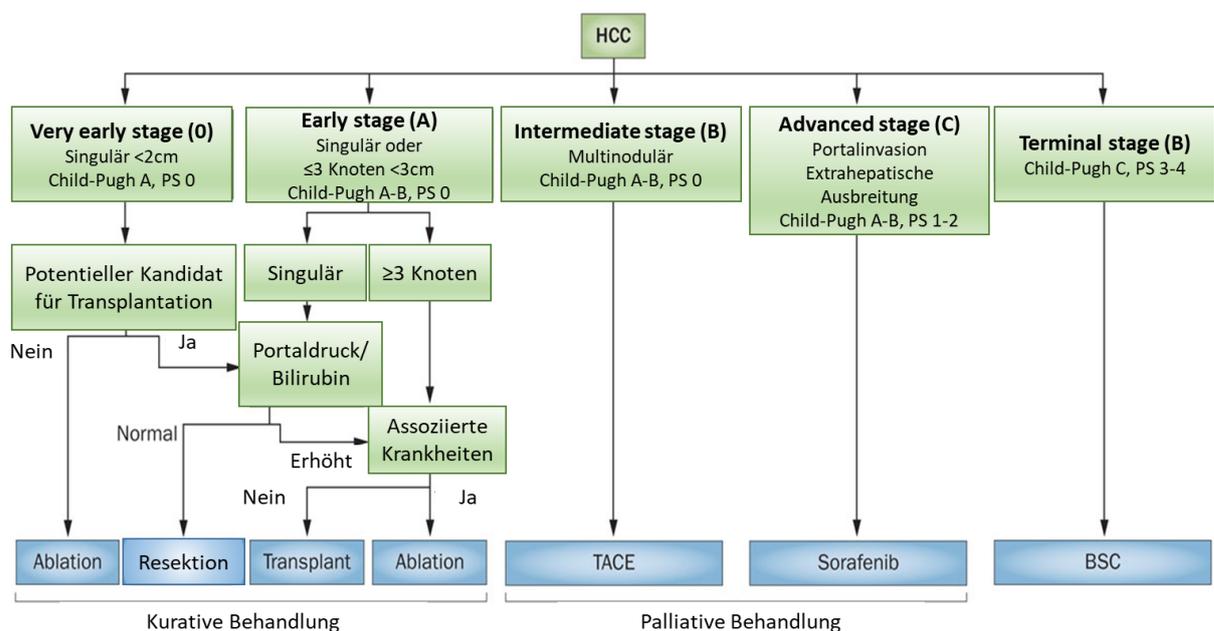
In Deutschland betrug die standardisierte Erkrankungsrate 2012 10,2/100.000 bei Männern und 3,4/100.000 bei Frauen (Robert Koch-Institut 2015). Die Prognose besonders des fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinoms ist schlecht; das Verhältnis von Mortalität zu Inzidenz beträgt 0.95 (Ferlay et al. 2013).

Ätiologische Faktoren für das hepatozelluläre Karzinom sind seit langem bekannt. Es zählen hierzu besonders die Infektionen mit den hepatotropischen Viren Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV), und Hepatitis D (HDV). Bis zu 90 Prozent aller hepatozellulären Karzinome entwickeln sich auf dem Boden einer Leberzirrhose (Zhang und Friedman 2012), welche neben den genannten viralen Ursachen eine Vielzahl anderer Ursachen haben kann. Zu den wichtigsten gehören hier der Alkoholabusus und die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) (Seitz und Stickel 2006). Der häufigste der genannten Faktoren ist die HBV Infektion, welche für etwa 54 Prozent der Fälle von hepatozellulärem Karzinom verantwortlich ist (Ghoury et al. 2017). Die endemische Verbreitung von HBV, beispielsweise in südostasiatischen Ländern lässt dies zu einem globalen Problem mit hoher ökonomischer Last für die betroffenen Regionen werden. Eine deutliche Risikoerhöhung besteht zudem bei Koinfektion von HBV mit HDV oder HCV (Fattovich et al. 2004) sowie auch durch das gleichzeitige Vorliegen von Alkoholabusus. Das Risiko für die Erkrankung von Hepatitis B Patienten ist auch ohne Vorliegen einer Zirrhose erhöht (Bruix und Sherman 2011). Die chronische Infektion mit

HCV wird für 10 bis 25 Prozent der Fälle von hepatozellulärem Karzinom verantwortlich gemacht (Huang et al. 2011) wobei etwa 2,5 Prozent der chronisch infizierten Patienten die Erkrankung entwickeln (Bowen und Walker 2005). Die alkoholassoziierte Zirrhose gilt als dritthäufigste Ursache für das hepatozelluläre Karzinom. (Donato et al. 2002). Vor allem in den westlichen Industrienationen spielen die nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) und nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) zunehmend eine Rolle in der Entstehung von Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom. Sie sind mit dem Anstieg von Diabetes mellitus Typ II und Adipositas in diesen Ländern assoziiert (Bugianesi 2007).

### 2.1.2 Therapieoptionen

Die Auswahlmöglichkeiten der Therapie werden vom oft fortgeschrittenen Zustand der Erkrankung bei Diagnose sowie der schlechten Leberfunktion der Patienten mit vorliegender Zirrhose eingeschränkt. Zum Staging der Patienten kommt u.a. das Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Schema zur Anwendung (Abbildung 3). Es berücksichtigt die Tumorausbreitung, die Leberfunktion anhand des Child-Pugh Scores und den physischen Zustand des Patienten anhand des ECOG Performance Status (Kinoshita et al. 2015).



**Abbildung 3:** BCLC Schema zur Therapieauswahl. Darstellung modifiziert nach Forner et al. 2014.

Der chirurgischen kurativen Therapie können Patienten mit einem Karzinom im Frühstadium zugeführt werden. Die chirurgische Resektion und Ablation ist Patienten im Frühstadium ohne dekompensierte Leberzirrhose vorbehalten, auch wenn durch den

Mangel an Organen für die Transplantation zunehmend die Erfolgsaussichten von chirurgischen Interventionen in späteren Stadien getestet werden (Kokudo et al. 2016). Für Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose ist die Organtransplantation derzeit die beste Option. Um für die Transplantation in Frage zu kommen muss der Patient unter die Milan Kriterien fallen (Mazzaferro et al. 1996), d.h. es liegen ein solitärer Tumor von maximal 5 cm Größe oder maximal drei Läsionen von je maximal 3 cm Größe vor. Vaskuläre Invasion des Tumors oder extrahepatische Manifestation sind Ausschlusskriterien. Patienten außerhalb dieser Kriterien können durch zwischenzeitliche andere Therapien ein sogenanntes „Downstaging“ erhoffen, das sie wieder einschließt. Zur Überbrückung der Zeit bis zur Transplantation führen viele Behandlungszentren eine sogenannte „Bridging“-Therapie durch, wobei deren Nutzen für die Überlebensdauer bisher nicht vollständig nachgewiesen ist (Gosalia et al. 2017). Die dazu und für die palliative Therapie genutzten radiologisch interventionellen Verfahren umfassen die Radiofrequenzablation (RFA), die perkutane Ethanolinjektion (PEI), die Kryoablation, die Mikrowellenablation sowie die transarterielle Chemoembolisation (TACE), welche auch in Kombination angewandt werden. Neuere interventionelle Verfahren sind die transarterielle Radioembolisation (TARE) sowie die irreversible Elektrokorporation (IRE). Für Patienten, die einer interventionellen Therapie nicht zugänglich sind, gibt es bisher nur limitierte systemische Behandlungsoptionen. Konventionelle Chemotherapie bei Patienten in BCLC Stadien C und D zeigen sich wenig erfolgreich. Ein Oxaliplatin basiertes Regime konnte zuletzt eine leichte Verbesserung in der Überlebensrate zeigen (Petrelli et al. 2014).

Der Multikinaseinhibitor Sorafenib, der durch Inhibition des VEGF Rezeptors Angiogenese und Tumorwachstum vermindern soll, ist das erste zugelassene orale chemotherapeutische Agens. Es zeigte einen statistisch signifikanten aber bescheidenen Überlebensvorteil in zwei großen Phase III Studien (Llovet et al. 2008). Mit einem medianen Überlebensvorteil von 2,5 Monaten und einer Antwortrate von kleiner 5% ist die Therapie jedoch nur von beschränktem Erfolg gekennzeichnet (Cheng et al. 2009). Neue Ansätze befinden sich derzeit in Entwicklung. Das strukturell dem Sorafenib ähnliche Regorafenib wurde in einer Phase III Studie als Zweitlinientherapie nach Sorafenib getestet und zeigte ein um 3 Monate verlängerte mittlere Überlebenszeit gegenüber Placebo (Trojan und Waidmann 2016). Des Weiteren zeigen sich immuntherapeutische Ansätze vielversprechend. Checkpoint Inhibitoren wie PD-1- oder CTLA4-Inhibitoren greifen in die T-Zellfunktion ein und sollen dem Immunsystem ermöglichen, effektiv Tumorzellen zu bekämpfen. Mehrere Studien der bereits bei anderen Tumorentitäten verwendeten Therapeutika werden derzeit durchgeführt (Obeid et al. 2017). Trotz neuer Ansätze bleiben die therapeutischen Optionen aktuell noch

limitiert. Ein verbessertes Verständnis der genauen molekularbiologischen Vorgänge in Tumorentstehung und –funktion ist wichtig, um effektive Therapieoptionen zu ermöglichen.

## **2.2 Hypoxie im hepatozellulären Karzinom**

### **2.2.1 Faktoren der Tumorphathogenese**

In dem durch Zirrhose geschädigten Lebergewebe werden durch oxidativ bedingte Schädigung, zyklische Inflammation, Nekrose und wiederholte kompensatorische Regeneration eine Vielzahl genetischer Fehler und Mutationen angesammelt, welche die Bildung monoklonaler Populationen dysplastischer Zellen zur Folge haben kann (Jhunjhunwala et al. 2014). Diese genetischen Veränderungen umfassen beispielsweise Punktmutationen, Deletion in TP53, Telomerveränderungen, sowie Aktivierung des Ras-MAPK Signalweges und  $\beta$ -Catenin als Protoonkogene. (Thorgeirsson und Grisham 2002). Ein weiterer Faktor der Tumorentwicklung ist das enge Zusammenspiel aus Immunzellen, Stromazellen, angioplastischen Zellen und Tumorzellen (Hernandez-Gea et al. 2013).

### **2.2.2 Bedeutung von Hypoxie in der Tumorgenese**

Eine besondere Bedeutung in der Tumorentwicklung kommt der Reaktion der Tumorzelle auf ihre hypoxische Umgebung zu. Hypoxie ist definiert als die insuffiziente Sauerstoffversorgung oder Sauerstoffausschöpfung eines Gewebes oder einer Zelle und führt letztendlich zu einer Malfunktion oder Schädigung der betroffenen Region. Gründe für Hypoxie können von einer Minderversorgung durch niedrigen Partialdruck, Reduktion der Transportkapazität wie beispielweise bei anämischer Hypoxie, einer erhöhten Diffusionsbarriere bis hin zu Fehlfunktionen innerhalb der Zelle reichen, bei der diese den vorhandenen Sauerstoff nicht mehr adäquat umsetzen kann. Es wurde gezeigt dass Hypoxiezustände dabei grundlegend in intrazelluläre Vorgänge innerhalb der Leber eingreifen und dort epigenetische und genetische Veränderungen hervorrufen (Höckel und Vaupel 2001).

Die Leber zeigt sich dabei als ein besonders hypoxiemepfindliches Organ (Li et al. 2015). Bereits während der Leberzirrhose kommt es zu einer Einschränkung der Sauerstoffversorgung der Zellen durch Ablagerung von Extrazellulärmatrix und dies ist maßgeblich an der Entstehung von Dyplasien beteiligt (Wu et al. 2012). Im hepatozellulären Karzinom besteht vom umgebenden Lebergewebe hin ein deutliches Gefälle des Sauerstoffpartialdrucks von 30 zu 6 mmHg (Vaupel et al. 2007). In der Entstehung des vorwiegend soliden hepatozellulären Karzinoms kann dies zu einem Teufelskreis führen. Durch enthemmte Proliferation der Tumorzellen kommt es zu einer

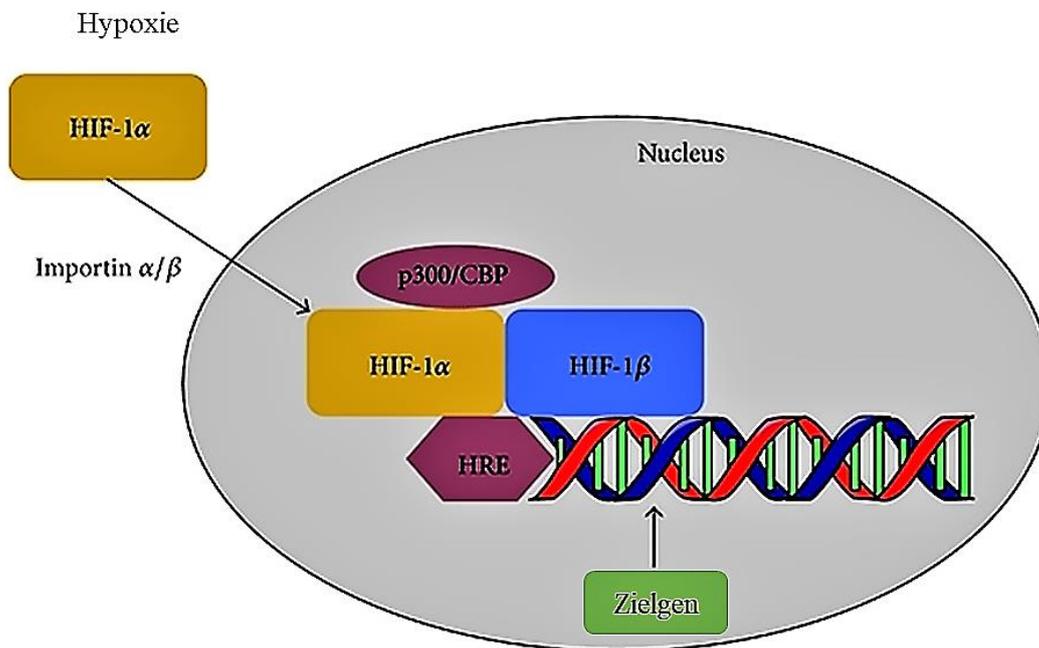
ungenügenden Sauerstoffversorgung innerhalb des Tumors. Die vorherrschende Hypoxie führt wiederum zu einer genetischen Instabilität und Selektion von Tumorzellen mit einem an die Hypoxie angepassten Profil. Diese können wiederum unter Hypoxie weiter proliferieren (Dachs und Tozer 2000). Um die resultierenden zellulären Anpassungsvorgänge zu verstehen, ist ein Verständnis der genauen intrazellulären Vorgänge wichtig.

### **2.2.3 HIF-1 $\alpha$ als zentraler Mediator von Hypoxie in hepatozellulärem Karzinom**

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) ist der erste in Säugetierzellen identifizierte Mediator der Zellantwort auf Hypoxie (Semenza und Wang 1992). HIF-1 $\alpha$  konnte als negativer Prognosemarker im hepatozellulären Karzinom nachgewiesen werden (Srivastava et al. 2015). Eine Erhöhung korreliert mit einer schlechteren Überlebenszeit und aggressiverem Verlauf der Erkrankung mit erhöhter Tumorgroße und Metastasierungshäufigkeit (Osman et al. 2015).

HIF-1 $\alpha$  ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, welcher eine HIF-1 $\alpha$  und eine HIF-1 $\beta$  Untereinheit umfasst. HIF-1 $\alpha$  ist dem Sauerstoffangebot gegenüber sensitiv. In Gegenwart von Sauerstoff katalysieren Prolylhydroxylasen (PHD1, PHD2, PHD3) die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$ . Dies führt dazu, dass HIF-1 $\alpha$  in einem mit dem von Hippel-Lindau Protein assoziierten Mechanismus im Proteosom degradiert wird. Liegt Hypoxie vor, ist die Aktivität der Prolylhydroxylasen inhibiert (Kaelin 2005). HIF-1 $\alpha$  akkumuliert und wird über den Zellkerntransportrezeptor Importin  $\alpha/\beta$  in den Zellkern eingeschleust. Es bindet an HIF-1 $\beta$  und es bildet sich ein stabilisiertes HIF-1 $\alpha/\beta$ -Dimer. Dieses kann nun im Zellkern an sogenannte „hypoxia response element“ (HRE) Promoterregionen binden welche die gemeinsame DNA Sequenz 5' -G/ACGTG- 3' besitzen und auf den Zielgenen von HIF-1 liegen (Jiang et al. 1996). So kann es die Transkription eines speziellen Zielgenmusters initiieren.

Ein Co-Aktivatoren der Transkription bei Bindung an HRE ist p300/CBP (CREB-Bindeprotein). Unter Normoxie wird dieser Co-Aktivatoren von factor Inhibiting HIF-1 (FIH-1) limitiert, indem dieses als Asparaginyhydroxylase an dessen C-terminaler Transaktivationsdomäne wirkt und die Bindung des Co-Aktivatoren mit HIF-1 unterbindet (Hewitson et al. 2002). Ein HIF-1 $\alpha$  Homolog, HIF-2 $\alpha$ , wird in ähnlicher Weise durch Hypoxie reguliert. Es teilt sich Zielgene mit HIF-1 $\alpha$ , indem es ebenfalls an HRE-Regionen bindet. Der Effekt auf die Genexpression unterscheidet sich jedoch an vielen Stellen (Loboda et al. 2010)



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des HIF-1 $\alpha$  Aktivierungsweges. In Normoxie (nicht dargestellt) wird HIF-1 $\alpha$  durch Prolylhydroxylasen hydroxyliert und durch Assoziation mit dem von Hippel Lindau Protein über das Ubiquitin-Proteasom System degradiert. In Hypoxie (dargestellt) findet die Akkumulation und Translokation in den Nucleus statt. Durch Bindung mit Hif1 $\beta$  und p300/CBP kann eine Aktivierung der HRE-Promoterregionen erfolgen. Grafik modifiziert nach Luo et al. 2014.

#### 2.2.4 Die Hif-1 $\alpha$ gesteuerte Hypoxieantwort der Zelle

Die Ziele des HIF-1 $\alpha$  Transkriptionsfaktors umfassen eine Vielzahl von Genen und fördert so Angiogenese, Erythropoese, Glukosestoffwechsel, Zellproliferation, Zellinvasion, Metastasierung und Apoptose der von Hypoxie betroffenen Zellen (Hong et al. 2004).

##### *VEGF und Angiogenese*

Eines der bedeutendsten Ziele von HIF-1 $\alpha$  ist der für die Angiogenese essentielle Wachstumsfaktor vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF-A lässt sich durch Hypoxie in drei verschiedenen Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms, darunter auch HepG2, stimulieren. Desweiteren konnte eine funktionierende HRE-Promoterregion für VEGF nachgewiesen werden. (von Marschall 2001). Nach Bindung von VEGF-A an VEGFR1 und VEGFR2 Rezeptoren werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, welche die Migration, Proliferation und Invasion von endothelialen Zellen vorantreiben. VEGF funktioniert zudem als Zytokin, welches direkt mit hepatischen Sternzellen,

Kupffer-Sternzellen und Hepatozyten interagiert und die vaskuläre Basalmembran und interstitielle Matrix schwächen kann (Zhu et al. 2011).

Neben der direkten Stimulation von VEGF fördert HIF-1 $\alpha$  andere Mechanismen der Angiogenese durch Aktivierung von Faktoren wie Angiopoetin-2 (Simon et al. 2008), Endothelin-1 (Hu et al. 1998) oder SDF-1 (Ceradini et al. 2004). Der Angiogenese kommt in der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms eine besondere Bedeutung zu. Die Gefäßversorgung im hepatozellulären Karzinom ist grundlegend umstrukturiert. Der Tumor ist zumeist primär arteriell perfundiert und perfusionsreich (Chou et al. 2014). Allerdings ist die Struktur und Funktionalität der Gefäße abnorm verändert, sodass innerhalb des Tumors von heterogenen regionalen Hypoxiezuständen ausgegangen werden kann (Hernandez-Gea et al. 2013).

#### *Glukosestoffwechsel*

Um das Überleben der Zelle unter hypoxischen Bedingungen zu verbessern, verändert HIF-1 $\alpha$  den Glukosestoffwechsel der Zelle hin zu vermehrter Glykolyse. Es aktiviert GLUT1 (Glukosetransporter 1), welcher die Aufnahme von Glukose in die Zelle steuert, und zudem Hexokinase und Laktatdehydrogenase A (LDHA), welche Pyruvat in Laktat umwandeln (Semenza 2009). Der Umstellung von Tumorzellen zu Glykolyse wird auch als Warburg-Effekt bezeichnet. Das gebildete Laktat wird durch ebenfalls von HIF-1 $\alpha$  regulierte Transportproteine aus der Zelle eliminiert (Ullah et al. 2006). Die dadurch in der Zellumgebung entstehende Azidose wird wiederum mit Aktivierung von Vorgängen der Invasion und Metastasierung in Verbindung gebracht (Raghunand et al. 2003).

#### *Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose*

Die Rolle von HIF-1 mit Bezug auf Apoptose und Proliferation ist mehrschichtig. Zielgene von HIF-1 $\alpha$  umfassen Wachstumsfaktoren wie insulin-like growth factor-2 (IGF-2) (Feldser et al. 1999) und antiapoptische Faktoren. Gleichzeitig fördert HIF-1 jedoch auch Faktoren des Zellzyklusarrests und der Apoptose (Song et al. 2012) über Zielgene wie p53 (Sermeus und Michiels 2011) oder BNIP3 (Zhang et al. 2008). HIF-1 hat zudem einen Effekt auf die Expression von p21 (CDKN1A) und p27 (CDKN1B) (Goda et al. 2003a). Beide Faktoren sind als Inhibitoren von Cyclin abhängigen Kinasen für Zellzyklusarrest verantwortlich und gelten als Tumorsuppressoren. Interessanterweise wird für beide Faktoren im hepatozellulären Karzinom eine proonkogene Funktionswandlung bei Translokation in das Zytoplasma vermutet (Ohkoshi et al. 2015, Matsuda et al. 2013).

### *Invasion und Metastasierung*

Für den Metastasierungsprozess des Karzinoms ist der Übergang von epithelialelem zu einem motilen mesenchymalem Expressionsmuster (EMT) der Zelle von Bedeutung. Hierbei gehen Zell-Zell Kontakte sowie Zellpolarität verloren. Intrazellulär sind hiermit der Verlust von E-Cadherin und der Anstieg von Vimentin assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie einen fördernden Einfluss auf diesen Prozess hat. Ein Mechanismus mittels HIF-1 $\alpha$  ist dabei die Induktion von SNAIL, ein Transkriptionsrepressor von E-Cadherin (Zhang et al. 2013). Weitere Ziele von HIF-1 $\alpha$  konnten bei Zellveränderungen hin zu verbesserter Zellmotilität, Intravasion, Extravasion und Kolonisation ausgemacht werden. Hierzu gehört beispielweise das für die Zellmigration essentielle Angiopoetin-like 4 (ANGPTL4) als direktes Ziel von HIF-1 $\alpha$  (Zhang et al. 2012).

## **2.3 CUX1 wirkt als Transkriptionsfaktor auf eine Vielzahl von Zellfunktionen**

### **2.3.1 CUX1: Struktur und Funktion**

Cut homeobox 1 (CUX1) ist ein Gen aus der Homöobox Familie. Diese hochkonservierten Gene kodieren mit der 180 Basenpaare enthaltenden Homöobox für einen bestimmten Proteinabschnitt, die sogenannte Homöodomäne. Diese kann durch Bindung an DNA-Abschnitte deren Transkription unterdrücken oder aktivieren. Die Homöobox Gene umfassen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die für die Determination von Zellen wichtig sind. In der frühen Entwicklung sind sie beispielweise für die Einteilung des Zellverbandes in Segmente essentiell und an den Entwicklungsprozessen der Organsysteme und Zelltypen beteiligt.

CUX1 wurde als Ortholog der cut Gensequenz der *Drosophila melanogaster* identifiziert und wird auch als „CUT-like homeobox 1“ (CUTL1) oder „CCAAT-displacement protein“ (CDP) bezeichnet (Neufeld et al. 1992). Es befindet sich auf Genlocus 7q22.1. Es sind mehrere Isoformen von CUX1 bekannt. Die p200 Isoform besteht aus 3 Wiederholungen der cut-Sequenz sowie der spezifischen Homöodomäne. Die p110 Isoform wird durch proteolytische Umwandlung von Cathepsin L am N-Terminus um eine Wiederholung von cut verkleinert (Goulet et al. 2004). Die p75 Isoform enthält nur mehr eine einzige cut-Region und ist ein alternatives Spleißprodukt (Ramdzan und Nepveu 2014; Vandenheuvel, G.B., Quaggin, S.E., Igarashi, P 1996). Andere Isoformen wie p60, p90 und p150 wurden nachgewiesen, sind jedoch bisher in ihrer Funktion nicht vollständig erforscht. (Truscott et al. 2003; Moon et al. 2002).

p200	HD	cut	cut	cut
p110	HD	cut	cut	
p75	HD	cut		

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der CUX1 Isoformen p200, p110 und p75 mit Homöodomainabschnitt (HD) und cut Regionen. Es existiert zudem ein sogenanntes alternatives Spaltprodukt (CASP), welchem die DNS-Bindungsregion fehlt. Es ist am retrograden Transport von Vesikeln zwischen Golgiapparat und Endoplasmatischem Retikulum beteiligt.

Die p200 Isoform unterscheidet sich von anderen Transkriptionsfaktoren durch eine sehr schnelle aber nur transiente Bindung an DNS. Trotzdem hat p200 Auswirkungen auf die Transkription und agiert als Repressor (Moon et al. 2000). Die beiden kleineren Isoformen wirken hingegen als stabil bindende Transkriptionsfaktoren sowohl aktivierend als auch unterdrückend auf die Transkription von bestimmten Gensequenzmustern (Sansregret und Nepveu 2008). Die Ziele der Transkriptionsregulation von CUX1 sind sehr vielfältig. Die p200 Isoform von CUX1 ist beispielsweise beteiligt an Antwortmechanismen bei DNS Schäden (Vadnais et al. 2012). Die Cut-Repeats sind dabei akzessorische Faktoren im Basenexzisions-Reparaturmechanismus (Dianov und Hübscher 2013). Ebenso wird die Enzymaktivität von OGG1 (8-oxoguanine DNA Glykosylase1), einem der zentralen Enzyme dieses Reparaturmechanismus stimuliert (Ramdzan et al. 2014).

Die p110 Isoform von CUX1 ist u.a. beteiligt an der Zellzyklusprogression in der S Phase (Sansregret et al. 2006) und der korrekten Ausbildung des Spindelapparats (Sansregret et al. 2011). Weiter spielt CUX1 eine Rolle in der Zellproliferation (Truscott et al. 2008), Zellmigration und Invasion (Michl et al. 2005) sowie Apoptoseresistenz (Ripka et al. 2010a). Es ist ebenso in der neuronalen Entwicklung beteiligt (Cubelos et al. 2010). Noch nicht alle dieser Funktionen können bisher einer bestimmten Isoform zugeordnet werden. Die kurze p75 Isoform wurde bisher u.a. in Thymusgewebe und Brusttumoren nachgewiesen. In letzteren zeigt sich bei erhöhtem CUX1 ein aggressiveres Wachstumsmuster (Goulet et al. 2002).

### 2.3.2 CUX1 hat eine widersprüchliche Rolle in der Tumorgenese

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen von CUX1 in Bereichen der Zellentwicklung und Zellanpassung ist die Bedeutung von CUX1 für die Tumorentwicklung ein spannendes Forschungsgebiet. Interessanterweise wurde CUX1 in bisherigen Veröffentlichungen sowohl als Tumorsuppressor, als auch als Onkogen bezeichnet und scheint in einer

Vielzahl von Mechanismen der Tumorgenese beteiligt zu sein, die nicht immer der gleichen Zielführung zu dienen scheinen.

Eine Analyse der Genexpression in Fällen von Akuter myeloischer Leukämie fand zum Beispiel in über 50 Prozent eine Reduktion von CUX1 bei komplettem oder teilweisem Verlust von Chromosom 7q. Dieser Verlust eines Allels, ein sogenannter *loss of heterozygosity* ließ darauf schließen, dass CUX1 hier als haploinsuffizienter Tumorsuppressor funktioniert (McNerney et al. 2013). Inaktivierende Punktmutationen wurden bei 1-5 % der Karzinome mit beiden Allelen gefunden (Wong et al. 2014). Ein sogenannter „*loss of heterozygosity*“ findet sich auch in Mammakarzinom (Zeng et al. 1999). CUX1 wird so von mehreren Autoren als haploinsuffizientes Tumorsuppressorgen bezeichnet (Ramdzan und Nepveu 2014). Hinweise auf eine Rolle als Tumorsuppressor finden sich auch im Mausmodell. In einer Studie von Wong et al. wurde gezeigt, dass knock-down von CUX1 in KE37 T-ALL Zellen zur Tumorbildung nach Injektion in immundefizienten Mäusen führte (Wong et al. 2014). In einem heterozygoten CUX1 knock-out Mausmodell zeigten sich in homozygoten Mäusen schwere Gewebsentwicklungsstörungen und Hyperplasien, besonders in Knochenmark und Milz. (Sinclair et al. 2001) .

Im Gegensatz dazu findet sich eine Reihe von Arbeiten in denen die pro-onkogene Rolle von CUX1 in Tumorzellen beschrieben wird. Die p75 und p110 CUX1 Isoform wurden in Brusttumoren und anderen Tumorgeweben nachgewiesen und gehen dabei mit einem aggressiverem Tumorwachstum einher (Moon et al. 2002). CUX1 ist erhöht in neuroendokrinen Neoplasien des Pankreas (PNEN). Hier konnte knock-down von CUX1 mittels siRNA zeigen, dass CUX1 eine Voraussetzung für Zellmigration ist und in der Zelle Resistenz gegenüber Apoptose vermittelt (Michl et al. 2005). CUX1 stimuliert die Tumorzellmigration und Invasion durch Unterdrückung der Src-Proteindegradation (Aleksic et al. 2007) und fördert Zellinvasion des Tumors als Effektor des TGF $\beta$ -Signalwegs (Michl et al. 2005; Michl und Downward 2006). Auch in der Umgebungsreaktion des Tumors spielt dies eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$  die Expression von CUX1 in tumorassoziierten Makrophagen stimuliert und daraufhin die Zytokinexpression verändert wird (Kühnemuth et al. 2015). CUX1 wurde auch als Effektor im sogenannten PAR2 (Proteinase-aktivierter Rezeptor) Signalweg in Fibroblasten gefunden. Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor ist an Prozessen der Inflammation und Zellproliferation beteiligt (Wilson et al. 2009). CUX1 induziert zudem die Expression von WNT5A, woraufhin Zellmigration, Proliferation und Invasivität gesteigert sein können (Ripka et al. 2007). CUX1 wiederum ist induziert durch Aktivierung des Akt/Proteinkinase B-Signalwegs und inhibiert durch PI3K Inhibitoren und spielt im Pankreaskarzinom eine antiapoptotische Rolle (Ripka et al. 2010a). In

Pankreaskarzinom schützte zudem eine Überexpression von CUX1 pankreatische Karzinomzelllinien gegenüber TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) induzierter Apoptose. Knock-down von CUX1 erhöhte zudem den Anteil apoptotischer Zellen im Pankreaskarzinom (Ripka et al. 2010a; Ripka et al. 2010b).

Auch hier finden sich Arbeiten mit Mausmodell, die die Hypothese von CUX1 als Onkogen weiter unterstützen. In transgenen CUX1 Mausmodellen wurden verschiedene mit Tumorentstehung assoziierte Veränderungen gefunden, darunter Multiorganmegalie und Veränderung des Nierengewebes (Ledford et al. 2002). Es kam zur Entwicklung von Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose (Brantley et al. 2003) sowie zur Entwicklung von Brusttumoren (Cadieux et al. 2009) und primären Lungentumoren (Ramdzan et al. 2014). CUX1 greift, neben der Aktivität als Transkriptionsfaktor, auch durch Proteininteraktion in Zellvorgänge ein. Hierzu gehören die Interaktionen mit Cyclin A und Retinoblastom Protein (pRB), welche in Osteosarkomzellen gefunden wurden (van Gurp et al. 1999).

Die Rolle von CUX1 ist zum einen im Zellzyklus bei der Vorbereitung der Zelle auf die DNS Replikation und die korrekte Chromosomensegregation, sowie durch Schutz des Genoms durch DNS Reparaturmechanismen charakterisiert. Auf der anderen Seite finden sich in Tumorgewebe mit CUX1 Überexpression aggressivere Wachstumsmuster (Tsumi et al. 2003; Ripka et al. 2007) und CUX1 ist an vielen Vorgängen der Tumorgenese fördernd beteiligt.

