

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
(Schwerpunkt: Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie,
Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie)

**Charakterisierung und molekulare Mechanismen
Therapie-induzierter Seneszenz durch epigenetisch
aktive Therapeutika**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von:

Ruff, Christer Alexander

2022

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bitzer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Schilbach-Stückle
3. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Tag der Disputation: 09.08.2022

Anmerkung

Die praktische Durchführung der Experimente für die vorliegende Dissertation erfolgte 2011 bis 2012 in den Laborräumen der Arbeitsgruppe „Virotherapie, Epigenetische Therapie & Molekulare Hepato-Onkologie“ von Prof. Dr. Ulrich Lauer und Prof. Dr. Michael Bitzer des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung Innere Medizin I.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Bitzer in der Arbeitsgruppe „Virotherapie, Epigenetische Therapie & Molekulare Hepato-Onkologie“ an der Eberhard Karls Universität Tübingen in der Abteilung Innere Medizin I angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Bitzer für seine Übernahme, die Überlassung dieses Dissertationsthemas und die stets überaus freundliche, äußerst kompetente und schnelle Betreuung während der gesamten Promotionszeit. Durch sein Wirken und seine Unterstützung wurden mir tiefe Einblicke in das wissenschaftliche Denken und Arbeiten und in moderne molekularbiologische Arbeitstechniken ermöglicht. Für seine große Begeisterung und sein Engagement für dieses Projekt möchte ich ihm herzlich danken. Mein Dank gilt zugleich Herrn Prof. Dr. Ulrich Lauer sowohl für die Aufnahme in die gemeinsame Arbeitsgruppe von ihm und Herrn Prof. Dr. Michael Bitzer als auch dem wissenschaftlichen Diskurs im Rahmen der Laborseminare.

Weiterhin gilt ein großer Dank Herrn Dr. Timo Weiland für die kompetente Betreuung dieser Dissertation sowohl während seiner Zeit im Labor und als auch darüber hinaus. Er vermittelte mir die Arbeitstechniken im Labor, bot einen fundierten wissenschaftlichen Austausch und ermöglichte mir somit die erfolgreiche Anfertigung dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Sascha Venturelli, Dr. Alexander Berger und Dr. Susanne Berchtold herzlich bedanken, die jederzeit offen für jede Frage waren.

Ein großes Dankeschön gehören auch Frau Irina Smirnow, Frau Andrea Schenk und Frau Christine Geisler, auf deren großen Erfahrungsschatz in verschiedensten Arbeitstechniken ich jederzeit zurückgreifen konnte.

Alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite und motivierten mich auch nach fehlgeschlagenen Experimenten immer wieder. Sie alle trugen zu einem sehr freundlichen und angenehmen Arbeitsklima bei. Daher an dieser Stelle nochmals an alle, auch an die vielen nicht genannten aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter des Labors, einen herzlichen Dank.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC).....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Molekulare Pathomechanismen	2
1.1.3 Aktuelle Therapieansätze in der Therapie des HCCs.....	3
1.1.4 Klassische Therapieansätze in der HCC-Therapie im Speziellen: Topoisomerase II-Inhibitoren	4
1.2 Epigenetik.....	7
1.2.1 Chromatinstruktur	8
1.2.2 Rolle des Acetylierungsstatus von Histonen auf die transkriptionelle Aktivität.....	9
1.2.3 Epigenetische Therapieansätze in der Krebstherapie: HDAC- Inhibitoren (HDACi)	11
1.2.4 Rolle eines gestörten Methylierungsmusters bei der malignen Transformation	14
1.2.5 Epigenetische Therapieansätze in der Krebstherapie: Methyltransferase-Inhibitoren	16
1.3 MicroRNAs (miRNAs).....	20
1.3.1 Allgemeiner Überblick und Regulationsphänomene beim HCC.....	20
1.3.2 miRNA-Synthese und Nomenklatur.....	22
1.3.3 Rolle und Funktion.....	24
1.4 Seneszenz.....	26
1.4.1 Replikative Seneszenz	27
1.4.2 Seneszenzmechanismen in Tumorzellen	28
2. Motivation, Zielsetzung und Aufbau der Arbeit	31
3. Materialien und Methoden	33
3.1 Materialien	33
3.1.1 Verbrauchsmaterial	33
3.1.2 Substanzen.....	34

3.1.3	Enzyme, Reaktionspuffer und Antikörper	35
3.1.4	Zellkultur	36
3.2	Methoden.....	38
3.2.1	Zellkultur	38
3.2.1.1	Zelllinien	38
3.2.1.2	Zellkultur und Zellpassage.....	39
3.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
3.2.1.4	Behandlungen von Zellen	40
3.2.2	Proliferations- und Zytotoxizitätsprüfung	41
3.2.2.1	Sulforhodamin B-Assay	41
3.2.2.2	Lactat-Dehydrogenase-Assay	42
3.2.3	Seneszenzüberprüfung mittels β Gal-Assay.....	43
3.2.4	Zellzyklus-Analyse	44
3.2.4.1	Propidiumjodid (PI)-FACS nach Nicoletti (engl. Fluorescence Activated Cell Sorting).....	44
3.2.5	Transfektion.....	45
3.2.5.1	miRNA- und siRNA-Transfektionen	45
3.2.5.2	HDAC4-Plasmid-Transfektion.....	47
3.2.6	Proteinchemische Methoden/Western Blot.....	50
3.2.6.1	Proteinbestimmung nach Pierce.....	50
3.2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page)	51
3.2.6.3	Western Blotting	53
3.2.6.4	Proteindetektion mittels ECL-Detektionssystem	53
3.2.6.5	Herstellungsangaben und Informationen für die zum Western Blot benötigten Lösungen	56
3.2.7	Molekularbiologische Methoden	58
3.2.7.1	Materialien und Geräte	58
3.2.7.2	Microarray.....	58
3.2.7.3	RNA-Isolation	59
3.2.7.4	cDNA-Synthese (RT-PCR)	60
3.2.7.5	Quantitative Real-time PCR (qPCR).....	61
3.3	Stastitik.....	65
4.	Ergebnisse	66

4.1	Vorexperimente	66
4.1.1	Antiproliferative Wirkung in von 5-aza-dC- oder Doxorubicin-behandelten Hepatomzelllinien.....	66
4.1.3	Induktion eines Zellzyklus-Arrests in HepG2-Zellen mittels 5-aza-dC und Doxorubicin.....	71
4.1.4	Induktion von p53 mittels 5-aza-dC und Doxorubicin in HepG2-Zellen	72
4.2	MicroRNA-Expressionsmuster von 5-aza-dC- oder Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen.....	73
4.2.1	Mikroarray-Expressions- und Sequenzierungsanalyse des miRNoms von 5-aza-dC und Doxorubicin behandelten HepG2-Zellen	73
4.2.3	Hochregulation von miR-494 und miR-369-5p in 5-aza-dC- und Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen	75
4.2.4	Modulation der Zellproliferation und Induktion eines Seneszenz-ähnlichen Zustandes über miR-494 in HepG2-Zellen.....	77
4.2.5	Effekt von miR-494 auf die 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierte Wachstumshemmung und Seneszenzinduktion	79
4.2.7	miR-494: Ist die Proliferationshemmung und Seneszenz durch die Zellzyklus-regulierenden Proteine Cdk4/6 vermittelt?.....	81
4.2.8	Induktion eines G1-Arrests in HepG2-Zellen über den Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib	85
4.3	Die Rolle der HDAC4-Inhibition in der Proliferations-hemmung und Seneszenzinduktion in Hepatomzelllinien	87
4.3.1	Verminderung des HDAC4-Gehalts in HCC-Zelllinien nach einer Behandlung mit 5-aza-dC oder Doxorubicin	87
4.3.2	Nachahmung von 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierter Effekte mittels siRNA-vermitteltem HDAC4-Knockdown in HepG2-Zellen.....	87
4.3.3	Reduktion der 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierten SA-βGal-Aktivität mittels einer HDAC4-Überexpression in HepG2-Zellen	90
4.3.4	Proliferationsinhibition und Induktion eines Seneszenz-ähnlichen Zustandes mittels miR-1-vermitteltem HDAC4-Knockdown in HepG2-Zellen.....	91
4.3.5	Expressionsänderungen von miR-1 und HDAC4 mittels qPCR.....	93
5.	Diskussion	94
5.1	miRNom-Regulation mittels 5-aza-dC und Doxorubicin	94
5.1.1	miR-494.....	95

5.1.1.1	Potential einer Therapie-induzierten Seneszenz (TIS) über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen.....	95
5.1.1.2	Bewertung der AntagomiR-494-Transfektion.....	97
5.1.2	Modulation weiterer, ausgewählter miRNAs durch 5-aza-dC und Doxorubicin.....	97
5.2	HDAC4	99
5.2.1	HDAC4 als zentrale Schnittstelle Therapie-induzierter Seneszenz .	100
5.2.2	Potentielle Mechanismen der HDAC4-Regulation	102
5.2.3	Verfügbare antitumorale Substanzen mit HDAC4-Wirksamkeit.....	103
6.	Zusammenfassung und Ausblick	105

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1: Barcelona-Kriterien für das Staging des hepatozellulären Karzinoms und Behandlungsalgorithmus	3
Abb. 1. 2: Wirkungswiese der Topoisomerase II (TOP2) und deren Inhibition durch Doxorubicin und Etoposid.....	5
Abb. 1. 3: Vereinfachter Aufbau eines Histon-Oktamers, eines Nukleosoms und Auswahl möglicher epigenetischer Histon- und DNA-Modifikationen	9
Abb. 1. 4: Vereinfacht dargestellter Mechanismus der Histonacetylierung und – deacetylierung	10
Abb. 1. 5: Epigenetische Kontrolle der Transkription und Inhibition von Histon-Deacetylasen mittels HDACi	12
Abb. 1. 6: Epigenetische Veränderungen des Methylierungsmusters bei der malignen Transformation.....	15
Abb. 1. 7: Intrazelluläre Verstoffwechslung der hypomethylierenden Nukleosid-Analoga Azazytidin (5-aza-CR) und Decitabin (5-aza-dC) bis zur wirksam aktiven Form.....	17
Abb. 1. 8: Strukturformeln von Cytidin, 2´Deoxycytidin, Azazytidin (5-aza-CR) und Decitabin (5-aza-dC)	18
Abb. 1. 9: Schematische Darstellung der miRNA-Synthese	22
Abb. 1. 10: miRNA-Wirkmechanismus als posttranskriptioneller Regulationsmechanismus	24
Abb. 1. 11: Schematische Darstellung der Hauptmechanismen replikativer Seneszenz.....	27
Abb. 1. 12: Schematische Darstellung der schrittweisen Entartung normaler Zellen, dem Eigenschutzmechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) und dem Unterschied zwischen traditionellen Chemotherapeutika und einer spezifisch proseneszenten Therapie	28
Abb. 3. 1: Repräsentative Photographien der Hepatom-Zelllinien HepG2 und Hep3B	38
Abb. 3. 2: Katalysereaktion von Pyruvat zu Laktat durch die Laktat-Dehydrogenase	42
Abb. 3. 3: Sequenz des Plasmids „pcDNA-HDAC4-FLAG“ mit 813 Basenpaaren (bp) laut Addgene	48
Abb. 3. 4: Versuchslayout zur Auswertung des HDAC4-Plasmid-Versuchs.....	49
Abb. 3. 5: Biuret –Reaktion und Komplexbildung zweier BCA-Moleküle im Rahmen der Proteinmengenbestimmung nach Pierce	51
Abb. 3. 6: Aufbau der Kammer zur Proteinübertragung vom SDS-Page-Gel auf die PVDF-Membran im Rahmen des Western Blottings.....	53
Abb. 3. 7: Zusammenfassende Darstellung der	64

Abb. 4.1: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die Proliferation und Zytotoxizität in HepG2 (A) und Hep3B-Zellen (B).....	66
Abb. 4.2: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die SA-βGal-Aktivität in HepG2-Zellen.....	68
Abb. 4.3: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die Morphologie und das Zellwachstum von HepG2-Zellen über 9 Tage	69
Abb. 4.4: SA-βGal-Modulation von HepG2-Zellen mittels unterschiedlicher Inkubationszeiten mit 5-aza-dC	70
Abb. 4.5: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die SA-βGal-Aktivität in Hep3B-Zellen	70
Abb. 4.6: Vergleich der Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Behandlung mit 5-aza-dC und Doxorubicin mittels FACS-Analyse PI-markierter HepG2-Zellen.....	71
Abb. 4.7: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von p53 der Zelllinie HepG2 nach einer Behandlung durch 5-aza-dC und Doxorubicin.....	72
Abb. 4.8: Microarray und Sequenzierungsanalyse von 5-aza-dC- [10 μM] oder Doxorubicin- [100 nM] behandelten HepG2-Zellen	73
Abb. 4.9: Reinheitskontrolle der qPCR von miR-494 mittels Auftragen der qPCR-Proben auf ein Elektrophorese-Gel (A) und Betrachten der Schmelzkurve (B) in 5-aza-dC und Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen	76
Abb. 4.10: Effekte einer Mimic-494- bzw. 369-5p-vermittelten Transfektion auf die Proliferation und SA-βGal-Aktivität von HepG2-Zellen	78
Abb. 4.11: Effekte einer AntagomiR-494 und AntagomiR-369-5p-Transfektion auf die 5-aza-dC- oder Doxorubicin-induzierte Proliferationsminderung (A) und SA-βGal-Aktivität (B-D) von HepG2-Zellen	80
Abb. 4.12: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib alleine und in Kombination mit 5-aza-dC oder Doxorubicin auf die Proliferation (A) und SA-βGal-Aktivität (B) auf HepG2-Zellen	82
Abb. 4.13: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib auf die Morphologie und SA-βGal-Aktivität von HepG2-Zellen.....	84
Abb. 4.14: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib auf die Morphologie und das Wachstum von HepG2-Zellen über 9 Tage	84
Abb. 4.15: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib [1 μM] auf die Morphologie und das Wachstum in HepG2-Zellen im Vergleich zu 5-aza-dC [10 μM] und Doxorubicin [100 nM] über 9 Tage	85
Abb. 4.16: Vergleich der Zellzyklusverteilung in HepG2-Zellen nach Behandlung mit 5-aza-dC [10 μM] und Doxorubicin [100 nM] alleine oder in Kombination mit dem Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib [500 nM] für drei bzw. sechs Tage	86
Abb. 4.17: Western Blot-Analyse von HDAC4 in 5-aza-dC- [10 μM] oder Doxorubicin- [100 nM] behandelten HepG2- und Hep3B-Zellen	87
Abb. 4.18: Effekte eines siRNA-vermittelten Knockdowns von HDAC4 auf HepG2-Zellen.....	89

Abb. 4.19: Effekte einer HDAC4-Überexpression auf die SA-βGal-Färbung von 5-aza-dC oder Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen	90
Abb. 4.20: Effekte einer miR-1 Überexpression auf HepG2-Zellen	92
Abb. 4.21: Vergleich der Expression von miR-1 und HDAC4 unter Behandlung von 5-aza-dC und Doxorubicin in HepG2-Zellen	93

Tabellenverzeichnis

Tab 1. 1: miRNA-Nomenklatur	23
Tab. 3. 1: Chemische Struktur und Molekulargewicht (MG in g/mol) der Substanzen	40
Tab. 3. 2: Substanzen, deren Abkürzungen und Behandlungskonzentrationen	40
Tab. 3. 3: Inhalt der Sulforhodamin B (SRB)-Färbelösung (0,4% w/v)	41
Tab. 3. 4: Inhalt der Tris-Lösung (10 mM, pH 10,5).....	42
Tab. 3. 5: Bestandteile der βGal-Färbelösung (engl. Staining Solution) (20ml)	44
Tab. 3. 6: Fluorophor Hoechst 33342 einschließlich dessen Exzitations- und Emissionshöhepunkte	44
Tab. 3. 7: Bestandteile des FACS-Puffers.....	45
Tab. 3. 8: Mengenangaben der für die Transfektion benötigten Substanzen ...	46
Tab. 3.9: Verwendete nc-siRNAs einschließlich der Exzitations- und Emissionshöhepunkte der Fluoreszenzfarbstoffe [306].....	47
Tab. 3. 10: Datenblatt zu HDAC4-Plasmid „pcDNA-HDAC4-FLAG“	48
Tab. 3. 11: Anleitung zur Herstellung eines SDS-Page-Trenngels (10ml) und – Sammelgels (3 ml), Angaben in ml.....	52
Tab. 3. 12: Übersicht der Primär-Antikörper.....	55
Tab. 3. 13: Übersicht der Sekundär-Antikörper	55
Tab. 3. 14: Herstellungsangaben für die zum Western Blot benötigten Lösungen, alphabetisch geordnet	56
Tab. 3. 15: Produktaufstellung für die zur quantitativen real-time PCR benötigten Produkte, nach Hersteller geordnet.....	58
Tab. 3. 16: RT-PCR-Ansatz für Masercycler Gradient (Eppendorf AG)	61
Tab. 3. 17: qPCR-Ansatz für den Lightcycler 480 (Roche Life Scienc)	62
Tab. 3. 18: qPCR-Zyklus-Programm für den Lightcycler 480 (Roche Life Science)	62
Tab. 3. 19: Zusammensetzung des TBE-Puffers (10x), pH 8,3.....	63
Tab. 3. 20: Inhalt des DNA-Ladepuffers (10x).....	63
Tab. 4.1: Effekte von 5-aza-dC [10 μM] und Doxorubicin [100 nM] auf die Proliferation (A) und Zytotoxizität (B) in HepG2-Zellen.....	67
Tab. 4.2: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die Proliferation (A) und Zytotoxizität (B) in Hep3B-Zellen.....	67