#### *CUX1 in Lebergewebe*

Bisher liegen wenige Analysen von CUX1 im Lebergewebe oder in Lebertumoren vor. In HepG2 Zellen wurde die als Aktivator der Transkription wirkende Isoform p75 gefunden (Arthur et al. 2017). Einige Hinweise auf einen Zusammenhang mit malignen Vorgängen der Leber existieren jedoch: Transgene Mäuse, welche CUX1 exprimieren zeigen im Verlauf Hepatomegalie und fortschreitende kanzerogene Läsionen der Leber (Vanden Heuvel et al. 2005).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass CUX1 einen direkten Einfluss auf den Tumormarker AFP (Alpha-Fetoprotein) hat. AFP ist der bisher wichtigste prognostische Marker des hepatozellulären Karzinoms. CUX1 funktioniert als positiver Regulator von Micro RNA miR124, welche wiederum die Translation von ZBTB20 inhibiert und dadurch AFP erhöht (Xu et al. 2010). In der gleichen Arbeit konnte wiederum für CUX1 einer der bisher einzig erforschten Kontrollmechanismen ausgemacht werden. In der Entwicklung des Lebergewebes nimmt die Proteinexpression von CUX1 graduell ab, trotz Vorliegen von CUX1 mRNA. Das lässt eine post-translational Regulierung vermuten (Xu et al. 2010). Die leberspezifische Micro RNA miR122 ist in aggressiveren HCC-Tumoren oft

vermindert. In Zellen, in welchen miR122 ausgeschaltet wurde, zeigte sich eine erhöhte Expression von CUX1, ein invasiveres Wachstumsmuster und eine Erhöhung von AFP. Die Kontrolle von miR122 ist wiederum komplex und wird von sogenannten „*liver-enriched*“ Transkriptionsfaktoren (LEFTs) mitbestimmt (Kojima et al. 2011).

### 3. Fragestellung

Die vielfältige Beteiligung von CUX1 an Mechanismen der Tumorgenese wirft die Frage auf, ob auch ein Zusammenhang von CUX1 und der Anpassungsreaktion von Tumorzellen an Hypoxie vorliegt. Dies könnte gerade im hepatozellulären Karzinom von Bedeutung sein, da hier erhöhte Hypoxiemarker mit einer schlechteren Prognose und einer aggressiveren Tumorentwicklung einhergehen. Es konnte in einer Arbeit von Krug et al. in CUX1 überexprimierenden Bon1 Zellen eine Hochregulierung des zentralen Hypoxiemediators HIF1- $\alpha$  nachgewiesen werden (Krug et al. 2014). Im hepatozellulären Karzinom wurde dieser Zusammenhang bisher nicht erforscht. In dieser Arbeit werden daher folgende Fragestellungen behandelt:

- **Gibt es einen Zusammenhang von Hypoxie und der Expression von CUX1 im hepatozellulären Karzinom?**

Hierzu wurden die zwei hepatozellulären Karzinomlinien Hep3B und HepG2 mit zwei verschiedenen Hypoxiemodellen untersucht und die Expression von CUX1 mittels q-RT-PCR und Western Blot quantifiziert.

- **Welche Rolle spielt CUX1 bei der Zellantwort auf Hypoxie im hepatozellulären Karzinom?**

Hierzu wurde versucht, CUX1 in HepG2 und Hep3B Zellen durch siRNA transient auszuschalten und zentrale Zielgene und Modulatoren der Hypoxieantwort mittels q-RT-PCR und Antikörper Array nach Hypoxieinduktion zu analysieren.

- **Gibt es einen direkten Einfluss von CUX1 auf die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  als zentralen Mediator der Hypoxiereaktion und auf die durch HIF-1 $\alpha$  vermittelten Signalwege?**

Hierzu erfolgte die Analyse der HIF-1 $\alpha$  Aktivität nach Kotransfektion von siRNA CUX1 und einem HRE-Luciferase Plasmid mittels Luciferase Assay.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Chemilumineszenz	FUSION SL-4	PeqLab, Erlangen (Deutschland)
Detektion	SNAP i.d. 2.0. Protein Detection System	Merck Millipore, Billerica (USA)
Eismaschine	Eiswürfelbereiter R 1565	Manitowoc GmbH, Herborn (Deutschland)
Elektrophoresekammer	X Cell SureLock™ Mini- Cell Electrophoresis System	Life Technologies, Carlsbad (USA)
ELISA-Reader	Molecular Devices Emax Precision Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale (California)
Gefrierschrank	Gefrierschrank SANYO  Ultra-Low Temperature Freezer (-80 °C) Kühl-Gefrierkombination KGS 3213-5 (-20°C) Liebherr Comfort Kühlschrank	Eswald Innovationstechnik GmbH SANYO Electric Co., Ltd., Moriguchi (Japan) Liebherr-International AG, Bulle, (Schweiz) Liebherr-International AG, Bulle (Schweiz)
Heiz- und Kühlblock	BIOER Cooling & Heating Block	Bioer Technology Co., Ltd., Hangzhou (China)
Hypoxiekammer	New Brunswick Scientific Innova CO-48 CO <sub>2</sub> Incubator	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Inkubator	Heraeus HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Kamera	LEICA DFC 300	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar (Deutschland)

Luminometer	GloMax Multi Detection System	Promega Corporation, Fitchburg (USA)
Mikroskop	Leica DM IL LED	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar (Deutschland)
	Nikon TMS	Nikon Corporation, Tokio (Japan)
	Olympus CK2	Olympus Optical Co., Ltd., Tokio (Japan)
Neubauerzählkammer		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
Oszillator	Power Pac 200 Electrophoresis Power Supply	BIO-RAD, Hercules (USA)
PCR System	CFX 96 RT PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Pipetten	Pipetten Discovery Comfort (2; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	HTL, Warschau (Polen)
	Multichannel Finnpipette™ Novus	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
	Eppendorf Reference (1, 10, 20, 100, 200, 1000µL)	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Pipettierhilfe	Pipetboy accu-jet®	Brand GmbH + CO KG, Wertheim (Deutschland)
Pumpe	Millivac Maxi	Merck Millipore, Billerica, MA (USA)
Schüttler	Labquake Shaker Rotisserie	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Spektrophotometer	NanoDrop™ Lite Spectrophotometer	Thermo FisherScientific, Waltham (USA)
Sterilbank	Telstar Bio II-A	Telstar, Terrassa (Spain)
Thermocycler	FlexCycler	Analytic Jena AG, Jena (Deutschland)
	C1000 Thermal Cycler	BIO-RAD, Hercules (USA)

Transferkammer	Semi-Dry Transfer Cell	BIO-RAD, Hercules (USA)
Vortex	bioSan Combi-Spin fVL-2400N IKA MS 1 Minishaker	Biosan, Riga (Lettland) Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Wasserbad	Julabo TW20	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach (Deutschland)
Zentrifuge	Heraeus Biofuge pico Eppendorf Centrifuge 5430R GS15R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland) Beckmann Coulter, Brea (USA)

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well PCR Platten	VWR International, Darmstadt (Deutschland)
Blottingmembran Nitrocellulose Hybond ECL	GE Healthcare, Littel Chalfont, (UK)
Einfrierröhrchen Nunc CryoTubes	NUNC A/S, Roskilde (Denmark)
Folie StarSeal Advanced Polyoleyl Film	Starlab, Hamburg (Deutschland)
Kapillarspitzen 200µL	Biozym Scientific, Oldenburg (Germany)
Nitrilhandschuhe Microflex XCEED	MicroFlex, Reno (USA)
Pipettenspitzen 10µL, 20µL, 100µL, 200µL, 1000µL	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht (Deutschland)
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips 2.5µL,	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht (Deutschland)
Reagiergefäße SafeSeal 0,5mL, 1,5 mL, 2mL	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht (Deutschland)

Serologische Pipetten 2mL, 5mL, 10mL, 25mL, 50mL	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht (Deutschland)
Spritzen 5mL, 10mL	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht (Deutschland)
Spritzenfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht (Deutschland)
Zellflaschen TC-Flasche T25, T75, T175	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht (Deutschland)
Zellkulturplatte TC-Platte 96 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen Cellstar Centrifuge Tubes 15 mL, 50mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zentrifugenröhrchen Centrifuge Tube 50mL	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht (Deutschland)

#### 4.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Medien

**Tabelle 3:** Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien.

Substanz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchhardt, Hohenbrunn (Deutschland)
Attractene Transfection Reagent	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)/St.Louis (USA)
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)/St.Louis (USA)
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)/St.Louis (USA)
Fötales bovines Serum FBS Superior	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
HEPES PUFFERAN C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)

HiPerfect Transfection Reagent	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
Magic Mark XP Western Protein Standard	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)/St.Louis (USA)
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Novagen RedAlert™ 10X Western Blot Stain	Merck Millipore, Billerica (USA)
Nucleasefreies Wasser	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE Antioxidant	Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE LDS Sample Buffer 4X	Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X	Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE Sample Reducing Agent 10X	Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE Transfer Buffer 20X	Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS-Lösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Penicillin/Streptomycin (10.000U/mL/10.000µg/mL)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
PhoSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland)
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Pro Sieve Quad Color Protein Marker 4,6 - 300 kDa	Lonza AG, Basel (Schweiz)
Restore™ Plus Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Waltham (USA)

TRIS PUFFERAN C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) in PBS	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Tween (Polysorbat) 20	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)

Alle nicht weiter aufgeführten aber benutzten Chemikalien und Reagenzien stammen von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland) und Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)

#### 4.1.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4:** Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
TBS	140 mM NaCl 25 mM Tris                      pH 7,6
TBS-T	140 mM NaCl 25 mM Tris 1 % Tween®20 (v/v)      pH 7,6
Proteinlysatpuffer 50mL	10 mM HEPES Puffer      pH 7,6 1 Tbl. cOmplete Mini-Protease Inhibitor Cocktail 1 Tbl. phosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail
TE	20 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA

#### 4.1.5 siRNAs und Plasmid

**Tabelle 5:** Verwendete siRNAs und Plasmid

siRNA	Produktname	Hersteller
CUX1_1	Hs_CUTL1_1 FlexiTube siMRNA (SI00357049)	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
CUX1_4	Hs_CUTL1_4 FlexiTube siMRNA (SI00357070)	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)

CUX1_7	Hs_CUTL1_7 FlexiTube siMRNA (SI04244009)	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
CUX1_8	Hs_CUTL1_8 FlexiTube siMRNA (SI04317999)	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
Negative Control	AllStars Negative Control siMRNA	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
<b>pGL3-TK Plasmid</b>	<b>Zusammensetzung:</b>	Promega Corporation, Fitchburg (USA)
Vektor	pGL3+TK-mp	Freundlicherweise überlassen von Jörg
Reportergen	Luciferase	Hänze, Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Promoter	HRE-PGK (fünf Wiederholungen): CTAGCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATA GCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATAGCG CGTCGTGCAGGACGTGACAAAT	UKGM Standort Marburg

#### 4.1.6 Primer

**Tabelle 6:** Verwendete Primer:

Primer	Bezeichnung	Hersteller
CUX1	Hs_CUX1_1_SG Assay	QUIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
FIH	Hs_HIF1AN_1_SG Assay	QUIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG Assay (Prime PCR Assay)	QUIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
GLUT1	Hs_SLC2A1_1_SG Assay	QUIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
Hif1 $\alpha$	Hs_HIF1A_1_SG Assay	QUIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)
p21	Prime PCR Assay, CDKN1A Hsa	BIO-RAD
p27	Prime PCR Assay, CDKN1B Hsa	BIO-RAD
VEGFA	Hs_VEGF_1_SG Assay	QUIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)

#### 4.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-CUX1	Abcam Anti-CUTL1 antibody (ab54583)	mouse monoclonal IgG	1:500	Abcam, Cambridge (Großbritannien)
Anti-HIF-1 $\alpha$	Hif1 $\alpha$ antibody Y-15 (sc-12542)	goat polyclonal IgG	1:600	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Anti- $\beta$ -Actin	Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin (A5441)	mouse monoclonal IgG	1:3000	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)/St.Louis (USA)
Anti-mouse IgG	Anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate (A2304)	goat polyclonal IgG	1:3000	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)/St.Louis (USA)
Anti-goat IgG	Anti-goat IgG Peroxidase Conjugate (A5420)	rabbit polyclonal IgG	1:3000	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)/St.Louis (USA)

#### 4.1.8 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Herstellernachweis	Kulturbedingungen
Hep3B	ATCC HB-8064	DMEM 10 % FCS

HepG2	ATCC HB-8065	100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin  RPMI 1640 10 % FCS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
-------	--------------	---

#### 4.1.9 Kits

**Tabelle 9:** Verwendete Kits.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
iScript cDNA Synthesis Kit	iScript Reaction mix Nuclease-freies Wasser iScript reverse Transkriptase	BIO-RAD, Hercules (USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	BCA Reagent A BCA Reagent B Albumin Standard Ampullen 2mg/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Proteome Profiler Human Cell Stress Array Kit	Array-Membranen Transparency Overlay 4 Well multidish Arraypuffer 6 Arraypuffer 4 Lysepuffer 6 Streptavidin-HRP Detection Antibody Cocktail Chemi Reagent 1 Chemi Reagent 2	Proteome Profiler Antibody Arrays: R&D Systems, Minneapolis (USA)
RNeasy Plus Mini	gDNA Eliminator Mini Spin Columns RNeasy Mini Spin Columns	QIAGEN N.V., Venlo (Niederlande)

	Collection Tubes RLT Plus Puffer RW1 Puffer RPE Puffer RNase-freies Wasser	
SsoFast EvaGreen Supermix	Sso Fast EvaGreen supermix Reagent	BIO-RAD, Hercules (USA)

#### 4.1.10 Software

**Tabelle 10:** Verwendete Software.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Bio-Rad CFX-Manager 2.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
REST 2008	Corbett Research, Sydney (Australien) und M.Pfaffl, TU München (Deutschland)
Bio-1D Version 15.01	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell (Deutschland)
FUSION-CAPT 15.15	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell (Deutschland)
SOFTmax Pro 3.1.1	Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA (USA)
GloMax Multi Detecion Software	Promega Corporation, Fitchburg (USA)
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft PowerPoint 2013	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Die verwendeten humanen hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 und Hep3B wurden im Inkubator bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit je nach Bedarf in T-25, T-75 oder T-175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zelllinie HepG2 erhielt das Kulturmedium RPMI 1640 mit Zugabe von 10% fötalem bovinem Serum (FBS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin. Die Zelllinie Hep3B erhielt das Kulturmedium DMEM mit gleichen Zugaben. Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden, der Zustand der Zellen wurde engmaschig mikroskopisch kontrolliert.

Alle Arbeiten an den Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen an der Reinraumwerkbank verrichtet. Die verwendeten Substanzen, Medien und Chemikalien wurden zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt, außer wenn durch den Versuch anders gefordert.

#### *Subkultivierung*

Die Zelllinien wurden bis zu einer Passagezahl von 30 verwendet. Das Subkultivieren der Zellen erfolgte ab einer Konfluenz von etwa 70%. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen bei Kultivierung in der Flaschengröße T-75 mit 10 mL PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden der Kulturflasche wurde 2 mL Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit im Brutschrank von 5 Minuten wurde die Lösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Daraufhin wurde die Reaktion mit Zugabe 4 mL Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet je nach gewünschter Zellzahl in der geforderten Menge frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturflaschen verteilt, welche unter Standardbedingungen bis zur nächsten Passage weiter inkubiert wurden. Die verwendeten Mengen wurden entsprechend an die unterschiedlichen Flaschengrößen angepasst.

#### *Zellzahlbestimmung*

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Trypsin/EDTA-Lösung gelöst und resuspendiert. Es wurden 10 µL Zellsuspension entnommen und 1:10 verdünnt und in die Neubauerzählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurde nun die Zellzahl in den vier Quadranten der Kammer bestimmt und mit dem errechneten Mittelwert die

Gesamtzellzahl nach der Formel  $\text{Zellzah/mL} = \text{Mittelwert} \times \text{Vorverdünnung} \times 10^4$  bestimmt.

#### *Einfrieren und Auftauen der Zellen*

Für das Einfriermedium wurden 35 mL Medium mit 10 mL FBS und 5 mL DMSO versetzt. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung wie oben beschrieben gelöst und gezählt. Die Suspension wurde zentrifugiert und die Zellpellets mit Einfriermedium resuspendiert. Je 1,5 Millionen Zellen wurden in 1,5 mL auf Eis gekühltem Einfriermedium suspendiert, darauf ohne Zeitverlust in Kryoröhrchen überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bis zum Schmelzpunkt erwärmt und die aufgetaute Zellsuspension in 10 mL Kulturmedium aufgenommen. Dieses wurde für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das verbleibende Pellet mit 10 mL Kulturmedium resuspendiert und in die entsprechende Zellkulturflasche überführt.

#### **4.2.2 Transfektion**

Bei der transienten Transfektion wird durch Einbringen von Fremdmaterial eine zeitweilige Herunterregulation der Genexpression des gewünschten Gens erlangt. Dies kann durch Nutzung des RNA-Interferenz Mechanismus erzielt werden. Hierbei werden kleine doppelsträngige RNA-Fragmente, sogenannte „small-interfering“ (si)RNA in die Zellen eingebracht. Diese wird in die sogenannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC) inkorporiert. In der folgenden Reaktion werden komplementäre RNA Moleküle abgebaut (Eggert und Fischer 2003). Eine Möglichkeit, die siRNA in die Zellen einzubringen, ist die Lipofektion mittels HiPerFect Transfection Reagent. Es wurde versucht, eine transiente CUX1 Herunterregulierung oder Knock-down mittels CUX1 siRNA zu erreichen. Hierzu wurden in einem einzelnen Vorversuch vier verschiedene siRNA-Oligonukleotide getestet und der Erfolg des transienten Knock-downs mittels qRT-PCR analysiert. Eine siRNA wurde hiernach für alle weiteren Transfektionen verwendet wie im Ergebnisteil unter 5.1 beschrieben. Immer wurden die Transfektionsversuche mit silencer-negativer Kontroll siRNA des gleichen Herstellers als Negativkontrolle (NTC) durchgeführt. Dies ist eine vom Hersteller als Kontrolle entwickelte unspezifische RNA Sequenz.

Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Vorversuch wurde ein einzelner Transfektionsversuch analysiert. In den Folgeversuchen mit qRT-PCR Analyse wurden jeweils biologische Duplikate in beiden Zelllinien angelegt und analysiert. Der

unten beschriebene Versuch mit Western Blot basiert auf Einzelexperimenten. Der Array-Versuch wurde mit biologischen Duplikaten in beiden Zelllinien, das Luciferase-Assay wurde mit biologischen Triplikaten in beiden Zelllinien durchgeführt.

Im Vorversuch wurden 400.000 der HepG2 Zellen und 200.000 der Hep3B Zellen pro Well einer 6 Well Platte mit je 2mL Medium ausgesät und bis zur Transfektion inkubiert. Bei den weiteren Versuchen zur Transfektion der Zellen vor Hypoxie- und CoCl<sub>2</sub>-Behandlung wurden die Zellen zunächst passagiert und gezählt. Je 1 Million Zellen wurde in eine T-25 Zellkulturflaschen überführt und bis zur Transfektion bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> und bei 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde nach Herstellerprotokoll mit siRNA, serumfreiem Medium und dem HiPerFect Transfektion Reagenz hergestellt.

**Tabelle 11:** Transfektionsprotokoll

Größe	siRNA (20 µM)	Medium o. S.	HiPerFect	siRNA Konzentration
400.000 Zellen in 2,3 mL Well	2,4 µL	97,6 µL	12 µL	20 nM
1 Mio. Zellen in T-25 Kulturflasche	4,8 µL	195,2 µL	24 µL	20 nM

Das Transfektionsgemisch wurde mit dem Vortexmischer gründlich durchmischt. Anschließend wurde es für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung der Transfektionskomplexe zu erlauben und daraufhin tropfenweise zu den Zellen gegeben und vorsichtig durch Bewegen der Flasche auf den Zellen verteilt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert, bevor sie weiter analysiert oder behandelt wurden.

#### 4.2.3 Hypoxieinduktion mit CoCl<sub>2</sub>

Cobalt(II)-chlorid (CoCl<sub>2</sub>) ist ein aus Cobalt und Chlor bestehende Verbindung welche zur chemischen Induktion von Hypoxie in Zellen genutzt wird. CoCl<sub>2</sub> stabilisiert HIF-1α indem es die Bindung von HIF-1α zu dem von Hippel-Lindau Protein verhindert und HIF-1α so dem Abbau entgeht (Yuan et al. 2003). Die Behandlung der Zellen mit CoCl<sub>2</sub>

erfolgte gemäß dem von Wu und Yotnda beschriebenen Protokoll (Wu und Yotnda 2011). Nach dem Subkultivieren wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert bevor mit der Behandlung begonnen wurde. Zur Behandlung der Zellen mit CoCl<sub>2</sub> wurde stets frische Lösung angesetzt. Für 25 mM Stock-Lösung wurden 0,1485g Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat in 25 mL Aqua dest. gelöst und die Lösung steril gefiltert. Die gewünschte Menge frisches Medium wurde mit 150 µM CoCl<sub>2</sub> aus der Stock-Lösung angesetzt und das frische Medium gegen das alte Medium in den Zellkulturflaschen komplett ausgetauscht. Die Zellen wurden bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert und nach 6 bzw. 24 Stunden wurde die Protein- oder RNA-Isolation durchgeführt.

#### **4.2.4 Hypoxieinduktion in der Hypoxiekammer**

Die Zellen wurden ohne vorherigen Mediumwechsel in Zellkulturflaschen die Hypoxiekammer überführt und dort für 6 bzw. 24 Stunden bei 37°C bei einem Sauerstoffgehalt von 0,5% inkubiert. Die Bedingungen wurden während der gesamten Dauer durch das elektronische System der Kammer überwacht und aufgezeichnet. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellkulturflaschen sofort auf Eis gebracht, das Medium entfernt und die RNA- und Proteinisolation ohne Zeitverzögerung durchgeführt, um den gewünschten Effekt zu erhalten.

#### **4.2.5 RNA-Isolierung**

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mini Plus Kit von Qiagen verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde durchgehend auf Eis gearbeitet. Nach der Isolation wurde die RNA-Konzentration der Proben mit dem NanoDrop Spectrophotometer von Peqlab bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit der Probe wurde die Absorption der Proben bei 260 nm sowie 280 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient E<sub>260nm</sub>/E<sub>280nm</sub> wurde bestimmt wobei reine RNA ein Verhältnis von 2:1 aufweist. Die Proben wurden direkt verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

#### **4.2.6 cDNA-Synthese**

Die gewonnene RNA wurde in komplementäre DNS (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde das iScript cDNA Synthesis Kit von BIO-RAD verwendet, welches nach

Herstellerprotokoll durchgeführt wurde. Es wurde durchgehend auf Eis gearbeitet. Die Zusammensetzung der Proben gemäß Tabelle 12 ergab eine finale RNA-Konzentration von 200 ng in 20 µL wobei die zugegebene Menge nukleasefreies Wasser entsprechend angepasst wurde.

**Tabelle 12:** Probenzusammensetzung für cDNA Synthese.

Komponente	Volumen
5x iScript reaction mix	4 µL
iScript Reverse Transkriptase	1 µL
Nukleasefreies Wasser	X µL
mRNA200 ng	X µL
<b>Totalvolumen</b>	20 µL

Die Proben wurden im Thermocycler mit dem entsprechenden Reaktionsprotokoll in Tabelle 13 inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 13:** Reaktionsprotokoll der cDNA-Synthese.

Reaktionszyklen	Temperatur
5 Minuten	25 °C
30 Minuten	42 °C
5 Minuten	85 °C

#### 4.2.7. Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, auch quantitative Real-Time PCR genannt (q-RT-PCR), bietet zur herkömmlichen Polymerasekettenreaktion die Möglichkeit, die Menge der analysierten DNA der Ausgangsprobe zu quantifizieren. Hierzu wird der zur Menge des entstehenden DNA-Produktes proportionale Anstieg der Fluoreszenz des verwendeten Farbstoffes gemessen. Es erfolgt die Berechnung des sogenannten Threshold-Cycle Wertes (Ct-Wert), an dem die Fluoreszenz die des Hintergrunds überschreitet. Die Quantifizierung erfolgt relativ zur Fluoreszenzmessung eines Referenzgens, von welchem angenommen wird, dass es auch unter Versuchsbedingungen stets stabil exprimiert wird. In den durchgeführten Messungen wurde hierzu Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse verwendet.

Für die quantitative Echtzeit-PCR (q-RT-PCR) wurde das ssoFast™ EvaGreen® Supermix Kit eingesetzt. Dieses wurde nach Herstellerangaben angewandt und die Schritte auf Eis durchgeführt. Die zuvor hergestellten cDNA-Proben wurden, mit den im Folgenden aufgeführten Mengenverhältnissen, mit dem jeweiligen Primer und dem ssoFast™ EvaGreen® Supermix zusammengeführt.

**Tabelle 14:** Probenzusammensetzung für q-RT-PCR.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
ssoFast™ EvaGreen® Supermix	10 µL
Primer	2 µL
Nukleasefreies Wasser	6 µL
cDNA-Probe	2 µL
<b>Totalvolumen</b>	20 µL

Zur Erstellung einer Standardkurve wurde jeweils pro Versuchsreihe aus 5 µL Probe eine Verdünnungsreihe mit 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 angelegt. Zudem wurde bei jeder Versuchsreihe zur Reinheitskontrolle reines Wasser mitlaufen gelassen. Die Proben wurden in geeignete 96-Well PCR Platten gegeben, welche mit Abdeckfolie verschlossen wurden. Die Probengemische wurden anschließend für 15 Sekunden bei 300 g zentrifugiert. Die q-RT-PCR wurde mit dem CFX 96™ RT PCR Detection System durchgeführt. Hierzu wurde folgendes Protokoll aus Tabelle 15 verwendet. Die Erfassung der Daten erfolgte mit der zugehörigen CFX Manager™ Software und die Analyse mittels der REST 2008 Software (siehe 4.2.13).

**Tabelle 15:** Protokoll q-RT-PCR.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
1. Enzymaktivierung	95°C	30 Sekunden	1
2. Denaturierung	95°C	1-5 Sekunden	30-40
3. Annealing/Extension	55°C	1-5 Sekunden	
4. Schmelzkurve	65°C – 95°C (Anstieg in 5°C Schritten)	2-5 Sekunden pro Anstieg um 5°C	1

#### **4.2.8. Proteinisolierung**

Für 50 mL Proteinlysatpuffer wurde 10 mM Hepes-Puffer angesetzt, welcher unter Zugabe von NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,6 gebracht wurde. Als Zusätze wurden je eine Tablette complete Mini-Protease Inhibitor Cocktail und phosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail von Roche zugegeben. Die Kombination mehrerer Proteaseinhibitoren und Phosphataseninhibitoren dient der Verhinderung von Proteindegradation und Dephosphorylierung der Proteinprobe. Zur Gewinnung von Proteinproben aus dem Zellmaterial wurden die zuvor behandelten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung wie oben beschrieben gelöst und gezählt. Zusammen mit dem gesammelten Medium wurden die gelösten Zellen in einem Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet in 80 µL des zuvor hergestellten Proteinlysatpuffers gelöst. Die Proteinproben wurden anschließend für 30 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde behalten und bei -80°C gelagert.

#### **4.2.9. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der zuvor hergestellten Proben wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. Dieses beruht auf dem Prinzip der biuretischen Reaktion, bei welcher durch Protein in einem alkalischen Medium  $\text{Cu}^{+2}$  zu  $\text{Cu}^{+1}$  reduziert wird. Der Farbumschlag durch Reaktion von  $\text{Cu}^{+1}$  und Bicinchoninsäure (BCA) wird dann zur photometrischen Proteingehaltsbestimmung herangezogen.

Das Kit wurde nach Herstellerangaben angewendet, wobei als zunächst als Proteinstandard eine Verdünnungsreihe mit Bovinem Serumalbumin angelegt wurde. Die Proteinproben wurden mit Wasser 1:10 verdünnt und je 10 µL in eine 96-Well-Platte gegeben. Jede Probe wurde dreifach analysiert. 200 µL des Reagens bestehend aus BCA, Kupfersulfat und Pufferlösung wurde zu jeder Probe zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurden die Proben mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm analysiert und der Proteingehalt der Proben mit der SOFTmax Pro Software berechnet.

#### **4.2.10 Western Blot**

Bei der Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot wurde sich weitgehend an das Handbuch des NuPAGE electrophoresis system von Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA gehalten und die Geräte und Chemikalien des Herstellers verwendet.

### *Gelelektrophorese*

Zur Vorbereitung der Proben wurden 15 µg der Proteinproben mit 2,5 µL 4X NuPage LDS Probenpuffer und 1 µL 10X Reducing Agent vermischt und das Gemisch mit Wasser auf eine finale Menge von 10 µL gebracht. Die Proben wurden nun zur Denaturierung der Proteine bei 70°C für 10 Minuten inkubiert und auf Eis zwischengelagert. Der Laufpuffer wurde aus 50 mL 20X NuPAGE MOPS SDS Running Buffer und 950 mL Wasser hergestellt und in die Elektrophoresekammer gefüllt. Zu dem Puffer in der inneren Kammer wurden vor Elektrophoresebeginn zusätzlich 500 µL Antioxidant zugegeben. Die Dichtigkeit der inneren Kammer wurde vor Befüllen der äußeren Kammer mit Laufpuffer überprüft. Das NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel wurde vor Einsetzen in die Kammer mit Aqua dest. gespült. Die Geltaschen wurden nach Entfernen des Kammes mit den denaturierten Proteinproben gemischt beladen. Zudem wurden je ein gefärbter und ein ungefärbter Proteinstandard in separate Taschen geladen. Die Elektrophorese wurde nach sorgfältigem Verschluss der Kassette für 50 Minuten bei 200 Volt durchgeführt.

### *Semi-dry Transfer*

Für den Transfer nach semi-dry Methode wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll pro Gel jeweils 100 mL Transferpuffer aus 10 mL 20X NuPAGE Transferpuffer, 0,1 mL NuPAGE Antioxidant und 10 mL Methanol sowie 79,9 mL Aqua dest. hergestellt. 4 Lagen Filterpapier und die Transfermembran aus Nitrozellulose wurden mit dem Transferpuffer getränkt. Nach vorsichtiger Entnahme des Gels wurde folgende Schichtung auf der Anodenplatte für den Blot angeordnet: 2 Lagen Filterpapier, darauf die Transfermembran, darauf das Gel und darauf erneut zwei Lagen Filterpapier. Der Transfer wurde nun bei 15 Volt für 30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde das Ergebnis des Transfers mittels Ponceau-Färbung kontrolliert. Nach Auswaschen des Farbstoffes wurde die Nitrozellulosemembran daraufhin für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-Tween Lösung mit 1% BSA-Zusatz geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in entsprechender Konzentration in TBS-T bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wurde die Membran zunächst dreifach mit TBS-T für jeweils 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde sie mit dem in TBS-T verdünnten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wiederum dreimalig gewaschen.

### *Immunodetektion*

Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit ECL-Substrat benetzt und für eine Minute inkubiert, bevor die Bildaufnahme in der Detektionskammer erfolgte. Die Auswertung der erhaltenen Werte für die Dichte der Banden erfolgte mit der Bio-1D Software. Zur korrekten Auswertung der gemessenen Dichte der Banden erfolgte jeweils eine Ladungskontrolle mit  $\beta$ -Aktin. Hierzu wurde jede Membran nach Aufnahme des ersten Bildes mit dem Restore™ Plus Western Blot Stripping Puffer von Thermo Scientific nach Herstellervorgaben gestriipt. Hierfür wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, um das ECL-Substrat zu entfernen und für 15 Minuten mit dem Stripping Puffer inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde die Membran für eine Stunde in TBS-T bei Raumtemperatur geblockt. Nach Kontrolle des erfolgreichen Strippings durch eine erneute Bildaufnahme erfolgte die Inkubation der Membran mit  $\beta$ -Aktin als Primärantikörper und ein weiteres Vorgehen zur Immunodetektion wie oben beschrieben.

#### **4.2.11 Zellstress Array**

Das verwendete Zellstress Array beruht auf dem Prinzip eines Sandwich-Immunoassay. Ausgewählte „Capture“-Antikörper sind auf einer Nitrozellulosemembran punktförmig als Duplikate angeordnet sind. Zelllysate werden mit einem Cocktail aus Sekundärantikörpern gemischt und mit dem Array inkubiert. Streptavidin-HRP-Konjugat bindet als Detektionsantikörper auf die Proteine, welche an die Capture Antikörper gebunden sind. Ein Chemilumineszenz-Reagent wird hinzugefügt und so wird ein dem gebundenen Protein proportionales Signal erzeugt. Die Chemilumineszenz wird entsprechend der Methode bei Western Blot detektiert. Folgende Zellstressproteine befinden sich auf der Nitrozellulosemembran des verwendeten Arrays (in Bezeichnung des Herstellers):

ADAMTS1, Bcl-2, Carbonic Anhydrase IX, Cited-2, COX-2, Cytochrom c, DKK-4, FABP1/L-FABP, Dkk-4, HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, Phospho-HSP27 (S78/S82), HSP60,IDO, Phospho-JNK Pan (T183/Y185), NFkappaB1, p21/CIP1, p27/Kip1, Phospho-p38 alpha (T120/Y182), Phospho-p53 (S46), PON1, PON2, PON3, Thioredoxin-1, SIRT2, SOD2.