Tab. 4.3: Doxorubicin-regulierte miRNAs in HepG2-Zellen	74
Tab. 4.4: Signalintensitäten von miR-494 und miR-369-5p in 5-aza-dC oder Doxorubicin behandelten HepG2-Zellen	75
Tab. 4.5: RPKM-Werte von miR-494 und miR-369-5p in 5-aza-dC behandelten HepG2-Zellen.....	75
Tab. 4.6: Signalintensitäten von miR-494 und miR-369-5p in unbehandelten primären humanen Hepatozyten (PHH)	75
Tab. 4.7: Effekte einer Mimic-494 bzw. 369-5p Transfektion auf die Proliferation von HepG2-Zellen	79
Tab. 4.8: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib alleine und in Kombination mit 5-aza-dC oder Doxorubicin auf die Proliferation auf HepG2-Zellen.....	83
Tab. 4.9: Effekte eines siRNA-vermittelten Knockdowns von HDAC4 auf die Proliferation von HepG2-Zellen	88
Tab. 4.10: Effekte eines miR-1 Überexpression auf die Proliferation von HepG2-Zellen	91

Abkürzungsverzeichnis

3MA	3-Methyladenine
5-aza-CR	5-Azacytidin
5-aza-dC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
Abb.	Abbildung
ad	auf
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	engl. bovine serum albumine (Serumalbumin)
Bidest	bidestilliert
Bp	Basenpaare
CAM	Chorioallantoismembran
Cdk	engl. Cyclin-dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
DMEM	Dulbelcco's modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
Doxo	Doxorubicin
ECL	engl. enhanced chemoluminescence (verstärkte Chemolumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	engl. European Medicines Agency (europäische Arzneimittel-Agentur)
et al.	et alii; und andere
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	engl. fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FDA	engl. Food and Drug Administration (US-amerikanische Arzneimittelbehörde)
FL	engl. fluorescence (Fluoreszenz)
h	lat. Hora (Stunde)
H ₂ O _{dd}	deionisiertes, Millipore-Filter aufgereinigtes Wasser
HAT	engl. Histone-Acetyltransferase
HCC	engl. hepatocellular carcinoma (hepatocelluläres Karzinom)
HDAC	engl. histone deacetylase (Histone-Deacetylase)
HDACi	Histone-Deacetylase-Inhibitor
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
LDH	Lactat-Dehydrogenase
mRNA	engl. messenger RNA (Boten-RNA)
M	molar
n	nano

nc	engl. noncoding (nicht kodierend)
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	engl. polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFT- α	Pifithrin
pH	lat. pondus hydrogenii
PI	engl. propidium iodide (Propidiumjodid)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RNA	engl. ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	engl. reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
ROS	engl. reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	engl. revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SA- β Gal	Seneszenz-assoziiertes β Gal
SAHA	engl. suberoylanilide hydroxamic acid (Suberoylanilid-Hydroxamsäure)
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SD	engl. standard deviation (Standardabweichung)
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SRB	Sulforhodamin B
TBS	engl. Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzmischung)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
Temed	Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TSA	Trichostatin A
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen Sorbiton-Monolaurat
v/v	engl. volume per volume (Volmenprozent)
w/v	engl. weight per volume (Gewichtsprozent)
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Beta-D-galactosid

1. Einleitung

1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Leberkrebs ist weltweit mit jährlich ca. 854.000 Neuerkrankungen die fünfthäufigste Krebserkrankung und liegt mit ca. 810.000 hierunter bedingten Todesfällen an zweiter Stelle bezüglich der durch Krebs bedingten Mortalität [1, 2]. Es liegen bei Inzidenz und Mortalität regionale Verteilungsunterschiede zugrunde, mit gehäufterem Auftreten in Regionen Afrikas und Asiens [3, 4]. Das HCC kann jedes Lebensalter betreffen. Männer erkranken häufiger als Frauen, wobei die Geschlechtsverteilung weltweit durchschnittlich bei 2 - 2.5:1 liegt [5]. Je nach Land macht das HCC bis zu 90 % aller primären Leberkarzinome aus [6]. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose befindet sich der Patient häufig schon in einem späten Krankheitsstadium, sodass bei bis zu 60% der Patienten primär eine palliative Therapiesituation vorliegt [7, 8]. Alle ätiologischen Formen der Zirrhose können durch Tumorbildung kompliziert werden, aber das Risiko ist bei Patienten mit chronischer Virushepatitis am höchsten. In den USA und Europa stellt die chronische Hepatitis-C Infektion das Hauptrisiko für die Inzidenz des HCCs dar [1, 9-11]. In Regionen Asiens und Afrikas ist hingegen die chronische Hepatitis B-Infektion der führende Risikofaktor [1, 9, 10]. Bei der Mehrzahl aller Patienten (95%) in Industrienationen entsteht das HCC auf dem Boden einer vorbestehenden Leberzirrhose, wohingegen es in asiatischen Ländern nur 60% sind [8]. Langzeitstudien haben ergeben, dass etwa 1 - 8 % der Patienten mit Zirrhose pro Jahr ein HCC entwickeln (z.B. 2 % bei HBV-infizierten zirrhatischen Patienten und 3 - 8 % bei HCV-infizierten zirrhatischen Patienten) [12-14]. Insgesamt entwickelt ca. ein Drittel der Zirrhose-Patienten im Laufe ihres Lebens ein HCC [15]. Neben der viralen Ätiologie als Hauptfaktor der HCC-Entstehung spielen unter anderem Alkohol, Stoffwechsel-erkrankungen wie die Hämochromatose und der α 1-Antitrypsinmangel, die primär biliäre Zirrhose, Aflatoxin B1, Medikamente und selbst Adipositas und Diabetes als Risikofaktor eine Rolle [16-22]. Retrospektive Analysen deuten darauf hin, dass eine erhöhte HCC-Inzidenz bei Patienten mit NAFLD in Verbindung mit metabolischem Syndrom, Diabetes und Adipositas assoziiert ist [23-25]. Außerdem scheint das

metabolisches Syndrom einen additiven Risikoeffekt bei Patienten mit chronischer Virushepatitis zu haben [26, 27]. Insgesamt wird die NAFLD in den entwickelten Regionen zu einer wichtigen Ursache für HCC [28-30]. Bei NAFLD, ist die gemeldete HCC-Inzidenz sehr heterogen und reicht von 0,25 % - 7,6 % [31].

1.1.2 Molekulare Pathomechanismen

Die molekulare Pathogenese des HCC stellt ein multifaktorielles Ereignis dar und unterliegt einer Progredienz mit zunehmender TNM-Klassifikation [32]. p53-Mutationen finden sich zum Beispiel häufig erst bei einem Tumorgrading Grad IV nach TNM-Klassifikation [33, 34]. Als signifikant dysregulierte Signalwege und Moleküle wurden bisher unter anderem erkannt: der β -Catenin/WNT-Signalweg [33, 35-37], der Ras-Signalweg [33, 37], CyclinD1 [38], der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg [37, 39], p53-Mutationen [33] und funktioneller p16- und p27-Verlust [40, 41]. Zusätzliche von anderen Tumoren bekannte Ursachen in der Pathogenese sind sowohl epigenetische Faktoren wie ein verändertes DNA-Methylierungsmuster und Histon-Acetylierungsmuster als auch genomische Instabilitäten und Veränderungen [33, 42-48]. Unter anderem ist eine Dysregulation der Histondeacetylase HDAC4, einem HDAC der Klasse IIa, beschrieben [48]. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass je nach Ätiologie des HCCs unterschiedliche molekulare Mechanismen bei der Entstehung zugrunde liegen. Bei HCV- oder HBV-Infektion, zum Beispiel, gibt es jeweils ein unterschiedliches Genexpressionsmuster mit unterschiedlichen Aktivitäten bestimmter Signalwege [32, 49-52]. Kupffer-Zellen und CD8+ T-Zellen in HCC exprimieren nachweislich hohe Mengen von PD-1 (engl. programmed death) und PD-L1 (engl. programmed death ligand) und spielen eine Schlüsselrolle für den immunologischen Phänotyp des HCC [53]. Eine hohe Expression von PD-L1 korrespondiert mit einer schlechteren Prognose bei HCC-Patienten [54-56].

1.1.3 Aktuelle Therapieansätze in der Therapie des HCCs

Die Überlebenszeit von an HCC erkrankten Patienten ist im weit fortgeschrittenen Stadium unbehandelt mit unter 3 Monaten als gering zu bewerten. **Abb. 1.1** zeigt dies anhand der therapeutischen Vorgehensweise im Rahmen der sogenannten Barcelona-Kriterien [4]. Bisher sind als einzig verfügbare Therapien, die zu einer Heilung führen können, die chirurgische Resektion und die Lebertransplantation nach Milan- und extended Milan-Kriterien anzusehen. Durch wiederholt durchgeführte partielle Hepatektomien kann je nach Studie eine 5-Jahresüberlebensrate von zwischen 25% - 87% erzielt werden [57]. Bei durchgeführten Lebertransplantationen nach Milan-Kriterien liegt die 4-Jahresüberlebenszeit mit etwa 80% noch höher [3, 5, 6, 58]. Hinzu kommen therapierefraktäre Patienten bei primär chirurgischer Therapie. Als weitere Therapieoptionen stehen lokale Verfahren wie die Radiofrequenzablation, Chemoembolisation, Radiotherapie und systemisch verabreichte medikamentöse Therapien zur Verfügung [4, 59, 60]. Medikamentöse Therapien sind bisher der chirurgischen und interventionellen Therapie unterlegen und werden im palliativen Kontext eingesetzt.

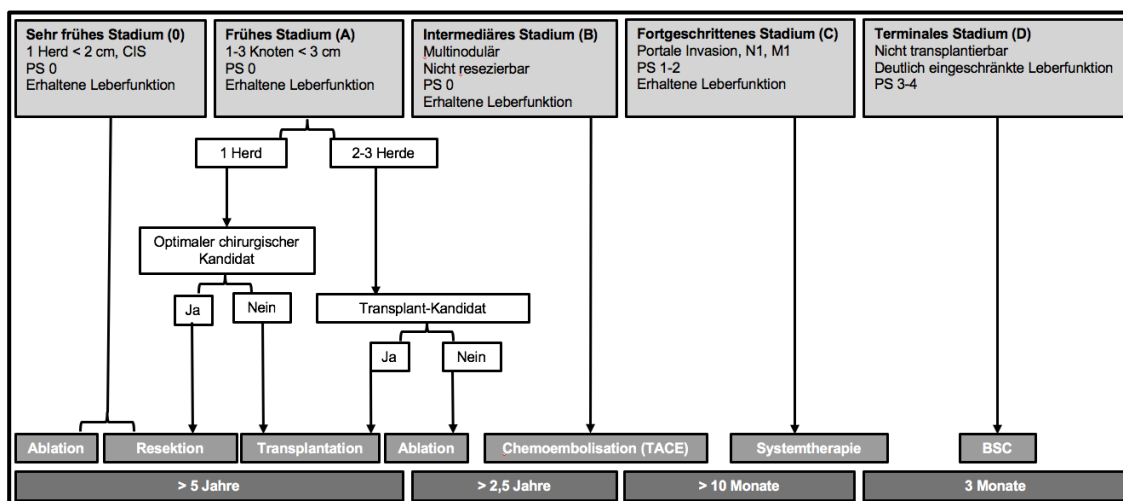


Abb. 1. 1: Barcelona-Kriterien für das Staging des hepatozellulären Karzinoms und Behandlungsalgorithmus
 PS = "performance status". CIS = Carcinoma in situ. N1 = Lymphknoten-Befall. M1 = Metastasierung. TACE = Transarterielle Chemoembolisation. In Anlehnung an: Vogel et al. (2018) und EASL Clinical Practice Guidelines (2018) [4, 61].

Mit dem Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib steht seit 2007 das erste Medikament zur Verfügung, welches in einer Phase III-Studie das Gesamtüberleben im Vergleich zur Placebogruppe von 7,9 Monaten auf 10,7 Monaten erhöhen konnte

[7, 62, 63]. Als Inhibitor der Raf-Kinase, der VEGF-Rezeptoren 2 und 3 und dem Platelet-derived growth factor beta (engl., PDGFR- β), werden sowohl die Zellproliferation als auch die Neoangiogenese gehemmt [7, 62-64]. Weitere Tyrosinkinaseinhibitoren wurden im Verlauf der Jahre zugelassen. Hierzu gehören Regorafenib, Cabozantinib, Lenvatinib und Ramucirumab [2, 4, 61]. Regorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor und weist einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Sorafenib auf. Dieser zeigte in einer Phase-III-Studie bei Patienten mit Leberzirrhose (Child-Pugh A) und fortgeschrittener Tumorerkrankung einen Effekt auf die Überlebensdauer als second-line Therapie [65]. Lenvatinib weist die höchste Ansprechrate gegenüber den anderen Tyrosinkinase-Inhibitoren und Ramucirumab auf. Lenvatinib zeigte sich in einer multizentrischen, randomisierten Studie gegenüber Sorafenib nicht unterlegen [66]. Die Kombinationstherapie aus Atezolizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen PD-L1, mit Bevacizumab zeigte eine bessere Wirksamkeit im Vergleich zu Sorafenib und wird nach aktuellen Leitlinien als Erstlinientherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC empfohlen [59, 67, 68]. Diese Therapie erhielt von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) Ende 2020 die Zulassung. Darüber hinaus liegen vielversprechende Daten für Checkpoint-Inhibitoren, insbesondere in Kombination mit Angiogeneseinhibitoren oder Tyrosinkinaseinhibitoren, vor [2, 4, 61].

1.1.4 Klassische Therapieansätze in der HCC-Therapie im Speziellen: Topoisomerase II-Inhibitoren

Die Topoisomerasen (Top) sind für die Entwindung superhelikaler Strukturen der DNA verantwortlich [69-72]. Hierfür gibt es bei Menschen drei unterschiedliche Formen, die Topoisomerasen I bis III [69, 73]. Klinisch relevant sind bisher jedoch nur die Topoisomerase I und II [69, 70, 74]. Aufgrund ihrer Funktion spielen diese Enzyme sowohl bei Transkriptions- als auch Replikationsprozessen eine Rolle [69-72]. Die Unterbindung ihrer Enzymfunktion ist daher ein Ziel klassischer Chemotherapeutika. Die Topoisomerase I (Top1) bindet über einen Tyrosylrest und eine Phosphodiesterbindung an die DNA und verursacht einen Einzelstrangbruch in einer Nicht-ATP abhängigen Reaktion [69, 71]. Die

Topoisomerase II (Top2) hingegen durchtrennt in einer ATP-abhängigen Reaktion beide DNA-Stränge [69]. Das Enzym bindet hierbei ebenfalls über eine Phosphodiesterbindung kovalent an die DNA und verursacht somit einen Doppelstrangbruch. Dadurch wird die DNA entspannt und sowohl Transkriptionsprozesse als auch die DNA-Replikation werden ermöglicht. Anschließend werden durch Ablösung des Enzyms die betroffenen DNA-Abschnitte wieder in eine superhelikale Struktur überführt (**Abb. 1.2**).

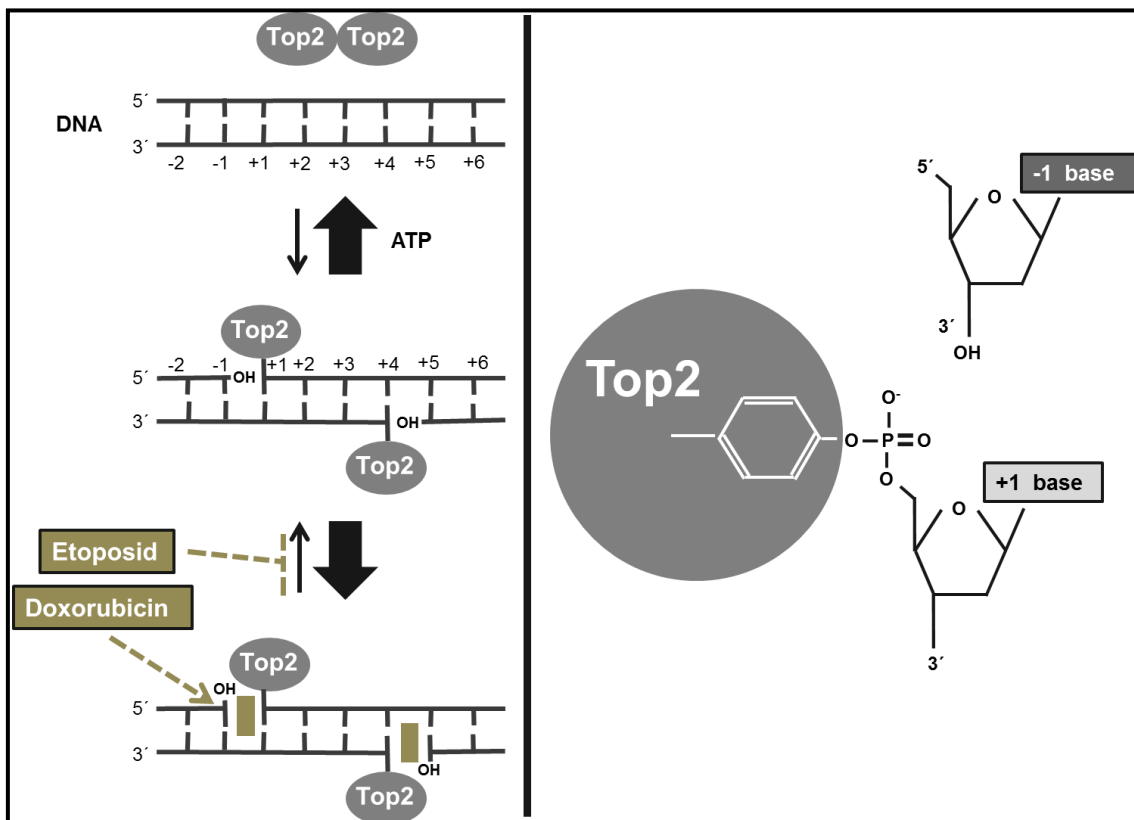


Abb. 1. 2: Wirkungsweise der Topoisomerase II (TOP2) und deren Inhibition durch Doxorubicin und Etoposid
In Anlehnung an Pommier et al. (2009) [69].

Aufgrund der Verwendung des Topoisomerase II-Inhibitors Doxorubicin in dieser Arbeit, wird in folgenden Ausführungen besonders auf diese Enzymhemmung eingegangen. Ein anderer Topoisomerase II-Inhibitor mit ähnlicher Wirkungsweise ist das Epipodophyllotoxin Etoposid [69]. Vereinfacht blockieren sowohl Doxorubicin als auch Etoposid den oben beschriebenen Zyklus indem nach Strangdurchtrennung und Bindung der Topoisomerase II an die DNA eine Re-Ligation der DNA-Stränge blockiert wird (**Abb. 1.2**) [69]. Ein Effekt dieser Chemotherapeutika ist daher die Bildung und Aufrechterhaltung kovalenter

Komplexe zwischen der Topoisomerase II und der DNA. Dadurch kommt es zu einer strukturellen DNA-Schädigung und in Folge dessen zu einer sog. DNA damage response (engl., DDR) der Zelle [72, 74]. In der englischen Literatur werden Substanzen mit dem Wirkmechanismus von Doxorubicin und Etoposid auch Topoisomerase-Gifte (engl. topoisomerase poisons) genannt, da sie aus der Aufrechterhaltung der kovalenten Bindung von Topoisomerase II zur DNA und deren Komplexbildung über dauerhafte Doppelstrangbrüche einen enzymvermittelten DNA- und Zellschaden hervorrufen [72, 74, 75]. Durch diesen Wirkmechanismus entsteht bei klinischer Anwendung jedoch die Möglichkeit der Bildung sekundärer Tumore aufgrund induzierter Translokationen [74, 75]. Das Anthrazyklin Doxorubicin interferiert darüber hinaus über die Interkalierung in die DNA mit Trennungsmechanismen der DNA-Stränge und der Helikase-Aktivität [69]. Über eine Radikalbildung kommt es zur weiteren DNA-Schädigung und Lipid-Peroxidation mit entsprechender Zellantwort [75-77]. Doxorubicin zeigt darüber hinaus bei einer geringen Ansprechrate von unter 20% beim HCC keine Vorteile bezüglich der Mortalität [17]. Interessanterweise zeigen Studien, dass einige klassische zytotoxische Medikamente einschließlich Doxorubicin Konzentrationsabhängig Seneszenz auslösen können [78].

1.2 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde von Conrad Waddington 1942 geprägt und umfasst meiotisch und mitotisch vererbte Veränderungen in der Genexpression, welche nicht auf einer Änderung der DNA-Sequenz beruhen [79-81]. Praktisch beschreibt Epigenetik eine reversible Aktivitätsänderung von Genen, welche besonders durch die bisher am besten untersuchten Mechanismen der DNA-(de)methylierung und Histon-Modifikationen gekennzeichnet ist [81]. Hinzu kommen jedoch auch RNA-basierte epigenetische Veränderungen zum Beispiel im Rahmen von microRNAs (miRNAs) [82, 83]. Alle möglichen epigenetischen Veränderungen und deren Einfluss auf die Genexpression werden unter dem Begriff des Epigenoms zusammengefasst. Durch die reversible Aktivitätsänderung von Genen hat jede eukaryotische Zelle ein spezifisches und von den Notwendigkeiten geprägtes Genexpressionsmuster. Während der Krebsentstehung wird dieses, genauso wie direkte genetische Veränderungen, im Verlauf eines mehrstufigen Prozesses dysreguliert [81, 84-92]. Epigenetische Veränderungen korrelieren mit der Pathophysiologie vieler Erkrankungen einschließlich des HCC [46, 92]. Epigenetische Störungen liegen nicht nur bei malignen Entartungen vor [85, 93]. Beispiele sind das Prader-Willi-Syndrom, das Angelman-Syndrom und das Fragile X-Syndrom, bei denen Veränderungen des Methylierungsmusters vorliegen und damit eine Dysregulation der genomischen Prägung [94]. Beim systemischen Lupus erythematodes und bei neurologischen Krankheitsbildern wie Huntington, Alzheimer und dem Parkinson-Syndrom sind ebenfalls Störung des Methylierungsmusters nachgewiesen worden [94, 95].

Epigenetische Fehlregulationen sind potentiell reversibel und daher attraktive Ziele von Tumortherapien [81, 92, 96]. Epigenetische Therapien zielen darauf ab DNA-Methylierungsmuster und posttranslationale Modifikationen an Histonen zu normalisieren, die einen malignen Phänotyp fördern oder erhalten. Die Entwicklung von Medikamenten, die auf die Veränderung von Chromatin abzielen, lässt sich auf die Differenzierungsmittel der 1970er Jahre und ihre Verbindung zur DNA-Methylierung zurück [97]. Neun epigenetische Wirkstoffe sind derzeit für die Standardbehandlung in den Vereinigten Staaten zugelassen: zwei DNMT-Inhibitoren, vier HDAC-Inhibitoren, zwei IDH-Inhibitoren und der

EZH2-Inhibitor Tazemetostat [81]. Epigenetische Therapeutika wurden in der Vergangenheit kombiniert mit klassischen Chemotherapien, zielgerichteten Therapien, anderen epigenetischen Wirkstoffen und Immun-Checkpoint-Inhibitoren, um die Ansprechraten bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen zu erhöhen und die Behandlungen auf solide Tumore auszudehnen. Obwohl synergistische Effekte in vitro häufig nachzuweisen sind, waren die klinischen Ergebnisse in vielen Studien oft enttäuschend. Bislang hat ausschließlich die Kombination von Panobinostat, Bortezomib und Dexamethason eine FDA-Zulassung (engl. Food and Drug Administration) erhalten [98].

1.2.1 Chromatinstruktur

Das menschliche Genom besteht aus 22 autosomalen und 2 gonosomalen Chromosomen unterschiedlicher Größe. Die DNA und die an sie gebundenen basischen Proteine in Form von Histonen bilden mit Nicht-Histonproteinen das Chromatin [99, 100]. Transkriptionell aktive Bereiche des Genoms sind weniger stark gepackt und werden Euchromatin genannt [101, 102]. Hiervon zu unterscheiden ist das dicht gepackte, transkriptionell inaktive Heterochromatin [101, 102]. Mittels mehrerer Organisations- und Faltungsstufe liegt der Verdichtungsfaktor bei bis zu 10.000 - 20.000 [103]. Die erste Organisationsstufe innerhalb eines Chromosoms bildet das Nukleosom, welches zum größten Teil aus einem Histon-Oktamer und einem sich darum wickelnden 145-147 Basenpaar (bp) langen DNA-Abschnitt besteht [100, 104, 105]. Dieser Teil wird als Nucleosome-Core-Particle bezeichnet. Hinzu kommt das bis zu 80 bp lange DNA-Verbindungsstück zwischen diesen, an welches sich das sogenannte Linker-Histon H1 bindet (**Abb. 1.3b**) [99, 100]. Das Histon-Oktamer besteht aus den vier Histonen H2A, H2B, H3 und H4 [81, 100, 106]. Diese lagern sich zu zwei H2A-H2B-Dimeren und einem (H3)₂(H4)₂-Tetramer zusammen (**Abb. 1.3a**) [100, 105-107]. Die gerade genannten Histone bilden fünf Hauptfamilien, welche sich weiter in Sub-Familien auftrennen [100, 108, 109]. Wie dicht das Chromatin gepackt ist, d.h. auch wie eng die negativ-geladene DNA und die positiv geladenen Histonproteine in Verbindung treten, entscheiden die

Wechselwirkungen und Ladungsunterschiede zueinander [110, 111]. Dies ist ein klassischer Ansatzpunkt epigenetischer Regulationsmechanismen. Die Wechselwirkungen und Ladungsunterschiede zwischen DNA und Histonen werden durch posttranslationale Modifikationen der Histone bestimmt [84, 110, 111]. Diese finden zum überwiegenden Teil an den sogenannten N-terminalen „Histon-Schwänzen“ (engl. histone tails) statt (**Abb. 1.3c**) [110, 112]. Gemeint sind darunter unter anderem Acetylierungen an der Aminosäure Lysin, Methylierungen an Lysin und Arginin, Phosphorylierungen an Serin und Threonin, Sumoylierungen, Ubiquitynlierungen und die ADP-Ribosylierung [84, 110].

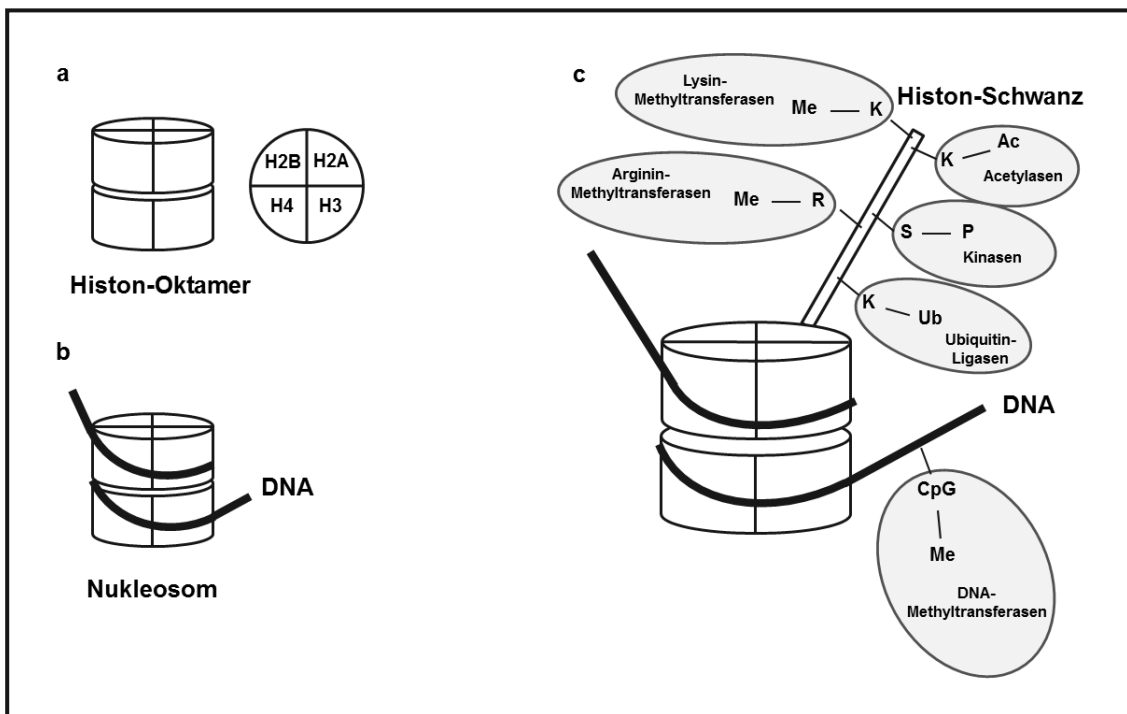


Abb. 1. 3: Vereinfachter Aufbau eines Histon-Oktamers, eines Nucleosoms und Auswahl möglicher epigenetischer Histon- und DNA-Modifikationen
 (a)Histon-Oktamer, (b) Nucleosom: Histon-Oktamer mit darum gewundener DNA-Doppel-Helix aus 146 Nucleotidpaaren (ca. 1,8 Windungen), nicht abgebildet das dazugehörige Linker-Histon, (c) Auswahl von Histon- und DNA-Modifikationen. In Anlehnung an Pollock et al., (2009) [112], Copeland et al. (2009) [113] und Bates et al. (2020) [81].

1.2.2 Rolle des Acetylierungsstatus von Histonen auf die transkriptionelle Aktivität

Das N-terminale Ende des Histon-Oktamers ist reich an positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin welche mit der negativ geladenen DNA interagieren [84]. Durch die Acetylierung mittels Histon-Acetyltransferasen (KATs/HATs) werden die positiv geladenen Aminosäuren neutralisiert indem ein H-Atom durch eine

Acetylgruppe ersetzt wird [84]. Dies geschieht mit dem Co-Faktor Acetyl-CoA [114]. Infolgedessen findet durch die Ladungsänderung eine Auflockerung und Entfaltung des Chromatins mit darauffolgender Genexpression statt [110, 115]. Umgekehrt sind die Histon- und damit Chromatindeacetylierung und die hierbei in Zusammenhang stehende Transkription inhibition reversibel mittels Histon-Deacetylasen (HDACs) reguliert [110]. HDACs werden ebenfalls als Lysin-Deacetylasen (engl. KDACs) bezeichnet, um die Funktion anstelle der Zielstruktur zu beschreiben. Noch präziser ist der Ausdruck N-ε-Lysin-Deacetylase [116]. Während die Acetylierung von Lysin-Resten in Histonen 1968 entdeckt wurde [117], konnten die Histon-Acetyltransferasen (KATs/HATs) und Histon-Deacetylasen (KDACs/ HDACs) erst 1995 identifiziert werden [118]. **Abb. 1.4** stellt den allgemeinen Wirkmechanismus vereinfacht dar.

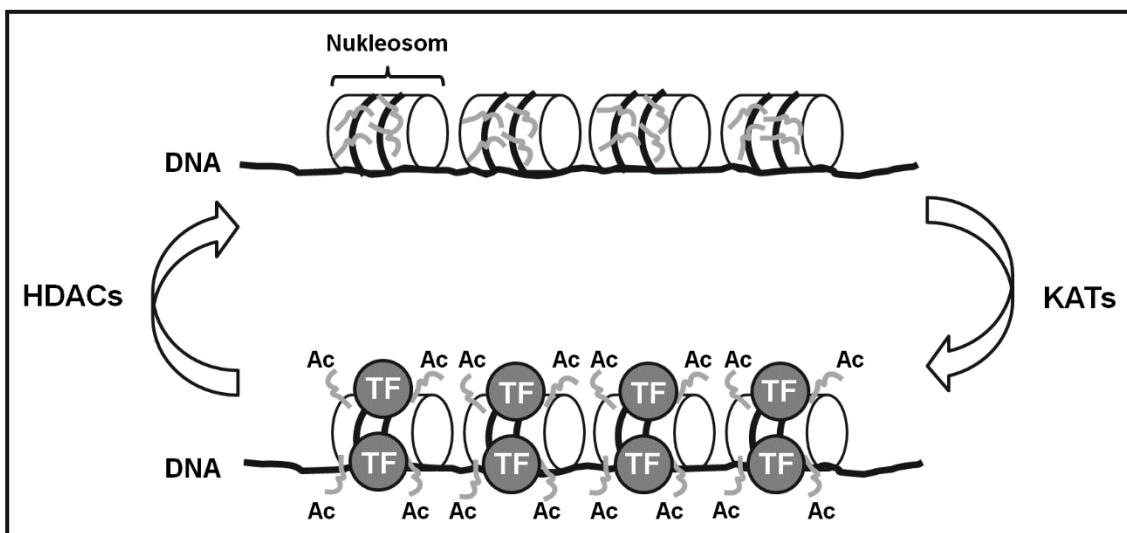


Abb. 1. 4: Schematisch dargestellter Mechanismus der Histonacetylierung und -deacetylierung
 HDAC: Histondeacetylase, KAT: Histon-Acetyltransferasen, TF: Transkriptionsfaktor, Ac: acetyliert
 In Anlehnung an: de Ruijter et al. (2003) [119].

Die Histon-Deacetylasen werden komplementär zu ihrer Homologie mit Hefepoteinen gewöhnlich in vier Hauptklassen unterteilt [119, 120], wovon die Klassen I, II und IV Zn²⁺-abhängige Enzyme sind [120]. Die Klasse I Mitglieder (HDAC1, 2, 3 und 8) sind homolog zum Protein Reduced-Potassium-Dependency 3 (RPD3) der Hefe [119]. Die Klasse II HDACS (HDAC4, 5, 6, 7, 9 und 10) haben Ähnlichkeit zur Histon-Deacetylase 1 (HDA1) [119]. HDAC6 und HDAC10 bilden mit zwei katalytischen Domänen eine Ausnahme und werden daher der Klasse IIb zugeordnet [121-123]. Die 3. Klasse, die Sirtuin-Proteine 1-

7 (SIRT1-7), ist homolog zum Silent-Information-Regulator 2 (SIR2) und benötigen Nicotin-Amid-Dinucleotid (NAD⁺) als Co-Faktor [84]. Aufgrund der großen Sequenzunterschiede zu den anderen Klassen werden sie nicht von den klassischen HDAC-Inhibitoren beeinflusst [111]. Eine weitere 4. Klasse wurde erst 2002 mit der zu diesem Zeitpunkt entdeckten Histon-Deacetylase 11 gebildet [119, 124, 125]. HDAC11 enthält konservierte Anteile innerhalb des aktiven Zentrums, welche eine gewisse Homologie zur 1. und 2. Klasse besitzt [124, 125].