Das Human Cell Stress Array Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Zur Herstellung der Zelllysaten wurden die Zellen mit PBS gespült.  $10^6$  Zellen pro mL wurden im beigefügten Lysepuffer gelöst, welcher zuvor mit Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin

in Form der cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets von Roche Diagnostics versetzt wurde. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Kit bestimmt (s.o.). Es wurde eine Probenkonzentration zwischen 100-300 µg/mL angestrebt. Die Membranen wurden anschließend für eine Stunde unter Bewegung im beigefügten Arraypuffer 6 inkubiert. Die Zellysatproben wurden mit 0,5 mL des Arraypuffer 4 versetzt und mit Arraypuffer 6 auf insgesamt 1,5 mL aufgefüllt. Zusätzlich wurden je 20 µg des in 100µL Wasser gelösten Antikörpercocktails zugegeben und die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zugedeckt wurden die Membranen bei 4°C im Kühlraum über Nacht mit dem Antikörpergemisch unter Bewegung inkubiert.

Die Membranen wurden darauf mit je 20 mL Waschpuffer dreimal für 10 Minuten gewaschen. Streptavidin-HRP wurde in Arraypuffer 6 gelöst und die Membranen in je 2 mL des Gemisches für 30 min bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Membranen erneut dreimal in Waschpuffer gewaschen. Dann wurden die Membranen entnommen, abgetropft und mit der gekennzeichneten Fläche nach oben in die Plastikschrutzhülle gelegt. Sie wurden mit je 1 mL Chemi Reagent Mix bedeckt und mit Folie umwickelt, wobei Luftblasen vorsichtig ausgestrichen wurden. Mit der Kennzeichnungsnummer nach oben wurden die Membranen nun in der Vilber Chemilunimeszenskammer beleuchtet und die Daten mit der Herstellersoftware erfasst und analysiert.

#### **4.2.12 Luciferase Assay**

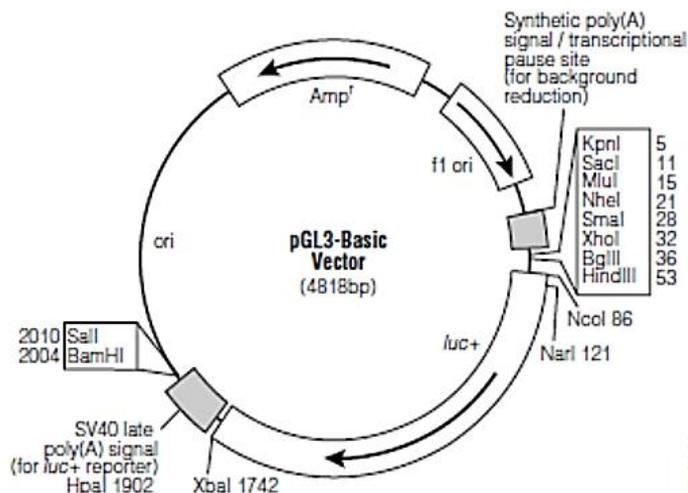
##### *Vektor-Plasmid*

HIF-1 $\alpha$  ist die regulatorische Untereinheit von HIF-1. Sie wird primär durch Hypoxie aktiviert, wenn die abbauenden Prolyl- und Asparaginyhydroxylasen inhibiert werden. HIF-1 $\alpha$  wird stabilisiert und in der Folge werden durch Bindung an HRE (Hypoxia responsive element) um die 100 Zielgene induziert, welche die Zellantwort auf Hypoxie steuern (Wenger et al. 2005).

Zur Quantifizierung der HIF-1 $\alpha$  Aktivität in Bezug auf HRE und wie diese Aktivität durch Modulation von CUX1 reguliert wird, wurde ein Luciferase Reporter Vektor in Form eines Plasmids mit HRE-Promoter verwendet. Dieses wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Jörg Hänze aus dem molekularbiologischen Labor der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Marburg überlassen. Die Konstruktion wurde in der Arbeit von Malec et. al. beschrieben (Malec et al. 2010).

Zur Konstruktion des Vektors wurde ein pGL3-TK Plasmid der Firma Promega verwendet. Es besteht aus einem Thymidinkinase-Reporter (TK-mp), gekoppelt an ein

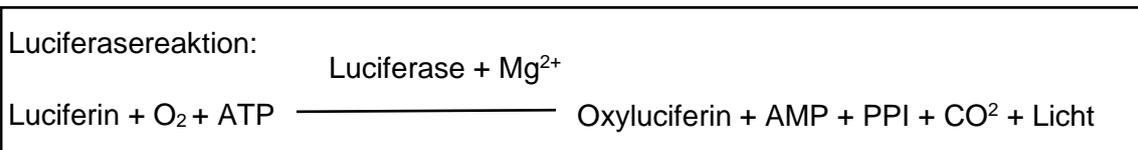
Firefly-Luciferasegen zur späteren Aktivitätsmessung mittels Lichtintensität bei der Luciferinumwandlung. Es wurden fünf Repeats des HRE entsprechenden Promoters des Phosphoglyceratkinasegens (HRE-PGK) an das 5`Ende der Thymidinkinase (TK-mp) einkloniert (Malec et al. 2010).



**Abbildung 6A:** Aufbau pGL3-Vektor aus TM033, Promega Corporation, Fitchburg (USA)

### Prinzip des Luciferase Assays

Dem Prinzip des Luciferase Testsystems gemäß wird ein Luciferase Gen als Reporter gen hinter den Promoter kloniert und die Plasmid-DNA in die Zelle eingebracht. Nach Zugabe von Luciferinsubstrat wird durch Luciferase Oxyluciferin und Licht erzeugt. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorher produzierten Menge Luciferase und somit proportional zur Aktivität des Promotors.



**Abbildung 6B:** Luciferasereaktion angelehnt an TB#281 von Promega Corporation, Fitchburg (USA)

### Durchführung von Kotransfektion und Assay

Als Luciferase Assay wurde das Luciferase Assay System von Promega verwendet welches auf der Reaktion der Firefly-Luciferase beruht und Coenzym A zur Stabilisierung des Lichtsignals beigibt. Zur Durchführung des Assays wurden zunächst auf einer für ELISA geeigneten 96-Well Platte 3x3 Wells mit 40.000 Zellen HepG2 und 3x3 Wells mit je 10.000 Zellen Hep3B in je 50 µL Medium ohne Serum ausgesät. Zunächst erfolgte die Kotransfektion von siRNA nach dem oben beschriebenen HiPerFect

Transfektionsprotokoll und von Plasmid-DNA mit dem Attractene Transfektionsreagent nach Herstellerprotokoll. Hierzu wurden pro Well 0,2 µg Plasmid-DNA und 0,75 µL Attractene Transfektionsreagent verwendet. Es wurden je drei Wells pro Zellreihe mit Plasmid-DNA und siRNA CUX1 kotransfiziert sowie eine je Reihe mit Plasmid-DNA und Negativ-Kontroll siRNA. Je eine Reihe blieb als Negativkontrolle untransfiziert. Pro Well wurden jeweils 0,2 µg DNA und 1,6 pmol siRNA zur Transfektion verwendet.

**Tabelle 16:** Versuchsaufbau Kotransfektion DNA-Plasmid und siRNA in 96-Well Platte.

<b>HepG2</b>	<b>HepG2</b>	<b>HepG2</b>
<b>HepG2 + siRNANTC + Plasmid</b>	<b>HepG2 + NTC + Plasmid</b>	<b>HepG2 + siRNANTC + Plasmid</b>
<b>HepG2 + siRNACUX1 + Plasmid</b>	<b>HepG2 + siRNACUX1 + Plasmid</b>	<b>HepG2 + siRNACUX1 + Plasmid</b>
<b>Hep3B</b>	<b>Hep3B</b>	<b>Hep3B</b>
<b>Hep3B + siRNANTC + Plasmid</b>	<b>Hep3B + NTC + Plasmid</b>	<b>Hep3B + siRNANTC + Plasmid</b>
<b>Hep3B + siRNACUX1 + Plasmid</b>	<b>Hep3B + siRNACUX1 + Plasmid</b>	<b>Hep3B + siRNACUX1 + Plasmid</b>

Die Platte wurde zunächst für 24 Stunden unter Normalbedingungen im Brutschrank inkubiert. Zur Hypoxieinduktion wurde die Platte nach Ablauf der 24 Stunden in die Hypoxiekammer überführt. Hier wurde sie unter ständiger Überwachung der Parameter bei 37°C bei einem Sauerstoffgehalt von 0,5% O<sub>2</sub>-Gehalt für exakt 24 Stunden inkubiert. Darauf wurde das Medium abgesaugt und jedes Well mit PBS gewaschen und mit je 20 µL Lysepuffer gefüllt. Nach gründlichem Verteilen und Bewegen des Puffers in den Wells wurden die Zellysate abgesaugt und in geeigneten Tubes bei 12 000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurden sie bei -80°C gelagert. Die Messung der Lichtintensität wurde im Folgenden mit dem GloMax® 96 Microplate Luminometer durchgeführt wobei die Messdauer des Lichtsignals mindestens 10 Sekunden betrug.

#### 4.2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erforderte durch die unterschiedliche Probengrößen der Einzelversuche eine differenzierte Abwägung.

Die Ergebnisse qRT-PCR Versuche erfolgten als Angabe der normalisierten relativen Expression des Zielgens gegenüber der Referenzgens. Die Normalisierung erfolgte unter Verwendung des Haushaltsgens GAPDH wie o.g., welches als nicht weiter reguliert und stabil im verwendeten Gewebe exprimiert angenommen wird. Hierdurch reduziert sich die Streuung der Expressionsergebnisse, da verschiedene Gewebeeffekte und Extraktionskoeffizienten der einzelnen Proben berücksichtigt werden können, welche sowohl Referenz- als auch Zielgen beeinflussen.

Wie bereits erwähnt, wird als Ct-Wert die Anzahl von PCR-Zyklen angegeben, welche zum Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus erforderlich sind. Bei dieser Wiederholungszahl befindet sich in jedem Reaktionsgefäß eine gleiche Menge synthetisierter DNS. Bei einer theoretisch angenommenen Effizienz der PCR von 100% verdoppelt sich dabei in jedem Zyklus die Produktmenge. Dies wird in der Literatur als Effizienzkoeffizient angegeben, dabei ist die Festlegung eines Wertes von  $E = 2$  bei einer Effizienz von 100 % gebräuchlich. (Pfaff et. al 2004). Da die Effizienz der Verdopplungsrate während der PCR von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden kann, gibt es Möglichkeiten, näherungsweise die Effizienz der einzelnen PCR-Messungen zu bestimmen und in die jeweilige Auswertung einfließen zu lassen, wie weiter unten beschrieben wird.

Für den zunächst durchgeführten Vorversuch zum Test des Effektes mehrerer siRNAs (siehe Ergebnisteil 5.1) erfolgte eine Messung mit technischen Replikaten. Hier wurde die relative Quantifizierung des mRNA Expressionsniveaus durch die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode angewandt: Zunächst wird hierbei zur Normalisierung jeder Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des untersuchten Zielgens abgezogen ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$ ). Von der so entstandenen Differenz ( $\Delta\text{Ct Zielgen}$ ) wird die ebenfalls bestimmte Differenz zwischen Ct-Wert des Kontrollgens der Zielgruppe und der Referenzgruppe ( $\Delta\text{Ct Kontrollgen}$ ) abgezogen:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Zielgen} - \Delta\text{Ct Kontrollgen}$$

Mit der arithmetischen Formel  $R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  kann der relativer Expressionsunterschied (Ratio) zwischen behandelter Probe und Kontrolle normalisiert zum Referenzgen als Verhältnis in Form einer dimensionslosen Größe dargestellt werden. In diesem Modell wird eine optimale Effizienz der PCR von  $E = 2$  angenommen. (Livak und Schmittgen,

2001), was wie o.g. durch vielfältige Einflussfaktoren auf den Reaktionsablauf nicht der Wirklichkeit entsprechen muss.

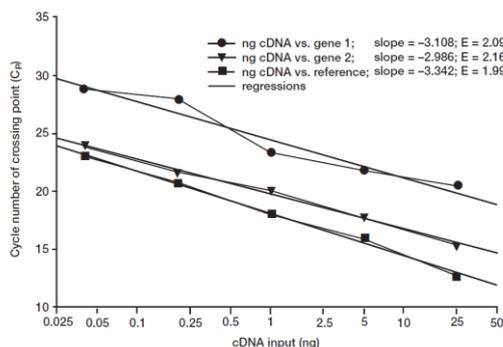
Eine effizienzkorrigierte Auswertung mittels der u.g. REST-Software, welche eine jedoch in diesem Fall nicht verwertbare statistische Wertung mit einschließt, wurde zur Kontrolle im Anhang mit aufgeführt. Eine weitere statistische Wertung des einmalig durchgeführten Experimentes erfolgte nicht.

Die weiteren qRT-PCR Analysen der Transfektionskontrolle (Abb. 8C) und der weiteren Folgeversuche, in welchen jeweils biologischen Duplikate vorlagen, erfolgten mittels der von Pfaff et. al entwickelten REST-Software 2008 (REST = Relative Expression Software Tool). Die Software bietet den Vorteil unterschiedliche Behandlungsgruppen (hier beispielsweise unterschiedliche Hypoxiebehandlungen) auch unterschiedlicher Größen mit einer Kontrollgruppe vergleichen zu können.

Zudem kann hierbei die Effizienz der einzelnen PCR-Analysen näherungsweise bestimmt werden und in die Ergebnisinterpretation mit einfließen. Hierzu sind mehrere Methoden möglich. Erstens kann, wie in dieser Arbeit angewendet, eine Standardkurve aus unterschiedlichen cDNA Verdünnungsstufen der verwendeten Proben angelegt werden. Deren messbare Steigerung legt die RT-PCR Effizienz fest, indem die eingesetzte Menge an cDNA (mRNA) in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dargestellt wird. Die Effizienz berechnet sich nach der Formel:

$$E = 10^{(-1/Steigung)}$$

$E$  kann hierbei, wie in der Literatur üblich, vom Minimalwert 1 bis 2 (theoretisches Maximum und Optimum der Effizienz mit vollständiger Verdopplung der cDNA in jedem Zyklus) reichen. (Pfaffl et. al 2002). Alternativ ist eine Berechnung der absoluten Effizienz aus dem absoluten Fluoreszenzanstieg in der exponentiellen Phase der PCR möglich oder verschiedene Berechnungen mittels mathematischer Algorithmen. Während erstere Methode die reelle Effizienz überschätzen kann, d.h. Werte von  $> 2$  theoretisch möglich sind, kann Zweitgenannte sie unterschätzen. (Pfaffl et. al 2002).



**Abb. 7:** PCR Effizienzberechnung auf Basis einer Verdünnungskurve nach  $E = 10^{(-1/Steigung)}$  aus Pfaffl et. al 2004.

Die Effizienzkorrektur fließt in die Berechnung der relativen Expression mit ein. Die Normalisierung erfolgt mittels Bestimmung der mittleren Expressionsunterschiede der Versuchsgruppen und über ein festgelegtes Haushaltsgen (hier GAPDH):

$$R = \frac{(E \text{ Zielgen})^{\Delta CT \text{ Zielgen (MW Kontrolle-MW Behandlung)}}}{(E \text{ Referenzgen})^{\Delta CT \text{ Referenzgen (MW Kontrolle-MW Behandlung)}}$$

Inkludiert in der REST-Software ist eine statistische Auswertung mittels des „Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test©“. Dieser Test basiert auf einer Wahrscheinlichkeitsanalyse nach einer festgelegten hohen Zahl von Ergebnisrandomisierungen. Im Vergleich zu parametrischen Tests wie dem t-Test, ist hier keine vorherige Annahme einer Normalverteilung in der Datengesamtheit notwendig.

Der Test bestimmt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Behandlungseffekts durch zufällige Zuordnung (Randomisierung) der beobachteten Testergebnisse. Unter Annahme der Nullhypothese, also dass kein Behandlungseffekt vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass eine wiederholte Randomisierung der Testergebnisse Behandlungseffekte von gleichen Proportionen wie der tatsächlich gemessene Behandlungseffekt zeigt.

Es erfolgt die wiederholte Randomisierung der Ct-Werte der einzelnen Probe zu einer unbehandelten Probe (zweiseitig gepaarter Test) und die Bestimmungen der jeweiligen relativen Expression. Ist der Anteil von zufälligen Zuordnungen, in welchen der Behandlungseffekt größer als der Effekt in der reell zugeordneten Behandlungsgruppen ist, sehr klein, so ist dies ein Hinweis, dass der tatsächlich beobachtete Effekt nicht zufällig zustande gekommen ist, sondern ein signifikantes physiologisches Genexpressionskorrelat hat. Hierfür muss die zufällige Zuordnung sehr oft wiederholt werden (>10 000 x) um eine Näherung an den p-Wert angeben zu können. Ist also nach mehr als 10 000 durchgeführten Randomisierungen der Prozentsatz an in den Randomisierungen höher als in der tatsächlichen Behandlungsgruppe gemessenen Expressionsunterschieden unter 5%, wird folgende Aussage getroffen: Die Wahrscheinlichkeit, dass der Behandlungseffekt Zufall ist, liegt bei <5% und der p-Wert wird mit  $p < 0,05$  angegeben (Pfaffl et. al 2002).

Aufgrund der in der vorgestellten Arbeit limitierten Probengröße, sind jedoch statistische Wertungen nur eingeschränkt möglich. Die von der REST Software ausgewerteten statistischen Analysen beziehen sich in u.g. Versuchen auf biologische Duplikate in zwei

Zelllinien. Daher wurde auf eine Signifikanzberechnung und deren Darstellung verzichtet. Die in den Abbildungen angegebenen Fehlerbalken beziehen sich auf die Abweichung der Mittelwerte der Duplikate. Die o.g. statistische Analyse der REST Software für die qRT-PCR Ergebnisse der biologischen Replikate ist im Anhang dargestellt. Eine statistische Analyse zweier Replikate ist möglich, die Aussagekraft jedoch eingeschränkt, sodass auf eine Darstellung im Ergebnisteil verzichtet wurde. Im Luciferase Assay wurde drei biologische Replikate analysiert. Somit erfolgte hier eine statistische Auswertung der Messwerte mittels Standardabweichung und Standardfehler, sowie die Signifikanzbewertung mittels zweiseitigem t-Test. Das statistische Signifikanzniveau für aussagekräftige Ergebnisse wurde hier mit  $p < 0,05$  festgelegt.

**Tabelle 17:** Übersicht der analysierten Proben und Auswertungsmethoden:

Versuch	Probengröße	Auswertung
Abb. 8A/B (qRT-PCR)	Einzelexperiment mit <ul style="list-style-type: none"> <li>zwei Zelllinien</li> </ul>	Relative normalisierte Expressionsdarstellung mittels $2^{\Delta\Delta CP}$
Abb. 8C (qRT-PCR)	Biologische Duplikate mit <ul style="list-style-type: none"> <li>zwei Zelllinien</li> <li>zwei Zeitpunkten</li> </ul>	Relative normalisierte Expressionsdarstellung mittels $2^{\Delta\Delta CP}$
Abb. 12-13 (Western Blot)	Einzelexperiment mit <ul style="list-style-type: none"> <li>zwei Zelllinien</li> </ul>	Densitometrische Messung und Bilddarstellung
Abb. 14-20 (qRT-PCR)	Biologische Duplikate mit <ul style="list-style-type: none"> <li>zwei Zelllinien</li> <li>zwei Zeitpunkten</li> </ul>	Effizienzkorrigierte normalisierte relative Expression mittels REST
Abb. 21-22 (Zellstress-Array)	Biologische Duplikate mit <ul style="list-style-type: none"> <li>zwei Zelllinien</li> </ul>	Densitometrische Messung und Bilddarstellung
Abb. 23 (Luciferase Assay)	Biologische Triplikate <ul style="list-style-type: none"> <li>zwei Zelllinien</li> </ul>	Luminometrische Messung  Statistische Analyse mit Standardabweichung und Standardfehler  Zweiseitiger t-Test

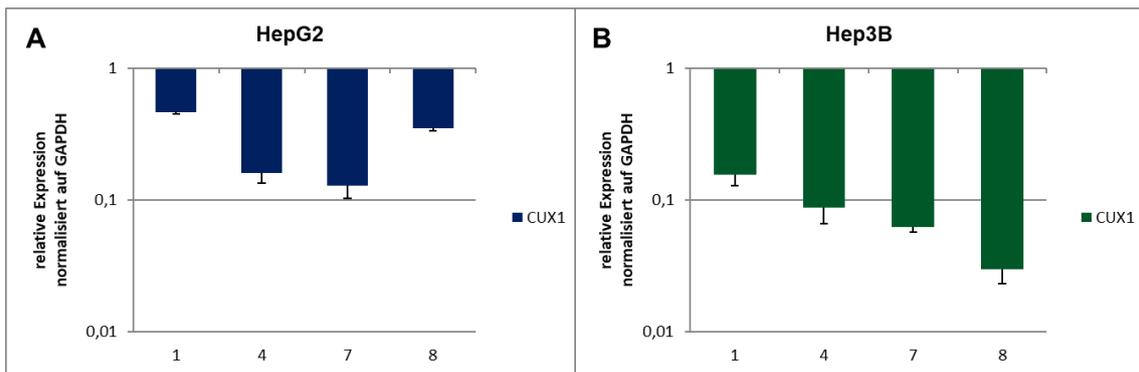
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Transienter knock-down von CUX1 RNA in Hep3B und HepG2 Zelllinien wird nach Transfektion mit spezifischen siRNS beobachtet

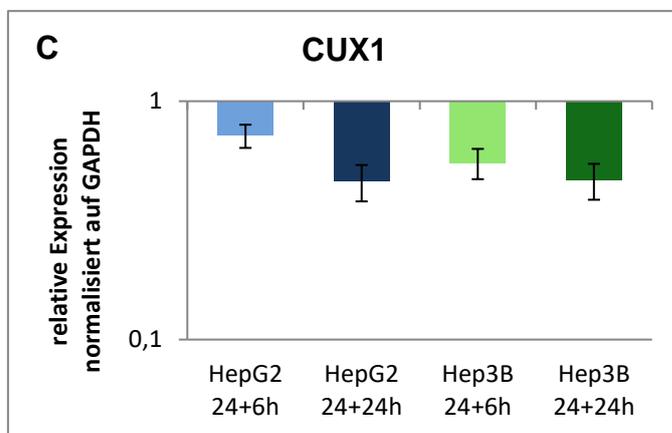
Zunächst wurde versucht durch Einbringen von siRNA mittels Lipofektion eine transiente Unterdrückung von CUX1 zu erreichen, um im Anschluss den Effekt der Herunterregulierung („knock-down“) von CUX1 auf die Hypoxiereaktion der Zelle analysieren zu können. Hierzu wurden zunächst vier verschiedene siRNA-Oligonukleotide in den beiden hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 und Hep3B getestet. Die Zelllinien wurden gleichzeitig nach Aussaat transfiziert und nach weiteren 24 Stunden erfolgte die RNA-Isolation zur Analyse des Erfolgs der Transfektion mittels q-RT-PCR. Die Ergebnisse wurden gegen GAPDH als endogene Kontrolle normiert und in Relation zur Negativkontrolle des siRNA Transfers gesetzt. Die Negativkontrolle erfolgte nach identischem Transfektionsprotokoll mit Verwendung einer unspezifischen siRNA (im Folgenden referenziert als NTC für „negative transfection control“).

In den HepG2 Zellen zeigte sich eine Tendenz zur Herunterregulierung von CUX1 mRNA nach 24h mit allen verwendeten siRNAs und stärkster Ausprägung in siRNA 4 und 7 (Abbildung 8A). In der Hep3B Zelllinie zeigte sich ebenfalls mit allen verwendeten siRNAs ein Effekt, mit stärkster Ausprägung mit siRNA 7 und 8 (Abbildung 8B). Mit siRNA 7 wurde in diesem Vorexperiment eine Herunterregulierung in HepG2 eine Herunterregulierung um den Faktor 7,8 beobachtet. In den Hep3B Zellen ließ sich eine Herunterregulierung um das 16-fache mit siRNA7 beobachten. In Folge wurde siRNA7 für alle weiteren Transfektionsversuche ausgewählt. Die Messwerte finden sich im Anhang in Tabelle 18.

In Folge wurde zu den durchgeführten Hypoxiebehandlungen parallel eine sonst unbehandelte Transfektionskontrolle mit siRNA CUX-1 Nr 7 in beiden Zelllinien jeweils zwei biologischen Replikaten zu den zwei festgelegten Analysezeitpunkten, 24 Stunden nach Transfektion und 6 oder 24 Stunden nach Hypoxiebehandlung, mitgeführt (Abbildung 8C). Hier zeigte sich ebenfalls der Hinweis einer erreichten Herunterregulierung von CUX1 in beiden Zelllinien. Der Reduktionsfaktor der RNA Transkription lag jedoch bei diesen Folgeversuchen zwischen 1,4 (HepG2) und 1,8 (Hep3B) nach 30 Stunden und 2,2 (HepG2 und Hep3B) nach 48 Stunden. Basierend auf diesen Beobachtungen lässt sich ein transienter Effekt der CUX1 siRNA Transfektion vermuten. Um den Effekt einer Hypoxiebehandlung unter maximal beobachteter Herunterregulierung zu studieren, wurde daher ein Behandlungsstart nach 24 Stunden gewählt.



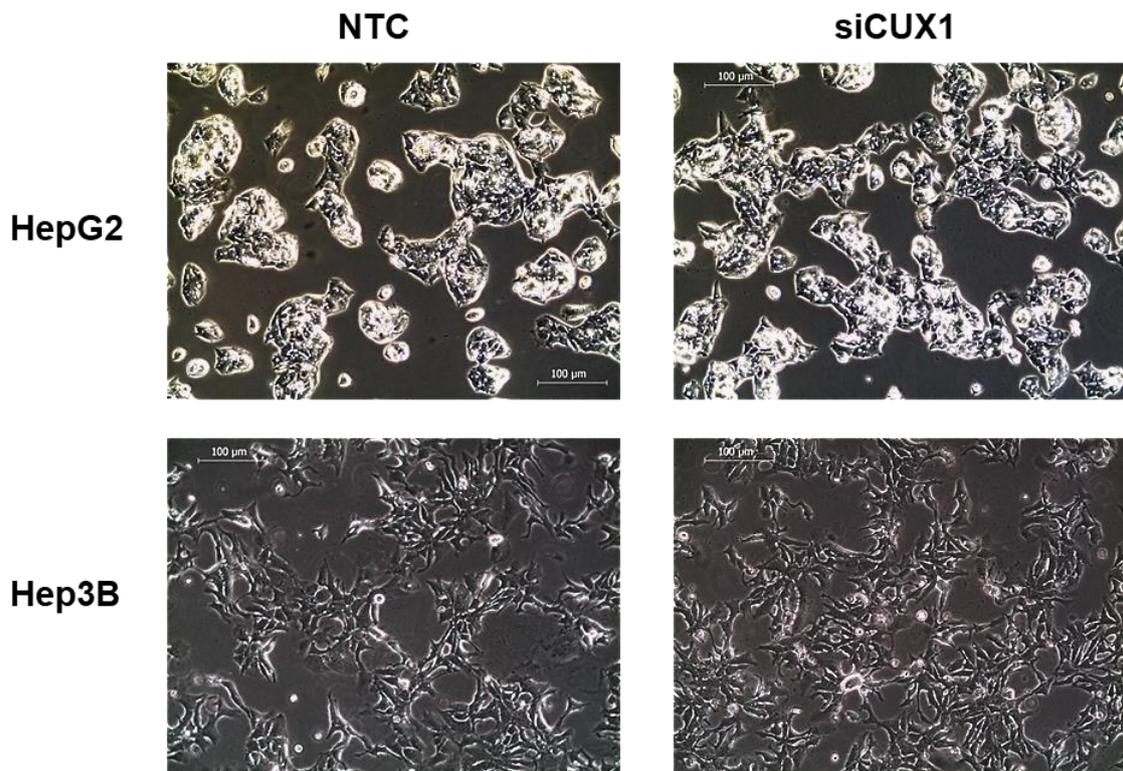
**Abbildung 8A/B:** q-RT-PCR Analyse von CUX1 in **A:** HepG2 und **B:** Hep3B Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit siRNA CUX1 (siRNA 1, siRNA 4, siRNA 7, siRNA 8). Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert und die Ergebnisse sind in Relation zur Negativkontrollprobe mit unspezifischer RNA dargestellt (NTC), die als Wert von 1 gesetzt ist. Die y-Skala ist 10-logarithmisch skaliert. Dargestellt sind die gemittelten Werte der zweifach analysierten Proben (technische Duplikate) mit Angabe der Mittelwertabweichung (SEM) der Duplikate als Fehlerbalken. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 8C:** q-RT-PCR Analyse von CUX1 in HepG2 und Hep3B Zellen nach 24 Stunden Transfektion mit siRNA CUX1 7 zu unterschiedlichen Analysezeitpunkten. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert und die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe, die als Wert von 1 gesetzt ist. Die y-Skala ist logarithmisch skaliert. Dargestellt sind die gemittelten Werte der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente mit Angabe der Mittelwertabweichung (SEM) als Fehlerbalken. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

## 5.2. Hypoxieinduktion mit $\text{CoCl}_2$ und Inkubation bei 0,5% Sauerstoff führen zu stärker veränderter Zellmorphologie nach knock-down von CUX1

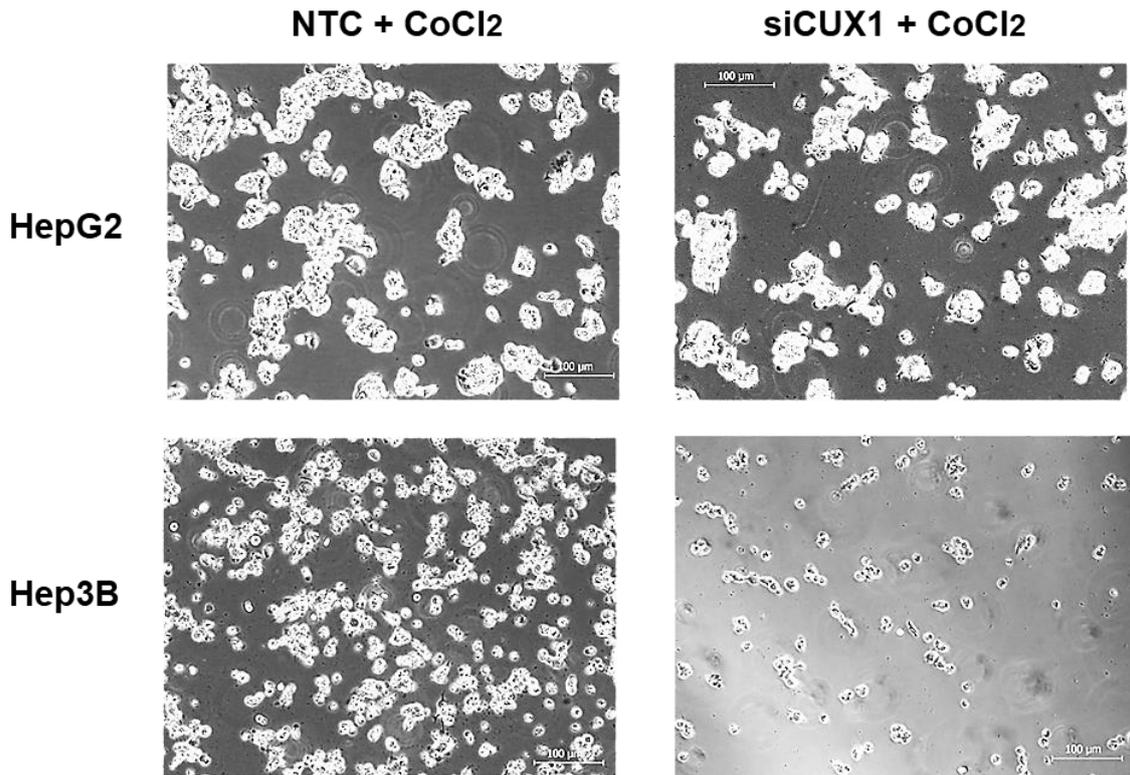
Der Zusammenhang von CUX1 und der Zellreaktion unter Hypoxie wurde mittels oben beschriebener Transfektion von siCUX1 in Kombination mit einer Hypoxiebehandlung der Zellen untersucht. Zur Induktion von Hypoxie in den Zelllinien wurden diese gemäß dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll mit  $150 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  behandelt. Zum Vergleich dieser chemischen Methode mit der Reaktion der Zelle auf physikalischen Sauerstoffmangel, wurden die Zellen parallel unter Hypoxiebedingungen mit 0,5% Sauerstoff für die gleiche Zeitdauer inkubiert. Die Transfektion mit siRNA CUX1 (siCUX1) erfolgte immer 24 Stunden vor Weiterbehandlung mit  $\text{CoCl}_2$  oder in der Hypoxiekammer. Gleichzeitig wurden Kontrollproben der Transfektion mit Negativ Control siRNA angelegt (NTC).