Allgemein besteht bei Histon-Deacetylasen eine gewebespezifische Lokalisation und eine spezifische Dysregulation abhängig von der Tumorentität [114, 126]. Beim HCC wurde eine Überexpression von HDAC4 in mehreren unabhängigen Publikationen festgestellt [48, 127, 128]. Molekularbiologisch gemeinsam ist den HDACs der Klasse I und II eine ca. 390 Aminosäure umfassende katalytische Domäne [119]. HDAC6 und HDAC10 bilden mit zwei katalytischen Domänen eine Ausnahme [122, 123]. Die katalytische Domäne bildet eine Art Tasche, in welcher Histidin, Aspartat und Tyrosin über Ladungsverschiebungen für die Entfernung der Acetylgruppe von Lysin des Histon-Schwanzes während des Deacetylierungsprozesses mitverantwortlich sind [119, 129, 130]. Das als Ko-Faktor dienende Zink-Ion am Boden der katalytischen Domäne erleichtert neben weiteren Ko-Faktoren diese Reaktion [119, 129, 131].

1.2.3 Epigenetische Therapieansätze in der Krebstherapie: HDAC-Inhibitoren (HDACi)

Das durch Histon-Acetylasen und –Deacetylasen vermittelte Gleichgewicht zwischen Genexpression und –repression ist in malignen Erkrankungen gestört. Abhängig von der Tumorentität sind Überexpressionen bzw. Dysregulationen bestimmter HDACs berichtet, was zu einer transkriptionellen Blockade über hypoacetyliertes Chromatin führt [81, 119]. Studien zeigen, dass auch einzelne HDACs wie HDAC4 im HCC im Vergleich zu nicht-entartetem Lebergewebe dysreguliert sind [46, 48]. Ein Ziel epigenetischer Therapieansätze in der Tumorthherapie ist die Aufhebung dieser Blockade mittels HDAC-Inhibitoren (HDACi) ohne dabei jedoch normales, nicht entartetes Gewebe in seiner Funktion zu beeinträchtigen (**Abb. 1.5**). Die Wirkung von HDACi beschränkt sich

nicht nur auf eine direkte Aktivierung der Genexpression mittels Hyperacetylierung, sondern auch auf einer Vielzahl anderer Faktoren. Beispielsweise verändern HDACi auch den Acetylierungsstatus und somit die Stabilität von vielen an Signalwegen beteiligten Nicht-Histon-Proteinen wie p53 [132]. Mit dem Acetylierungsstatus ist ein Funktionsverlust oder Funktionsgewinn von Proteinen assoziiert [132]. In Abhängigkeit von Substanz und Zelltyp sind HDACi in der Lage eine Änderung der Genexpression von 4 - 20% aller Gene herbeizuführen [114].

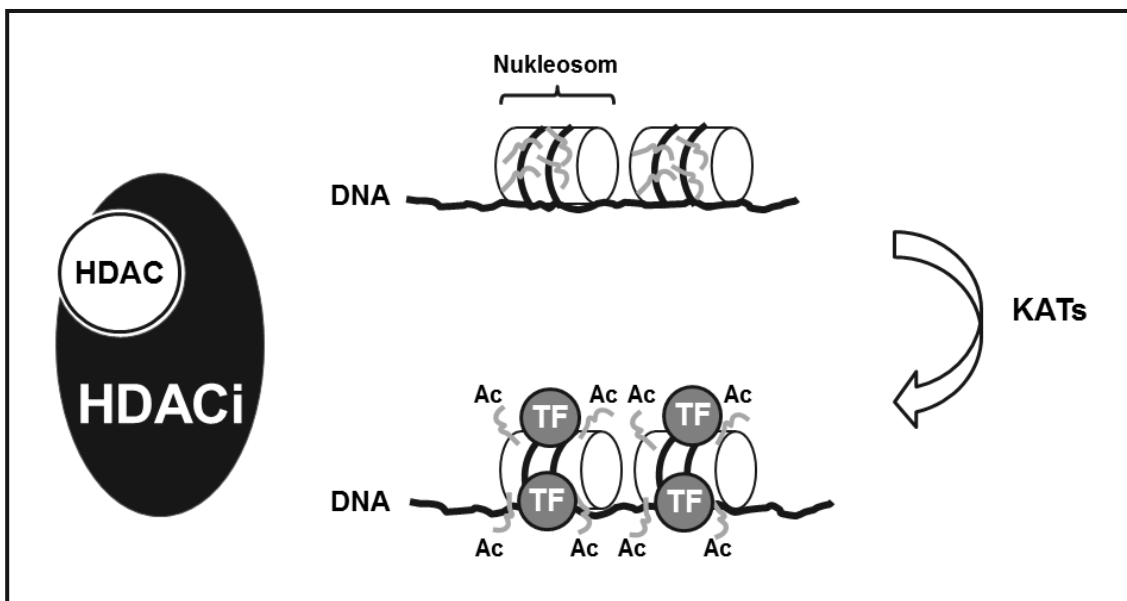


Abb. 1. 5: Epigenetische Kontrolle der Transkription und Inhibition von Histon-Deacetylasen mittels HDACi
 HDAC: Histon-Deacetylase, HDACi: Histon-Deacetylase-Inhibitor, KAT: Histon-Acetyltransferase, TF: Transkriptionsfaktor, Ac: acetyliert. In Anlehnung an: de Ruijter et al. (2003) [119].

Die bisher sehr gut charakterisierten HDACi gehören größtenteils den strukturell verschiedenen Substanz- bzw. Stoffklassen der kurzkettigen Carboxylsäuren, den Hydroxamaten, den zyklischen Tetrapeptiden, den Benzamiden oder elektrophilen Ketonen an. Innerhalb dieser Klassen gibt es sowohl synthetisch hergestellte als auch natürliche Substanzen. Einer der Hauptwirkmechanismen von HDACi ist die Chelatkomplexbildung mit dem Zink-Ion innerhalb der katalytischen Domäne über die der Deacetylierungsprozess gehemmt wird [133]. Aufgrund eines ungünstigen Toxizitätsprofils sind manche Pan-Inhibitoren von HDACs wie das Hydroxymat Trichostatin A (TSA) für den klinischen Einsatz nicht geeignet [134]. Hydroxamate besitzen folgende identische Strukturmerkmale: eine funktionelle Gruppe zur Interaktion mit dem Zink-Ion der katalytischen

Domäne, eine 5-6 Kohlenhydrat lange aliphatische Kette welche eine Lysin-Seitenkette nachahmt und drittens eine hydrophobe Endstruktur, auch Cap-Struktur genannt, im Sinne eines Benzolringes [120, 129, 135]. Letztere kann mit Randstrukturen der katalytischen Domäne interagieren [129]. HDACi mit geringerem Potential wie Valproat (VPA) können mit dem Zink-Ion der katalytischen Domäne ebenfalls interagieren, bilden jedoch aufgrund der kurzen Seitenketten keine wirksamen Van-der-Waals-Kräfte zu Randstrukturen aus. [87]. Hierdurch lassen sich die unterschiedlich wirksamen Konzentrationen zwischen den Substanzen erklären. Während TSA schon im nanomolaren Bereich wirkt, ist ein sichtbarer Effekt bei SAHA im mikromolaren und bei VPA erst im millimolaren Bereich erkennbar [114, 116, 119]. Vereinfacht zusammengefasst unterscheiden sich die synthetischen und natürlichen HDACi auf molekularer Ebene bezüglich der funktionellen Gruppe, der Länge der Seitenketten und der Cap-Struktur.

Ein erster klinischer Einsatz von HDACi wurde im Formenkreis der hämatologischen Tumorerkrankungen durchgeführt [81, 136]. Dies hatte mit der Erkenntnis zu tun, dass Leukämien und Lymphome als Gemeinsamkeit eine abnorme Rekrutierung von HDACs zu spezifischen Genloci über onkogene, DNA-bindende Fusionsproteine besitzen [84]. Diese entstehen durch chromosomale Translokationen oder einer Überexpression von unterdrückenden Transkriptionsfaktoren wie PML-RAR α [114]. Beispielsweise ist der Transkriptionsfaktor Bcl-6 im großzelligen B-Zell-Lymphom überexprimiert, worunter HDAC2 verstärkt an Genloci rekrutiert wird [114]. Durch HDACi wird der Wirkung der verstärkten Rekrutierung von Histon-Deacetylasen an Genloci entgegengewirkt [84]. Vorinostat (SAHA, engl. suberoylandilide hydroxamic acid) ist der erste im Jahr 2006 von der FDA (engl. food and drug administration, amerik. Zulassungsbehörde) zugelassene HDACi für die Therapie des fortgeschrittenen kutanen T-Zell Lymphoms [137]. Eine antiproliferative und tumorsuppressive Wirkung von HDACi auf Krebszelllinien in vitro wurde in vielen Veröffentlichungen bestätigt. Jedoch zeigen klinische Studien unter Verwendung von HDACi als Monotherapie bei soliden Tumoren wie dem Glioblastom, Nierenzellkarzinom und dem hepatozellulären Karzinom bisher nur geringen

Erfolg [81, 95, 136]. Obwohl einige Fallberichte eine positive Wirkung von HDACi in Kombination mit Sorafenib bei HCC zeigten, sind die meisten Studien auch bei dieser Entität bisher enttäuschend [138]. Eine Phase-2-Studie mit Belinostat (Inhibitor aller zinkabhängigen HDAC-Isoformen) bei inoperablem HCC zeigte ein progressionsfreies Überleben und ein Gesamtüberleben von 2,6 bzw. 6,6 Monaten [139]. Die SHELTER-Studie untersuchte Resminostat (orales Pan-HDACi mit vorherrschender Aktivität gegen HDAC1, HDAC2 und HDAC3) in Kombination mit Sorafenib in einer Zweitlinienbehandlung von fortgeschrittenem HCC und zeigte ein Gesamtüberleben von 8,0 Monaten, während Resminostat als Monotherapie nur 4,1 Monate erreichte [140]. Diese Studien, wie auch andere, die Tyrosinkinase-Inhibitoren untersuchen, beinhalten in der Regel Patienten mit progressivem, inoperablem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem HCC mit einer insgesamt schlechten Prognose, so dass die Chance auf ein verlängertes progressionsfreies Überleben oder ein Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens begrenzt sind [141]. Der kombinatorische Einsatz von epigenetischen Therapeutika wie HDACi mit klassischen Therapeutika und sog. Biologicals zur Überwindung von Resistenzen und Wirkungsverstärkung stellt jedoch weiterhin ein interessantes Forschungsgebiet dar [81, 96].

1.2.4 Rolle eines gestörten Methylierungsmusters bei der malignen Transformation

Im Verlauf der malignen Entartung von Zellen kommt es neben den in Kap. 1.2.2 und 1.2.3 besprochenen Dysregulationen spezifischer HDACs und Änderungen des Histonacetylierungsmusters auch zu spezifischen Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters [81, 84, 86-88, 111, 142, 143]. Darunter ist eine genomweite Hypomethylierung bei gleichzeitiger Hypermethylierung von sogenannten CpG-Promotor-Inseln zu verstehen (**Abb. 1.6**) [144]. Die genomweite Hypomethylierung führt zu genomischer Instabilität, wohingegen die Hypermethylierung von Promotoren zu einer Unterdrückung der Expression von zum Beispiel Tumor-Suppressorgen führt (engl. gene silencing) [86, 144]. Da ca. 60% aller Promotoren mit CpG-Inseln assoziiert sind, ist das potentielle

Ausmaß auf die Genexpression enorm [145, 146]. Definiert sind CpG-Inseln als mindestens 200 Basenpaar (bp) lange DNA-Abschnitte mit mindestens 50%-igem Anteil der Nukleotide Guanin und Cytidin [145, 147].

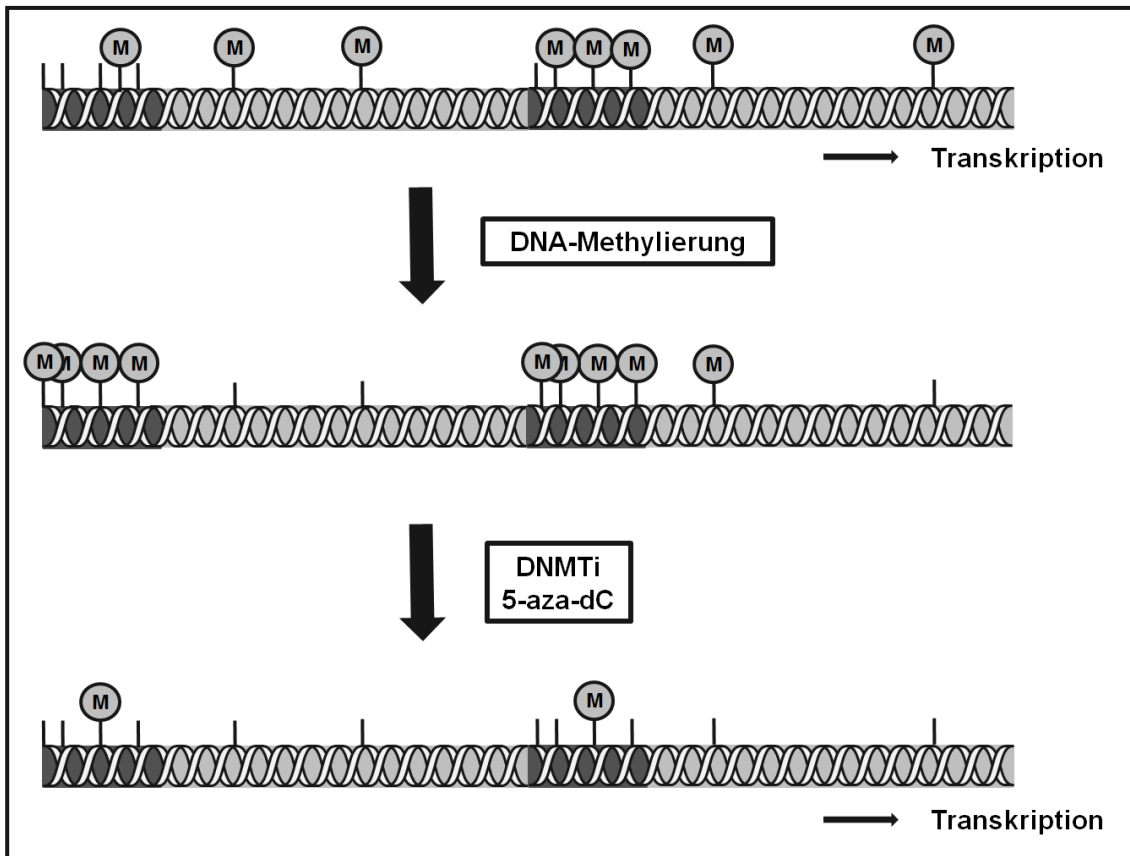


Abb. 1.6: Epigenetische Veränderungen des Methylierungsmusters bei der malignen Transformation
 Hypermethylierung von Promotoren führt zur transkriptionellen Inaktivität. Behandlung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTi) führt zur Reaktivierung der Genexpression. In Anlehnung an Mund et al. (2006), Gronbaek et al. (2007) und Fernandez et al. (2012) [111, 144, 148].

Diese Veränderungen des Methylierungsmusters spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese [81]. Dazu zählen u.a. auch familiär gehäufte Formen wie das von-Hippel-Lindau-Syndrom [86, 149] oder das Mamma-Ca mit einer Hypermethylierung des BRCA1-Gens [86, 150]. Klinisch und experimentell werden Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen (DNMT-Inhibitoren, DNMTi) wie 5-aza-dC auf ihre Wirksamkeit in der Tumorthherapie hin untersucht [81, 84, 95, 96, 98, 135, 136, 140, 142, 151-156]. Ziel dabei ist eine Reaktivierung der Genexpression über eine verminderte Methylierung von Promotoren und dadurch ermöglichter Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an die DNA. Die drei in eukaryotischen Zellen vorkommenden DNA-Methyltransferasen (DNMTs) sind DNMT1, DNMT3A und DNMT3B [86, 157]. Diese übertragen Methylgruppen auf

Cytosin-Phosphatidyl-Guanin (CpG)-Dinukleotide der DNA. Während DNMT1 der Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters dient, sind DNMT3A und 3B für die Bildung eines de novo Methylierungsmusters verantwortlich [86, 157, 158]. Alle drei DNMTs sind in Tumoren überexprimiert [86, 159, 160]. Diese sind bezüglich ihrer Methylierungsfähigkeit aufeinander angewiesen, wie Versuche mit Kolonkarzinom-Zellen gezeigt haben [86, 161, 162]. Obwohl eine Inaktivierung von DNMT1 in diesen zu einer sehr starken Reduktion der Gesamtkิจกรรมität der DNMTs auf circa 4% führt, bleibt die Hypermethylierung der Promotorregionen bestehen und eine Abnahme der globalen Genommethylierung findet nur um ca. 20% statt. Bei einer Inaktivierung von DNMT3B reduziert sich weder die globale Genommethylierung noch die Gesamtkิจกรรมität der DNMTs bedeutsam. Werden jedoch DNMT1 und DNMT3B gemeinsam inaktiviert, führt dies zu einer bedeutenden Abnahme der DNMT-Aktivität, einem 95%-igem Verlust der genomweiten Methylierung und zu einer teilweisen Aufhebung der Hypermethylierung von Promotoren bzw. der transkriptionellen Ruhigstellung [86, 161, 162].