**Abbildung 9:** Aufnahme in 20-facher Vergrößerung. Oben: HepG2 Zelllinie Unten: Hep3B Zelllinie 24 Stunden nach Transfektion mit siRNA CUX1 (siCUX1) und Negativkontroll-siRNA (NTC) und 24 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen.

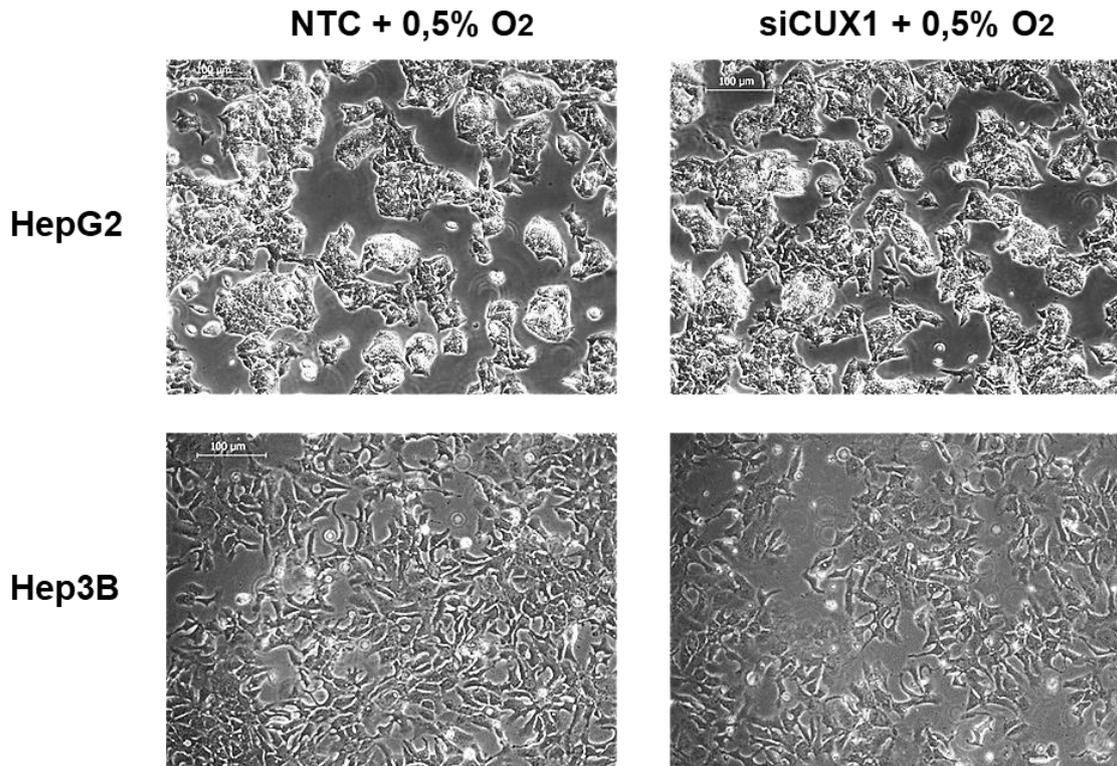
Zunächst erfolgte die optische Begutachtung aller Behandlungskombinationen aus Transfektion und Hypoxiebehandlung unter dem Mikroskop. Es zeigte sich, dass die alleinige Transfektion mit siCUX1 ohne anschließende Hypoxiebehandlung augenscheinlich keine morphologischen Veränderungen an beiden Zelllinien hervorruft (Abbildung 9). Hier zeigte sich das typische adhärenzte Wachstumsmuster mit Neigung zur Inselbildung bei der HepG2 Zelllinie. Die Hep3B Zelllinie zeigte ein typisches einschichtiges Wachstumsmuster.

Anschließend erfolgte die Transfektion mit NTC oder siCUX1 in beiden Zelllinien und eine Hypoxiebehandlung mit 150 µM CoCl<sub>2</sub> für 24 Stunden. Die Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> rief deutliche Veränderungen der Zellmorphologie hervor (Abbildung 10). Sowohl HepG2 als auch Hep3B Zellen zeigten sich in der Größe reduziert und von kugelförmiger Gestalt. Zu beachten ist die deutliche Verminderung der Zelldichte und Zellgröße der Hep3B Zellen nach Transfektion mit siCUX1 und Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> gegenüber der Negativkontrollprobe der Transfektion.



**Abbildung 10:** Aufnahme in 20-facher Vergrößerung. Oben: HepG2 Zelllinie Unten: Hep3B Zelllinie 24 Stunden nach Transfektion mit siRNA CUX1 (siCUX1) und Negativkontroll-siRNA (NTC) und 24 Stunden Behandlung mit 150 µM CoCl<sub>2</sub>.

Die Inkubation unter Hypoxiebedingungen (Abbildung 11) rief weitaus geringer ausgeprägte morphologische Veränderungen vor als die Behandlung mit CoCl<sub>2</sub>. Es zeigte sich eine leicht verringerte Wachstumsdichte bei den mit siCUX1 transfizierten Hep3B Zellen im Vergleich zur Transfektion mit Kontroll RNA. Diese optische Begutachtung der Zellen zeigte erste Hinweise darauf, dass die Anpassungsreaktion der Zellen, besonders der Hep3B Zelllinie, bei möglichem Fehlen bzw. Verringerung von CUX1 weniger ausgeprägt ist und die Zellen vulnerabler gegenüber den hypoxischen Stress sind.



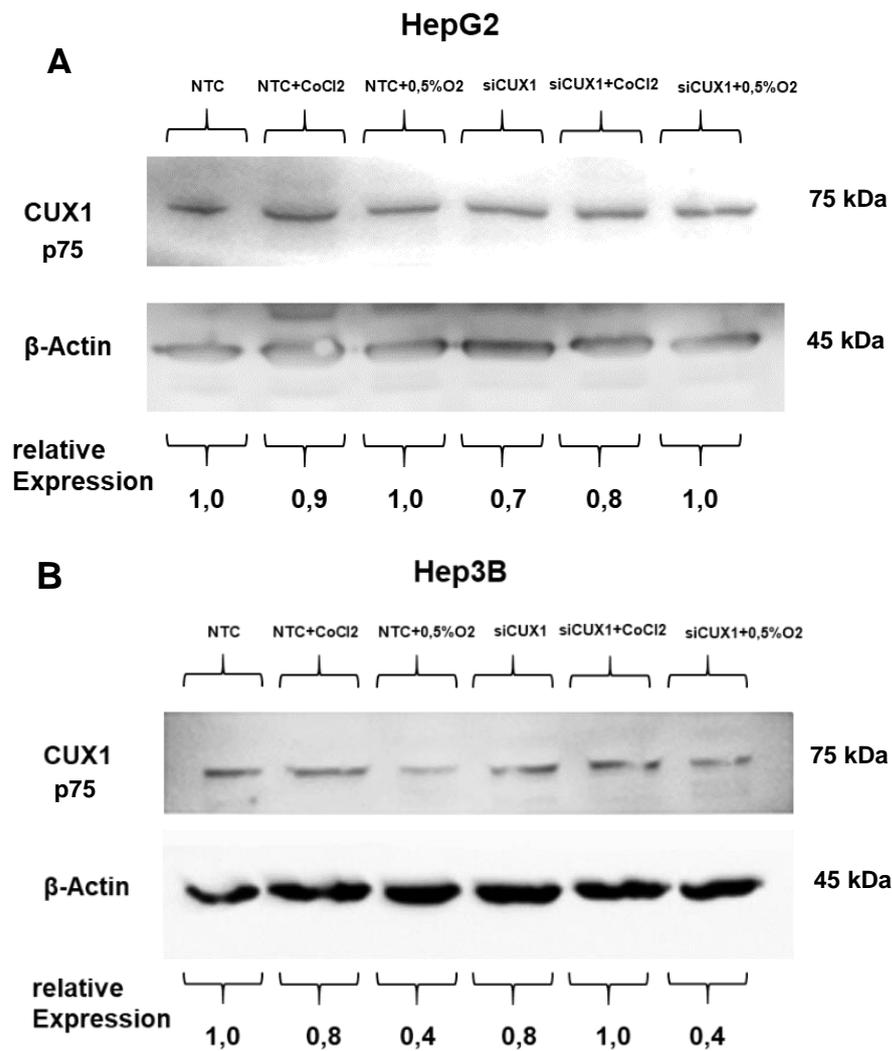
**Abbildung 11:** Aufnahme in 20-facher Vergrößerung. Oben: HepG2 Zelllinie Unten: Hep3B Zelllinie 24 Stunden nach Transfektion mit siRNA CUX1 (siCUX1) und Negativkontroll-siRNA (NTC) und 24 Stunden Behandlung mit 0,5% Sauerstoff.

### 5.3. Hypoxieinduktion zeigt keinen Effekt auf CUX1 auf Proteinebene

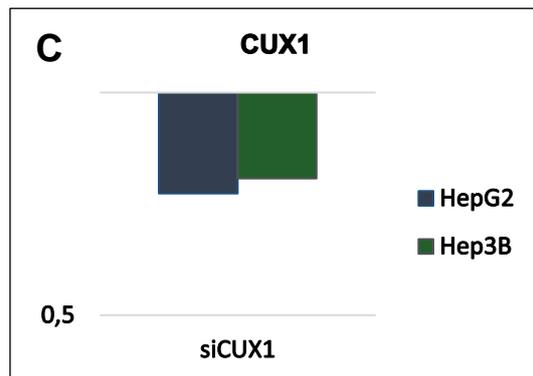
Zur Analyse des Effekts der siCUX1 Transfektion und der beiden Methoden der Hypoxiebehandlung der Zellen auf Proteinebene wurde ein semiquantitativer Western Blot für CUX1 durchgeführt (Abbildung 12 A und B). Die Hypoxiebehandlung erfolgte 24 Stunden nach erfolgter Transfektion. Der Analysezeitpunkt lag somit bei 48 Stunden nach Transfektion und 24 Stunden nach jeweiliger Hypoxiebehandlung bzw. Negativkontrolle ohne Hypoxiebehandlung. Die einzig darstellbare Bande entsprach dem Molekulargewicht der p75 Isoform von CUX1. Andere Isoformen ließen sich nicht darstellen, sodass diese für die Analyse verwendet wurde. Beide Zellreihen zeigten auf der Proteinebene eine allenfalls leicht verminderte Expression von CUX1 nach Transfektion mit siCUX1 im Vergleich zur Kontrollprobe der Transfektion (NTC) von 0,7 (HepG2) und 0,8 (Hep3B). Dies steht im Gegensatz zum Hinweis aus dem Vorversuch einer deutlichen verminderten Expression von CUX1 auf mRNA Ebene 24 Stunden nach siCUX1 Transfektion (siehe 5.1). Die geringfügige Abnahme der CUX1 Proteinkonzentration im Western Blot spiegelt sich annähernd in der geringfügigeren Abnahme der RNA Konzentration nach 48 Stunden (Abbildung 8C) wider. Dies könnte

durch einen transienten knock-down Effekt der siRNA erklärt werden. Eine klare Aussage über einen erreichten Knockdowneffekt auf Proteinebene kann also nicht getroffen werden und muss für die folgenden Ergebnisinterpretationen berücksichtigt werden.

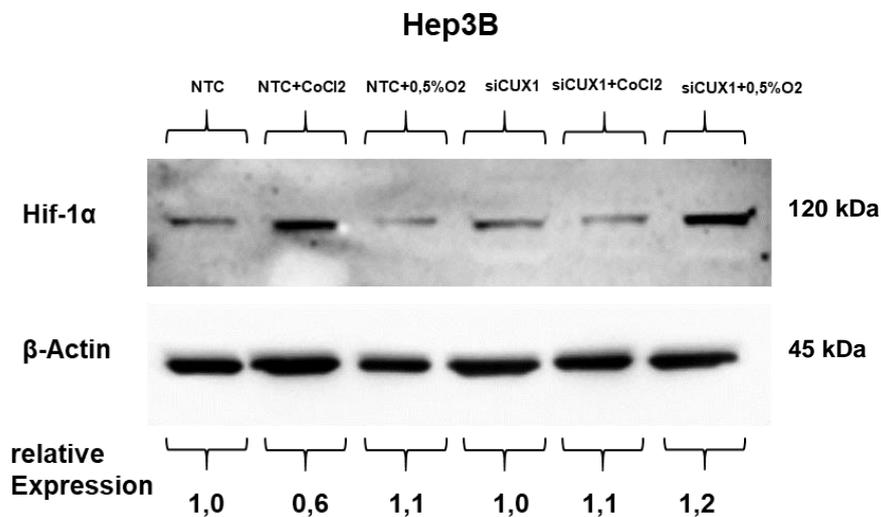
Die Hypoxiebehandlung mit  $\text{CoCl}_2$  für 24 Stunden zeigte bei beiden Zellen keinen wesentlichen Effekt auf die CUX1 Expression, dies ist relevant, um Behandlungseffekte zwischen transfektions- und hypoxiebehandelten Proben interpretieren zu können. Bei der Hypoxiebehandlung mit 0,5% Sauerstoff für den gleichen Zeitraum zeigte sich bei Hep3B ein Rückgang der CUX1 Expression um den Faktor 0,4. Hier ist von einem toxischen Effekt der Hypoxiebehandlung in der Hypoxiekammer auf die Hep3B-Zellen auszugehen, der bereits deutlich die reguläre Proteinexpression verändert. Dieser Effekt der Hypoxiebehandlung ist bei den HepG2 Zellen nicht zu beobachten



**Abbildung 12:** Western Blot mit **A:** HepG2 und **B:** Hep3B für das Protein CUX1 mit β-Actin als Ladekontrolle nach Transfektion der Zellen mit siRNA CUX1 oder Negativkontroll-siRNA und 24 Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder Inkubation unter 0,5% Sauerstoff. Angabe der densitometrischen Werte der Ausmessung. **C.** Die relative Proteinexpression von CUX1 in HepG2 und Hep3B nach Transfektion mit siRNA CUX1 nach 48 Stunden ohne Hypoxiebehandlung normalisiert gegen Negativkontroll-siRNA (NTC) mit logarithmisch skaliertes y-Achse.



Zur weiteren Analyse des starken Effektes der Hypoxie auf die Hep3B Zellen wurde ein Western Blot zum Nachweis des essentiellen Hypoxiemarkers HIF-1 $\alpha$  durchgeführt (Abbildung 13). Hier zeigte sich interessanterweise kein deutlicher Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Expression nach Hypoxieinduktion. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen CUX1 knock-down und der HIF-1 $\alpha$  Expression auf Proteinebene gezeigt werden. Die Expression von HIF-1 $\alpha$  der Kontrollproben nach Hypoxieinduktion in der Hypoxiekammer in der densitometrischen Messung trotz optischem Eindruck nicht vermehrt, hier ist der hohe Probengehalt, gekennzeichnet durch die  $\beta$ -Aktin Kontrolle, zu beachten.



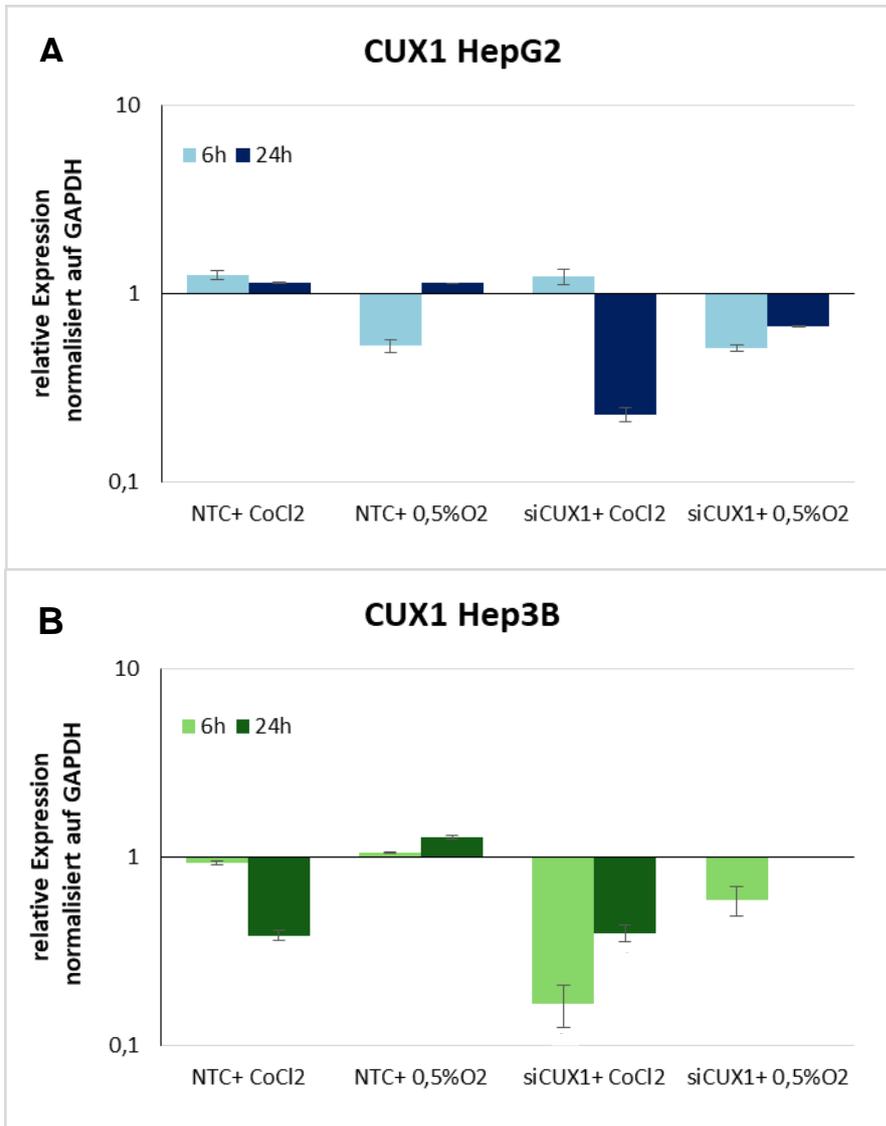
**Abbildung 13:** Western Blot mit Hep3B Zellen für das Protein HIF-1 $\alpha$  mit  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle nach Transfektion der Zellen mit siRNA CUX1 oder Negativkontroll-siRNA und 24 Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder Inkubation unter 0,5% Sauerstoff. Angabe der densitometrischen Werte der Ausmessung.

#### 5.4. CUX1 scheint einen Effekt auf HIF-1 $\alpha$ abhängige Faktoren der Hypoxieantwort auszuüben, ohne HIF-1 $\alpha$ auf mRNA Ebene direkt zu regulieren

##### 5.4.1. Hypoxie zeigt keinen Einfluss auf die Modulation von CUX1

Der Zusammenhang von CUX1-Expression und Hypoxiebehandlung wurde auf der mRNA Expressionsebene mittels q-RT-PCR analysiert (Abbildung 14). Die Expression von CUX1 mRNA in den nicht mit siRNA transfizierten Proben zeigte sich in der HepG2 Zelllinie von beiden Methoden der Hypoxieinduktion nicht beeinflusst. Nach Transfektion mit siCUX1 lässt sich eine Minderepression von CUX1 nach 24 Stunden Transfektion

und 24 Stunden Hypoxiebehandlung beobachten. Hierdurch ist zu vermuten, dass auch unter Hypoxie die CUX1 Expression unabhängig durch Transfektion moduliert werden kann. Die Erkenntnis, dass Hypoxie selbst nicht die Expression von CUX1 beeinflusst, ist essentiell, um den Effekt eines CUX1 knock-down auf Faktoren der Hypoxieantwort der Zelle analysieren zu können.



**Abbildung 14:** q-RT-PCR Analyse von **A: HepG2** und **B: Hep3B** für mRNA **CUX1** nach Transfektion mit Negativkontroll siRNA oder Transfektion mit siCUX1 nach **6** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub> und **24** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub>. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe mit logarithmisch skaliert y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

Bei der Analyse der Hep3B Zelllinie zeigte sich in den Beobachtungen ebenfalls kein Einfluss der Hypoxiebehandlung auf die Expression von CUX1 mRNA. Die Transfektion mit siCUX1 zeigte hier bereits nach 24 Stunden Transfektion und 6 Stunden

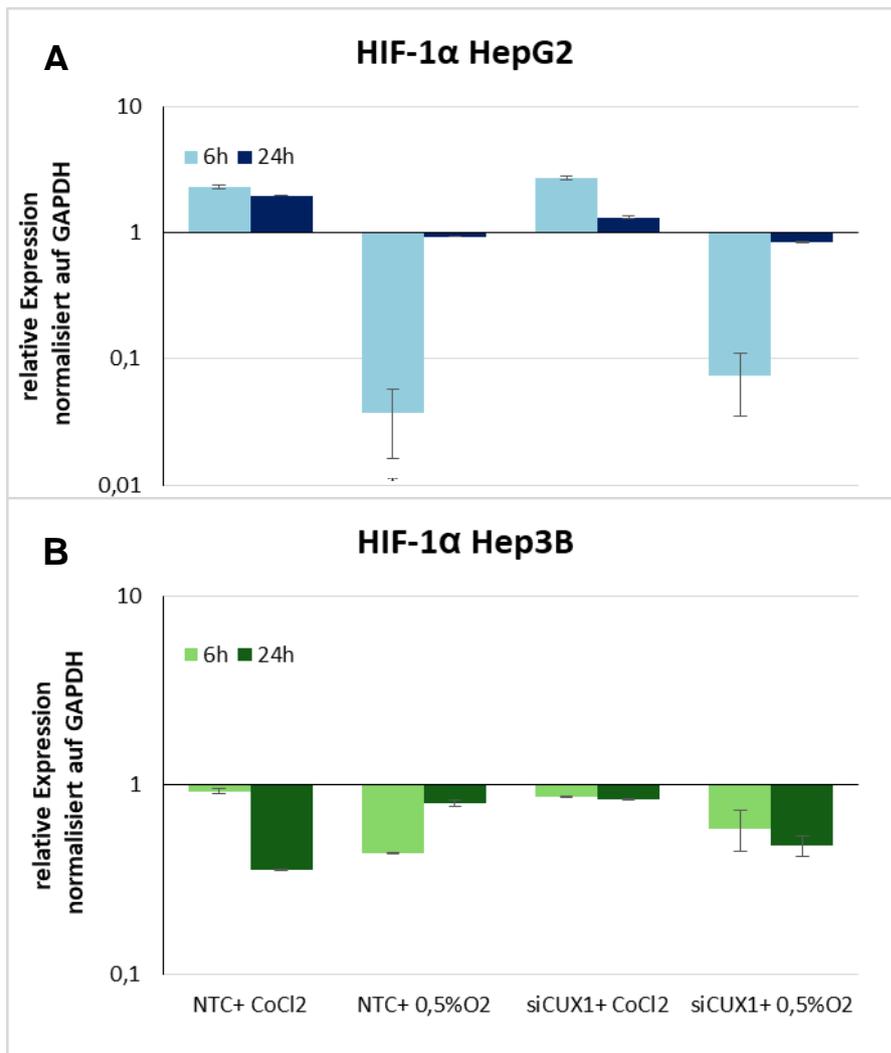
Hypoxiebehandlung einen negativen Einfluss auf die Expression von CUX1 mRNA. Nach 24 Stunden Hypoxiebehandlung mit 0,5% Sauerstoff war keine mRNA in den Hep3B Zellen mehr detektierbar. Es kann hier ein bereits toxischer Effekt von Hypoxie bei Fehlen von CUX1 vermutet werden, der die Hep3B Zellen stärker als die HepG2 Zellen betrifft. Die Herunterregulierung von CUX1 mittels siCUX1 ließ sich also beobachten, jedoch sind die Hep3B Zellen durch die anschließende Hypoxiebehandlung nach 24 Stunden bereits deutlich geschädigt.

#### **5.4.2. CUX1 hat keinen Effekt auf die Expression des zentralen Hypoxiemodulators HIF-1 $\alpha$ , scheint jedoch die Expression dessen Gegenspielers FIH in HepG2 zu beeinflussen**

Der wichtigste Modulator der Zellantwort auf Hypoxie ist HIF-1 $\alpha$ . Dieser Transkriptionsfaktor, der unter Hypoxie akkumuliert, steuert eine Vielzahl der Anpassungsprozesse der Zelle. Um den Einfluss von CUX1 auf diese Anpassungsprozesse zu klären ist zunächst wichtig, ob dies über direkte Regulation dieses zentralen Faktors geschieht.

Beide Zelllinien wurden nach Transfektion von siCUX1 und Negativkontroll siRNA für 6 und 24 Stunden mit CoCl<sub>2</sub> und 0,5% Sauerstoffbehandlung auf die Expression von HIF-1 $\alpha$  mRNA analysiert (Abbildung 15). In den HepG2 Zellen zeigte die sechsstündige Hypoxiebehandlung mit CoCl<sub>2</sub> eine Tendenz zur Hochregulierung von HIF-1 $\alpha$ . Eine interessantere Beobachtung ist die Herunterregulierung von HIF-1 $\alpha$  nach 6 Stunden Inkubation bei 0,5% Sauerstoff der HepG2 Zellen sowohl in den NTC als auch den mit siCUX1 transfizierten Proben. Die 24-stündigen Hypoxiebehandlungen zeigten keine Veränderung von HIF-1 $\alpha$ . Die zu erwartende Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch Hypoxie konnte auf mRNA Ebene wie auch schon auf Proteinebene (siehe 5.3) nicht gezeigt werden.

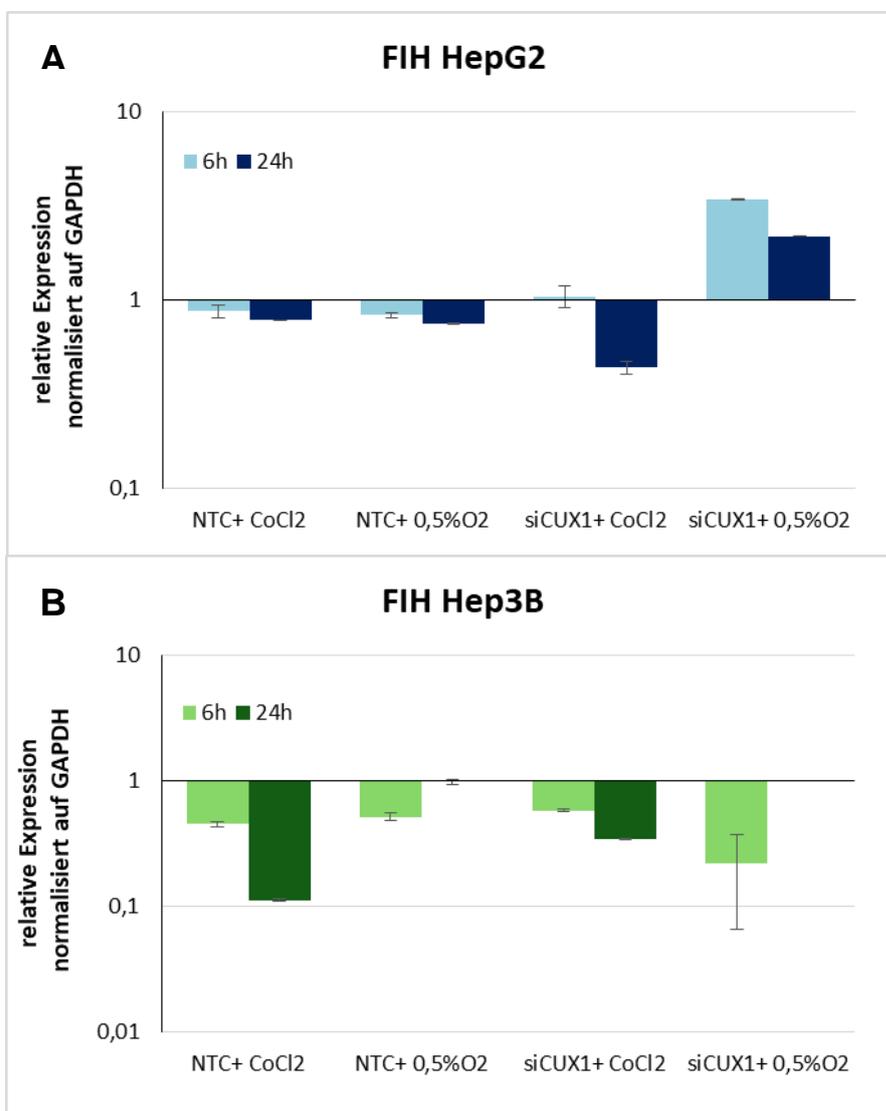
In der Hep3B Zelllinie unter gleicher Behandlung zeigte sich ebenfalls keine relevante Hochregulierung von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxiebehandlung nach 6 oder 24 Stunden. Ebenso zeigte sich kein Hinweis von Einfluss des nach Transfektion mit siCUX1 auf das mRNA Level von HIF-1 $\alpha$  in beiden Zelllinien. Eine Herunterregulierung nach 6 Stunden Behandlung mit 0,5% Sauerstoff war auch hier in der Kontrollprobe zu beobachten. Ein Zusammenhang zwischen siCUX1 Transfektion und HIF-1 $\alpha$  Expression kann in Hep3B wie in HepG2 nicht hergestellt werden.



**Abbildung 15:** q-RT-PCR Analyse von **A: HepG2** und **B: Hep3B** für mRNA **HIF1α** nach Transfektion mit Negativkontroll siRNA oder Transfektion mit siCUX1 nach **6** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub> und **24** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub>. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe mit logarithmisch skaliertes y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

Ein Gegenregulator von HIF-1α ist FIH (Factor inhibiting HIF-1) (Mahon et al. 2001) welcher in Normoxie die Bindung von HIF-1α mit dessen Cofaktoren verhindert und mit Proteinen in dessen Abbauweg interagiert (Lando et al. 2002). Ein Einfluss von CUX1 auf den HIF-1α Antwortweg könnte also über Regulation dessen Gegenspielers laufen. Die Analyse von FIH erfolgte nach der oben beschriebenen Transfektions- und Hypoxiebehandlung (Abbildung 16). Es ließ sich in der HepG2 Zelllinie eine Hochregulation von FIH bei Transfektion mit siCUX1 und nach 24 Stunden

Hypoxiebehandlung mit 0,5% Sauerstoff beobachten. In den mit  $\text{CoCl}_2$  behandelten Proben findet sich diese Beobachtung nicht. In der Hep3B Zelllinie zeigte sich eine Herunterregulierung von FIH-1 nach 24 Stunden Behandlung mit  $150 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . Es fand sich keine sichtbare Hochregulierung von FIH nach Transfektion mit siCUX1. Es stellte sich nach siCUX1 Transfektion nach 6 Stunden Behandlung mit 0,5% Sauerstoff eine Herunterregulierung von FIH dar und nach 24h Behandlung mit 0,5% Sauerstoff war keine mRNA in den Proben mehr nachweisbar. Hier ist der toxische Effekt der Hypoxiebehandlung bereits zu ausgeprägt, sodass über den Effekt von CUX1 knock-down auf die mRNA Expression von FIH in Hep3B nach Inkubation mit 0,5% Sauerstoff keine Aussage getroffen werden kann.