1.2.5 Epigenetische Therapieansätze in der Krebstherapie: Methyltransferase-Inhibitoren

Von der FDA (engl. federal drug administration, amerik. Zulassungsbehörde) wurden 2004 5-Azazytidin (Vidaza®, 5-aza-CR) und 2006 5-aza-2'-Deoxycytidin (Dacogen®, Decitabin, 5-aza-dC) für die Behandlung des Myelodysplastischen Syndrom (MDS) zugelassen [81, 153, 163, 164]. Beide Substanzen wurden zunächst als klassische Zytostatika entwickelt. Erstmals wurden sie 1964 in vitro getestet und erst später ihr Potential als DNA-Methyltransferase-Inhibitor festgestellt [153, 154, 165-167]. 5-aza-CR und 5-aza-dC sind Prodrugs und müssen nach ihrer intrazellulären Aufnahme in ihre aktive Form umgewandelt werden [153, 168, 169]. 5-aza-dC wird über ATP-abhängige Reaktionen mittels der Deoxycytidin-Kinase in einem mehrstufigen Prozess in die aktive Form 5-aza-2'-Deoxyzytidin-5'-triphosphat umgewandelt (**Abb. 1.7**).

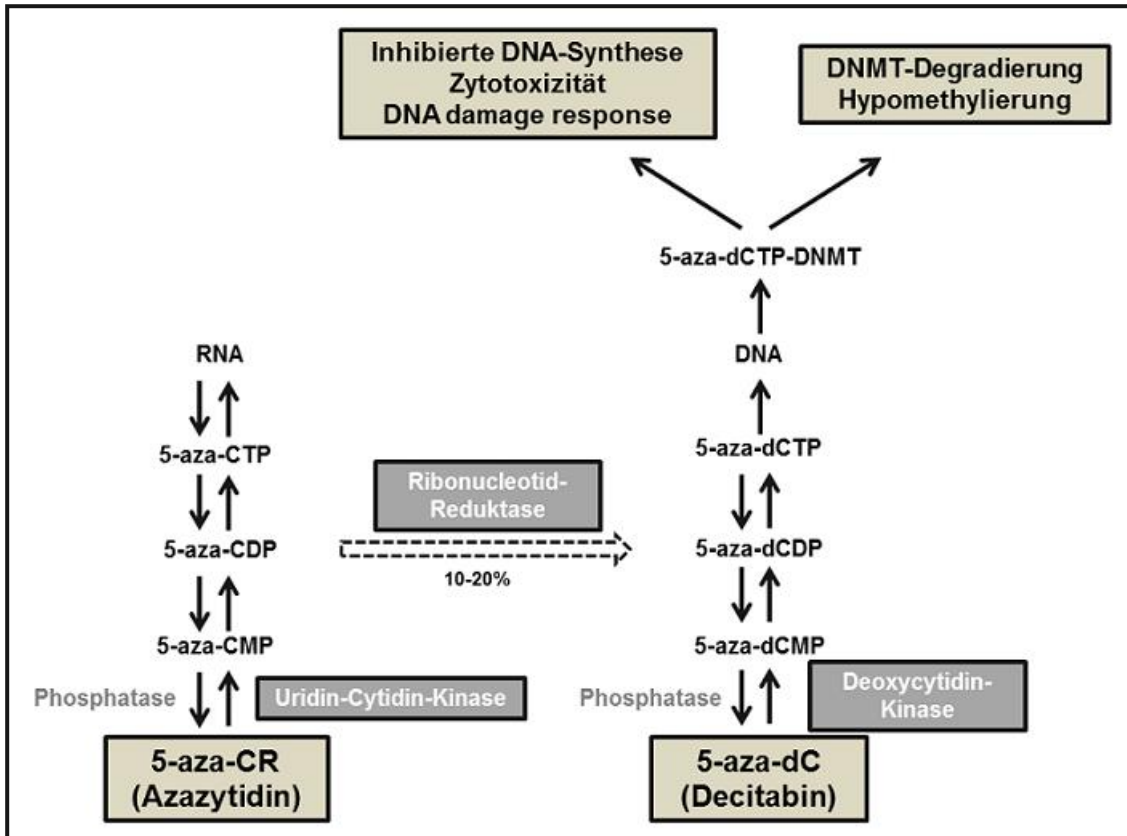


Abb. 1.7: Intrazelluläre Stoffwechslung der hypomethylierenden Nucleosid-Analoga Azazytidin (5-aza-CR) und Decitabin (5-aza-dC) bis zur wirksam aktiven Form
 In Anlehnung an Issa et al. (2009) und Stresemann et al. (2008) [153, 169].

Bei 5-aza-CR werden für die Aktivierung Uridin-Cytosin-Kinasen angeführt [153, 169]. Eine Studie mit der Leukämie-Zelllinie L1210 zeigte, dass 80 - 90% von 5-aza-CR direkt in die RNA eingebaut werden, wohingegen 10 - 20% über die Ribonucleotid-Reduktase in Deoxyribonucleotide umgewandelt werden können und somit dem Metabolisierungsweg von 5-aza-dC folgen [153]. Die intrazelluläre Stoffwechslung zeigt, dass die Wirkmechanismen von 5-aza-CR und Decitabin zum Teil ähnlich jedoch auch komplett andere sind. 5-aza-CR stört durch den Einbau in die RNA im Gegensatz zu 5-aza-dC unter anderem zusätzlich die Proteinbiosynthese [155]. Nachdem die Azanucleotide in die aktive Form 5-aza-2'-Deoxycytidin-5'Triphosphat umgewandelt wurden, können sie anstelle von Cytosin während der DNA-Replikation in die DNA-Stränge eingebaut werden. Cytidin und Deoxycytidin unterscheiden sich von deren Analoga 5-aza-CR und 5-aza-dC strukturell lediglich durch ein Stickstoffatom an Position 5 des Pyrimidinrings (**Abb. 1.8**).

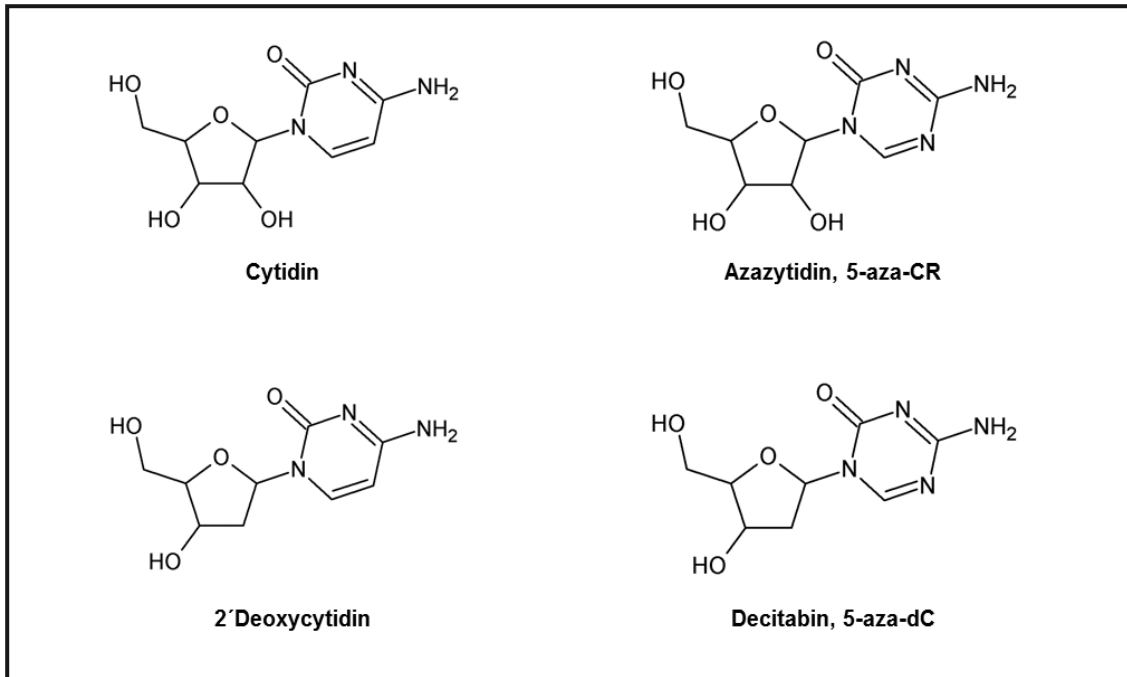


Abb. 1.8: Strukturformeln von Cytidin, 2'-Deoxycytidin, Azacytidin (5-aza-CR) und Decitabin (5-aza-dC)
 Strukturformeln mittels ChemSketch von Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD) gezeichnet.

Bei jeder DNA-Replikation und darauffolgender Zellteilung werden Methylierungsmuster der DNA auf die Tochterzellen übertragen [79]. Hierfür verantwortlich sind sog. DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Diese binden intermediär während des Methylierungsprozesses über Cytosin kovalent an die DNA und methylieren diese. Bindet die DNMT anstatt an Cytosin an 5-aza-2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphat, kann die kovalente Bindung nicht wieder aufgehoben werden (engl. DNMT trapping) [169]. In der Folge kommt es zur Degradierung der DNMTs und zur Hypomethylierung der DNA. Die sichtbare Wirkung von DNMTi setzt im Vergleich zu klassischen Zytostatika leicht verzögert ein, da die Zellen mindestens einmal den kompletten Zellzyklus für den Einbau von 5-aza-2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphat in die DNA durchlaufen haben müssen. Das epigenetische Therapieziel ist eine Wiederherstellung der Gen-expression beispielsweise von Tumorsuppressor-Proteinen, welche zuvor über eine Hypermethylierung von sogenannten CpG-Inseln im Rahmen einer malignen Transformation nicht möglich gewesen wäre (engl. gene silencing). Weiterhin hat eine globale Hypomethylierung der DNA starke Auswirkungen auf das Expressionsmuster des miRNoms (Gesamtheit der microRNAs) und dadurch indirekt auf posttranskriptionelle Kontroll- und Regulationsmechanismen [170-177]. Neben den Effekten auf das DNA-Methylierungsmuster, gibt es weitere

Effekte von 5-aza-dC auf die Zelle. Wichtig ist die von klassischen Chemotherapeutika bekannte DNA-Schädigung mit entsprechender Zellantwort (engl. DNA damage response, DDR), welche zu einem Zellzyklusarrest und Zelltod führen kann [178-181].

Außer 5-aza-CR und 5-aza-dC gibt es weitere Substanzen mit dem Potential einer DNMT-Inhibierung über unterschiedliche Mechanismen. Zebularin als Derivat von 5-aza-CR wird in die DNA eingebaut und hat einen ähnlichen Wirkmechanismus wie 5-aza-CR und 5-aza-dC [163]. Der niedermolekulare (engl. small-molecular) Inhibitor RG108 blockiert hingegen direkt das katalytisch aktive Zentrum der Methyltransferasen [148, 163]. Guadecitabin (SGI-110) zeigte in in-vitro Studien eine Proliferationsminderung in Hepatomzelllinien [156]. Zur Vollständigkeit erwähnt sind die 4-Aminobenzosäure-Derivate wie Procainamid, Oligonukleotide wie MG98 und die Psammapline welche zusätzlich eine HDACi-Funktion besitzen [148, 163, 182].

1.3 MicroRNAs (miRNAs)

1.3.1 Allgemeiner Überblick und Regulationsphänomene beim HCC

MicroRNAs (miRNAs) sind 21-25 Nukleotid lange, nicht kodierende einzelsträngige RNAs [82]. Die allererste beschriebene miRNA, lin-4, wurde 1993 im Nematoden-Wurm *C.elegans* entdeckt [183-185]. Es sind in 206 Spezies über 24.521 miRNA-Genloci und über 30.424 miRNA-Sequenzen entdeckt worden [186]. Davon entfallen 2578 auf den Menschen [186]. Jedoch werden hiervon einige miRNAs ubiquitär, andere hingegen nur gewebespezifisch exprimiert [187-191]. miRNAs regulieren die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene über eine komplementäre Bindung an mRNA [82]. Dadurch wird die Translation und schlussendlich die Proteinbiosynthese gehemmt. miRNAs stehen bezüglich ihrer Expression selbst unter dem Einfluss von Methylierung und Acetylierung [175, 192-194], einige können jedoch auch direkt DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen in ihrer Expression unterdrücken [171]. Computerbasierte Analysen zeigen, dass über 30% der Protein kodierenden Gene über miRNAs moduliert werden [171, 195, 196]. Regulatorische Faktoren der miRNA-Biogenese koordinieren nicht nur einzelne miRNA-Verarbeitungsschritte, sondern verbinden auch die miRNA-Biogenese mit anderen zellulären Prozessen verbinden [83]. Ein Beispiel ist die Phosphorylierung von Proteinen, die die miRNA-Biogenese mit verschiedenen Signalwegen verbindet [83]. miRNAs haben dadurch in so gut wie allen zellulären Prozessen eine regulationsbeeinflussende Rolle [83, 197-201]. Verstärkt wird dieser Effekt dadurch, dass eine miRNA-Sequenz komplementär an eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs bindet und umgekehrt eine mRNA komplementär zu mehreren miRNAs ist [82]. MiRNAs selbst können also in diesem Netzwerk durch Modulation der Proteinbiosynthese als Tumorsuppressoren oder Onkogene wirken [83, 176, 194, 202-208]. Eine globale Reduktion der miRNA-Expression wird als ein typisches Kennzeichen von Krebszellen angesehen [208]. Eine gezielte, intendierte miRNA-Regulation hätte aufgrund des Wirkmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene therapeutisches Potential.

Die ersten Hinweise auf eine Verbindung zwischen dem miRNom (Gesamtheit aller miRNAs) und der malignen Entartung wurde von Calin et al. im Jahr 2002

für die chronisch lymphatische Leukämie veröffentlicht [209, 210]. Der Einfluss des miRNoms auf die Genese und Homöostase des HCC wurde in mehreren Studien beschrieben [89-91, 196, 206, 211-217]. Pogribny et al. zeigten schon 2007 durch eine Langzeitbehandlung von Tamoxifen, dass eine Veränderung des miRNoms in Rattenlebern vor der Tumorformation stattfindet und nicht nur Ausdruck eines transformierten Gewebes ist [218]. Sulas et al. analysierten 2018 das miRnom von dysplastischen Knoten der Leber, HCCs und dem jeweils hieran angrenzenden Lebergewebe [89]. Hierbei wiesen 62 miRNAs der HCCs Unterschiede in der Expression im Vergleich zu peritumoralem Lebergewebe auf, unabhängig von der Ätiologie des HCC. 52 dieser miRNAs (83 %) wiesen bereits eine veränderte Expression in dysplastischen Knoten auf. Dies zeigt, dass ein Großteil der dysregulierten miRNAs schon vor Entstehung eines HCCs in Vorstufen dysreguliert sind. Eine anormale Expression im HCC weisen u.a. miR-1, miR-10a, miR-7, miR-21, miR-22, miR-99a, miR-101, miR-122, miR-124, miR-125a und b, miR-138, miR-139, miR-145, miR-195, miR-199a-3p und -5p, miR-200a, miR-203, miR-214, miR-221, miR-222, miR-224, miR-375, miR-483-3p, miR-500, miR-519d und miR-520e wurde auf [89, 127, 207, 216, 219-228]. Diese miRNAs beeinflussen unter anderem Signalwege für Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung [90, 91, 194]. Einige dieser Expressionsänderungen korrelieren sowohl mit klinisch-pathologischen Merkmalen als auch erhöhter Mortalität und haben potenziellen Nutzen als prädiktive Biomarker für die HCC-Prognose [194, 205, 206, 216, 219-223, 229]. Studien haben gezeigt, dass u.a. eine hohe Expression von miR-92a, miR-221, miR-487a oder miR-1468 und eine Herunterregulierung von miR-33a, miR-137, miR-194 oder miR-940 mit einer schlechten Prognose bei HCC-Patienten verbunden ist [90, 230-233]. Die Analyse der Phase-3-Studie von Regorafenib bei HCC (RESORCE) hat neben einem Plasmaprotein-Expressionsprofil auch 9 miRNAs im Plasma identifiziert, die mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit und verlängertem progressionsfreien Überleben assoziiert waren [234].

1.3.2 miRNA-Synthese und Nomenklatur

Die miRNA-Synthese ist ein mehrstufiger, intranukleärer und zytoplasmatischer Prozess (**Abb. 1.9**) [82, 83, 235]. Der miRNA-Vorläufer Pri-miRNA wird von der RNA-Polymerase II oder III transkribiert und in eine Haarnadelstruktur gefaltet (engl. hairpin). Anschließend bildet diese einen Komplex mit der RNase Typ III Drosha und dem Protein Pasha. In diesem Komplex wird die Pri-miRNA in eine ungefähr 70 Nukleotid lange Pre-miRNA prozessiert. Diese wird anschließend Ran-GTP-abhängig über Exportin-5 in das Zytoplasma ausgeschleust. Dort angelangt, erfolgt ein weiterer Prozessierungsschritt mittels der RNase III Dicer und dem Protein TRBP (engl. HIV transactivating response RNA-binding protein). Die Haarnadelstruktur wird dabei aufgelöst und es entsteht eine doppelsträngige, ungefähr 21-25 Nukleotid lange RNA (dsRNA). Anschließend wird diese im sog. miRISC-Komplex (engl. multiprotein RNA-induced silencing complex) mittels einer Helikase in zwei einzelsträngige RNAs getrennt. Nur eine der beiden Einzelstrang-RNAs, die sog. mature miRNA, dient zur späteren komplementären Anlagerung an mRNA und damit der translationellen Hemmung. Bei der zweiten, sogenannten miRNA* (star) geht man von einer Degradierung aus. In Einzelfällen ist diese aber auch funktionell aktiv. Die reife miRNA (engl. mature miRNA) bindet mittels eines Komplexes aus Argonaute-Proteinen (AGO) an komplementäre Sequenzen der mRNA. Dies führt zur Unterdrückung der Translation und damit der Proteinbiosynthese [82]. Neben den Drosha- und Dicer-abhängigen Wegen der miRNA-Biogenese, bestehen zusätzlich hiervon unabhängige [236, 237]. Eine für Tumorzellen typische Hypoacetylierung des Chromatins über eine spezifische HDAC-Überexpression und eine Hypermethylierung der CpG-Inseln von Promotoren führt zu verminderter Aktivität der RNA Polymerase II [176]. Umgekehrt erlauben Histon-Deacetylase- und Methyltransferase-Inhibitoren über eine „Auflockerung“ des Chromatins bzw. über eine Demethylierung von Promotoren einen verstärkten Zugriff der RNA-Polymerasen auf die DNA und damit eine verstärkte Transkription der miRNA-Vorläufersequenzen [170, 176, 238]. Hinzu kommt, dass miRNAs selbst die oben beschriebenen epigenetischen Regulationsmechanismen modulieren können [170]. Beispielsweise führt mir-29 eine globale Hypomethylierung der DNA über eine Verringerung der DNMT-

Expression herbei [239-242]. Dies zeigt, dass alle bisher beschriebenen (epigenetischen) Regulationsmechanismen miteinander vernetzt sind [170, 172-174, 176, 238, 243].

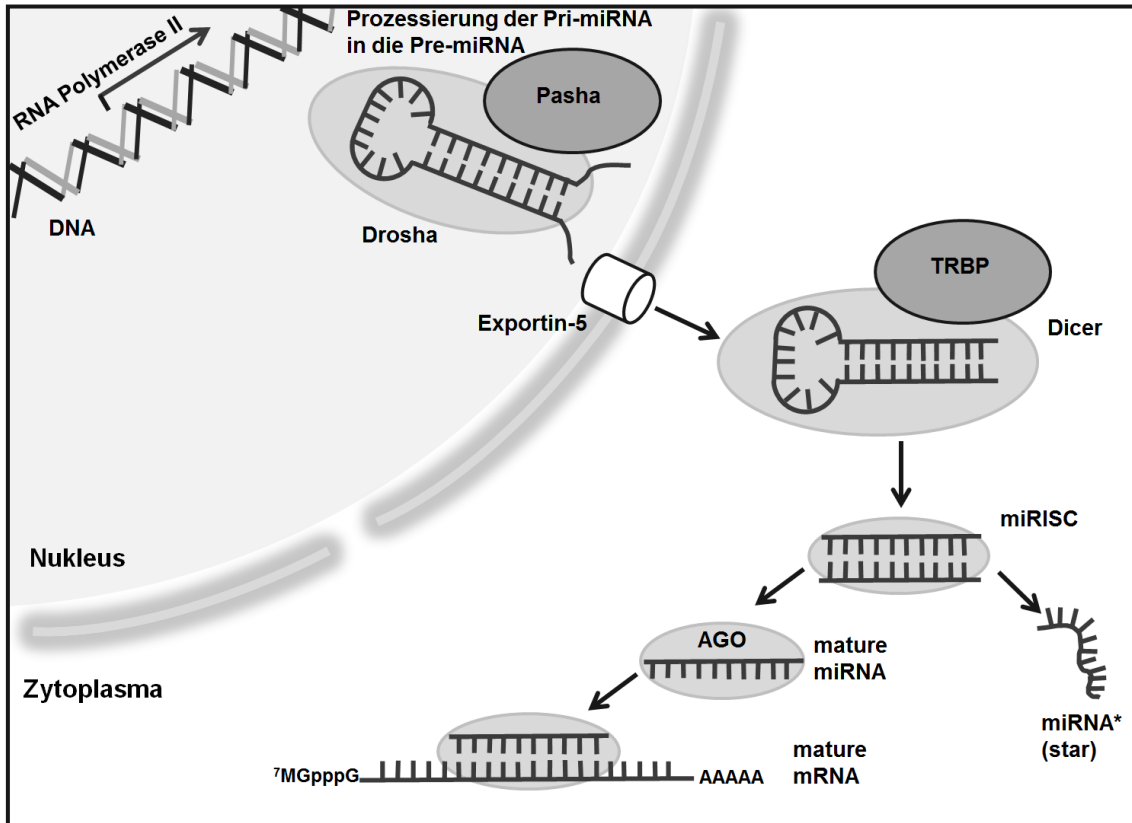


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der miRNA-Synthese
In Anlehnung an Gebert et al (2019) [82] und Lin et al. (2015) [208]

Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die komplexe Nomenklatur der miRNAs. Da in dieser Promotionsarbeit ausschließlich humane Zellen verwendet werden, wird auf das Präfix „hsa“ für homo sapiens verzichtet.

Tab 1. 1: miRNA-Nomenklatur [244]

Begriff	Erklärung
hsa -miR-116	Spezies bzw. Organismus; hsa= homo sapiens
hsa-mi R -116	wirksame Endsequenz (engl. mature sequence)
hsa-mi r -116	Vorläuferstruktur (engl. precursor hairpin)
hsa-miR-116 a hsa-miR-116 b	Ähnliche miRNAs, die sich nur in ein oder zwei Basen unterscheiden
hsa-miR-116- 1 hsa-miR-116- 2	Verschiedene Vorläufer und Genloci, jedoch dieselbe wirksame Endsequenz (engl. mature sequence)
hsa-miR-116 hsa-miR-116*	Sequenzen desselben Vorläufers ohne * „dominante“ häufigere Form
hsa-miR-116- 5p hsa-miR-116- 3p	unklar welche Sequenz desselben Vorläufers „dominant“ ist 5p stammt vom 5' Arm des Vorläufers, 3p vom 3' Arm des Vorläufers

1.3.3 Rolle und Funktion

Da miRNAs der posttranskriptionellen Regulation dienen, führen Veränderungen in der miRNA-Expression potentiell zu Veränderungen auf Ebene der Proteinexpression (**Abb 1.10**) [82, 83].

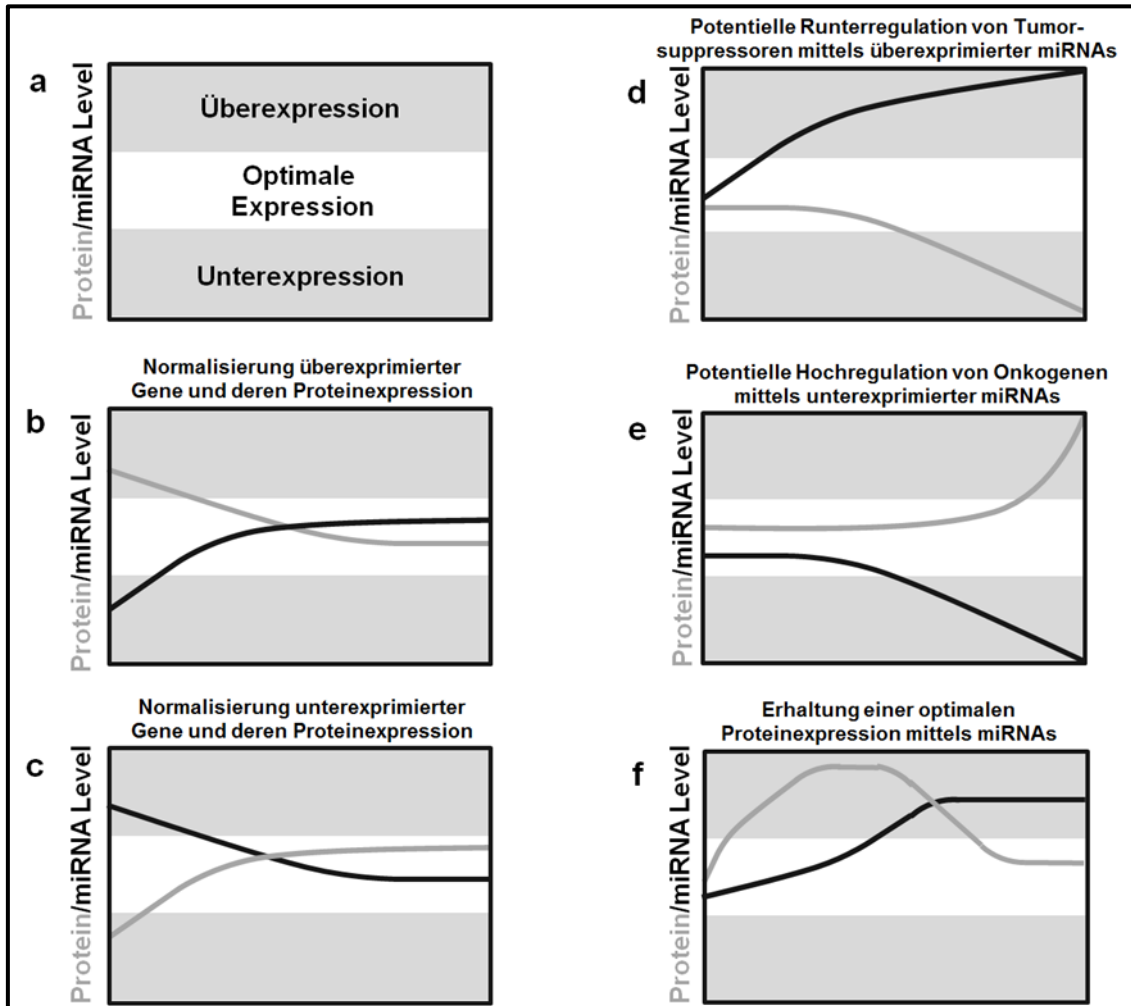


Abb. 1. 10: miRNA-Wirkmechanismus als posttranskriptioneller Regulations-mechanismus
Die Erklärungen der Kurven von a bis f erfolgt im Text. In Anlehnung an Bartel et al. (2004) und Treber et al (2019) [245].

In normalen, nicht entarteten Zellen wird eine für die Zelle zum jeweiligen Zeitpunkt optimale Proteinexpression in einem Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau aufrechterhalten (a). Falls Gene fälschlicherweise über- oder unterexprimiert werden, können miRNAs über den oben beschriebenen posttranskriptionellen Regulations-mechanismus eine optimale Proteinexpression wiederherstellen. Dies geschieht im Fall von überexprimierten Genen über eine Hochregulation der zur mRNA des Proteins komplementären miRNA (b), oder im Fall von unterexprimierten Genen über einer Runterregulation

der entsprechenden miRNA (c). In maligne entarteten Zellen ist der posttranskriptionelle Regulationsmechanismus über miRNAs zur Aufrechterhaltung einer optimalen Proteinexpression gestört. Eine maligne Überexpression von miRNAs könnte folglich Tumorsuppressoren herunterregulieren (d), wohingegen eine verminderte miRNA-Expression und dem damit einhergehenden Inhibitionsverlust zu einer Hoch-regulation von Onkogenen führen könnte (e). miRNAs können durch den Regulationsmechanismus sogar selbst die Rolle eines Tumorsuppressors oder Onkogens haben. Vorstellbar ist, dass die Zelle selbst im Verlauf der malignen Entartung miRNAs zum „Selbstschutz“ hoch- oder runterreguliert um eine optimale Proteinexpression aufrechtzuerhalten (f). In der experimentellen Tumorthherapie-Forschung wird das Grundprinzip der posttranskriptionellen Regulation genutzt, um künstlich miRNAs intrazellulär zu überexprimieren oder umgekehrt um spezifische miRNAs zu hemmen.

1.4 Seneszenz

Menschliche Zellen haben eine begrenzte Teilungsfähigkeit, bevor sie ihre Proliferation einstellen. Dieser terminale Wachstumsarrest bei Erschöpfung der Replikationskapazität wurde von Hayflick und Moorhead 1961 als zelluläre Seneszenz bezeichnet [246]. Dieser weist einen spezifischen morphologischen und biochemischen Phänotyp auf und ist typischerweise eine Antwort der Zelle auf unterschiedliche, nicht-tödliche Stressreize [78, 247-250]. Später wurde gezeigt, dass neben dieser replikativen Seneszenz auch Stressreize (wie die abnorme Aktivierung von Onkogenen, Bestrahlung oder die Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten) einen ähnlichen Phänotyp auslösen. Diese Arten der Seneszenz wurden als Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) und Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) bezeichnet. Die Zellen können hierbei entweder in der G1- oder G2-Phase arretieren und sind trotz Wachstumsarrest metabolisch aktiv [78, 250, 251]. Auch kommt es zur Formation sogenannter Seneszenz-assoziiierter Heterochromatin-Foci (SAHF) als Zeichen des Chromatin-Remodelings oder γ H2AX-Foci als eine bestimmte Form der DNA-Schädigung [249, 250, 252, 253]. Diese sind kritisch kurze oder dysfunktionale Telomere [249, 250, 253]. Kennzeichnend für seneszente Zellen ist u.a. eine erhöhte lysosomale β -Gal-Expression [78, 250, 254]. Dies ist der am häufigsten akzeptierte und benutzte Marker für seneszente Zellen [78, 255]. Bei in vivo Experimenten ist eine immunhistochemische Gewebeanfärbung von Zellzyklusregulatoren wie p21 oder p27^{kip1} eventuell hilfreicher als eine β Gal-Färbung [248, 256]. Neben diesen klassischen Seneszenzmarkern, wurden in der Literatur auch weitere vorgeschlagen wie die Expression der sog. Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor 10D (TNFRSF10D) oder die NAD-abhängige Protein-Deacetylase Sirtuin-2 (SIRT2) [257-259]. Morphologisch kommt es typischerweise zu einer Abflachung und optischen Vergrößerung der Zellen sowie Vergrößerung des Zellkerns in vitro [260]. Es muss jedoch betont werden, dass bisher kein einzelner Seneszenzmarker zur Verfügung steht, um seneszente Zellen zuverlässig zu identifizieren. Die kombinierte Verwendung von mehreren Markern hat sich als wirksam erwiesen [261].

1.4.1 Replikative Seneszenz

Die Erstbeschreibung seneszenten Zellen stammt von Hayflick und Moorhead aus dem Jahr 1961 [246, 249, 250]. Sie beobachteten, dass sich in Kultur befindliche humane Fibroblasten mit der Zeit in einen Zustand eines irreversiblen, terminalen Wachstumsarrestes begeben (**Abb. 1.11a**). Dieser Wachstumsarrest normaler, nicht entarteter Zellen wird als replikative Seneszenz bezeichnet [247, 249, 250, 262, 263]. Ein Hauptfaktor hierfür ist eine Aktivierung der „DNA damage response“ (DDR) verursacht durch eine im Laufe fortschreitender Replikation erworbener Telomerverkürzungen und eine Akkumulation nicht-reparierter DNA- und Chromosomenschäden sichtbar an γ H2AX-Foci (**Abb. 1.11b**) [247, 249, 250, 263]. Hinzu kommt u.a. eine aufgehobene Repression des INK4a/ARF-Lokus, was zu einer Aktivierung von p53 und des Retinoblastom-Gens (Rb) führt (**Abb. 1.11c**) [249, 250].

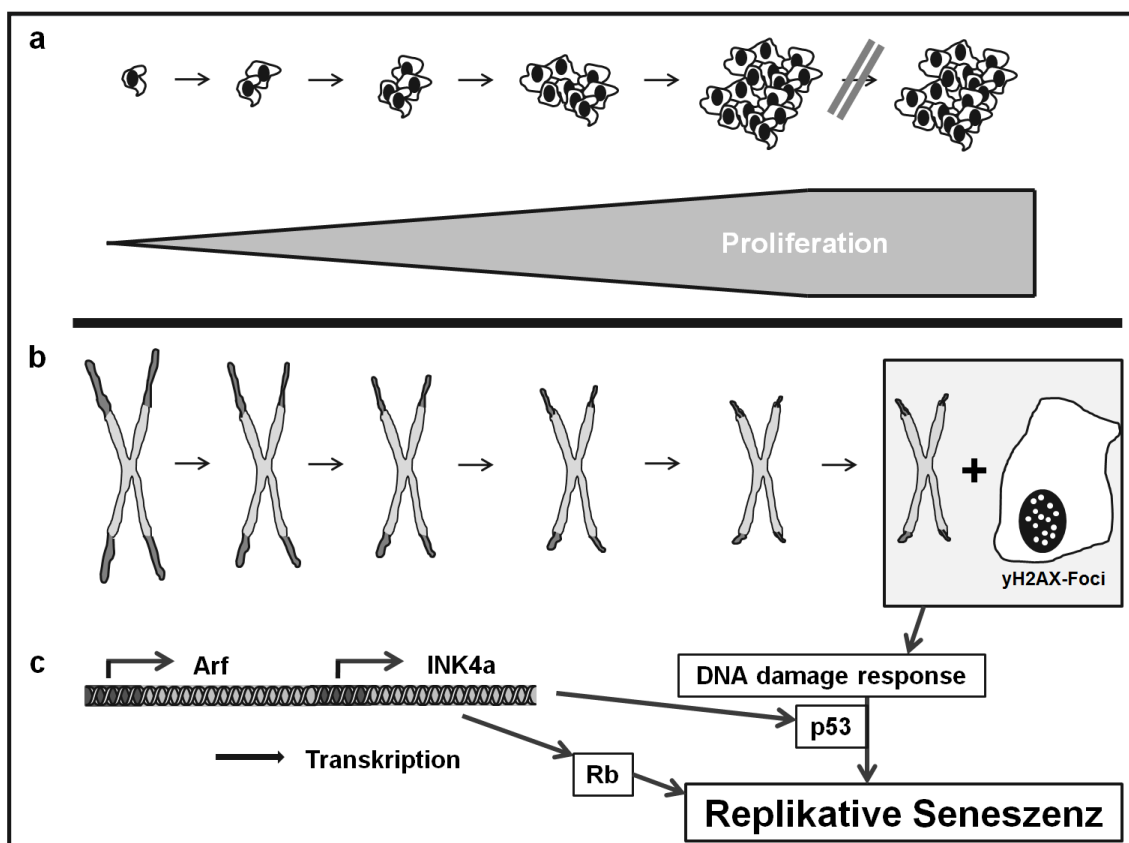


Abb. 1. 11: Schematische Darstellung ausgewählter Mechanismen replikativer Seneszenz

a) Wachstumsstopp normaler, nicht maligne entarteter Zellen nach mehreren Replikationen; b) Telomerverkürzungen bei Replikationsteilungen und γ H2AX-Foci-Bildung als Ausdruck von DNA- und chromosomaler Schäden; c) Aktivierung des INK4a/ARF-Lokus. In Anlehnung an Collado et al. (2007) [249] und Di Micco et al. (2021) [250]

1.4.2 Seneszenzmechanismen in Tumorzellen

Der Onkogen-induzierte Seneszenzmechanismus unterscheidet sich von dem der replikativen Seneszenz. Die Stressreaktion der Zelle auf Onkogene und der hierdurch verbundene Wachstumarrest, wird nach potenziell tumorfördernden Reizen aktiviert und stellt eine wirksame Barriere gegen die weitere Tumorentwicklung dar. Auch die Aktivierung von Onkogenen ist ein starker Auslöser der Seneszenz [250]. Insbesondere induzieren die meisten aktivierten Onkogene, teilweise über die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), eine Hyperproliferation und veränderte DNA-Replikationsmuster, die letztlich zu Replikationsstress und einer Anhäufung von DNA-Schäden an fragilen Stellen führen, zu denen auch Telomere gehören [250]. Prämaligene Vorstufen werden hierdurch über Jahre bis Jahrzehnte hinweg in ihrem Wachstum in vivo kontrolliert [264]. Beispiele sind Melanozyten in Nävi als Vorstufen von Melanomen [264, 265], gutartige Läsionen der Prostata [266] und Lungenadenome [259].