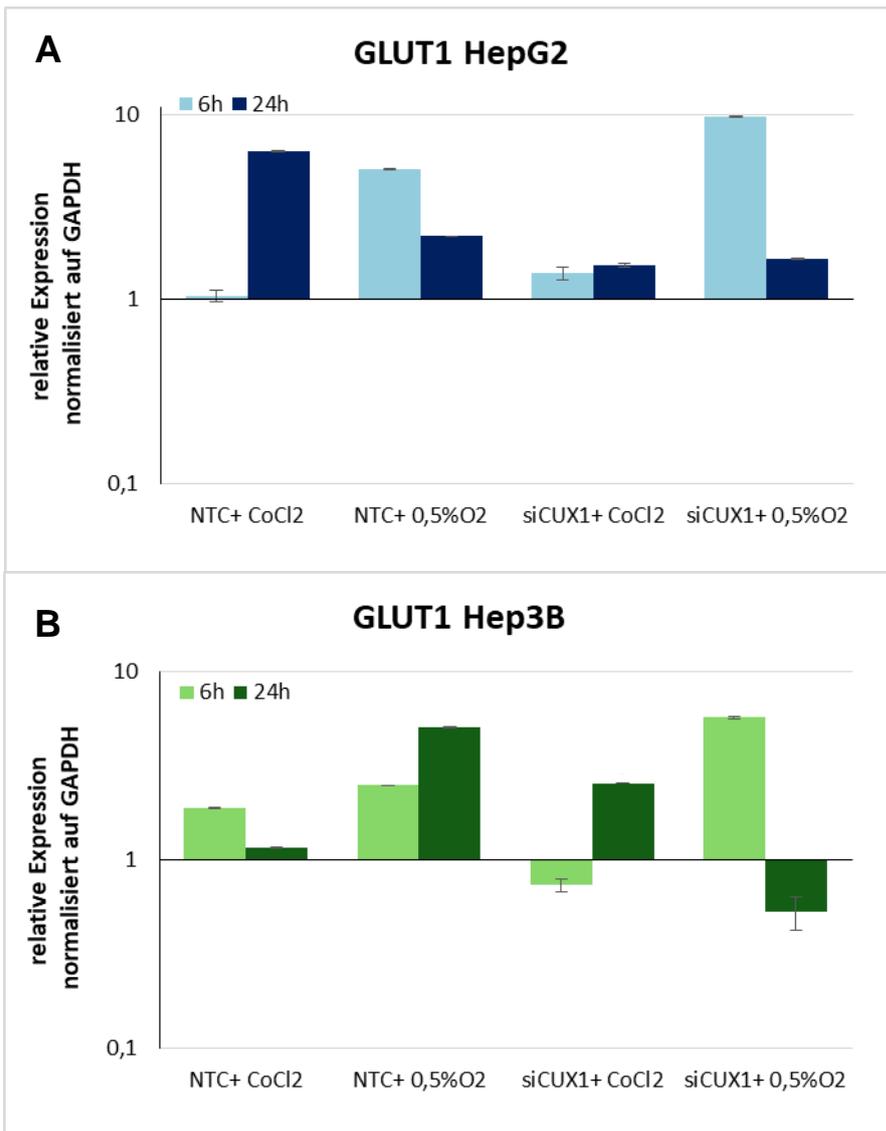


**Abbildung 16:** q-RT-PCR Analyse von **A: HepG2** und **B: Hep3B** für mRNA **FIH** nach Transfektion mit Negativkontroll siRNA oder Transfektion mit siCUX1 nach 6 Stunden Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  oder 0,5%  $\text{O}_2$  und 24 Stunden Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  oder 0,5%  $\text{O}_2$ . Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe mit logarithmisch skaliertes y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

### **5.4.3. Zielgene von HIF-1 $\alpha$ scheinen CUX1 abhängig reguliert zu werden**

HIF-1 $\alpha$  wirkt nach seiner Aktivierung durch Hypoxie auf eine Vielzahl von Signalwegen stimulierend. Besonders die Anpassung des Glucosestoffwechsels durch Regulation von GLUT1 und die Stimulation der Angiogenese durch VEGFA sind bedeutsam für die Anpassungsreaktion auf Hypoxie (Marschall 2001; Semenza 2009). Hat CUX1 einen Einfluss auf die Funktion von HIF-1 $\alpha$ , so müssen dessen Zielgene bei knock-down von CUX1 in ihrer Expression nachgeschaltet ebenfalls verändert sein. GLUT1 wurde nach der oben beschriebenen Transfektions- und Hypoxiebehandlung analysiert (Abbildung 17). In den HepG2 Zellen zeigt sich durch Hypoxiebehandlung in der Kontrollproben weitestgehend eine Hochregulation der GLUT1 mRNA in den 24 Stunden mit CoCl<sub>2</sub> und 6 Stunden bei 0,5% Sauerstoff behandelten Proben. Dies weist zunächst darauf hin, dass in den Zellen eine HIF-1 $\alpha$  vermittelte Hypoxiereaktion stattgefunden hat, obwohl kein deutlicher Anstieg von HIF-1 $\alpha$  auf mRNA und Proteinebene nachweisbar war (s. 5.3; 5.4.). Nach knock-down von CUX1 zeigt sich bei den mit CoCl<sub>2</sub> behandelten Proben diese Hochregulierung nicht mehr, ausgenommen die 6 Stunden bei 0,5% Sauerstoff behandelten Proben.

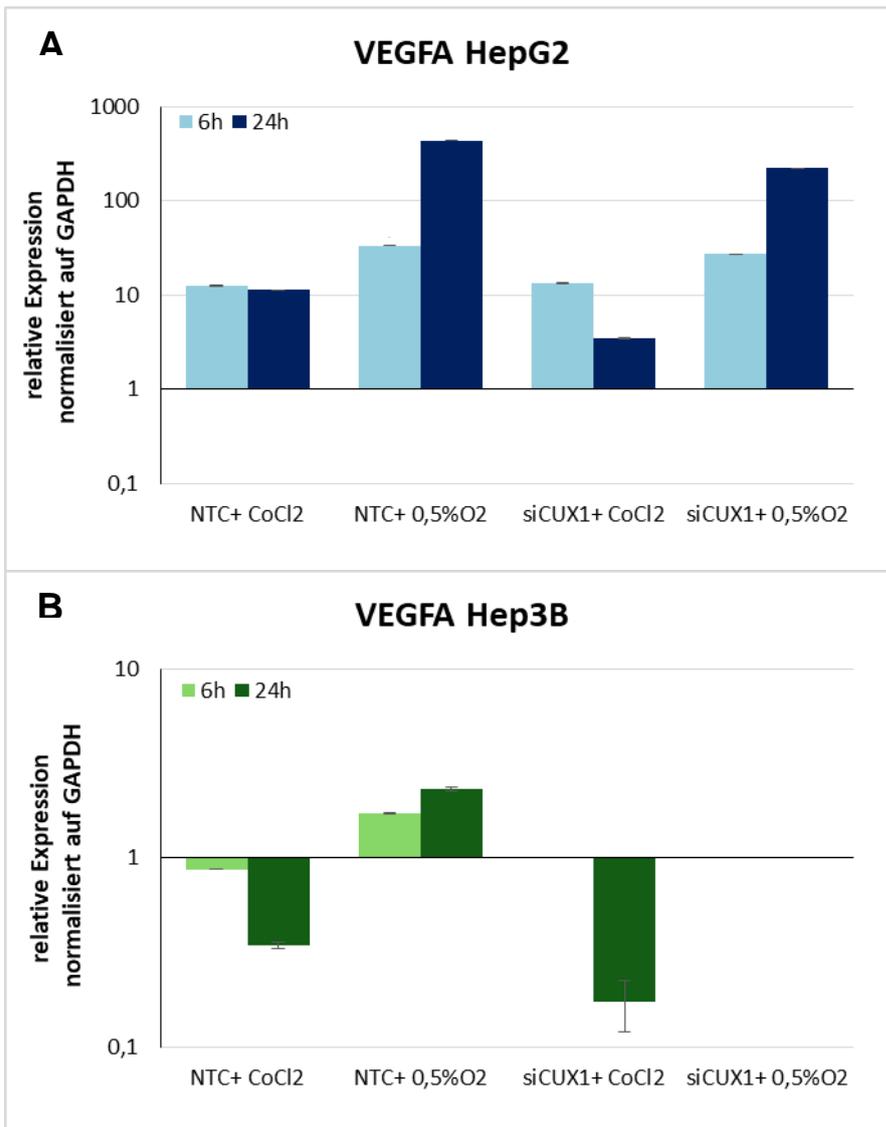
In den Hep3B Zellproben lässt sich ebenfalls eine Hochregulierung von GLUT1 in den mit 6 Stunden CoCl<sub>2</sub> behandelten und 24 Stunden mit 0,5% Sauerstoff behandelten Kontrollproben beobachten. Die mit siCUX1 transfizierten Proben zeigen eine Herunterregulierung von GLUT1 in den 6 Stunden mit CoCl<sub>2</sub> behandelten und den 24 Stunden mit 0,5% Sauerstoff behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle. Der in den anderen qRT-PCR Analysen beobachtete starke toxische Hypoxieeffekt auf die 24 Stunden mit 0,5% Sauerstoff behandelten Hep3B Zellen ist jedoch zu beachten.



**Abbildung 17:** q-RT-PCR Analyse von **A: HepG2** und **B: Hep3B** für mRNA **GLUT1** nach Transfektion mit Negativkontroll siRNA oder Transfektion mit siCUX1 nach **6** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub> und **24** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub>. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe mit logarithmisch skaliertes y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

In der HepG2 Zelllinie ließ sich eine deutliche Hochregulierung von VEGFA mRNA nach Hypoxiebehandlung beobachten, sodass auch hierdurch von einer adäquaten Hypoxieantwort der Zelle ausgegangen werden kann (Abbildung 18.A). Nach Transfektion mit CUX1 siRNA zeigte sich die mRNA Expression von VEGFA vermindert in den 6 Stunden mit  $\text{CoCl}_2$  behandelten und den 6 und 24 Stunden mit 0,5% Sauerstoff behandelten HepG2 Zellen im Vergleich mit der jeweils identisch behandelten Probe mit Negativkontroll-siRNA.

Die Hep3B Zellen zeigten in den Kontrollproben eine geringer ausgeprägte, jedoch vorhandene, Induktion von VEGFA durch Hypoxie (Abbildung 18.B). Eine Hochregulierung von VEGFA mRNA ließ sich in den 24 Stunden mit 0,5% Sauerstoff behandelten Kontrollproben nachweisen. Wiederum scheinen die Hep3B Zellen vulnerabler für hypoxischen Stress bei zunehmender Verminderung von CUX1 zu sein. In den 6 Stunden mit  $\text{CoCl}_2$  behandelten Proben und in den 6 und 24 Stunden mit 0,5% Sauerstoff behandelten Proben war keine VEGFA mRNA mehr nachweisbar, da hier der toxische Effekt der Hypoxiebehandlung bereits zu ausgeprägt ist. In der 24 Stunden mit  $\text{CoCl}_2$  behandelten siCUX1 Probe zeigte sich VEGFA mRNA vermindert. Auch wenn daher keine spezifische Aussage zur VEGFA Expression in der Hep3B Zelllinie getroffen werden kann, ist zu beachten, dass in den mit Negativkontroll-siRNA transfizierten Proben nach Behandlung mit 0,5 % Sauerstoff noch mRNA nachweisbar ist, während bei Fehlen von CUX1 der toxische Effekt deutlich ausgeprägter war und keine mRNA mehr messbar war. Der toxische Effekt der Hypoxiebehandlung ist also bei Spresion von CUX1 ausgeprägter.



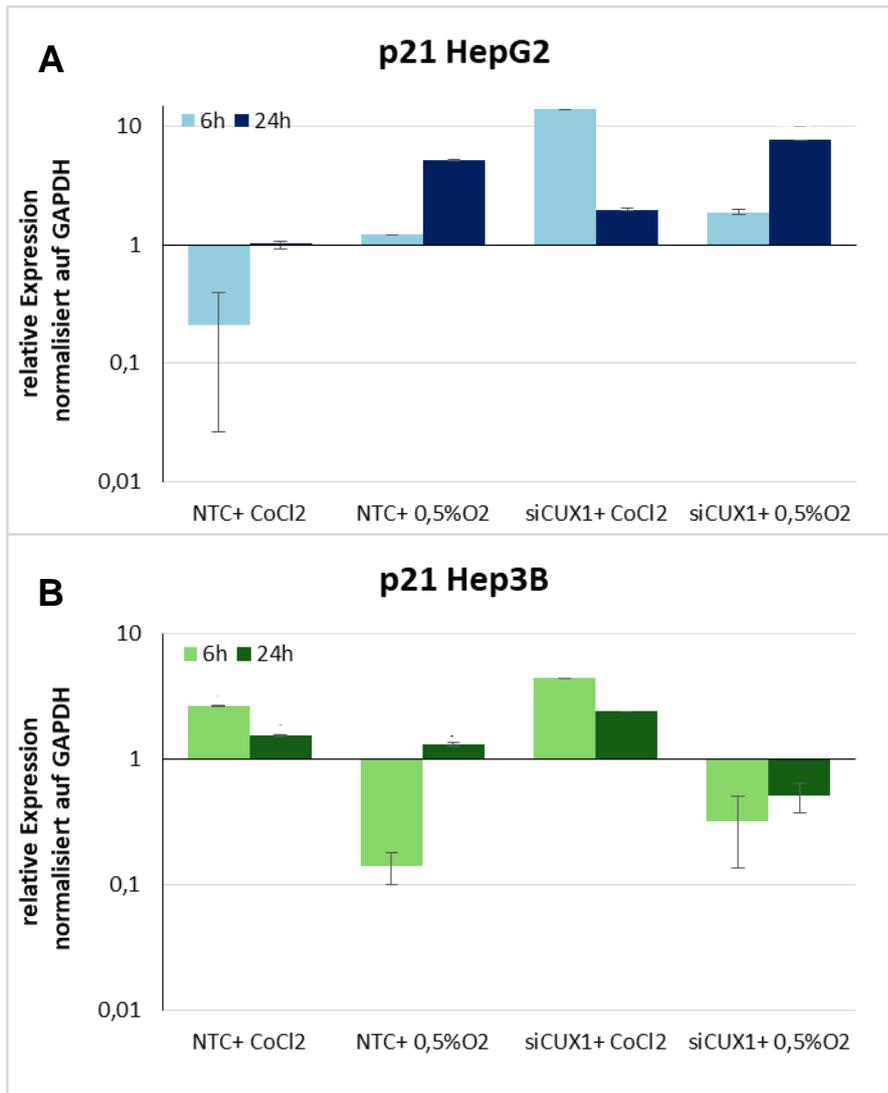
**Abbildung 18:** q-RT-PCR Analyse von **A: HepG2** und **B: Hep3B** für mRNA **VEGFA** nach Transfektion mit Negativkontroll siRNA oder Transfektion mit siCUX1 nach **6** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub> und **24** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub>. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe mit logarithmisch skaliertes y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

#### **5.4.4. CUX1 zeigt unter Hypoxie eine Modulation des Zellzyklusarrest über die Cyclin-abhängige Kinasen Inhibitoren p21 und p27**

Eine Reaktion auf Zellschaden durch Hypoxie ist Zellzyklusarrest. Die Cyclin-abhängige Kinasen Inhibitoren CDKN1A (p21) und CDKN1B (p27) sind hier maßgeblich beteiligt und werden unter Hypoxie über HIF-1 $\alpha$  induziert (Goda et al. 2003). Sie sind zudem ein wichtiges Ziel des Tumorsuppressors p53 (Waldman et al. 1995; Casalini et al. 2007).

In der HepG2 Zelllinie zeigte sich unter Hypoxiebehandlung zunächst keine Induktion von p21 (Abbildung 19.A). Nach Transfektion von CUX1 siRNA zeigte sich eine Tendenz zur Induktion in allen Proben nach 6 Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> und 24 Stunden Behandlung mit 0,5% Sauerstoff.

In der Hep3B Zelllinie zeigte sich zunächst eine Hochregulierung von p21 nach Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> für 6 Stunden und 24 Stunden, die in den mit 0,5% Sauerstoff behandelten Proben erst nach 24 Stunden geringer ausgeprägt zu beobachten war (Abbildung 19.B). Bei Transfektion mit siCUX1 zeigte sich p21 mRNA erhöht bei 24 Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub>. Die mit 24 Stunden 0,5% Sauerstoff behandelten Proben zeigten eine Verminderung der p21 mRNA Expression. Hier ist erneut auf den toxischen Schaden in diesen Proben zu verweisen.

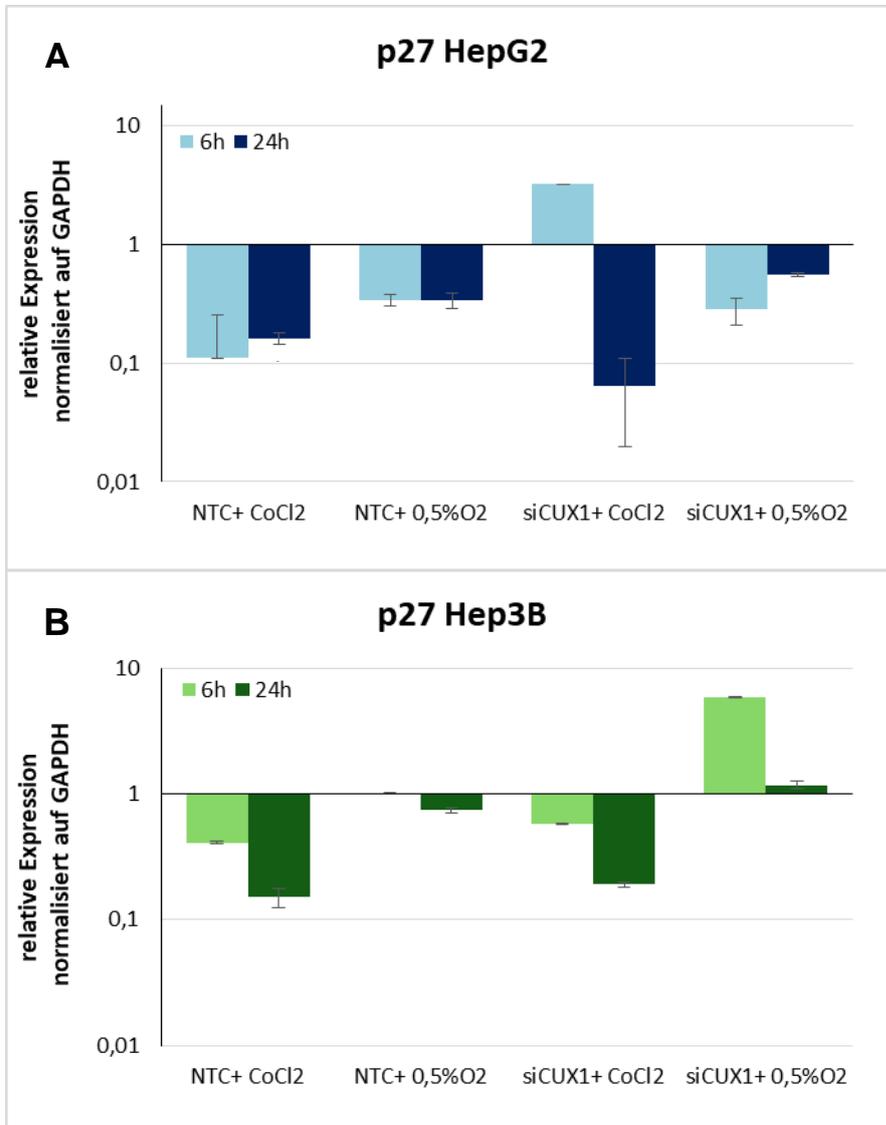


**Abbildung 19:** q-RT-PCR Analyse von **A: HepG2** und **B: Hep3B** für mRNA **p21** nach Transfektion mit Negativkontroll siRNA oder Transfektion mit siCUX1 nach **6** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub> und **24** Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> oder 0,5% O<sub>2</sub>. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe mit logarithmisch skaliertes y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

In der HepG2 Zelllinie zeigte sich unter der durchgeführten Hypoxiebehandlung keine Hochregulierung von p27 (Abbildung 20.A). Es ließ sich nach 24 Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> eine Herunterregulierung der p27 mRNA Expression sowohl in den mit siCUX1 transfizierten Proben als auch in der Kontrollprobe beobachten. Die Modulation von CUX1 scheint keinen relevanten gerichteten Einfluss auf die Expression von p27 zu haben.

In der Hep3B Zelllinie zeigte sich zunächst nach Hypoxieinduktion ebenfalls keine Hochregulierung von p27 mRNA (Abbildung 20.B). Nach Transfektion mit siCUX1 war

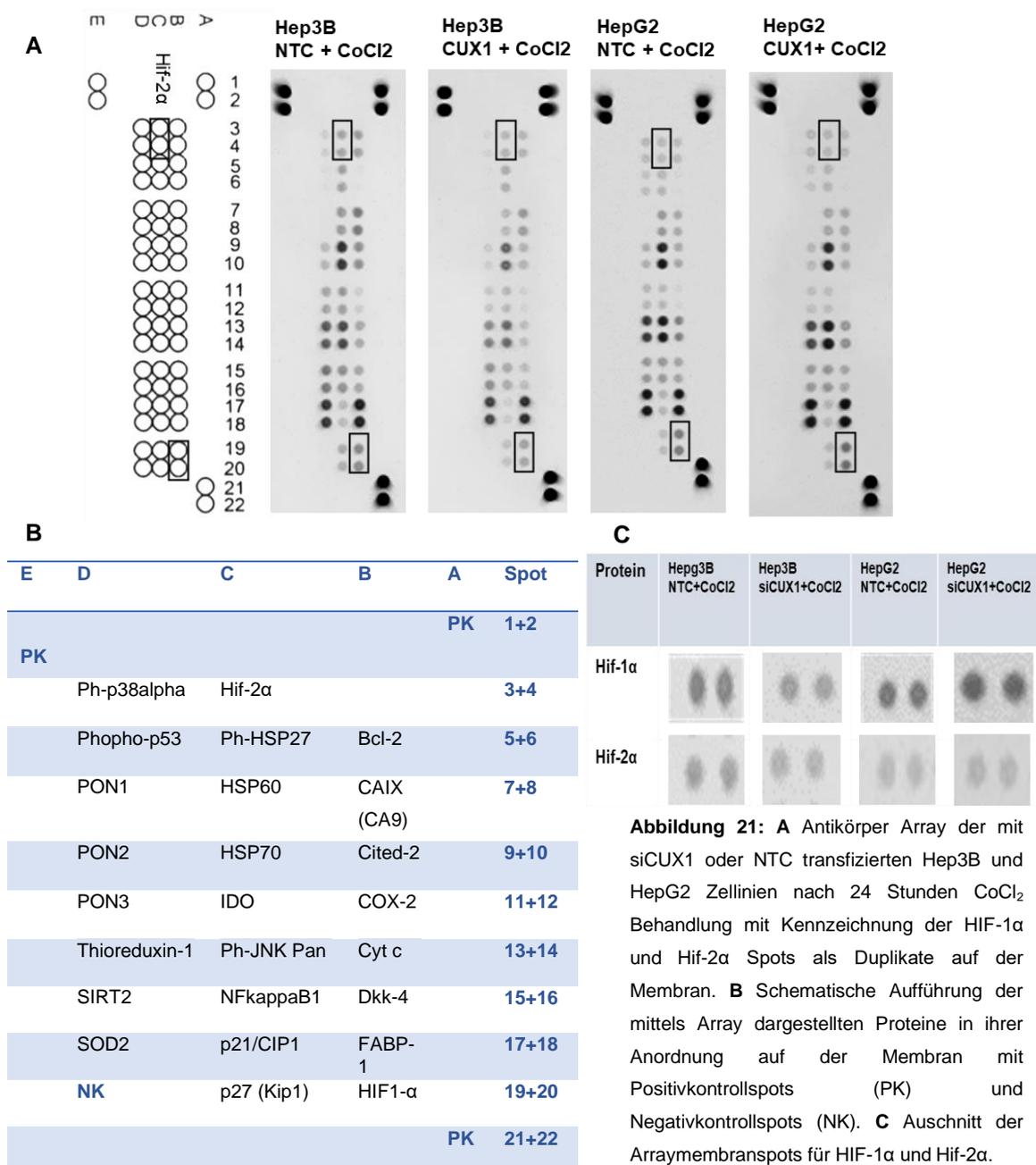
isoliert eine Hochregulierung in den für 6 Stunden mit 0,5% Sauerstoff behandelten Zellen zu beobachten. In den für 24 Stunden mit  $\text{CoCl}_2$  behandelten Proben zeigt sich wiederum wie in den HepG2 Zellen die Tendenz zur Herunterregulierung auf p27 mRNA Ebene.



**Abbildung 20:** q-RT-PCR Analyse von **A: HepG2** und **B: Hep3B** für mRNA **p27** nach Transfektion mit Negativkontroll siRNA oder Transfektion mit siCUX1 nach **6** Stunden Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  oder 0,5%  $\text{O}_2$  und **24** Stunden Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  oder 0,5%  $\text{O}_2$ . Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Relation zur Negativkontrollprobe mit logarithmisch skaliertes y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

## 5.5. CUX1 scheint am Erhalt der Zellstressreaktion beteiligt zu sein

Die Komplexität der Anpassungsreaktion der Zelle auf hypoxischen Stress erfordert eine breitgefaste Analyse der verschiedenen beteiligten Faktoren. Um zu sehen ob die mittels q-RT-PCR vereinzelt gefundenen Effekte des CUX1 knock-downs ein größeres Gesamtbild widerspiegeln, wurde ein Antikörper Array durchgeführt, welcher insgesamt 26 Proteine der Zellstressreaktion enthält. Die Zellen zeigten nach Transfektion mit Negativkontroll-siRNA oder siCUX1 und Behandlung mit 24 Stunden CoCl<sub>2</sub> eine deutliche Hypoxieinduktion, gekennzeichnet durch den Anstieg von HIF-1α und HIF-2α (Abbildung 21.C).



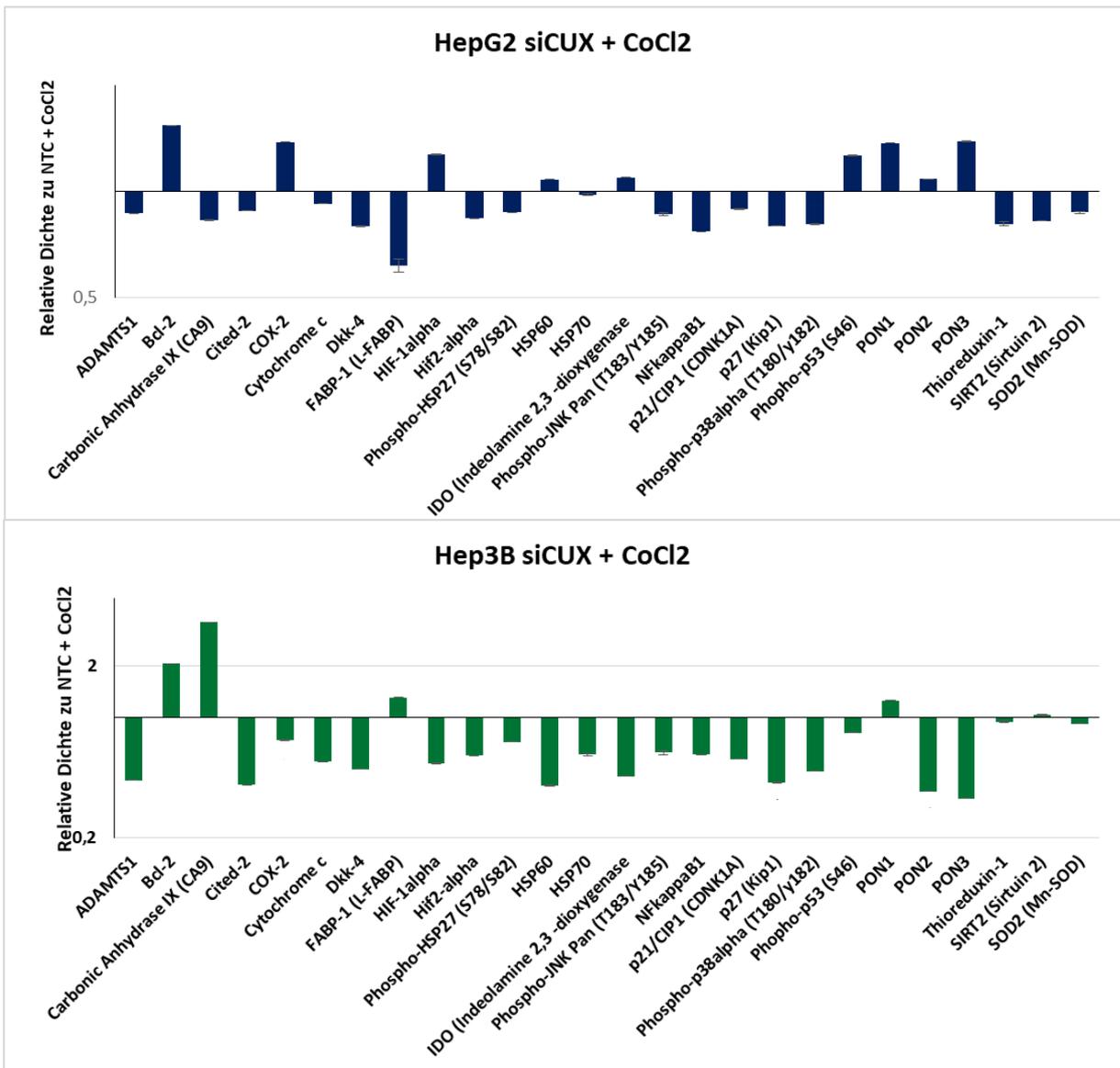
Die einzelnen Veränderungen unter Hypoxie nach CUX1 knock-down auf Proteinebene wurden densitometrisch analysiert und sind als Übersicht in Abbildung 22 dargestellt.

In den HepG2 Zellen zeigte sich in den mit CUX1 siRNA transfizierten Zellen eine teilweise Aktivierung der typischen Zellstressmechanismen als Antwort auf die Hypoxie im Vergleich zur kontrolltransfizierten Probe. Dies ist gekennzeichnet durch die Hochregulierung von HIF1- $\alpha$  Protein. Auch zeigte sich Bcl-2, ein unter Hypoxie hochreguliertes anti-apoptotisches Protein (Shroff et al. 2007), hochreguliert. Zudem zeigte sich ein Anstieg von Hitzeschockprotein 60. HSP 60 ist ein mitochondriales Protein, welches neben seiner Rolle in der Proteinfaltung in Hypoxie mit Apoptose und HIF-1 $\alpha$  assoziiert ist (Ban et al. 2012; Gupta und Knowlton 2005). Paraoxonase-1 (PON1), ein in Hypoxie erhöhtes (Thiersch et al. 2008) antioxidativ wirkendes Enzym im Fettstoffwechsel, zeigte sich ebenfalls erhöht.

Von den 26 analysierten Zellstressenzymen zeigte sich jedoch eine Tendenz zur verminderten Expression bei 17 Proteinen: Cytochrom C ist ein Teil der Apoptosekaskade und wird bei Hypoxie normalerweise aus dem Mitochondrium freigesetzt (Greijer und van der Wall 2004). Hier zeigte es sich vermindert. Hitzeschockprotein 70 (HSP 70) ist als Chaperon in der Proteinfaltung wichtig für das Zellüberleben und steigt unter Hypoxie. Es besitzt ebenfalls eine HRE-Bindungsregion für HIF-1 $\alpha$  (Xia et al. 2009). Hier zeigte es sich nach Transfektion mit CUX1 siRNA trotz Hypoxie vermindert. Nuklear Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), ein zentraler Transkriptionsfaktor der Zellstressantwort, der durch Hypoxie induziert wird (Koong et al. 1994), zeigte sich ebenfalls vermindert. Sirtuin 2 (SIRT-2) zeigte sich vermindert. SIRT-2 ist eine Deacetylase, die direkt auf HIF-1 $\alpha$  wirkt und die Bindung an die abbauenden Prolylhydroxylasen verstärkt. Verminderung von SIRT-2 führt so zu einer Destabilisierung von HIF-1 $\alpha$ .

In den Hep3B Zellen konnte nach Transfektion mit siCUX1 eine deutliche Abnahme der analysierten Zellstressproteine beobachtet werden. Von den 26 analysierten Proteinen zeigten sich 21 vermindert: Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein direktes Ziel von HIF-1 $\alpha$  (Kaidi et al. 2006) und zeigte sich vermindert. Ebenso Cytochrom C. Dickkopf-4 (Dkk-4) wird von HIF-1 $\alpha$  über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg reguliert (Mazumdar et al. 2010) und zeigte sich reduziert, ebenso HSP 60 ( $p=0,037$ ). HIF-2 $\alpha$  als Hypoxiemarker zeigte sich vermindert und ebenso die Proteine des Zellzyklusarrests p21 und p27. Hitzeschockprotein 27 ist ein weiteres Chaperon und Antioxidant welches von HIF-1 $\alpha$  hochreguliert wird (Whitlock et al. 2005) und sich ebenfalls vermindert darstellt. P38a ist ein MAP Kinase, die an der Zellantwort auf Zytokine, DNS-Reparatur und oxidativen Stress beteiligt ist und durch Hypoxie gesteigert wird, sich hier jedoch ebenfalls vermindert zeigte.

Nicht alle der durch die Hypoxiereaktion regulierten Proteine zeigten sich ausgeschaltet: Cited-2 ist ein durch Bindung an p300 an der Regulation von HIF-1 $\alpha$  beteiligter Faktor (Yoon et al. 2011) und kann HIF-1 $\alpha$  inaktivieren. Es zeigte sich vermindert. FABP-1 ist ein Fettsäuren-Bindungsprotein, welches unter Hypoxie erhöht wird und die Versorgung der Zelle verbessert (Biron-Shental et al. 2007). Es zeigte sich noch erhöht. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) wird durch Hypoxie (Schmidt et al. 2013) herunterreguliert und zeigte sich vermindert. Paraoxonase-2 (PON2) und Paraoxonase-3 (PON3) sind antioxidative und antiapoptotische Enzyme, die im Rahmen der Zellstressantwort steigen (Witte et al. 2012), und sich hier ebenfalls vermindert zeigte.