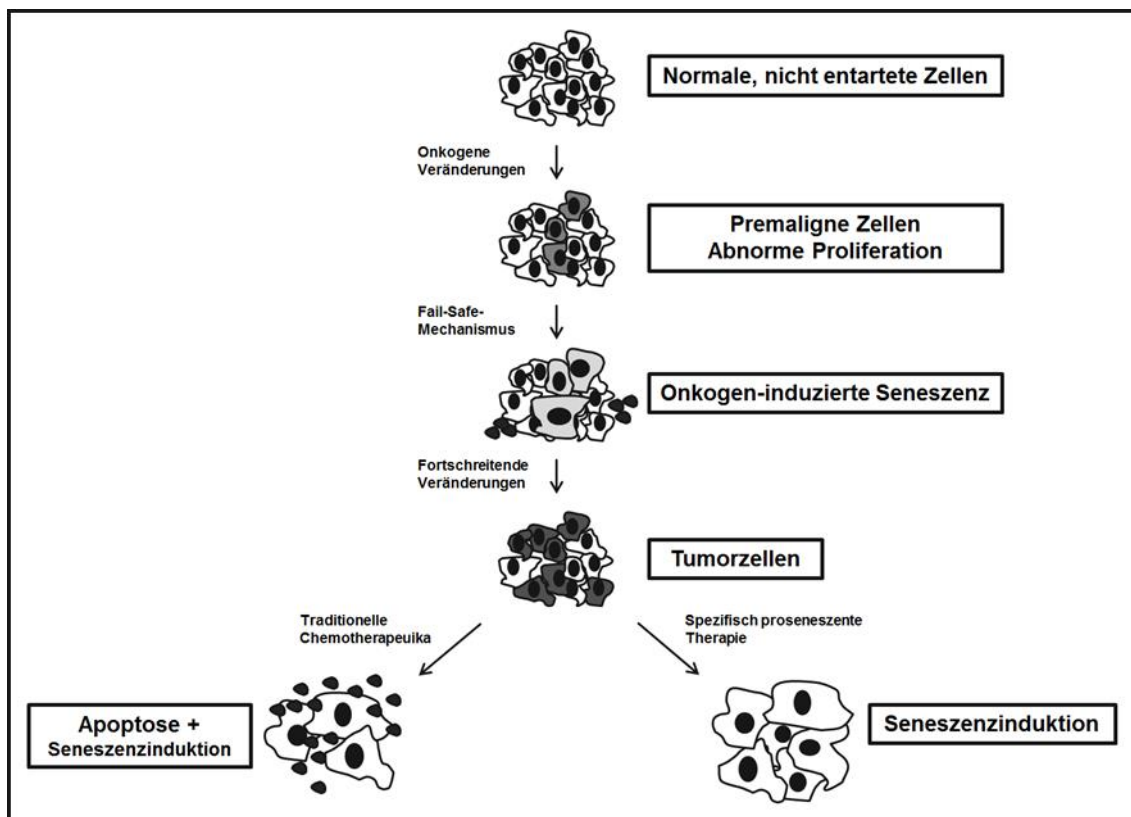


Abb. 1. 12: Schematische Darstellung der schrittweisen Entartung normaler Zellen, dem Eigenschutzmechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) und dem Unterschied zwischen traditionellen Chemotherapeutika und einer spezifisch proseneszenten Therapie

In Anlehnung an Acosta et al. (2011) [247], Bitzer et al. (2018) [78] und Di Micco et al. (2021) [250]

Interessanterweise stellt die zelluläre Seneszenz nicht nur eine intrinsische Barriere dar, die der Tumorentwicklung entgegenwirkt. Unter bestimmten Umständen kann auch das Vorhandensein präkanzeröser seneszenten Zellen (Zellen, die eine aberrante Onkogenaktivierung aufweisen, aber aufgrund ihres Seneszenzphänotyps von einer vollständigen onkogenen Transformation abgehalten werden) Immunreaktionen auslösen, die zur Beseitigung solcher präkanzeröser Zellen führen [259, 267, 268]. Solche Immunreaktionen werden durch verschiedene Zytokine, Chemokine, Matrix-umbauende Proteasen und Wachstumsfaktoren vermittelt, die von alternden Zellen ausgeschieden werden, und in der Gesamtheit als Seneszenz-assoziiertes Sekretom (SASP) bezeichnet (engl. SASP, senescence-associated secretory phenotype) [269, 270]. Der Schutzmechanismus der Seneszenz kann bei fortschreitenden intrazellulären Veränderungen wie einer Deletion des Tumorsuppressors p53 durchbrochen werden und zur malignen Transformation führen [247, 271, 272]. Sowohl Onkogen-exprimierende Zellen als auch prä-maligne Zellen weisen u.a. typische Zeichen einer DDR auf, wie eine Akkumulation hierfür spezifischer Proteine und γ H2AX-Foci [271-273]. Im Gegensatz zur replikativen Seneszenz sind diese jedoch nicht mit Telomerverkürzungen assoziiert [271, 273]. 90% der Tumore verfügen über eine Telomeraseaktivität und können daher die durch Replikation entstandenen Telomerverkürzungen kompensieren [247].

1.4.3 Therapie-induzierte Seneszenz (TIS)

Die Möglichkeit zur Verwendung einer pro-seneszenten Tumorthherapie hat beträchtliches Interesse hervorgerufen [78, 247, 248, 250, 260]. Traditionelle Therapien basieren auf einer zytotoxischen Behandlungsstrategie in der Annahme, dass eine zelluläre Zerstörung des Tumors die Patientenüberlebensrate erhöht. Da konventionelle Chemotherapeutika DNA-Schäden in sich schnell teilenden Zellen verursachen, sind hiervon überwiegend Tumorzellen betroffen. Jedoch kann dieser traditionelle Ansatz gravierende Nebenwirkungen wie eine Kardiotoxizität und ein sog. Tumorlyse-Syndrom verursachen [274, 275]. In mit traditionell DNA-schädigenden Chemotherapeutika behandelten oder mit Radiotherapie bestrahlten Zellen

wurden interessanterweise seneszente Zellen identifiziert [78, 260]. In in vitro Experimenten zeigt sich, dass klassische Chemotherapeutika wie Doxorubicin in geringen Konzentrationen Seneszenz induzieren, in höheren jedoch Apoptose [276-279]. Präklinische Studien sowie Analysen von Patienten stammendem Krebsgewebe deuten darauf hin, dass die Fähigkeit von Tumoren bzw. Tumorzellen in einen seneszenten Zustand zu gelangen, ein entscheidender Faktor für das Ergebnis der Tumorthherapie ist [261, 280]. Nach neoadjuvanter Chemotherapie analysierte Gewebeproben von Lungen-, Brust- und Darmkrebspatienten korrelierten Seneszenzmarker mit dem Therapieerfolg [248, 255, 281-284]. Diese sog. Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) zeigt die Möglichkeit eines von außen getriggerten Seneszenzmechanismus. In einzelnen Hepatomzelllinien zeigte sich in Experimenten in vitro, dass neben klassischen Chemotherapeutika auch der DNMTi 5-aza-dC in p53-kompetenten Zelllinien, wie den HepG2-Zellen, Seneszenz induzieren kann [285, 286]. Eine therapeutische Anwendung von Seneszenzagonisten stellt einen interessanten Wirkmechanismus und eine potentielle Therapieoption dar [78].

2. Motivation, Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Das HCC macht bis zu 90% der primären Leberkarzinome aus und weist eine steigende Inzidenz auf [1]. Als Hilfestellung zur Therapieauswahl dienen Staging-Systeme wie die sogenannten Barcelona-Kriterien [4]. Hieran ist ersichtlich, dass bei der Mehrzahl der Patienten auch bei anfangs asymptomatischer Erkrankung bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Stadium mit primär palliativer Therapiesituation besteht [2, 4, 8].

Zur Behandlung des HCCs gibt es keine effektive klassische Chemotherapie mit nachgewiesener Wirkung [8, 17, 287]. In der Krebsforschung wird nach anderen für die Krebstherapie wirksamen Mechanismen als die der klassischen, zytotoxischen Chemotherapeutika gesucht [78, 81, 96, 288, 289]. 2007 wurde der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib zur Behandlung des HCCs zugelassen [287]. Dieser zeigte in einer multizentrischen Phase III-Studie ein erhöhtes Gesamtüberleben von 7,9 auf 10,7 Monaten [287]. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Lenvatinib, Cabozantinib und Regorafenib sind in den letzten Jahren ebenfalls für die Therapie des HCCs zugelassen worden [4]. Die Kombinationstherapie von Atezolizumab mit Bevacizumab, die eine bessere Wirksamkeit im Vergleich zu Sorafenib zeigte, wird nach aktuellen Leitlinien als Standardtherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC empfohlen und erhielt von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) Ende 2020 die Zulassung [59]. Hieran ist zu erkennen, dass ein Bedarf besteht weitere Substanzen mit alternativen Wirkmechanismen zu identifizieren. Zwei interessante Ansätze sind die Modulation des epigenetischen Codes und die Therapie-induzierte Seneszenz mit der Hoffnung auf verbesserte Überlebensraten bei geringerem Nebenwirkungsprofil [78, 81, 250]

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die genauere Charakterisierung epigenetischer Wirkmechanismen, die zu einer Proliferationshemmung und nachfolgend Therapie-induzierten Seneszenz in Hepatomzelllinien führen können. Die zwei am besten erforschten Gebiete der Epigenetik sind der Methylierungsstatus der DNA und der Acetylierungsstatus von Histonproteinen [81]. Ein weiterer interessanter, ebenfalls zur Epigenetik gehörender Regulationsmechanismus ist die post-transkriptionelle Regulation mittels MicroRNAs (miRNAs) [82, 83].

In den in der Einleitung der Promotionsarbeit erläuterten Grundlagen werden die Interaktionen a) zwischen den epigenetischen Regulationsmechanismen untereinander und b) zwischen diesen sowie den konventionellen Therapieansätzen genauer erläutert. Experimentell soll in einem ersten Schritt der Einfluss des epigenetisch wirksamen Methyltransferase-Inhibitors 5-aza-dC (Decitabin) auf die Proliferation, den Zellzyklusarrest, und eine Therapie-induzierte Seneszenz in den Hepatomzelllinien HepG2 und Hep3B untersucht werden. Verglichen werden sollen die Ergebnisse mit dem zu den klassischen Chemotherapeutika gehörigen Topoisomerase II-Inhibitor Doxorubicin. Bei dieser Substanz ist primär von einer sog. „DNA-damage response“ (engl., DDR) als Wirkmechanismus auszugehen [74, 290].

Hauptziel der Arbeit ist intrazelluläre Signalwege der Therapie-induzierten Seneszenz (TIS) dadurch aufzudecken, dass gleiche Regulationsphänomene durch primär unterschiedlich wirkende Substanzen identifiziert werden. Methodisch wurden hierfür unter anderem ein Expressions-Chip und eine Sequenzierung des miRNoms unter Behandlung der jeweiligen Substanz verwendet. Hiermit soll der Einfluss des klassischen Chemotherapeutikums Doxorubicin und des Methyltransferase-Inhibitors 5-aza-dC auf das miRNom verglichen werden und gleichsinnig regulierte miRNAs über Transfektionsexperimente auf deren Potential der Proliferationsminderung und Seneszenzinduktion hin untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

In den folgenden Abschnitten sind die benutzten Materialien, Substanzen und Geräte alphabetisch sortiert.

3.1.1 Verbrauchsmaterial

6-Well-Zellkulturplatte	Becton Dickinson
24-Well-Zellkulturplatte (TPP)	Techno Plastic Products
96-well Microplate (ELISA-Platte)	Greiner Bio-One
Einfrier-Röhrchen	Nunc, Corning
Einweghandschuhe	B. Braun
Einweghandschuhe MICRO-TOUCH	HYGRIP
Einweghandschuhe, Latex	Ansell
Einwegpipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Coming Incorporated USA
Multistep-Pipettoraufsätze (50µl, 100µl, 250µl)	Eppendorf
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (früher: American National Can)
Pipettenspitzen (gestopft 10µl, 200µl, 1000µl)	Biozym
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl) KG	CARL ROTH GMBH + CO.
Pipettenspitzen Safeguard 10µl	Peqlab
Pipettenspitzen Safeguard 1000µl	Peqlab
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF)	
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml) (Falcon-Röhrchen/-Tubes, engl.)	Becton Dickinson USA
Whatman Papier 3MM	Schleicher & Schull
Vernichtungsbeutel	BRAND
Zellkulturflasche (75cm ² , 150 cm ²) (TPP)	Techno Plastic Products
Zellschaber Costar	Corning Incorporated
Zellsieb (40µM, Nylon)	Becton Dickinson USA

3.1.2 Substanzen

Spezielle Produkte und Kits sind zum Teil unter den jeweiligen Kapiteln der verschiedenen Methoden aufgelistet.

Acrylamid (30%)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co.
5-Aza-2'-deoxycytidin (5-aza-dC)	Sigma-Aldrich Co.
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co.
BSA 10mg/ml (Bovine Serum Albumin)	Promega
Citronensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co.
Doxorubicin	Sigma-Aldrich Co.
DNA Molecular Weight Marker X (0,07-12,2 kbp)	ROCHE Applied Science
Sekusept® PLUS	Ecolab GmbH & Co. OHG
Essigsäure 1%	Merck KGaA
Ethanol (absolute for analysis, engl.)	Merck KGaA
Full Range Recombinant Protein Marker (engl.) U.K.	Amersham Biosciences,
Glycin, PUFFERAN® ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG
H ₂ O _{bidest}	
Hoechst 33342	invitrogen
Isopropanol	Merck KGaA
Kalium-ferrocyanid	Sigma-Aldrich Co.
Kalium-ferricyanid	Sigma-Aldrich Co.
Lipofectamine™ RNAiMax Transfection Reagent	invitrogen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
2-Mercaptoethanol (BioUltra, ≥99 %)	Sigma-Aldrich Co.
Methanol (for analysis, engl.)	Merck KGaA
Milchpulver (blotting grade, engl.)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumazid, ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid	Merck KGaA
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Merck KGaA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
nc-siRNA	Qiagen

- AllStars neg. siRNA AF 647
- AllStars neg. siRNA AF 488

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences
Pifithrin-alpha, zyklisch	Sigma-Aldrich Co.
PlusOne™ TEMED	GE Healthcare Europe
GmbH	
(Tetramethylethylendiamin)	
Propodiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich Co.
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich Co.
RNAse away (engl.)	Molecular Bio Products
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sodiumdodecylsulfat (SDS) ultra pure, ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
SDS-PageS tandard (Low Range)	Bio-Rad
Sulforhodamin B (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Co.
Trichloressigsäure (TCA) ≥ 99 %	Merck KGaA
Trichloressigsäure 10%	Merck KGaA
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich Co.
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Co.
Trizma-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, ≥99 %	Sigma-Aldrich Co.
Trizma® base (Tris-Base)	Sigma-Aldrich Co.
Trichloressigsäure, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trichloressigsäure 10%	Merck KGaA
Tween® 20	Promega GmbH
Quiazol	Qiagen
X-Gal	Sigma-Aldrich Co.

3.1.3 Enzyme, Reaktionspuffer und Antikörper

Die für die verschiedenen Methoden verwendeten Enzyme, Reaktionspuffer und Antikörper sind unter den jeweiligen Kapiteln aufgelistet.