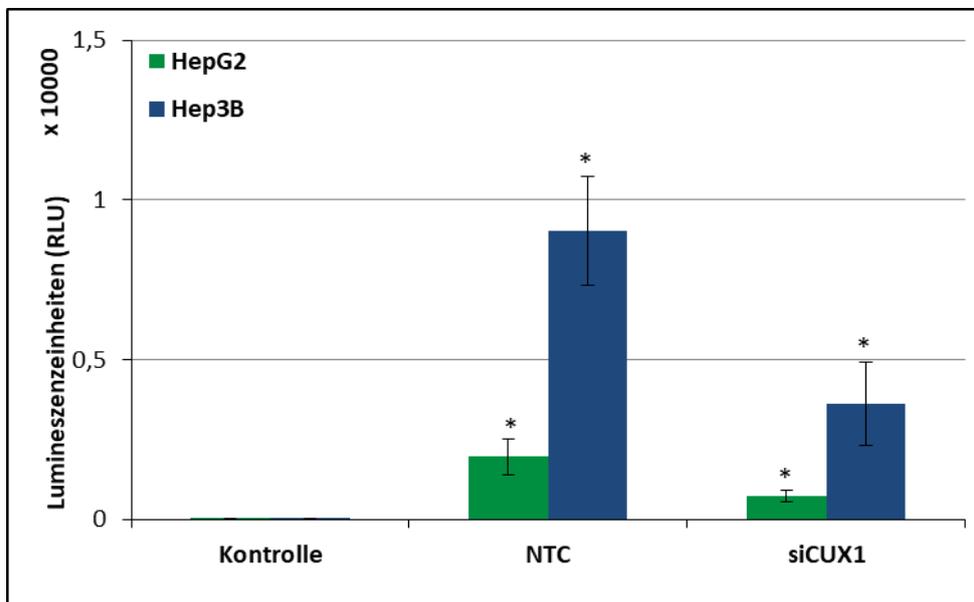
**Abbildung 22:** Zellstress Array von **A: HepG2** und **B: Hep3B** Zellen für die aufgeführten Proteine der Zellstressreaktion nach Transfektion mit siCUX1 und 24 Stunden Behandlung mit CoCl<sub>2</sub>. Die densitometrisch erfassten Werte wurden gegen die Hintergrundaktivität normalisiert und sind dargestellt in Relation zur 24 Stunden mit CoCl<sub>2</sub> behandelten Negativkontrolle der Transfektion mit logarithmisch skaliertem y-Achse. Dargestellt sind die gemittelten Werte (mit Standardfehler) der als biologische Duplikate durchgeführten Experimente. Die genauen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt.

### 5.6. CUX1 kontrolliert die transkriptionelle Aktivität von HIF-1

Die Frage, ob CUX1 einen direkten Einfluss auf Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  hat, sollte nun mithilfe eines Luciferase Reporter Vektors beantwortet werden. Durch die Verwendung eines Plasmids mit HRE-Reporter Sequenz konnte die Aktivität der Transkription von HIF-1 $\alpha$  bestimmt werden. HRE ist die Bindungssequenz auf Zielgenen für durch Hypoxie aktiviertes HIF-1 (Jiang et al. 1996). Die im Versuch als Lichtintensität

gemessene Luciferaseaktivität ist somit proportional zur Aktivität des Promoters von HIF-1 $\alpha$ .

Beide Zelllinien wurden nach Kotransfektion mit Plasmid und siCUX1 sowie Negativkontroll-siRNA mit 0,5% Sauerstoff für 24 Stunden inkubiert. Es zeigte sich eine signifikante Induktion der HIF-1 $\alpha$  Aktivität durch die Hypoxiebehandlung von über 60 Prozent in beiden Zelllinien (Abbildung 23). Wurde CUX1 durch die Transfektion mit siCUX1 herunterreguliert, zeigte sich eine signifikante Verminderung der HIF-1 $\alpha$  Aktivität in beiden Zelllinien (HepG2:  $p=0,0013$  und Hep3B  $p=0,015$ ). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass CUX1 die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 $\alpha$  positiv beeinflusst. Fehlen von CUX1 hat einen Rückgang dieser Aktivität zufolge.



**Abbildung 23:** Ergebnis des Luciferase Assay nach Kotransfektion von siCUX1 oder Negativkontroll siRNA (NTC) und 24 Stunden Inkubation mit 0,5% O<sub>2</sub> sowie der Kontrollprobe ohne Transfektion. Hep G2 und Hep3B Zelllinien sind zusammen dargestellt. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte der absolut gemessenen Lichtintensität  $\pm$  SEM der als biologische Triplikate durchgeführten Versuche. Die gemessene Lichtintensität entspricht dabei proportional der Luciferaseaktivität. Dargestellt ist die gemessene Lichtintensität der siCUX1 transfizierten Proben  $\pm$  SEM in Relation zu den Negativproben der Transfektion (NTC), welche als Wert von 1 gesetzt sind. Die Proben wurden zur Kontrollprobe normalisiert. Die y-Skala ist logarithmisch skaliert. Die einzelnen arithmetischen Mittelwerte sind im Anhang aufgeführt. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$ .

## 6. Diskussion

### 6.1. Zu den verwendeten Methoden und Aussagekraft der Ergebnisse

Um CUX1 zu unterdrücken, wurde die Methode der Transfektion von siRNA gewählt. Hierdurch kann nach 18 bis 48 Stunden eine deutliche Reduktion der mRNA über den RNA-induzierten Silencing Komplex (RISC) erzielt werden. Der Effekt auf die mRNA Degradation ist jedoch transient. Dies ist u.a. einem Verdünnungseffekt durch Zellteilung geschuldet. Gerade bei einem Zielprotein mit langer Halbwertszeit kann so teilweise ein vorhandener Effekt nicht detektiert werden, wenn die mRNA beispielsweise wieder ansteigt bevor der Effekt auf Proteinebene zu beobachten ist (Bartlett und Davis 2006). Die Effekte der CUX1 Unterdrückung mit siRNA wurden zunächst auf mRNA Ebene mittel q-RT-PCR analysiert. Zunächst wurden in einem Vorexperiment mehrere siRNAs für CUX1 getestet. In beiden Zelllinien zeigten alle siRNAs eine Herunterregulierung von CUX1 nach 24 Stunden, sodass von einem erreichten Knock-down ausgegangen werden kann. Jedoch wurde dieses Einzelexperiment nicht wiederholt und ein Knock-down ist somit nicht statistisch belegt.

Die Transfektion wurde im Verlauf jedoch mit einer siRNA (Nr.7) in beiden Zelllinien im Rahmen der Kontrolle der Hypoxiebehandlung wiederholt (Abbildung 8C). Die CUX1-RNA wurde hierbei in zwei biologischen Replikaten in beiden Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten (30 und 48 Stunden nach Transfektion) analysiert, welche sich aus den weiteren Behandlungen für 6 und 24 Stunden ergaben. Auch hier zeigte sich eine Herunterregulierung der CUX1 RNA nach Transfektion mit siRNA, jedoch um einen niedrigeren Faktor als im Vorexperiment (2,2 fach bei HepG2 und 2,2 fach bei Hep3B nach 48h versus 7,8 fach bei HepG2 und 16 fach die Hep3B im Vorexperiment). Auch hier ist die statistische Aussagekraft durch das Vorliegen zweier biologischer Replikate eingeschränkt.

Eine Erklärung für die Diskrepanz zum Vorexperiment könnte sein, dass die Inhibierung durch die siRNA zum Zeitpunkt 48h nach Transfektion bereits nachgelassen hatte, zum anderen können die im Vorexperiment nach 24h gemessenen starken Knock-down Effekte zufällige Streuwerte gewesen sein. Beim Vorexperiment müssen die hohen Ct-Werte sowohl der analysierten Zielgene als auch des Kontrollgens (hier GAPDH) und der damit korrespondierenden Ungenauigkeit der qPCR-Messung kritisch betrachtet werden. (siehe Tabelle 18, S.100). Immerhin war die Streuung der als biochemische Replikate durchgeführten Messung aber nicht besonders auffällig.

Eine Reproduktion der mRNA Regulation durch die verwendete siRNAs in einer ausreichenden Zahl von Experimenten ist daher notwendig, und eine statistisch abgesicherte Aussage über den Effekt der siRNA zu treffen. .

Eine eindeutige Bestätigung des CUX1 knock-downs auf Proteinebene gelang zudem nicht. Der Western Blot ließ eine Reduktion der CUX1 Proteinkonzentration auf das ca. 0,7 bzw. 0,8 fache erkennen. Wegen der niedrigen Qualität des vorliegenden Western Blots ist diese densitometrische Auswertung allerdings nur eingeschränkt zu verwenden. Es ist weiterhin generell zu beachten, dass die exprimierte mRNA bekanntermaßen nicht immer genau mit der Proteinexpression korreliert (Edfors et al. 2016). Auch hier korrelierte beispielweise die Proteinexpression von CUX1 nach Transfektion (Abbildung 10) nicht vollständig mit der starken Herunterregulierung auf mRNA Ebene nach 24h (Abbildung 8). Zum Analysezeitpunkt nach 48 Stunden war die RNA Konzentration auf etwa das 2,2 fache bei HepG2 und Hep3B reduziert, was etwas besser mit den Western Blot in Einklang steht. Es könnte sein, dass der Knock-down Effekt nach siRNA Transfektion nur transient erfolgte.

Eine erneute Analyse also mit unterschiedlichen Analysezeitpunkten und ausreichender Aussagekraft des Knock-down Effektes auf Proteinebene in ausreichender Qualität ist somit wichtig, um die in dieser Arbeit beobachteten physiologischen Zellvorgänge auf einen Knock-down von CUX1 beziehen zu können. Vorerst sei auf die deutlich limitierte Aussagekraft der Kontrollversuche zur Herunterregulierung von CUX1 mittels siRNA hingewiesen, welche die Interpretation der weiteren Beobachtungen aller vorgestellten Folgeexperimente deutlich einschränkt.

Bei der Interpretation der in dieser Arbeit beschriebenen Effekte der CUX1 siRNA Transfektion auf die Expression der verschiedenen potentiellen Zielgene von CUX1 ist weiterhin zu beachten, dass sogenannte „off-target“ Effekte der CUX1 siRNA, also ungewollte Veränderungen an Nicht-Zielsequenzen, nicht ausgeschlossen werden können. Um diese off-target Effekte der in dieser Arbeit verwendeten siRNA Nr. 7 auszuschließen, ist eine Bestätigung der Ergebnisse mit verschiedenen siRNAs nötig.

Unterschiedliche Effekte der Hypoxieantwort wurden mittels qRT-PCR in zwei verschiedenen Zelllinien zu zwei verschiedenen Analysezeitpunkten mit biologischen Duplikaten analysiert. Diese Datenmenge erlaubt noch keine statistische Analyse der beobachteten Effekte und Aussage über deren Signifikanz. Durch oftmals parallel in beiden Zelllinien beobachtete Effekte unter CUX1 Transfektion und Hypoxiebehandlung, stellen diese dennoch mögliche Hinweise auf relevante Behandlungseffekte dar, und können als Ansatzpunkte für weitere statistisch aussagekräftige Analysen geben.

Lediglich im durchgeführten Luciferase-Assay Experiment konnte eine reproduzierbare Induktion von HIF1- $\alpha$  nach Transfektion mit siRNA CUX1 Nr.7 nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den in den vorherigen Versuchen getroffenen Beobachtungen eines

Effektes der CUX1 Herunterregulierung auf die HIF1- $\alpha$ -vermittelte Hypoxieantwort der Zelle.

Somit ist diese Arbeit insgesamt als explorative Analyse zur weiteren Hypothesengenerierung zu verstehen. Durch die wiederholten Beobachtungen ergeben sich einige Ideen zur Rolle von CUX1 für die Hypoxieantwort der HCC-Zellen, welche jedoch insgesamt einer weiteren validen experimentellen Bestätigung bedürfen.

Zur Induktion der Hypoxie in den Zellen wurden zur besseren Validierung zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Inkubation der Zellen in der Hypoxiekammer bei 0,5 % Sauerstoff stellt hier die physiologisch vorliegende Hypoxie in Zellen direkt nach. Die etablierte Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$ , wie hier nach dem Protokoll von Wu et. al durchgeführt (Wu und Yotnda 2011), ist eine chemische Induktionsmethode. Sie stellt Hypoxie in sofern nach, dass durch Cobalt die Interaktion zwischen pVHL und hydroxyliertem HIF-1 $\alpha$  destabilisiert wird (Yuan et al. 2003). HIF-1 $\alpha$  kann infolge dem Abbau entgehen und als Dimer mit HIF-1 $\beta$  als Transkriptionsfaktor wirken. Es wird durch  $\text{CoCl}_2$  also vorwiegend der über HIF-1 $\alpha$  aktivierte Hypoxieantwortweg induziert. Da in der vorliegenden Arbeit vorrangig dieser analysiert werden sollte, sind hierfür beide Methoden geeignet. Allerdings konnte trotzdem ein Unterschied in den mit  $\text{CoCl}_2$  und den in der Hypoxiekammer behandelten Proben festgestellt werden, obwohl in der q-RT-PCR Analyse zunächst Zielgene von HIF-1 $\alpha$  analysiert wurden. Eine Beeinflussung der Ergebnisse von eventuell parallel ablaufenden Antwortreaktionen, welche nicht über den HIF-1 $\alpha$  Transduktionsweg laufen, ist nicht auszuschließen. Auch der Vergleich zwischen der Wirkung chemischen und der physikalischen Methode im zeitlichen Verlauf in den zwei verwendeten Zelllinien gestaltete sich schwierig. Nach 24 Stunden Behandlung in der Hypoxiekammer waren die Hep3B Zellen so beispielsweise auf mRNA Level weitaus stärker geschädigt (s. Abb.18.B) als die mit  $\text{CoCl}_2$  behandelten Proben, zeigten optisch jedoch eine geringere Veränderung der Zellmorphologie (s. Abb.10).

## **6.2. CUX1 führt über FIH-1 Repression zur Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$ abhängigen Hypoxieantwort der Zelle**

Das hepatozelluläre Karzinom ist durch Hypoxiezustände im Tumorgewebe gekennzeichnet (Vaupel et al. 2007). Dem Verständnis der Adaptionsvorgänge der Tumorzellen und wie diese über längere Zeit aufrechterhalten werden können, kommt daher besondere Bedeutung zu. Der zentrale Mediator der Hypoxieanpassung HIF-1 $\alpha$  konnte als negativer Prognosemarker im hepatozellulären Karzinom nachgewiesen

werden und korreliert mit schlechteren Überlebenszeiten (Osman et al. 2015, Srivastava et al. 2015).

CUX1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in einigen Tumoren mit aggressiverem Verhalten assoziiert ist (Michl und Downward 2006; Moon et al. 2002; Ripka et al. 2010a). Über den Zusammenhang zwischen CUX1 und der Zellreaktion auf Hypoxie ist bisher wenig bekannt. Krug et. al. fanden in BON1 Zellen, welche CUX1 überexprimieren, eine Erhöhung von HIF-1 $\alpha$ , dem zentralen Transkriptionsfaktor der Hypoxieantwort (Krug et al. 2014). Li et. al. zeigten 2007 einen Zusammenhang zwischen CUX1 und dem HIF-1 $\alpha$  Suppressor FIH-1 in Nierenzellkarzinomzellen. Inhibition von CUX1 mittels siRNA führte zur verstärkten Aktivität des FIH-1 Promoters und verstärkter Proteinexpression von FIH-1. Es gelang zudem der Nachweis einer spezifischen Bindungsstelle für CUX1 auf der Promoterregion von FIH-1 (Li et al. 2007). CUX1 funktioniert als Transkriptionsrepressor von FIH-1. Mit fallender FIH-1 Expression entfällt dessen Inhibition auf die Bindung zwischen HIF-1 $\alpha$  und dessen Ko-Faktor p300/CBP. Die HIF-1 $\alpha$  Aktivität an und die Transkription von VEGFA und GLUT1 als Zielgene nimmt zu. Dies ist konform mit der in der vorliegenden Arbeit getroffenen Beobachtung Induktion von FIH-1 nach Transfektion mit CUX1 siRNA und Hypoxieinduktion und der konsekutiven Verminderung von VEGFA und GLUT1 in HepG2 und Hep3B Zellen. Die mittels Luciferase Vektor aufgezeigte Verminderung der Transkriptionsaktivität von HIF-1 $\alpha$  stützt diese Hypothese insofern weiter, da für diese die Bindung des HIF-Komplexes mit dem Kofaktoren p300/CBP essentiell ist, und eben dieser durch FIH-1 beeinflusst wird. Wird die Bindung zwischen HIF-1 und p300/CBP durch Anstieg der FIH-1 Konzentration bei CUX1 Mangel beeinträchtigt, scheint die transkriptionelle Aktivität des HIF-1 Dimers abzunehmen und damit die Expression der Zielgene. Die in den aufgeführten Veröffentlichungen gefundene Veränderung der HIF-1 $\alpha$  auf mRNA- und Proteinexpression durch Modulation konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Als Bestandteil der Interaktion von CUX1 mit FIH-1 wurde Proteinkinase C identifiziert. Diese verstärkt die Phosphorylierung von CUX1 und dessen Bindung an den FIH-1 Promoter (Li et al. 2007). Die Veränderung der Zielgene kann jedoch auch FIH-1/HIF-1 unabhängig zustande kommen. Für das HIF-1 $\alpha$  Zielgen VEGFA gibt es beispielsweise gleichzeitig Hinweise, die auf eine HIF-1 $\alpha$  unabhängige Regulation hindeuten. Choi et.al. zeigten 2011 eine HIF-1 $\alpha$  unabhängige VEGFA Regulation in Hep3B Zellen unter Hypoxie. Hier konnte VEGFA durch Inhibition von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) HIF-1 $\alpha$  unabhängig vermindert werden. (Choi et al. 2011). Es wurde vorgeschlagen, dass eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges in bestimmten Zelltypen die Angiogenese durch VEGFA Stimulation unabhängig reguliert. Der PI3K/Akt-Signalweg ist dabei in vielen Karzinomtypen aktiviert und für erhöhte Zellproliferation, Migration, Invasion und

Apoptose bekannt (Haas-Kogan et al. 1998). Ripka et. al fanden eine Assoziation von CUX1 mit eben diesem Signalweg. CUX1 Expression wurde auf mRNA und Proteinniveau durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg induziert und konnte durch PI3K Inhibitoren vermindert werden (Ripka et al. 2010a).

### **6.3. Der HIF-1 $\alpha$ Transduktionsweg ist in ein komplexes Regulierungsmuster eingebunden**

Es konnten bisher eine Reihe von Faktoren aufgezeigt werden, welche die HIF-1 $\alpha$  gesteuerte Anpassungsreaktion der hypoxischen Zelle mit beeinflussen. Hierzu gehört beispielsweise P28<sup>Gank</sup> (Gankyrin), ein Teil des 26S Proteasoms und nachgewiesenes Onkogen im hepatozellulären Karzinom (Fu 2002). Eine Überexpression von P28<sup>Gank</sup> hatte einen Anstieg der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 $\alpha$  zufolge (Fu et al. 2011). Eine Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B konnte nachgewiesen werden. HIF-1 $\alpha$  kann unter akuter Hypoxie NF- $\kappa$ B verstärken, während eine umgekehrte Regulation von HIF-1 $\alpha$  durch verschiedene NF- $\kappa$ B Untereinheiten unter Normoxie und prolongierter Hypoxie nachgewiesen wurde (Jiang et al. 2015). Spannenderweise scheinen auch weitere Homöodomaingene an der Regulation des HIF-1 $\alpha$  Antwortweges beteiligt zu sein. PROX1 ist ebenfalls ein Homöodomain Gen, welches mit der Regulation von HIF-1 $\alpha$  in hepatozellulärem Karzinom in Verbindung gebracht wird. Überexpression von PROX1 rief einen Anstieg von HIF-1 $\alpha$  Zielgenen hervor mit Anstieg von E-Cadherin und Abfall von Vimentin. Umgekehrt verursachte ein PROX1 knock-down deren Stimulation (Liu et al. 2013b). Ein anderer Regulator, der HIF1 $\alpha$  und die Angiogenese unterdrückt sowie p53 hochreguliert, ist HOXA5 (Zhu et al. 2009), während HOXA3 Angiogenesefaktoren mit induziert (Myers et al. 2002). CUX1 ist also allenfalls ein Baustein in der Regulierung der Hypoxieantwort der Zelle. Andersherum ist der Einfluss auf die Hypoxieantwort nur ein Teil des großen Wirkungsspektrums von CUX1.

### **6.4. CUX1 verhindert die Zellzyklusblockade im hepatozellulären Karzinom p53 unabhängig durch Modulation der HIF-1 $\alpha$ Aktivität**

Die Repression des Cyklin-abängige Kinasen Inhibitors p21 (CDKN1A) durch CUX1 wurde bereits 1998 von Coqueret et.al. beschrieben. Erhöhung von CUX1 Aktivität korreliert mit einer Abnahme von p21 auf mRNA und Proteinebene in NIH 3T3 Zellen. Eine direkte Bindung von p21 konnte nachgewiesen werden (Coqueret et al. 1998). CUX1 ist in der Entwicklung von Nierengewebe an der Repression von p27 (CDKN1B) beteiligt. Mit Chromatin Immunoprecipitationsassays (ChIP) konnte in vivo eine direkte

Interaktion von CUX1 mit p21 in neugeborenem murinem Nierengewebe nachgewiesen werden. Mittels Luciferase Reporter Vektor konnte eine verstärkte Repression der p27 Promoteraktivität durch CUX1 nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine definierte Bindungsstelle von CUX1 auf dem p27 Promoter identifiziert, sowie eine Interaktion mit dem Ko-Repressor Grg4 (Sharma et al. 2009). Eine Analyse der Beteiligung von CUX1 in der Entwicklung von Pyramidenbahnneuronen ergab, dass CUX1 das Level von p27 in kultivierten Kortikalneuronen senken kann, indem es direkt an den p27 Promoter bindet (Li et al. 2010).

Neben der Bedeutung der p21 und p27 Repression von CUX1 für Differenzierung von gesundem Gewebe, gibt es auch Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Entstehung von krankhaftem Gewebe. In einem heterozygoten CUX1<sup>+/-</sup> Mausmodell zur Analyse der Entstehung von ADPKD (Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung) konnte durch verminderte CUX1 Expression ein Anstieg von p27 im Nierengewebe gefunden werden. Verminderung von CUX1 hatte eine Reduktion der Entwicklung von schweren Nierenzysten und einen verminderten Fortschritt der polyzystischen Nierenerkrankung zufolge (Paul et al. 2011).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche geben Hinweise, dass CUX1 in Hypoxie auf mRNA Ebene einen hemmenden Effekt auf Faktoren des Zellzyklusarrests hat. Sowohl die Analyse von p21 (CDKN1A) als auch p27 (CDKN1B) lassen eine Induktion nach Knock-down von CUX1 vermuten. Da der gleiche Zusammenhang sowohl in der Wildtyp p53 exprimierenden HepG2 Zelllinie und in der p53 negativen Hep3B Zelllinie beobachtet wurde, würde dies für eine p53 unabhängige Regulation durch direkte Bindung von CUX1 an Promoterregionen von p21 und p27 sprechen.

Nach diesem Modell würde CUX1 durch Inhibition von Zellzyklusarrest die Proliferation in Tumorzellen fördern. Der Zellzyklusarrest hat eine essentielle Funktion für den Erhalt der Lebensfähigkeit unter veränderten Umweltbedingungen der Zelle wie bei Hypoxie.

Im hepatozellulären Karzinom wurden jedoch widersprüchliche Rollen von p21 und p27 beschrieben. CDKN1A oder p21 findet sich in Gewebsanalysen von hepatozellulärem Karzinom oft vermindert (Furutani et al. 1997). In einer anderen Analysegruppe fand sich bei 37 % der analysierten HCC-Gewebsproben eine p53 unabhängige Expression von p21. Diese konnte mit einer verbesserten Überlebenszeit dieser Patienten in Verbindung gebracht werden (Kao et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde in zirrhotischem Lebergewebe mit erhöhten p21 auch eine erhöhte Auftauchen von hepatozellulärem Karzinom festgestellt (Wagayama et al. 2002). Laut Ohkoshi et. al. führt ein bestimmtes Phosphorylierungsmuster von p21 zu einer Translokation von p21 ins Zytoplasma. Dort

wirkt es dann vermehrt anti-apoptotisch über Cyclin D und Cyklin-abhängige Kinasen 4 und 6 (Ohkoshi et al. 2015).

Ähnliche Ergebnisse liegen für die Funktion von p27 im hepatozellulärem Karzinom vor. Matsuda et. al. fanden die 5-Jahres Überlebensrate von Patienten mit hoher Expression von p27 im HCC Gewebe bei 93% im Gegensatz zu 62% bei Patienten mit niedriger p27 Expression verbessert (Matsuda et al. 2013). Allerdings gibt es auch hier Hinweise, dass p27 durch veränderte Phosphorylierung in das Zytoplasma translokalisiert und dass in manchen hepatozellulären Karzinomen eine hohe zytoplasmatische p27 Konzentration zu einer verschlechterten Prognose führt (Nan 2004; Matsuda et al. 2003).

In Zusammenschau wirkt CUX1 also direkt als Repressor auf p21 und p27. Im hepatozellulären Karzinom senkt es diese beiden und somit die Fähigkeit der Zelle zum Zellzyklusarrest bei toxischem Zellschaden. CUX1 wirkt hier onkogen. Gleichzeitig ist erhöhtes p21 und p27 bei einigen Tumortypen im Zytoplasma mit schlechterer Prognose assoziiert.

Auch für HIF-1 $\alpha$  ist ein Effekt auf die Expression von p21 (CDKN1A) und p27 (CDKN1B) beschrieben. Die Ausschaltung von HIF-1 $\alpha$  durch Deletion in B-Lymphozyten der Milz im Mausmodell führte zum Zellzyklusprogress in S-Phase und zu vermehrter Proliferation unter Hypoxie. P27 und p21 mRNA zeigten sich durch Ausschaltung von HIF-1 $\alpha$  reduziert (Goda et al. 2003a). In der durchgeführten Arbeit zeigte sich dabei kein Unterschied in p53 positiven und p53 negativen B-Lymphozyten.

#### **6.5. Unterschiede der p53 Wildtyp exprimierenden Zelllinie HepG2 zur p53 negativen Zelllinie Hep3B in der Hypoxieantwort**

Aus den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lässt sich ein deutlicher Effekt von CUX1 Modulation auf die Hypoxiereaktion der Zelle in Hep3B Zellen vermuten. Diese zeigten sich bei Hypoxiebehandlung unter CUX1 knock-down deutlich stärker toxisch geschädigt mit Rückgang von mRNA und Proteinexpression auf nicht mehr messbare Niveaus. Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Zelllinien ist die Expression von Wildtyp p53 in HepG2 gegenüber der Nullexpression in Hep3B. P53 ist ein Protein, das von TP53 Gen kodiert wird, und am häufigsten Mutationen in menschlichen Tumoren zeigt. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der unter zellulärem Stress rapide stabilisiert wird und eine übergeordnete Rolle in der Zellreaktion spielt. Als sogenannter „Wächter des Genoms“ ist er für dessen Integrität verantwortlich und ist ein essentieller Tumorsuppressor. Der Frage, ob die p53 Expression sich auf die Apoptose unter Hypoxie dieser Zellen auswirkt, gingen Sermeus et. al. 2012 nach. Sie inkubierten

HepG2 und Hep3B Zellen sowie zwei weitere Zelllinien bei 1% Sauerstoff und testeten deren Resistenz gegenüber mehreren Chemotherapeutika, darunter Etoposid. Der Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Aktivität wurde mittels HRE-Luciferase Reporter bestätigt. Während HepG2 vermehrten Schutz vor Etoposid induzierter Apoptose zeigte, fand sich dieser Effekt in Hep3B Zellen nicht. Die folgende Analyse konnte jedoch kein einheitliches Bild der veränderten Apoptosefaktoren liefern. In HepG2 Zellen konnte eine Erhöhung einer bestimmten Proteinreihe ausgemacht werden, darunter BIM, BID, PUMA und NOXA. Von diesen zeigte sich NOXA als ein p53 abhängiger Faktor. Die Arbeit zeigte insgesamt, dass Hypoxie je nach Zelltyp unterschiedlich die Apoptosemechanismen beeinflusst und diese dabei teilweise von p53 beeinflusst sind (Sermeus et al. 2012).

#### **6.6. CUX1 wirkt im hepatozellulären Karzinom als Onkogen durch Aufrechterhaltung der Hypoxieantwortreaktion**

Die vorliegenden Beobachtungen unterstützen die Theorie von CUX1 als Onkogen in Tumorzellen. Durch Mitwirken am Erhalt der HIF-1 $\alpha$  Antwortreaktion auf Hypoxie und als Gegenspieler der Zellzyklusarrest könnte CUX1 im hepatozellulären Karzinom das Überleben unter hypoxischen Bedingungen fördern. Dieser Zusammenhang wurde bisher im hepatozellulären Karzinom nicht hergestellt. Arbeiten, welche den Zusammenhang von CUX1 und Hypoxie beschreiben, sind die von Li et al. nachgewiesene Interaktion zwischen CUX1 und FIH-1 (Li et al. 2007) und der Nachweis von HIF-1 $\alpha$  Erhöhung bei Überexpression von CUX1 in BON1 Zellen (Krug et al. 2014). Erstere Arbeit unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Zusammenhänge, die HIF-1 $\alpha$  Modulation von CUX1 konnte in dieser nicht aufgezeigt werden.

Die Rolle von CUX1 als Onkogen wird durch eine Reihe Publikationen gestützt, welche unter Punkt 2.3.2. aufgeführt sind. So fördert CUX1 beispielsweise in Pankreasneoplasien die Apoptoseresistenz und die Zellmigration (Michl et al. 2005). Ebenso schützt es im Pankreaskarzinom vor TRAIL-induzierter Apoptose (Ripka et al. 2010a) und induziert über WNT5A Proliferation und Zellmigration (Ripka et al. 2007). Im Mausmodell kam es zu Organhyperplasien, Nierenveränderungen und zur Entwicklung von Brust- und Lungentumoren (Ledford et al. 2002, Brantley et al. 2003, Cadieux et al. 2009, Ramdzan et al. 2014).

Die meisten Beschreibungen von einer tumorsuppressiven Funktion von CUX1 beziehen sich auf eine verminderte Expression von CUX1 bei Verlust eines Allels wie in AML (Zeng et al. 1999, McNerney et al. 2013, Ramdzan und Nepveu 2014).

Interessanterweise kann auch in Zellen mit „*loss of heterozygosity*“ von CUX1 teilweise eine Amplifizierung des verbleibenden Allels festgestellt werden. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist, dass zunächst ein Allel inaktiviert wird und das verbleibende Allel später amplifiziert wird. Nach Ramdzan und Nepveu könnte das widersprüchliche Bild von CUX1 soweit zusammengefügt werden, dass zur Tumorentstehung zunächst eine Verminderung CUX1 beiträgt und später eine vermehrte CUX1 Expression den Tumorprogress fördert (Ramdzan und Nepveu 2014).

Hier stellt sich die Frage, wie eine Reduktion eines Transkriptionsfaktors zu einem veränderten Transkriptionsmuster führen kann, welches dann die Tumorentstehung fördert.

Bisher sind zwei Prinzipien für den Einfluss der Konzentration eines Transkriptionsfaktors bekannt. Transkriptionsfaktoren können zum einen nach dem „affinity threshold“ Modell funktionieren. Hier zeichnen sich einige Bindungsstellen durch ihre niedrigere Affinität zum Transkriptionsfaktor aus und benötigen höhere Konzentrationen desselben, um aktiviert zu werden. Andere Transkriptionsfaktoren sind mit einer linearen oder „analog“ Genregulation assoziiert. Hier liegt eine Vielzahl von Bindungsstellen pro Gen vor und die Transkriptionsantwort ist proportional zur Menge des Transkriptionsfaktors. Die Frage, welcher dieser Prinzipien CUX1 folgt, gingen Arthur et al. in ihrer 2017 veröffentlichten Arbeit nach. Drei Zelllinien, darunter auch HepG2, wurden analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass mehrere Bindungsstellen für CUX1 auf Zielgenen vorliegen und die Affinität der Bindungsstellen sich nicht mit veränderter CUX1 Expression änderte. CUX1 folgt am ehesten dem linearen Modell der Genregulation. Jedoch zeigte CUX1 dabei einzigartige Eigenschaften: Die Bindung an Enhancer erfolgte distal von Promoterregionen zusammen mit Koaktivatoren (EP300) und Kohesinen. Diese distalen cis-regulatorischen Elemente sind mit einer dem Zelltyp spezifischer Genexpression assoziiert (Natarajan et al. 2012). Dies setzt CUX1 von herkömmlichen Transkriptionsfaktoren ab, welche zumeist an proximale Regionen zum Promoter binden. Zudem fand sich CUX1 vermehrt an DNA-Looping Stellen, wo DNA-Loops CUX1 mit den Promotern der regulierten Gene verbinden. (Arthur et al. 2017). Arthur et al. vertreten somit ein Modell, indem CUX1 bei normaler Konzentration an distale Enhancer bindet und Zielgene über DNA-Loops kontrolliert. Bei Halbierung der CUX1 Konzentration vermindert sich die Bindungswahrscheinlichkeit an allen Loci und das Genexpressionsmuster verändert sich.

## 6.7. Ausblick

Hypoxie und Erhöhung von HIF-1 $\alpha$  im hepatozellulären Karzinom sind mit einem höheren BCLC Stadium, vaskulärer Invasion und verkürzter Überlebenszeit assoziiert (Dai et al. 2009). Die HIF-1 $\alpha$  gesteuerte Anpassung an Hypoxie im hepatozellulären Karzinom scheint deshalb ein interessantes therapeutisches Ziel, jedoch sind noch wenige konkrete Ansätze hierfür vorhanden. Ein mRNA-Antagonist von HIF-1 $\alpha$  (SPC2968) wurde bisher in einer Phase I Studie getestet. Hier fand sich zunächst keine Korrelation zu einem klinischen Effekt, wenn auch eine Reduktion der Tumorgöße festgestellt wurde (Lin und Wu 2015). Auch GLUT1 als Therapieziel wird evaluiert (Amann und Hellerbrand 2009). Der Transkriptionsfaktor CUX1 wurde bisher in einem Review von Liu et.al. hinsichtlich seiner Eignung als therapeutisches Target evaluiert (Liu et al. 2013a). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass bei der Vielzahl von Veröffentlichungen, die eine proonkogene Wirkung von CUX1 beschreiben, die Entwicklung eines zielgerichteten siRNA-Komplexes abzuwägen ist (Liu et al. 2013a). Entgegen dazu beschrieben Li et al. in ihrer 2013 veröffentlichten Arbeit, dass in Gewebeproben von Magenkarzinomen eine erniedrigte CUX1 Aktivität mit einer Resistenz gegen medikamentöse Therapie assoziiert ist und CUX1 Expression hier mit längerem Überleben korreliert. Durch Versuche in vitro mit SGC7901 and MKN45 Zelllinien und in vivo im Mausmodell mit subkutanem Magenkarzinom konnte gezeigt werden, dass die Expression von aktivem CUX1 eine Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Doxorubicin rückgängig machen kann. Ein knock-down von CUX1 resultierte wiederum in erhöhter Therapieresistenz (Li et al. 2013). Die Autoren schlagen vor, die Induktion von CUX1 in Magenkarzinomen zur Verstärkung der Chemotherapieantwort zu erforschen.

Diese widersprüchlichen Ansätze zeigen auf, dass die komplexe Funktionsweise von CUX1 noch weiteren Verständnisses bedarf. Die duale Rolle in Tumorsuppression und Onkogenese in verschiedenen Zelltypen, die Einbindung in vielfältige Transduktionswege und die unterschiedlichen Wirkungsweisen der verschiedenen Isoformen machen CUX1 zu einem komplexen Thema. Über dessen genaue Regulierung und wie CUX1 zu bestimmten Bindungsstellen auf Genen rekrutiert wird ist bisher noch wenig bekannt. Ebenso warum bestimmte Gene unterdrückt und andere hochreguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal versucht, einen Zusammenhang zwischen CUX1 und der Adaptionfunktion von hepatozellulären Karzinomzellen an Hypoxie herzustellen. Zunächst ist eine aussagekräftige Bestätigung der in dieser Arbeit vermuteten Zusammenhänge nötig. Die genauen Mechanismen dieses

Zusammenhangs erfordern weitere Erforschung. Eine Bestimmung der genauen Isoform von CUX1, welche im hepatozellulären Karzinom diese Funktion erfüllt, wäre zudem ebenso interessant wie weitere Erkenntnisse über die genauen Ansatzpunkte der Regulierung der HIF-1 $\alpha$  Transkriptionsaktivität. Ebenso ist weiter zu evaluieren, inwiefern CUX1 direkt mit Zielgenen der Hypoxieantwort interagiert. Diese Erkenntnisse können weiterhelfen, die Bedeutung von CUX1 im hepatozellulären Karzinom einzuordnen und neue Therapieansätze über Regulation der Hypoxieadaptation aufzuzeigen.

## 7. Literaturverzeichnis

### Literaturverzeichnis

Aleksic, T.; Bechtel, M.; Krndija, D.; Wichert, G. von; Knobel, B.; Giehl, K. et al. (2007): CUTL1 promotes tumor cell migration by decreasing proteasome-mediated Src degradation. In: *Oncogene* 26 (40), S. 5939–5949. DOI: 10.1038/sj.onc.1210398.

Amann, Thomas; Hellerbrand, Claus (2009): GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 13 (12), S. 1411–1427. DOI: 10.1517/14728220903307509.

Arthur, Robert K.; An, Ningfei; Khan, Saira; McNerney, Megan E. (2017): The haploinsufficient tumor suppressor, CUX1, acts as an analog transcriptional regulator that controls target genes through distal enhancers that loop to target promoters. In: *Nucleic acids research* 45 (11), S. 6350–6361. DOI: 10.1093/nar/gkx218.

Ban, Hyun Seung; Shimizu, Kazuki; Minegishi, Hidemitsu; Nakamura, Hiroyuki (2012): Identification of heat shock protein 60 as the regulator of the hypoxia-inducible factor subunit HIF-1 $\alpha$ . In: *Pure and Applied Chemistry* 84 (11), S. 2510. DOI: 10.1351/PAC-CON-11-11-03.

Bartlett, Derek W.; Davis, Mark E. (2006): Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. In: *Nucleic acids research* 34 (1), S. 322–333. DOI: 10.1093/nar/gkj439.

Biron-Shental, Tal; Schaiff, W. Timothy; Ratajczak, Christine K.; Bildirici, Ibrahim; Nelson, D. Michael; Sadovsky, Yoel (2007): Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 197 (5), 516.e1-6. DOI: 10.1016/j.ajog.2007.03.066.

Bowen, David G.; Walker, Christopher M. (2005): Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. In: *Nature* 436 (7053), S. 946–952. DOI: 10.1038/nature04079.

Brantley, Jennifer G.; Sharma, Madhulika; Alcalay, Neal I.; Heuvel, Gregory B. Vanden (2003): Cux-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. In: *Kidney international* 63 (4), S. 1240–1248. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00889.x.

Bruix, Jordi; Sherman, Morris (2011): Management of hepatocellular carcinoma. An update. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (3), S. 1020–1022. DOI: 10.1002/hep.24199.

- Bugianesi, E. (2007): Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. In: *Clinics in liver disease* 11 (1), 191-207, x-xi. DOI: 10.1016/j.cld.2007.02.006.
- Cadieux, Chantal; Keding, Valérie; Yao, Lu; Vadnais, Charles; Drossos, Maria; Paquet, Marilène; Nepveu, Alain (2009): Mouse mammary tumor virus p75 and p110 CUX1 transgenic mice develop mammary tumors of various histologic types. In: *Cancer research* 69 (18), S. 7188–7197. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4899.
- Casalini, Patrizia; Iorio, Marilena V.; Berno, Valeria; Bergamaschi, Anna; Børresen Dale, Anne-Lise; Gasparini, Patrizia et al. (2007): Relationship between p53 and p27 expression following HER2 signaling. In: *Breast (Edinburgh, Scotland)* 16 (6), S. 597–605. DOI: 10.1016/j.breast.2007.05.007.
- Ceradini, Daniel J.; Kulkarni, Anita R.; Callaghan, Matthew J.; Tepper, Oren M.; Bastidas, Nicholas; Kleinman, Mark E. et al. (2004): Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. In: *Nature medicine* 10 (8), S. 858–864. DOI: 10.1038/nm1075.
- Cheng, Ann-Lij; Kang, Yoon-Koo; Chen, Zhendong; Tsao, Chao-Jung; Qin, Shukui; Kim, Jun Suk et al. (2009): Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma. A phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. In: *The Lancet Oncology* 10 (1), S. 25–34. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70285-7.
- Choi, Sae Byeol; Park, Jong Bae; Song, Tae-Jin; Choi, Sang Yong (2011): Molecular mechanism of HIF-1-independent VEGF expression in a hepatocellular carcinoma cell line. In: *International journal of molecular medicine* 28 (3), S. 449–454. DOI: 10.3892/ijmm.2011.719.
- Chou, Chen-Te; Chen, Ran-Chou; Lin, Wei-Chan; Ko, Chih-Jan; Chen, Chia-Bang; Chen, Yao-Li (2014): Prediction of microvascular invasion of hepatocellular carcinoma. Preoperative CT and histopathologic correlation. In: *AJR. American journal of roentgenology* 203 (3), W253-9. DOI: 10.2214/AJR.13.10595.
- Coqueret, O.; Bérubé, G.; Nepveu, A. (1998): The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. In: *The EMBO journal* 17 (16), S. 4680–4694. DOI: 10.1093/emboj/17.16.4680.
- Cubelos, Beatriz; Sebastián-Serrano, Alvaro; Beccari, Leonardo; Calcagnotto, Maria Elisa; Cisneros, Elsa; Kim, Seonhee et al. (2010): Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. In: *Neuron* 66 (4), S. 523–535. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.04.038.

- Dachs, G. U.; Tozer, G. M. (2000): Hypoxia modulated gene expression. Angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 36 (13 Spec No), S. 1649–1660.
- Dai, Chen-Xin; Gao, Qiang; Qiu, Shuang-Jian; Ju, Min-Jie; Cai, Ming-Yan; Xu, Yong-Feng et al. (2009): Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with inflammation, angiogenesis and MYC, is a critical prognostic factor in patients with HCC after surgery. In: *BMC cancer* 9, S. 418. DOI: 10.1186/1471-2407-9-418.
- Dianov, Grigory L.; Hübscher, Ulrich (2013): Mammalian base excision repair. The forgotten archangel. In: *Nucleic acids research* 41 (6), S. 3483–3490. DOI: 10.1093/nar/gkt076.
- Donato, F.; Tagger, A.; Gelatti, U.; Parrinello, G.; Boffetta, P.; Albertini, A. et al. (2002): Alcohol and hepatocellular carcinoma. The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. In: *American journal of epidemiology* 155 (4), S. 323–331.
- Edfors, Fredrik; Danielsson, Frida; Hallström, Björn M.; Käll, Lukas; Lundberg, Emma; Pontén, Fredrik et al. (2016): Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. In: *Molecular systems biology* 12 (10), S. 883. DOI: 10.15252/msb.20167144.
- Eggert, Christian; Fischer Utz (2003): RNA-Interferenz: Ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion. In: *BIOspektrum* 9, S. 372–374, zuletzt geprüft am 10.09.2017.
- El-Serag, Hashem B. (2007): Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. In: *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 37 Suppl 2, S88-94. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00168.x.
- Fattovich, Giovanna; Stroffolini, Tommaso; Zagni, Irene; Donato, Francesco (2004): Hepatocellular carcinoma in cirrhosis. Incidence and risk factors. In: *Gastroenterology* 127 (5 Suppl 1), S35-50.
- Feldser, D.; Agani, F.; Iyer, N. V.; Pak, B.; Ferreira, G.; Semenza, G. L. (1999): Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. In: *Cancer research* 59 (16), S. 3915–3918.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. (2013): GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France (IARC CancerBase, 11). Online verfügbar unter [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx), zuletzt geprüft am 23.10.2017.

Forner, Alejandro; Gilabert, Marine; Bruix, Jordi; Raoul, Jean-Luc (2014): Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 11 (9), S. 525–535. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.122.

Fu, Jing; Chen, Yao; Cao, Jie; Luo, Tao; Qian, You-Wen; Yang, Wen et al. (2011): p28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  pathways. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (1), S. 181–192. DOI: 10.1002/hep.24015.

Fu, Xiao-Yong (2002): Overexpression of p 28/ gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. In: *WJG* 8 (4), S. 638. DOI: 10.3748/wjg.v8.i4.638.

Ghouri, Yezaz Ahmed; Mian, Idrees; Rowe, Julie H. (2017): Review of hepatocellular carcinoma. Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. In: *Journal of carcinogenesis* 16, S. 1. DOI: 10.4103/jcar.JCar\_9\_16.

Goda, N.; Ryan, H. E.; Khadivi, B.; McNulty, W.; Rickert, R. C.; Johnson, R. S. (2003a): Hypoxia-Inducible Factor 1 Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia. In: *Molecular and cellular biology* 23 (1), S. 359–369. DOI: 10.1128/MCB.23.1.359–369.2003.

Goda, Nobuhito; Ryan, Heather E.; Khadivi, Bahram; McNulty, Wayne; Rickert, Robert C.; Johnson, Randall S. (2003b): Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is essential for cell cycle arrest during hypoxia. In: *Molecular and cellular biology* 23 (1), S. 359–369.

Gosalia AJ, Martin P, Jones PD: Advances and Future Directions in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. In: *Gastroenterology & Hepatology* 2017 (13(7)), S. 398–410.

Goulet, Brigitte; Baruch, Amos; Moon, Nam-Sung; Poirier, Madeleine; Sansregret, Laurent L.; Erickson, Ann et al. (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. In: *Molecular cell* 14 (2), S. 207–219.

Goulet, B., Watson, P., Poirier, M., Leduy, L., Berube, G., Meterissian, S., Jolicoeur, P., and Nepveu, A (2002): Characterization of a tissue-specific Supplemental data CDP/Cux isoform, p75, activated in breast tumor cells. In: *Cancer Res.* (62), S. 6625–6633.

Greijer, A. E.; van der Wall, E. (2004): The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. In: *Journal of clinical pathology* 57 (10), S. 1009–1014. DOI: 10.1136/jcp.2003.015032.

- Gupta, S.; Knowlton, A. A. (2005): HSP60, Bax, apoptosis and the heart. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 9 (1), S. 51–58.
- Haas-Kogan, D.; Shalev, N.; Wong, M.; Mills, G.; Yount, G.; Stokoe, D. (1998): Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. In: *Current biology : CB* 8 (21), S. 1195–1198.
- Hernandez-Gea, Virginia; Toffanin, Sara; Friedman, Scott L.; Llovet, Josep M. (2013): Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. In: *Gastroenterology* 144 (3), S. 512–527. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.002.
- Hewitson, Kirsty S.; McNeill, Luke A.; Riordan, Madeline V.; Tian, Ya-Min; Bullock, Alex N.; Welford, Richard W. et al. (2002): Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (29), S. 26351–26355. DOI: 10.1074/jbc.C200273200.
- Höckel, M.; Vaupel, P. (2001): Tumor hypoxia. Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. In: *Journal of the National Cancer Institute* 93 (4), S. 266–276.
- Hong, Soon-Sun; Lee, Hyunseung; Kim, Kyu-Won (2004): HIF-1alpha. A valid therapeutic target for tumor therapy. In: *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 36 (6), S. 343–353. DOI: 10.4143/crt.2004.36.6.343.
- Hu, J.; Discher, D. J.; Bishopric, N. H.; Webster, K. A. (1998): Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. In: *Biochemical and biophysical research communications* 245 (3), S. 894–899. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8543.
- Huang, Yen-Tsung; Jen, Chin-Lan; Yang, Hwai-I; Lee, Mei-Hsuan; Su, Jun; Lu, Sheng-Nan et al. (2011): Lifetime risk and sex difference of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis B and C. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (27), S. 3643–3650. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.2335.
- Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie; Center, Melissa M.; Ferlay, Jacques; Ward, Elizabeth; Forman, David (2011): Global cancer statistics. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 61 (2), S. 69–90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- Jhunjunwala, Suchit; Jiang, Zhaoshi; Stawiski, Eric W.; Gnad, Florian; Liu, Jinfeng; Mayba, Oleg et al. (2014): Diverse modes of genomic alteration in hepatocellular carcinoma. In: *Genome biology* 15 (8), S. 436. DOI: 10.1186/s13059-014-0436-9.

Jiang, B. H.; Rue, E.; Wang, G. L.; Roe, R.; Semenza, G. L. (1996): Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (30), S. 17771–17778.

Jiang, Yuan; Zhu, Ying; Wang, Xinxin; Gong, Juan; Hu, Chunyan; Guo, Bo et al. (2015): Temporal regulation of HIF-1 and NF- $\kappa$ B in hypoxic hepatocarcinoma cells. In: *Oncotarget* 6 (11), S. 9409–9419. DOI: 10.18632/oncotarget.3352.

Kaelin, William G. (2005): Proline hydroxylation and gene expression. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 115–128. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133142.

Kaidi, Abderrahmane; Qualtrough, David; Williams, Ann C.; Paraskeva, Christos (2006): Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. In: *Cancer research* 66 (13), S. 6683–6691. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0425.

Kao, Jung-Ta; Chuah, Seng-Kee; Huang, Chao-Cheng; Chen, Chao-Long; Wang, Chih-Chi; Hung, Chao-Hung et al. (2007): P21/WAF1 is an independent survival prognostic factor for patients with hepatocellular carcinoma after resection. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 27 (6), S. 772–781. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2007.01499.x.

Khemlina, Galina; Ikeda, Sadakatsu; Kurzrock, Razelle (2017): The biology of Hepatocellular carcinoma. Implications for genomic and immune therapies. In: *Molecular cancer* 16 (1), S. 149. DOI: 10.1186/s12943-017-0712-x.

Kinoshita, Akiyoshi; Onoda, Hiroshi; Fushiya, Nao; Koike, Kazuhiko; Nishino, Hirokazu; Tajiri, Hisao (2015): Staging systems for hepatocellular carcinoma. Current status and future perspectives. In: *World journal of hepatology* 7 (3), S. 406–424. DOI: 10.4254/wjh.v7.i3.406.

Kojima, Kentaro; Takata, Akemi; Vadhais, Charles; Otsuka, Motoyuki; Yoshikawa, Takeshi; Akanuma, Masao et al. (2011): MicroRNA122 is a key regulator of  $\alpha$ -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. In: *Nature communications* 2, S. 338. DOI: 10.1038/ncomms1345.

Kokudo, Takashi; Hasegawa, Kiyoshi; Matsuyama, Yutaka; Takayama, Tadatoshi; Izumi, Namiki; Kadoya, Masumi et al. (2016): Survival benefit of liver resection for hepatocellular carcinoma associated with portal vein invasion. In: *Journal of hepatology* 65 (5), S. 938–943. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.05.044.

Koong, A. C.; Chen, E. Y.; Giaccia, A. J. (1994): Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. In: *Cancer research* 54 (6), S. 1425–1430.

Krug, Sebastian; Kühnemuth, Benjamin; Griesmann, Heidi; Neesse, Albrecht; Mühlberg, Leonie; Boch, Michael et al. (2014): CUX1. A modulator of tumour aggressiveness in pancreatic neuroendocrine neoplasms. In: *Endocrine-related cancer* 21 (6), S. 879–890. DOI: 10.1530/ERC-14-0152.

Kühnemuth, B.; Mühlberg, L.; Schipper, M.; Griesmann, H.; Neesse, A.; Milosevic, N. et al. (2015): CUX1 modulates polarization of tumor-associated macrophages by antagonizing NF- $\kappa$ B signaling. In: *Oncogene* 34 (2), S. 177–187. DOI: 10.1038/onc.2013.530.

Lando, David; Peet, Daniel J.; Gorman, Jeffrey J.; Whelan, Dean A.; Whitelaw, Murray L.; Bruick, Richard K. (2002): FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. In: *Genes & development* 16 (12), S. 1466–1471. DOI: 10.1101/gad.991402.

Ledford, Aric W.; Brantley, Jennifer G.; Kemeny, Gabor; Foreman, Tonia L.; Quaggin, Susan E.; Igarashi, Peter et al. (2002): Deregulated expression of the homeobox gene *Cux-1* in transgenic mice results in downregulation of p27(kip1) expression during nephrogenesis, glomerular abnormalities, and multiorgan hyperplasia. In: *Developmental biology* 245 (1), S. 157–171. DOI: 10.1006/dbio.2002.0636.

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

Li, Ning; Zhao, Chun-Tao; Wang, Ying; Yuan, Xiao-Bing (2010): The transcription factor *Cux1* regulates dendritic morphology of cortical pyramidal neurons. In: *PloS one* 5 (5), e10596. DOI: 10.1371/journal.pone.0010596.

Li, Tingting; Wang, Honghong; Sun, Yimin; Zhao, Lina; Gang, Yi; Guo, Xuegang et al. (2013): Transcription factor CUTL1 is a negative regulator of drug resistance in gastric cancer. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (6), S. 4135–4147. DOI: 10.1074/jbc.M112.345942.

Li, Wenbin; Wang, Rong; Xie, Hua; Zhang, Juanhong; Jia, Zhengping (2015): Changes of pathological and physiological indicators affecting drug metabolism in rats after acute exposure to high altitude. In: *Experimental and therapeutic medicine* 9 (1), S. 98–104. DOI: 10.3892/etm.2014.2049.

- Lin, Daniel; Wu, Jennifer (2015): Hypoxia inducible factor in hepatocellular carcinoma. A therapeutic target. In: *WJG* 21 (42), S. 12171–12178. DOI: 10.3748/wjg.v21.i42.12171.
- Liu, Kuan-can; Lin, Bao-shun; Zhao, Meng; Wang, Kai-yu; Lan, Xiao-peng (2013a): Cutl1. A potential target for cancer therapy. In: *Cellular signalling* 25 (1), S. 349–354. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.10.008.
- Liu, Yanfeng; Zhang, Ju-Bo; Qin, Yi; Wang, Wei; Wei, Lili; Teng, Yigang et al. (2013b): PROX1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by way of up-regulating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and protein stability. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (2), S. 692–705. DOI: 10.1002/hep.26398.
- Llovet, Josep M.; Ricci, Sergio; Mazzaferro, Vincenzo; Hilgard, Philip; Gane, Edward; Blanc, Jean-Frédéric et al. (2008): Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 359 (4), S. 378–390. DOI: 10.1056/NEJMoa0708857.
- Loboda, Agnieszka; Jozkowicz, Alicja; Dulak, Jozef (2010): HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. In: *Molecules and cells* 29 (5), S. 435–442. DOI: 10.1007/s10059-010-0067-2.
- Luo, Dongjun; Wang, Zhongxia; Wu, Junyi; Jiang, Chunping; Wu, Junhua (2014): The role of hypoxia inducible factor-1 in hepatocellular carcinoma. In: *BioMed research international* 2014, S. 409272. DOI: 10.1155/2014/409272.
- Mahon, P. C.; Hirota, K.; Semenza, G. L. (2001): FIH-1. A novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. In: *Genes & development* 15 (20), S. 2675–2686. DOI: 10.1101/gad.924501.
- Malec, Viktor; Gottschald, Oana R.; Li, Shu; Rose, Frank; Seeger, Werner; Hänze, Jörg (2010): HIF-1  $\alpha$  signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells. In: *Free radical biology & medicine* 48 (12), S. 1626–1635. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.008.
- Marschall, Z. von (2001): Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. In: *Gut* 48 (1), S. 87–96. DOI: 10.1136/gut.48.1.87.
- Matsuda, Yasunobu; Ichida, Takafumi; Genda, Takuya; Yamagiwa, Satoshi; Aoyagi, Yutaka; Asakura, Hitoshi (2003): Loss of p16 contributes to p27 sequestration by cyclin D(1)-cyclin-dependent kinase 4 complexes and poor prognosis in hepatocellular

carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (9), S. 3389–3396.

Matsuda, Yasunobu; Wakai, Toshifumi; Kubota, Masayuki; Takamura, Masaaki; Yamagiwa, Satoshi; Aoyagi, Yutaka et al. (2013): Clinical significance of cell cycle inhibitors in hepatocellular carcinoma. In: *Medical molecular morphology* 46 (4), S. 185–192. DOI: 10.1007/s00795-013-0047-7.

Mazumdar, Jolly; O'Brien, W. Timothy; Johnson, Randall S.; LaManna, Joseph C.; Chavez, Juan C.; Klein, Peter S.; Simon, M. Celeste (2010): O2 regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. In: *Nature cell biology* 12 (10), S. 1007–1013. DOI: 10.1038/ncb2102.

Mazzaferro, V.; Regalia, E.; Doci, R.; Andreola, S.; Pulvirenti, A.; Bozzetti, F. et al. (1996): Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. In: *The New England journal of medicine* 334 (11), S. 693–699. DOI: 10.1056/NEJM199603143341104.

McNerney, Megan E.; Brown, Christopher D.; Wang, Xiaoyue; Bartom, Elizabeth T.; Karmakar, Subhradip; Bandlamudi, Chaitanya et al. (2013): CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. In: *Blood* 121 (6), S. 975–983. DOI: 10.1182/blood-2012-04-426965.

Michl, Patrick; Downward, Julian (2006): CUTL1. A key mediator of TGF $\beta$ -induced tumor invasion. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (2), S. 132–134. DOI: 10.4161/cc.5.2.2311.

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

Moon, N. S.; Bérubé, G.; Nepveu, A. (2000): CCAAT displacement activity involves CUT repeats 1 and 2, not the CUT homeodomain. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (40), S. 31325–31334. DOI: 10.1074/jbc.M002912200.

Moon, Nam Sung; Rong Zeng, Wendy; Premdas, Peter; Santaguida, Marianne; Bérubé, Ginette; Nepveu, Alain (2002): Expression of N-terminally truncated isoforms of CDP/CUX is increased in human uterine leiomyomas. In: *International journal of cancer* 100 (4), S. 429–432. DOI: 10.1002/ijc.10510.

Myers, Connie; Charboneau, Aubri; Cheung, Irene; Hanks, Douglas; Boudreau, Nancy (2002): Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. In: *The*

*American journal of pathology* 161 (6), S. 2099–2109. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64488-4.

Nan, Ke-Jun (2004): Expression and altered subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1 in hepatocellular carcinoma. In: *WJG* 10 (10), S. 1425. DOI: 10.3748/wjg.v10.i10.1425.

Neufeld, E. J.; Skalnik, D. G.; Lievens, P. M.; Orkin, S. H. (1992): Human CCAAT displacement protein is homologous to the *Drosophila* homeoprotein, cut. In: *Nature genetics* 1 (1), S. 50–55. DOI: 10.1038/ng0492-50.

Obeid, Joseph M.; Kunk, Paul R.; Zaydfudim, Victor M.; Bullock, Timothy N.; Slingluff, Craig L.; Rahma, Osama E. (2017): Immunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Is it ready for prime time? In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. DOI: 10.1007/s00262-017-2082-z.

Ohkoshi, Shogo; Yano, Masahiko; Matsuda, Yasunobu (2015): Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy. In: *WJG* 21 (42), S. 12150–12156. DOI: 10.3748/wjg.v21.i42.12150.

Osman, Nisreen A. A.; Abd El-Rehim, Dalia M.; Kamal, Inas M. (2015): Defective Beclin-1 and elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  expression are closely linked to tumorigenesis, differentiation, and progression of hepatocellular carcinoma. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (6), S. 4293–4299. DOI: 10.1007/s13277-015-3068-0.

Paul, Binu M.; Vassmer, Dianne; Taylor, Aaron; Magenheimer, Lynn; Carlton, Carol G.; Piontek, Klaus B. et al. (2011): Ectopic expression of Cux1 is associated with reduced p27 expression and increased apoptosis during late stage cyst progression upon inactivation of Pkd1 in collecting ducts. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 240 (6), S. 1493–1501. DOI: 10.1002/dvdy.22625.

Petrelli, F.; Coinu, A.; Borgonovo, K.; Cabiddu, M.; Ghilardi, M.; Lonati, V.; Barni, S. (2014): Oxaliplatin-based chemotherapy. A new option in advanced hepatocellular carcinoma. a systematic review and pooled analysis. In: *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 26 (8), S. 488–496. DOI: 10.1016/j.clon.2014.04.031.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9): e36. DOI: 10.1093/nar/30.9.e36

- Pfaffl, M., W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1/04, 10. Jahrgang
- Raghuhand, N.; Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. (2003): Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. In: *The British journal of radiology* 76 Spec No 1, S11-22. DOI: 10.1259/bjr/12913493.
- Ramdzan, Zubaidah M.; Nepveu, Alain (2014): CUX1, a haploinsufficient tumour suppressor gene overexpressed in advanced cancers. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (10), S. 673–682. DOI: 10.1038/nrc3805.
- Ramdzan, Zubaidah M.; Vadnais, Charles; Pal, Ranjana; Vandal, Guillaume; Cadieux, Chantal; Leduy, Lam et al. (2014): RAS transformation requires CUX1-dependent repair of oxidative DNA damage. In: *PLoS biology* 12 (3), e1001807. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001807.
- Ripka, S.; König, A.; Buchholz, M.; Wagner, M.; Sipos, B.; Klöppel, G. et al. (2007): WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. In: *Carcinogenesis* 28 (6), S. 1178–1187. DOI: 10.1093/carcin/bgl255.
- Ripka, S.; Neesse, A.; Riedel, J.; Bug, E.; Aigner, A.; Poulsom, R. et al. (2010a): CUX1. Target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. In: *Gut* 59 (8), S. 1101–1110. DOI: 10.1136/gut.2009.189720.
- Ripka, Stefanie; Riedel, Jan; Neesse, Albrecht; Griesmann, Heidi; Buchholz, Malte; Ellenrieder, Volker et al. (2010b): Glutamate receptor GRIA3--target of CUX1 and mediator of tumor progression in pancreatic cancer. In: *Neoplasia (New York, N. Y.)* 12 (8), S. 659–667.
- Robert Koch-Institut (Hg.): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes  
Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland  
2011/2012.
- Sansregret, Laurent; Goulet, Brigitte; Harada, Ryoko; Wilson, Brian; Leduy, Lam; Bertoglio, Jacques; Nepveu, Alain (2006): The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase. In: *Molecular and cellular biology* 26 (6), S. 2441–2455. DOI: 10.1128/MCB.26.6.2441–2455.2006.
- Sansregret, Laurent; Nepveu, Alain (2008): The multiple roles of CUX1. Insights from mouse models and cell-based assays. In: *Gene* 412 (1-2), S. 84–94. DOI: 10.1016/j.gene.2008.01.017.

Sansregret, Laurent; Vadnais, Charles; Livingstone, Julie; Kwiatkowski, Nicholas; Awan, Arif; Cadieux, Chantal et al. (2011): Cut homeobox 1 causes chromosomal instability by promoting bipolar division after cytokinesis failure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (5), S. 1949–1954. DOI: 10.1073/pnas.1008403108.

Schmidt, Silvia K.; Ebel, Sebastian; Keil, Eric; Woite, Claudia; Ernst, Joachim F.; Benzin, Anika E. et al. (2013): Regulation of IDO activity by oxygen supply. Inhibitory effects on antimicrobial and immunoregulatory functions. In: *PloS one* 8 (5), e63301. DOI: 10.1371/journal.pone.0063301.

Seitz, Helmut K.; Stickel, Felix (2006): Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. In: *Biological chemistry* 387 (4), S. 349–360. DOI: 10.1515/BC.2006.047.

Semenza, G. L.; Wang, G. L. (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. In: *Molecular and cellular biology* 12 (12), S. 5447–5454.

Semenza, Gregg L. (2009): Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. In: *Seminars in cancer biology* 19 (1), S. 12–16. DOI: 10.1016/j.semcancer.2008.11.009.

Sermeus, A.; Michiels, C. (2011): Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. In: *Cell death & disease* 2, e164. DOI: 10.1038/cddis.2011.48.

Sermeus, Audrey; Genin, Marie; Maincent, Amélie; Fransolet, Maude; Notte, Annick; Leclere, Lionel et al. (2012): Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. In: *PloS one* 7 (11), e47519. DOI: 10.1371/journal.pone.0047519.

Sharma, Madhulika; Brantley, Jennifer G.; Vassmer, Dianne; Chaturvedi, Gaurav; Baas, Jennifer; Vanden Heuvel, Gregory B. (2009): The homeodomain protein Cux1 interacts with Grg4 to repress p27 kip1 expression during kidney development. In: *Gene* 439 (1-2), S. 87–94. DOI: 10.1016/j.gene.2009.03.014.

Shroff, Emelyn H.; Snyder, Colleen; Chandel, Navdeep S. (2007): Role of Bcl-2 family members in anoxia induced cell death. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (7), S. 807–809. DOI: 10.4161/cc.6.7.4044.

Simon, Marie-Pierre; Tournaire, Roselyne; Pouyssegur, Jacques (2008): The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site

located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. In: *Journal of cellular physiology* 217 (3), S. 809–818. DOI: 10.1002/jcp.21558.

Sinclair, A. M.; Lee, J. A.; Goldstein, A.; Xing, D.; Liu, S.; Ju, R. et al. (2001): Lymphoid apoptosis and myeloid hyperplasia in CCAAT displacement protein mutant mice. In: *Blood* 98 (13), S. 3658–3667.

Song, Z-C; Zhou, W.; Shu, R.; Ni, J. (2012): Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1 $\alpha$  pathway. In: *Cell proliferation* 45 (3), S. 239–248. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2012.00810.x.

Srivastava, Supriya; Thakkar, Bhavin; Yeoh, Khay Guan; Ho, Khek Yu; Teh, Ming; Soong, Richie; Salto-Tellez, Manuel (2015): Expression of proteins associated with hypoxia and Wnt pathway activation is of prognostic significance in hepatocellular carcinoma. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 466 (5), S. 541–548. DOI: 10.1007/s00428-015-1745-4.

Thiersch, Markus; Raffelsberger, Wolfgang; Frigg, Rico; Samardzija, Marijana; Wenzel, Andreas; Poch, Olivier; Grimm, Christian (2008): Analysis of the retinal gene expression profile after hypoxic preconditioning identifies candidate genes for neuroprotection. In: *BMC genomics* 9, S. 73. DOI: 10.1186/1471-2164-9-73.

Thorgeirsson, Snorri S.; Grisham, Joe W. (2002): Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. In: *Nature genetics* 31 (4), S. 339–346. DOI: 10.1038/ng0802-339.

Trojan, Jörg; Waidmann, Oliver (2016): Role of regorafenib as second-line therapy and landscape of investigational treatment options in advanced hepatocellular carcinoma. In: *Journal of hepatocellular carcinoma* 3, S. 31–36. DOI: 10.2147/JHC.S112537.

Truscott, M.; Raynal, L.; Premdas, P.; Goulet, B.; Leduy, L.; Berube, G.; Nepveu, A. (2003): CDP/Cux Stimulates Transcription from the DNA Polymerase Gene Promoter. In: *Molecular and cellular biology* 23 (8), S. 3013–3028. DOI: 10.1128/MCB.23.8.3013–3028.2003.

Truscott, Mary; Harada, Ryoko; Vadnais, Charles; Robert, François; Nepveu, Alain (2008): p110 CUX1 cooperates with E2F transcription factors in the transcriptional activation of cell cycle-regulated genes. In: *Molecular and cellular biology* 28 (10), S. 3127–3138. DOI: 10.1128/MCB.02089-07.

Tsutsumi, Shuichi; Taketani, Takeshi; Nishimura, Kunihiro; Ge, Xijin; Taki, Tomohiko; Sugita, Kanji et al. (2003): Two distinct gene expression signatures in pediatric acute

- lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. In: *Cancer research* 63 (16), S. 4882–4887.
- Ullah, Mohammed S.; Davies, Andrew J.; Halestrap, Andrew P. (2006): The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (14), S. 9030–9037. DOI: 10.1074/jbc.M511397200.
- Vadnais, Charles; Davoudi, Sayeh; Afshin, Mojdeh; Harada, Ryoko; Dudley, Rachel; Clermont, Pier-Luc et al. (2012): CUX1 transcription factor is required for optimal ATM/ATR-mediated responses to DNA damage. In: *Nucleic acids research* 40 (10), S. 4483–4495. DOI: 10.1093/nar/gks041.
- van Gurp, M. F.; Pratap, J.; Luong, M.; Javed, A.; Hoffmann, H.; Giordano, A. et al. (1999): The CCAAT displacement protein/cut homeodomain protein represses osteocalcin gene transcription and forms complexes with the retinoblastoma protein-related protein p107 and cyclin A. In: *Cancer research* 59 (23), S. 5980–5988.
- Vanden Heuvel, Gregory B.; Brantley, Jennifer G.; Alcalay, Neal I.; Sharma, Madhulika; Kemeny, Gabor; Warolin, Joshua et al. (2005): Hepatomegaly in transgenic mice expressing the homeobox gene Cux-1. In: *Molecular carcinogenesis* 43 (1), S. 18–30. DOI: 10.1002/mc.20091.
- Vandenheuvel, G.B., Quaggin, S.E., Igarashi, P (1996): A Unique Variant of a Homeobox Gene Related to Drosophila cut Is Expressed in Mouse Testis. In: *Biol. Reprod.* (55), S. 731–739.
- Vaupel, Peter; Höckel, Michael; Mayer, Arnulf (2007): Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. In: *Antioxidants & redox signaling* 9 (8), S. 1221–1235. DOI: 10.1089/ars.2007.1628.
- Wagayama, Hidetaka; Shiraki, Katsuya; Sugimoto, Kazushi; Ito, Takeshi; Fujikawa, Katsuhiko; Yamanaka, Takenari et al. (2002): High expression of p21WAF1/CIP1 is correlated with human hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. In: *Human pathology* 33 (4), S. 429–434.
- Waldman, T.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1995): p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. In: *Cancer research* 55 (22), S. 5187–5190.
- Wenger, Roland H.; Stiehl, Daniel P.; Camenisch, Gieri (2005): Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005 (306), re12. DOI: 10.1126/stke.3062005re12.

- Whitlock, N. Andrew; Agarwal, Neeraj; Ma, Jian-Xing; Crosson, Craig E. (2005): Hsp27 upregulation by HIF-1 signaling offers protection against retinal ischemia in rats. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (3), S. 1092–1098. DOI: 10.1167/iovs.04-0043.
- Wilson, Brian J.; Harada, Ryoko; Leduy, Lam; Hollenberg, Morley D.; Nepveu, Alain (2009): CUX1 transcription factor is a downstream effector of the proteinase-activated receptor 2 (PAR2). In: *The Journal of biological chemistry* 284 (1), S. 36–45. DOI: 10.1074/jbc.M803808200.
- Witte, Ines; Foerstermann, Ulrich; Devarajan, Asokan; Reddy, Srinivasa T.; Horke, Sven (2012): Protectors or Traitors. The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. In: *Journal of lipids* 2012, S. 342806. DOI: 10.1155/2012/342806.
- Wong, Chi C.; Martincorena, Inigo; Rust, Alistair G.; Rashid, Mamunur; Alifrangis, Constantine; Alexandrov, Ludmil B. et al. (2014): Inactivating CUX1 mutations promote tumorigenesis. In: *Nature genetics* 46 (1), S. 33–38. DOI: 10.1038/ng.2846.
- Wu, Danli; Yotnda, Patricia (2011): Induction and testing of hypoxia in cell culture. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (54). DOI: 10.3791/2899.
- Wu, Sheng-Di; Ma, Yu-Shui; Fang, Ying; Liu, Li-Li; Fu, Da; Shen, Xi-Zhong (2012): Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. In: *Cancer treatment reviews* 38 (3), S. 218–225. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.06.010.
- Xia, Li-Min; Tian, De-An; Zhang, Qiong; Yan, Wei; Zhu, Qian; Luo, Min et al. (2009): Hypoxia induces heat shock protein HSP70-2 expression in a HIF-1 dependent manner. In: *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology* 17 (3), S. 207–212.
- Xu, Hui; He, Jie-Hua; Xiao, Zhen-Dong; Zhang, Qian-Qian; Chen, Yue-Qin; Zhou, Hui; Qu, Liang-Hu (2010): Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (4), S. 1431–1442. DOI: 10.1002/hep.23818.
- Yoon, Haejin; Lim, Ji-Hong; Cho, Chung-Hyun; Huang, L. Eric; Park, Jong-Wan (2011): CITED2 controls the hypoxic signaling by snatching p300 from the two distinct activation domains of HIF-1 $\alpha$ . In: *Biochimica et biophysica acta* 1813 (12), S. 2008–2016. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.08.018.
- Yuan, Yong; Hilliard, George; Ferguson, Tsuneo; Millhorn, David E. (2003): Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau

protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- $\alpha$ . In: *The Journal of biological chemistry* 278 (18), S. 15911–15916. DOI: 10.1074/jbc.M300463200.

Zeng, W. R.; 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 gene. In: *Oncogene* 18 (11), S. 2015–2021. DOI: 10.1038/sj.onc.1202519.

Zhang, David Y.; Friedman, Scott L. (2012): Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (2), S. 769–775. DOI: 10.1002/hep.25670.

Zhang, H.; Wong, C. C. L.; Wei, H.; Gilkes, D. M.; Korangath, P.; Chaturvedi, P. et al. (2012): HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. In: *Oncogene* 31 (14), S. 1757–1770. DOI: 10.1038/onc.2011.365.

Zhang, Huafeng; Bosch-Marce, Marta; Shimoda, Larissa A.; Tan, Yee Sun; Baek, Jin Hyen; Wesley, Jacob B. et al. (2008): Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (16), S. 10892–10903. DOI: 10.1074/jbc.M800102200.

Zhang, Lin; Huang, Gang; Li, Xiaowu; Zhang, Yujun; Jiang, Yan; Shen, Junjie et al. (2013): Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1 $\alpha$  in hepatocellular carcinoma. In: *BMC cancer* 13, S. 108. DOI: 10.1186/1471-2407-13-108.

Zhu, Andrew X.; Duda, Dan G.; Sahani, Dushyant V.; Jain, Rakesh K. (2011): HCC and angiogenesis. Possible targets and future directions. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 8 (5), S. 292–301. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.30.

Zhu, Yiqian; Cuevas, Ileana C.; Gabriel, Rodney Allanigue; Su, Hua; Nishimura, Stephen; Gao, Peng et al. (2009): Restoring transcription factor HoxA5 expression inhibits the growth of experimental hemangiomas in the brain. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 68 (6), S. 626–632. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181a491ce.

## 8. Anhang

**Tabelle 18:** Zu Abb. 8: Rohdaten der qRT-PCR mit logarithmischer Darstellung nach  $\Delta\Delta CP$  zur Angabe der relativen Expression der Mittelwerte der technischen Replikate genormt zu GAPDH für **A:** HepG2 und **B:** Hep3B. Vergleichende Angabe der effizienzkorrigierten Auswertung mittels REST Software ©.

**A:**

	HepG2	si RNA 1	si RNA 4	si RNA 7	si RNA 8
1	<b>CUX1 in NTC</b> (Ct-Wert) Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	38,32 37,38 37,85			
2	<b>CUX-1 in siRNA</b> (Ct-Wert) Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	37,97 38,91 38,29	39,42 38,06 38,74	41,95 40,45 41,20	37,91 36,98 37,45
3	<b>delta ct Cux-1:</b> Differenz der Cux1 Ct- MW aus Zeile 1 und 2	-0,44	-0,89	-3,35	0,4
4	<b>dCux-1:</b> relative Expression von cux-1 unter der Annahme einer Verdopplung der Zielmoleküle pro PCR-Zyklus. $dCux-1 = 2^{\text{delta Cux-1ct}}$	0,737	0,54	0,098	1,32
5	<b>GAPDH in NTC</b> (Ct-Wert) Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	32,40 32,71 32,56			
6	<b>GAPDH in siRNA</b> (Ct-Wert) Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	31,99 32,09 32,04	31,08 30,53 30,81	32,80 33,09 32,95	30,41 30,88 30,65
7	<b>delta ct GAPDH:</b> Differenz der Ct-MW aus Zeile 5 und 6	0,52	1,75	-0,39	1,91
8	<b>dGAPDH:</b> relative Expression von GAPDH unter. $dGAPDH = 2^{\text{delta ct GAPDH}}$	1,434	3,364	0,763	3,758
9	Normalisierte relative <b>CUX-1</b> Expression: (Quotient der Werte aus Zeile 4 und 8)	0,514	0,161	0,128	0,351
10	Vergleich: Auswertung mittels REST ©	0,465	0,160	0,129	0,352

**B:**

	Hep3B	si RNA 1	si RNA 4	si RNA 7	si RNA 8
1	<b>CUX1 in NTC</b> (Ct-Wert) Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	30,52 29,88 30,2			
2	<b>CUX-1 in siRNA</b> (Ct-Wert) Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	33,17 34,43 33,8	38,9 40,11 39,01	36,43 36,66 36,55	37,58 37,23 37,41
3	<b>delta ct Cux-1:</b> Differenz der Cux1 Ct- MW aus Zeile 1 und 2	-3,6	-8,81	-6,35	-7,21

4	<b>dCux-1:</b> relative Expression von cux-1 unter der Annahme einer Verdopplung der Zielmoleküle pro PCR-Zyklus. $dCux-1 = 2^{\Delta Ct_{Cux-1}}$	0,082	0,002	0,012	0,007
5	<b>GAPDH in NTC</b> (Ct-Wert)  Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	22,26 22,61 22,44			
6	<b>GAPDH in siRNA</b> (Ct-Wert)  Mittelwert (MW) d. techn. Duplikate	22,87 22,9 22,89	27,29 26,78 27,04	24,27 23,62 23,95	23,83 23,52 23,68
7	<b>delta ct GAPDH:</b> Differenz der Ct-MW aus Zeile 5 und 6	-0,45	-4,6	-1,51	-1,24
8	<b>dGAPDH:</b> relative Expression von GAPDH unter. $dGAPDH = 2^{\Delta Ct_{GAPDH}}$	0,732	0,041	0,35	0,423
9	Normalisierte relative <b>CUX-1</b> Expression: (Quotient der Werte aus Zeile 4 und 8)	0,112	0,048	0,034	0,017
10	Vergleich: Auswertung mittels REST ©	0,155	0,088	0,062	0,03

**Tabelle 18C:** Zu Abb. 8C: Rohdaten der qRT-PCR mit logarithmischer Darstellung nach  $\Delta\Delta CP$  zur Angabe der relativen Expression der Mittelwerte der biologischen Duplikate genormt zu GAPDH für HepG2 und Hep3B. Vergleichende Angabe der effizienzkorrigierten Auswertung mittels REST Software ©.

	<b>siRNA 7</b>	<b>HepG2 6h (30h)</b>	<b>HepG2 24h(48h)</b>	<b>Hep3B 6h (30h)</b>	<b>Hep3B 24h(48h)</b>
1	<b>CUX1 in NTC</b> (Ct-Wert)  Mittelwert (MW) d. biol. Duplikate	26,46 26,43 26,45	25,27 25,24 25,26	30,03 28,8 29,42	30,51 31,06 30,79
2	<b>CUX-1 in siRNA</b> (Ct-Wert)  Mittelwert (MW) d. biol. Duplikate	27,17 26,06 26,62	26,48 26,65 26,57	29,56 30,64 30,1	31,32 31,04 31,18
3	<b>delta ct Cux-1:</b> Differenz der Cux1 Ct- MW aus Zeile 1 und 2	-0,17	-1,31	-0,68	-0,39
4	<b>dCux-1:</b> relative Expression von cux-1 unter der Annahme einer Verdopplung der Zielmoleküle pro PCR-Zyklus. $dCux-1 = 2^{\Delta Ct_{Cux-1}}$	0,889	0,403	0,624	0,763
5	<b>GAPDH in NTC</b> (Ct-Wert)  Mittelwert (MW) d. biol. Duplikate	23,47 21,54 22,51	20,62 21,55 21,01	23,21 21,29 22,25	23,15 22,98 23,07
6	<b>GAPDH in siRNA</b> (Ct-Wert)  Mittelwert (MW) d. biol. Duplikate	22,88 21,51 22,2	21,08 21,32 21,2	21,25 22,8 22,03	22,79 21,93 22,36

7	<b>delta ct GAPDH:</b> Differenz der Ct-MW aus Zeile 5 und 6	0,31	-0,19	0,22	0,71
8	<b>dGAPDH:</b> relative Expression von GAPDH unter. $dGAPDH = 2^{\text{delta ct GAPDH}}$	1,24	0,877	1,165	1,636
9	Normalisierte relative <b>CUX-1</b> Expression: (Quotient der Werte aus Zeile 4 und 8)	<b>0,717</b>	<b>0,46</b>	<b>0,551</b>	<b>0,466</b>
10	Vergleich: Auswertung mittels REST©	<b>0,717</b>	<b>0,437</b>	<b>0,532 DOWN**</b>	<b>0,467</b>

\*\* statistische Bewertung des Pair Wise Fixed Reallocation Tests aus zwei biologischen Replikaten (p=0,05).

**Tabelle 19:** Zu Abb. 11 und 12: Densitometrische Mittelwerte genormt zu  $\beta$ -Aktin in Relation zur Negativkontrolle NTC.

Probe	CUX1 HepG2	CUX1 Hep3B	HIF-1 $\alpha$ Hep3B
NTC	1	1	1
NTC+CoCl <sub>2</sub>	0,924082859	0,816241585	0,64467232
NTC+0,5%O <sub>2</sub>	0,951036925	0,435963574	1,13534664
siCUX1	0,691147229	0,765000662	1,01699318
siCUX1+CoCl <sub>2</sub>	0,842780907	1,039772555	1,08961818
siCUX1+0,5%O <sub>2</sub>	0,983674219	0,394985169	1,15223151

**Tabelle 20:** Zu Abb. 14 bis 20: Arithmetische Mittelwerte der relativen Expression der biologischen Duplikate von mRNA genormt zu GAPDH mittels Auswertung durch REST©. Gekennzeichnet ist zudem die statistische Bewertung des Pair Wise Fixed Reallocation Tests aus zwei biologischen Replikaten (\* p=0,05).

RNA	HepG2 NTC	HepG2 NTC+ 6h CoCl <sub>2</sub>	HepG2 NTC+ 6h 0,5%O <sub>2</sub>	HepG2 siCUX1+ 6h CoCl <sub>2</sub>	HepG2 siCUX1+ 6h 0,5%O <sub>2</sub>
GAPDH	1	1	1	1	1
CUX1	0,717	1,253	0,527	1,231	0,516
FIH1	0,804	0,871	0,829	1,046	3,399
HIF-1 $\alpha$	1,117	2,321*	0,037*	2,713	0,073*
GLUT1	1,091	1,039	5,081*	1,385	9,747*
VEGFA	2,078	12,553*	33,243*	13,315*	27,002*
P21	1,064	0,212	1,218	13,881	1,892
P27	0,399	0,11	0,339	3,238	0,283

RNA	HepG2 NTC	HepG2 NTC+ 24h CoCl <sub>2</sub>	HepG2 NTC+ 24h 0,5%O <sub>2</sub>	HepG2 siCUX1+ 24h CoCl <sub>2</sub>	HepG2 siCUX1+ 24h 0,5%O <sub>2</sub>
GAPDH	1	1	1	1	1
CUX1	0,437	1,145	1,137	0,228*	0,674
FIH1	1,061	0,779	0,745*	0,438	2,181*
HIF-1 $\alpha$	2,071	1,979	0,933	1,329	0,841
GLUT1	2,144	6,342*	2,196	1,537	1,647
VEGFA	2,585	11,353	432,034*	3,458	222,09*
P21	1,414	1,003	5,134	1,986	7,621*
P27	0,473	0,163*	0,338	0,065*	0,559

RNA	Hep3B NTC	Hep3B NTC+ 6h CoCl <sub>2</sub>	Hep3B NTC+ 6h 0,5%O <sub>2</sub>	Hep3B siCUX1+ 6h CoCl <sub>2</sub>	Hep3BsiCU X1+ 6h 0,5%O <sub>2</sub>
GAPDH	1	1	1	1	1
CUX1	0,532	0,933	1,057	0,167*	0,593
FIH1	0,683	0,451	0,516	0,578	0,22*
HIF-1 $\alpha$	0,603	0,93	0,434*	0,865	0,59
GLUT1	0,671	1,886*	2,488	0,74	5,716*
VEGFA	0,213	0,871	1,723	nicht detektierbar	nicht detektierbar
P21	0,829	2,63*	0,139*	4,377	0,318
P27	0,49	0,41	1,017	0,58	5,897*

RNA	Hep3B NTC	Hep3B NTC+ 24h CoCl <sub>2</sub>	Hep3B NTC+ 24h 0,5%O <sub>2</sub>	Hep3B siCUX1+ 24h CoCl <sub>2</sub>	Hep3B siCUX1+ 24h 0,5%O <sub>2</sub>
GAPDH	1	1	1	1	1
CUX1	0,467	0,383	1,27	0,394*	n.d.
FIH1	0,553	0,112*	0,973	0,343	n.d.
HIF-1 $\alpha$	0,607	0,355	0,798	0,841	0,478
GLUT1	0,655	1,165	5,046*	2,558*	0,534*
VEGFA	0,46	0,344	2,338*	0,172	n.d.
P21	0,674	1,548*	1,306*	2,387	0,507*
P27	0,281	0,151	0,75	0,191*	1,185

**Tabelle 21:** Zu Abb. 28 und 29: Gemittelte densitometrische Messwerte der biologischen Duplikate des Zellstress Array normalisiert gegen Hintergrundaktivität.

Protein	Hep3B	Hep3B	HepG2	HepG2
	NTC+CoCl <sub>2</sub>	siCUX1+ CoCl <sub>2</sub>	NTC+ CoCl <sub>2</sub>	siCUX1+ CoCl <sub>2</sub>
ADAMTS1	235064	108604	350034,5	357703,5
Bcl-2	10721,5	23830,5	17978	32666
Carbonic Anhydrase IX (CA9)	63691,5	246514	507092,5	496364,5
Cited-2	258519	112246	603155,5	627095
COX-2	73843,5	58537,5	60487,5	98583
Cytochrome c	129414,5	76973	994971,5	1082723,5
Dkk-4	161376	86398,5	656292,5	618464
FABP-1 (L-FABP)	672222,5	945015	3130586,5	2279694
HIF-1alpha	311781,5	180724,5	980110,5	1472398
Hif2-alpha	186691,5	120749	421203,5	416125,5
Phospho-HSP27 (S78/S82)	214531,5	166154,5	328586,5	337811
HSP60	249857	107230,5	558885	713005
HSP70	776667	506923,5	2104955,5	2435011
IDO (Indeolamine 2,3 - dioxygenase	186078,5	90565	262613,5	339776
Phospho-JNK Pan (T183/Y185)	592912	398949	2826091,5	2873731,5
NFkappaB1	343985,5	224260,5	867176	786383,5
p21/CIP1 (CDNK1A)	125397,5	77211,5	388827	408934,5
p27 (Kip1)	254596	114339,5	340201,5	319841
Phospho-p38alpha (T180/y182)	69034	36137,5	362115	344535
Phopho-p53 (S46)	29815,5	26152,5	187123	279643
PON1	19670	26603,5	17371	28120
PON2	166427	66475	350489	447965,5
PON3	287724	104216	195991	320715,5
Thioreduxin-1	191924,5	195676,5	1712405	1633291
SIRT2 (Sirtuin 2)	341005	379469,5	837653,5	815808
SOD2 (Mn-SOD)	755118,5	749266,5	2966912	3056354

**Tabelle 22:** Zu Abb. 23: Arithmetische Mittelwerte der biologischen Triplikate des Lichtintensität des Luciferase Assay normalisiert zur unbehandelten Kontrolle.

<b>HepG2</b>	<b>MW norm. zu Ko.</b>	<b>Stabw.</b>	<b>SEM</b>	<b>t-Test</b>
Kontrolle	1			
NTC	1915,938717*	1222,81422	499,2118147	0,00242815
siCUX1	681,9682167*	401,0764474	163,738774	0,001271629
<b>Hep3B</b>				
Kontrolle	1			
NTC	8988,8899*	3816,21037	1557,96136	0,001420558
siCUX1	3569,63515*	2934,05751	1197,82396	0,014573222

\* p=0,05

## 9. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Weltweite Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms bei Männern	<b>10</b>
<b>Abbildung 2:</b>	Weltweite Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms bei Frauen	<b>11</b>
<b>Abbildung 3:</b>	BCLC Schema zur Therapieauswahl	<b>12</b>
<b>Abbildung 4:</b>	Schematische Darstellung des HIF-1 Aktivierungswegs	<b>16</b>
<b>Abbildung 5:</b>	Schematische Darstellung der CUX1 Isoformen	<b>19</b>
<b>Abbildung 6:</b>	Plasmidaufbau und Luciferasereaktion	<b>44</b>
<b>Abbildung 7:</b>	PCR Effizienzberechnung der REST© -Software	<b>47</b>
<b>Abbildung 8:</b>	q-RT-PCR-Analyse von CUX1 mRNA in HepG2 und Hep3B nach Transfektion mit siCUX 1, siCUX 4, siCUX 7, siCUX 8 sowie siCUX7 zu unterschiedlichen Zeitpunkten	<b>51</b>
<b>Abbildung 9:</b>	HepG2 und Hep3B Zellen in 20facher Vergrößerung nach Transfektion	<b>52</b>
<b>Abbildung 10</b>	HepG2 und Hep3B Zellen in 20facher Vergrößerung nach Transfektion und 24 Stunden Behandlung mit CoCl <sub>2</sub>	<b>53</b>
<b>Abbildung 11:</b>	HepG2 und Hep3B Zellen in 20facher Vergrößerung nach Transfektion und Stunden Inkubation unter 0,5% Sauerstoff	<b>54</b>
<b>Abbildung 12:</b>	Western Blot mit HepG2 und Hep3B Zellen für CUX1	<b>56</b>
<b>Abbildung 13:</b>	Western Blot mit Hep3B Zellen für HIF-1 $\alpha$	<b>57</b>
<b>Abbildung 14:</b>	q-RT-PCR-Analyse von CUX1 mRNA nach Transfektion und Hypoxiebehandlung	<b>58</b>
<b>Abbildung 15:</b>	q-RT-PCR-Analyse von HIF-1 $\alpha$ mRNA nach Transfektion und Hypoxiebehandlung	<b>60</b>
<b>Abbildung 16:</b>	q-RT-PCR-Analyse von FIH-1 mRNA in nach Transfektion und Hypoxiebehandlung	<b>61</b>
<b>Abbildung 17:</b>	q-RT-PCR-Analyse von GLUT1 mRNA in nach Transfektion und Hypoxiebehandlung	<b>63</b>
<b>Abbildung 18:</b>	q-RT-PCR-Analyse von VEGFA mRNA in nach Transfektion und Hypoxiebehandlung	<b>65</b>
<b>Abbildung 19:</b>	q-RT-PCR-Analyse von p21 mRNA in nach Transfektion und Hypoxiebehandlung	<b>67</b>
<b>Abbildung 20:</b>	q-RT-PCR-Analyse von p27 mRNA in HepG2 nach Transfektion und Hypoxiebehandlung	<b>68</b>

<b>Abbildung 21:</b>	Übersicht des Antikörper-Array für Zellstressproteine von HepG2 und Hep3B	<b>69</b>
<b>Abbildung 22:</b>	Densitometrische Auswertung des Zellstress	<b>72</b>
<b>Abbildung 23:</b>	Luciferase Assay zur Messung der HIF-1 $\alpha$ Aktivität	<b>73</b>

## 10. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Verwendete Geräte	<b>24</b>
<b>Tabelle 2:</b>	Verbrauchsmaterialien	<b>26</b>
<b>Tabelle 3:</b>	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien	<b>27</b>
<b>Tabelle 4:</b>	Verwendete Puffer und Lösungen	<b>29</b>
<b>Tabelle 5:</b>	Verwendete siRNAs und Plasmid	<b>29</b>
<b>Tabelle 6:</b>	Verwendete Primer	<b>30</b>
<b>Tabelle 7:</b>	Verwendete Antikörper	<b>31</b>
<b>Tabelle 8:</b>	Verwendete Zelllinien	<b>31</b>
<b>Tabelle 9:</b>	Verwendete Kits	<b>32</b>
<b>Tabelle 10:</b>	Verwendete Software	<b>33</b>
<b>Tabelle 11:</b>	Transfektionsprotokoll	<b>36</b>
<b>Tabelle 12:</b>	Probenzusammensetzung für cDNA Synthese	<b>38</b>
<b>Tabelle 13:</b>	Reaktionsprotokoll der cDNA Synthese	<b>38</b>
<b>Tabelle 14:</b>	Probenzusammensetzung für q-RT-PCR	<b>39</b>
<b>Tabelle 15:</b>	Protokoll für q-RT-PCR	<b>39</b>
<b>Tabelle 16:</b>	Versuchsaufbau Kotransfektion DNA-Plasmid und siRNA in 96-Well Platte	<b>45</b>
<b>Tabelle 17:</b>	Übersicht der analysierten Proben und Auswertungsmethoden	<b>49</b>
<b>Tabelle 17:</b>	Zu Abb. 8: Arithmetische Mittelwerte der relativen Expression von mRNA genormt zu GAPDH.	<b>101</b>
<b>Tabelle 18:</b>	Zu Abb. 11 und 12: Densitometrische Messwerte genormt zu $\beta$ -Aktin	<b>103</b>
<b>Tabelle 19:</b>	Zu Abb. 14 bis 20: Arithmetische Mittelwerte der relativen Expression von mRNA genormt zu GAPDH	<b>103</b>
<b>Tabelle 20:</b>	Zu Abb. 21 und 22: Gemittelte densitometrische Messwerte des Zellstress Array normalisiert gegen Hintergrundaktivität	<b>105</b>
<b>Tabelle 21:</b>	Zu Abb. 23: Arithmetische Mittelwerte der Lichtintensität des Luciferase Assay	<b>106</b>

## 11. Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µL	Mikrogramm
µM	Mikromol
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha Fetoprotein
ANGPTL 4	Angiopoeithinlike 4
BCA	Bicinchoninsäure Assay
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
Bzw.	beziehungsweise
CBP	CREB binding protein
CDK	Cyclin dependent/abhängige Kinase
cDNA	Complementary/komplementäre DNA
CDP	CCAAT Displacement Protein
CoCl <sub>2</sub>	Cobalt(II)-chlorid
CT Wert	Threshold Cycle Wert
Cu	Kupfer
CUTL1	Cut like homeobox 1
CUX 1	Cut like homeobox 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Co-operative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Et al.	Et alii/aliae/alia
Etc.	Et cetera
FBS	Fötale bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3- Phosphatdehydrogenase
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoffsäure

HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
Hep3B	Humane Hepatomzelllinie 3B
HepG2	Humane Hepomzelllinie G2
HIF	Hypoxia induced factor
HRE	Hypoxia response element
HRP	Horseradish peroxidase
Hrsg.	Herausgeber
IGF	Insulin-like growth factor
Knock-down	Dt. Niederschlag, hier: Herunterregulierung der Genexpression
LEFT	Liver enriched transcription factor
mL	Milliliter
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	Non alcoholic steatohepatitis
nm	Nanometer
nM	Nanomol
Nr.	Nummer
NTC	Negative transfer control
o.S.	Ohne Serum
off-target	Eng. das Ziel verfehlend
PAR	Proteinaseaktivierter Rezeptor
PBS	Phosphare buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerasekettenreaktion
PDH	Prolylhydroxylase
PGK	Phosphoglyceratkinase
pL	Pikoliter
PNEN	Pankreatische neuroendokrine Neoplasie
pRB	Retinoblastom Protein
q-RT-PCR	Quantitative Realtime/Echtzeit PCR
RISC	RNA induced silencing complex
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute
s.o.	Siehe Oben

SDS-PAGE	Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	short interference RNA
Sog.	sogenannt
Sogen.	Sogennante/sogenannter/sogennantes
TBS	Tris buffered saline
TGF $\beta$	Tumor growth factor $\beta$
TK	Thymidinkinase
u.a.	Unter anderem
v/v	Volumenprozent
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
z.B.	Zum Beispiel

## **12. Verzeichnis Akademischer Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge:

Adamkiewicz, Ahrens, Arabin, Barth, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Best, Bürk, Buchholz, Burchert, Cetin, Czubayko, Damanakis, Dannlowski, Daut, Decher, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Efe, Eilers, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fuchs-Wunkelmann, Geks, Glatzl, Görg C., Gress, Grimm, Henke, Hertl, Heverhagen, Heyse, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Kirschbaum, Klose, Köhler, König, Koolman, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Maier, Maisch, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nymphius, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Pantazis, Pape-Meyer, Peterlein, Plant, Renz, Rey del, Richter, Riera, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schneider, Schu, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Strick, Stiewe, Suske, Tackenberg, Teymoortasch, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wiegand, Wissniowski, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zettl, Zoremba

### **13. Danksagung**

Bei Herrn Dr. Wissniowski bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Unterstützung während der Durchführung, sowie für die Möglichkeiten und den wissenschaftlichen Austausch, die mit dieser Arbeit verbunden waren. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Gress, dass ich meine Dissertation in seiner Klinik durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Di Fazio für seine geduldige Anleitung, seine intensive Betreuung und Unterstützung bei allen Abschnitten dieser Arbeit. Mein Dank gilt zudem Herrn Dr. Hänze aus dem molekularbiologischen Labor der Klinik für Urologie und Kinderurologie für die freundliche Überlassung des Vektor-Plasmids zur Durchführung des Luciferase-Assays und die Bereitstellung der Hypoxie-Kammern.

Bei Herrn Prof. Dr. Bartsch bedanke ich mich dafür, die Räumlichkeiten des Forschungslabors der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie nutzen zu dürfen. Ich bedanke mich beim ganzen Laborteam für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für die gute Zusammenarbeit und die lehrreiche Zeit danke ich Frau Sylvia Roth, Frau Elvira Matthäi, Herrn Norman Gercke und Frau Carmen Bollmann.

Besonders möchte ich mich bei meinen Mitdotorandinnen Giulia Metzger, Elena Hofmann, Eva Becker und Sophia Polte bedanken. Ohne diese Zusammenarbeit, die gegenseitige Motivation und den gemeinsamen Austausch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte mich für die schöne Zeit mit ihnen sehr bedanken, an die ich mich immer gern erinnern werde.

Meinen Eltern danke ich besonders, ihre Unterstützung während dem Verfassen dieser Arbeit und während dem gesamten Studium hat mir viel Kraft gegeben. Meinem Vater danke ich im Besonderen, dass er mir so früh seine Begeisterung für die Wissenschaft vermittelt hat. Er war mit seiner Neugier und seinem klaren Blick eine wichtige Stütze und ist für mich ein Vorbild für die wissenschaftliche Arbeit.

Bei meinem Ehemann Christian bedanke ich mich für den liebevollen und geduldigen Beistand, der mich immer wieder motiviert hat beim Durchhalten. Ohne seine Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht entstanden. Bei meiner kleinen Martha bedanke ich mich für ihren neuen Blick auf die Welt, der alles entdecken will und wird.