3.1.4 Zellkultur

DMEM	Biochrom AG/ Sigma-Aldrich Co.
(engl. Dulbecco's modification of Eagle's Medium)	
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Co.
Dulbecco's PBS (engl. Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories GmbH
FBS (Fetal Bovine Serum, engl.)	Gibco/invitrogen
OptiMEM R -Medium	Gibco/invitrogen
Trypan Blue Solution (engl.) (0,4%, 0,81% NaCl, 0,06% K ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich Co.
Trypsin-EDTA (0,05% / 0,02% in PBS)	PAA Laboratories GmbH

Sonstige Materialien und Geräte

Autoklaven: Systec V-150 Typ FV	Systec GmbH INTEGRA Biosciences
Abdecktuch Folidrape protect (engl.)	Hartmann
Brutschrank	BINDER GmbH
ELISA-Reader GENios Plus	Tecan Group Ltd.
FACSCalibur	BD Biosciences
Filmentwicklungsgerät FPM 800A	Fujifilm
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Lightcycler 480	Roche Life Science
Mastercycler gradient	Eppendorf AG
Mikroskop Olympus IX-50 (F-View Kameraaufsatz)	Olympus GmbH
Mikroskop Zellkultur	Olympus GmbH
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container (engl.)	Sigma-Aldrich
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific
Plattformschüttler Promax 1020	Heidolph Instruments GmbH & Co.
Power-Supply PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories
Präzisionswaage EW	Kern & Sohn GmbH
Röntgenfilme (Hyperfilm)	Amersham Biosciences
Sterilbank HERAsafe	Kendro Laboratory Products GmbH
Trockenschrank	Binder

Trockenschrank Certomat U
Umwälzkühler Multitemp III
Wasserbad 1086

Zentrifugen

Megafuge 2.0R, Biofuge 13, 15R, fresco
Zentrifuge 5414

B. Braun
Pharmacia Biotech
GFL Gesellschaft für
Labortechnik GmbH

Heraeus Sepatech GmbH
eppendorf

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden ausschließlich die humanen Hepatomzelllinien HepG2 und Hep3B verwendet. Beide Zelllinien stammen vom Leibnitz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) aus Braunschweig. **Abb. 3.1** zeigt repräsentative Aufnahmen der beiden epithelartigen, adhärent wachsenden Zelllinien. Die Hepatoblastomzelllinie HepG2 (DSMZ-Nummer: ACC 180) wurde 1975 aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen Kaukasiers isoliert [291, 292]. Die Zellen sind adhärent und wachsen sowohl in einem Monolayer als auch in Zellklumpen übereinander [291]. Die Verdopplungszeit dieser Zelllinie ist sehr unterschiedlich angegeben und beträgt durchschnittlich circa 40 Stunden [292-294]. Besonderheiten sind unter anderem die Zellzyklusproteine p53 und Retinoblastom in Wildtyp-Form. Es besteht keine Integration des Hepatitis-B-Genoms in die HepG2-DNA [291, 292]. Die Sicherheitseinstufung ist S1 [291]. Hep3B-Zellen (DSMZ-Nummer: ACC 93) wurden 1976 aus einem 8-jährigen Afroamerikaner isoliert [295]. Die Zellen wachsen ebenfalls als Monolayer ohne jedoch wie die HepG2-Zellen zu verklumpen. Im Gegensatz zu den HepG2-Zellen sind p53 und das Retinoblastom deletiert [296]. Zudem besteht eine Integration des Hepatitis B-Genoms in die DNA [295]. Die Sicherheitseinstufung ist S2 [295].

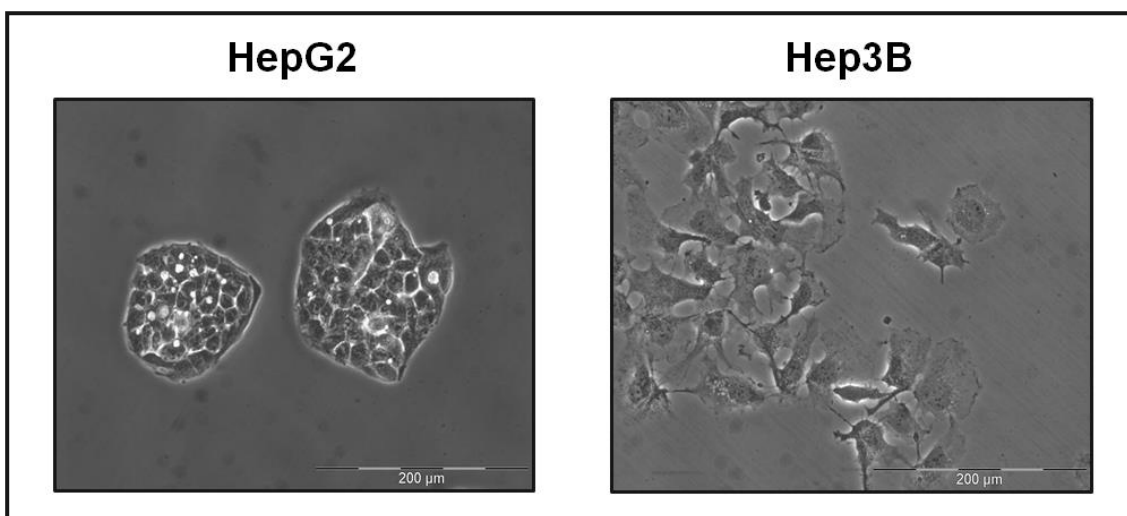


Abb. 3. 1: Repräsentative Photographien der Hepatom-Zelllinien HepG2 und Hep3B
Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 µm.

3.2.1.2 Zellkultur und Zellpassage

HepG2- und Hep3B-Zellen wurden in 10% FCS-haltigem DMEM-Medium ohne Antibiotika im Brutschrank (Heracell, Heraeus) bei 5% CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. FCS wurde vor Hinzugabe zum Medium im Wasserbad bei 57°C für 30 Minuten inaktiviert. Vor Gebrauch wurden Medien und Puffer im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellpassage erfolgte spätestens bei 80%-iger Konfluenz. Mediumwechsel wurden, sofern nötig, unabhängig von der Zellpassagierung durchgeführt. Die in Kultur gehaltenen Zelllinien wurden ca. zweimal wöchentlich unter Benutzung von Trypsin-EDTA 0,05% passagiert. Darunter löste sich nach einigen wenigen Minuten der Zellmonolayer vom Boden der Zellkulturflasche. Diese Reaktion wurde durch Hinzugabe von Zellkulturmedium abgebrochen. Anschließend wurden die Zellen in einem 50 ml Falcon-Röhrchen bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten unter Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen konnten daraufhin in frischem Nährmedium resuspendiert werden und für Versuche ausplattiert oder für die Kultivierung weiterverwendet werden. Alle sterilen Arbeitsschritte wurden in einer Sicherheitswerkbank (Herasafe, Heraeus) durchgeführt.

3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

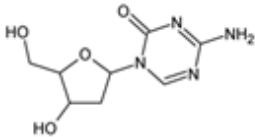
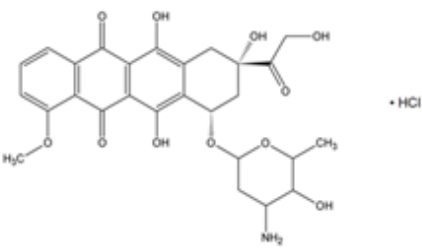
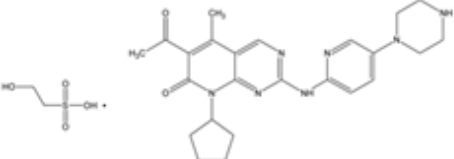
Um Zellen für eine Konservierung einzufrieren, wurden sie in ihrer exponentiellen Wachstumsphase wie oben beschreiben vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 10% DMSO und 20% FCS enthaltenem DMEM-Medium resuspendiert. Aliquots von ca. 1 ml wurden zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend in einen -180°C Gefrierschrank überführt.

Um Zellen aufzutauen, wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und in 9 ml eines 10% DMSO-haltigem Medium suspendiert. Wie oben beschrieben erfolgte eine Zentrifugation, Resuspension und Auslegung in eine Zellkulturflasche.

3.2.1.4 Behandlungen von Zellen

HepG2- und Hep3B-Zellen wurden am Tag vor der Behandlung über Nacht ausgelegt. Eine Ausnahme bildete die in Kapitel 3.2.5.1 besprochene reverse Transfektion. Zur Auszählung der entsprechenden Zellzahl wurde das Neubauer-Hämozytometer verwendet. Vor der jeweiligen Behandlung wurde nochmals ein Mediumwechsel durchgeführt. Substanzen wurden, sofern möglich, in 20-facher Arbeitskonzentration verwendet. Die Tab. 3.2 zeigt die bei den Behandlungen benutzten Stamm- und Endkonzentrationen der jeweiligen Substanzen.

Tab. 3. 1: Chemische Struktur und Molekulargewicht (MG in g/mol) der Substanzen
Strukturformeln mittels ChemSketch von Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD) gezeichnet

Substanz	MG (g/mol) Strukturformel
DNMTi	
5-aza-dC	MG: 228,21 
Topoisomerase II-Inhibitor	
Doxorubicin	MG: 579,98  + HCl
cdk4/6-Inhibitor	
PD0332991	MG: 573,66 

Tab. 3. 2: Substanzen, deren Abkürzungen und Behandlungskonzentrationen

Substanz	Abkürzung	[Behandlung]	[Stammlösung]
5-aza-dC	dC	10 µM	10 mM
Doxorubicin	Doxo	100 nM	10 mM
Palbociclib (PD0332991)		500 nM / 1 µM	57 mM

3.2.2 Proliferations- und Zytotoxizitätsprüfung

3.2.2.1 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B-Assay (SRB) dient zur indirekten Messung der Zellproliferation [297, 298]. Vereinfacht werden Zellen mittels eines Farbstoffs angefärbt. Der an Zellproteine gebundene Farbstoff wird anschließend herausgelöst und photometrisch vermessen. Dabei korreliert die optische Dichte der photometrischen Messung mit der vorhandenen Zellmenge. Für die Versuche wurden jeweils 50.000 Zellen in 24-well-Platten mit 500 µl Zellkulturmedium in Triplets ausgelegt. Nach 72-stündiger Inkubation mit der jeweils zu testenden Substanz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels 10%igem TCA bei +4°C für 30 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte ein Waschgang mit Wasser und Trocknung bei + 37°C. Daraufhin wurden die Zellen mittels 250 µl der SRB-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt.

Nach Bindung des Farbstoffs an die Zellen wurden diese mit 0,1%iger Essigsäure zum Entfernen des nicht gebundenen Farbstoffs mehrmals gewaschen und getrocknet. Der getrocknete SRB-Farbstoff wurde innerhalb von 48 Stunden mittels 500 µl Tris/Reaktionsgefäß wieder aus den Zellen gelöst. Pro Reaktionsgefäß wurden 80 µl dieser Mischung über eine 96-well-Platte der Firma greiner im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm vermessen. Je mehr Zellen pro Reaktionsgefäß vorhanden waren, desto mehr Farbstoff konnte gebunden werden und desto optisch dichter waren diese Reaktionsgefäße nach Lösung mit Tris-Lösung. Überstieg die optische Dichte der zu messenden Lösung die Messfähigkeit des ELISA-Readers, wurde die Lösung 1:2 mit Tris verdünnt. Die Zusammensetzungen der SRB- und Tris-Lösung stehen in Tabelle 3.3 und 3.4. Zur Unterscheidung zwischen einer reinen Proliferationshemmung oder Zytotoxizität musste anschließend der Laktat-Dehydrogenase-Assay (Kap. 3.2.2.2) durchgeführt werden.

Tab 3.3: Inhalt der Sulforhodamin B (SRB)-Färbelösung (0,4% w/v)

Substanz	Menge
SRB-Pulver	4g/l
Essigsäure	10ml/l
H ₂ O _{dd}	ad 1l

Tab. 3. 4: Inhalt der Tris-Lösung (10 mM, pH 10,5)

Substanz	Menge	[End]
Trizma-Base	1,211 g/l	10mM
H ₂ O _{dd}	ad 1 l	

3.2.2.2 Lactat-Dehydrogenase-Assay

Der Laktat-Dehydrogenase-Assay dient zur Messung der Zytotoxizität [299, 300]. Die Laktat-Dehydrogenase-Aktivität wird dabei indirekt über die NADH-Abnahme gemessen. Die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat wird durch die Laktat-Dehydrogenase katalysiert. Hierdurch wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die NADH-Abnahme wird photometrisch vermessen und ist direkt proportional zur LDH-Konzentration. **Abb. 3.2** zeigt die Katalysereaktion von Pyruvat zu Laktat durch die Laktat-Dehydrogenase:



Abb. 3. 2: Katalysereaktion von Pyruvat zu Laktat durch die Laktat-Dehydrogenase

Die Durchführung des Laktat-Dehydrogenase-Assays ist zu Beginn identisch mit dem zuvor besprochenen SRB-Assay. Für die Versuche wurden jeweils 50.000 Zellen in 24-well-Platten mit 500 µl Zellkulturmedium in Triplets ausgelegt. Nach 72-stündiger Inkubation mit der jeweils zu testenden Substanz wurde die Laktat-Dehydrogenase mit Hilfe des Kits LDH-P-Mono von Analyticon Biotechnologies nach Protokoll im Zellkulturüberstand und im verbliebenen Zellrasen nach Zellyse mit 0,1% Triton X-100 indirekt gemessen. Als Totkontrolle und als Maßstab maximaler Zytotoxizität diente ein mit 0,1% TritonX-100 lysiertes und sonst unbehandeltes Triplett. Vor Verwendung des LDH-P-Mono Kits wurde dieses auf Raumtemperatur erwärmt. Über das Verhältnis der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Überstand zum verbliebenen lysierten Zellrasen konnte der relative prozentuale Anteil der LDH-Freisetzung und somit die Zytotoxizität der jeweiligen Behandlung berechnet werden. Die Messung erfolgte mittels ELISA-Reader Genios plus von Tecan über 5 Messpunkte im Abstand von 2 Minuten bei einer Wellenlänge von 340 nm.

3.2.3 Seneszenzüberprüfung mittels β Gal-Assay

Die lysosomale β -Galaktosidase-Aktivität dient als Marker der zellulären Seneszenz. Eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität ist in seneszenten Zellen, jedoch nicht in anderen Zellzuständen wie der Quieszenz nachweisbar [254, 255, 301, 302].

Als Nachweisverfahren einer erhöhten β -Galaktosidase-Aktivität wurde das „Senescence Cells Histochemical Staining Kit“ von Sigma Aldrich verwendet. Eine Anfärbung der β -Galaktosidase-Aktivität findet bei pH 6 statt. Pro 6-well wurden für die Versuche jeweils 20.000 Zellen ausgelegt und für 72 Stunden behandelt. Danach wurden die Zellen mit einer Lösung aus 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd fixiert und über 24 Stunden bei 37°C unter Parafilm mit der „Staining Solution“ und folgenden Komponenten inkubiert: X-Gal, Kalium-Ferricyanide und Kalium-Ferrocyanide. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde für weitere 10 min bei 37°C Hoechst 33342 (1:5000, invitrogen) zum Anfärben der DNA bzw. der Zellkerne hinzugegeben (Tab. 3.6). Für die längerfristige Lagerung bei +4°C wurde die Staining Solution entfernt und durch 70%iges Glycerol ersetzt. Durch Auszählung von Zellkernen von zehn über das well verteilten Zellhaufen unter dem Mikroskop Olympus IX-50 konnte das Verhältnis der β Gal⁺ (positiven) Zellen zu Zellkernen bestimmt werden. Im Verlauf der Doktorarbeit wurde anstatt des kommerziell erhältlichen „Senescence Cells Histochemical Staining Kits“ von Sigma Aldrich eine eigene Färbelösung („Staining Solution“) mit identischem Inhalt und Konzentrationen zubereitet (Tab. 3.5). Auch hier wurde jedes 6-well des β Gal-Assays mit insgesamt 1,5 ml der Staining Solution und 37,5 μ l X-Gal (40 mg/ml) für 24 Stunden unter 37°C inkubiert und entsprechend obigen Ausführungen weiter verfahren.

Tab. 3.5: Bestandteile der β Gal-Färbelösung (engl. Staining Solution) (20ml)

Substanz	Konzentration	Menge (in ml)
Citronensäure	0,2 M	3,7
Na ₂ HPO ₄	0,4 M	6,3
Kalium-Ferricyanid	100 mM	1
Kalium-Ferrocyanid	100 mM	1
NaCl	5 M	0,6
MgCl ₂	0,2 M	0,2
H ₂ O _{dd}	/	6,2

Tab. 3. 6: Fluorophor Hoechst 33342 einschließlich dessen Exzitations- und Emissionshöhepunkte

Fluorophor	Exzitation (nm)	Emission (nm)
Hoechst 33342	350	461

3.2.4 Zellzyklus-Analyse

3.2.4.1 Propidiumjodid (PI)-FACS nach Nicoletti (engl. Fluorescence Activated Cell Sorting)

Der Zellzyklus wurde mittels eines durchflusszytometrischen Verfahrens analysiert. Von Nicoletti et al. stammt das in dieser Promotionsarbeit benutzte Verfahren zur Vorbereitung der Zellproben zur Zellzyklusanalyse [303, 304]. Ziel war es die verschiedenen Subpopulationen im jeweiligen Abschnitt des Zellzyklus zu identifizieren. Die Zellen wurden hierfür mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PI gefärbt. Die Differenzierung der Zellzyklusphasen geschieht über den DNA-Gehalt mit entsprechend unterschiedlicher Quantität der Interkalierung und der damit verbundenen Fluoreszenzstärke bei einer maximalen Anregung von PI mit einer Wellenlänge von ca. 480 nm. Eukaryotische Zellen besitzen in der G₀/G₁-Phase einen diploiden Chromosomensatz (2n), in der G₂/M-Phase vor der Zellteilung einen vierfachen (4n) und in der S-Phase zwischen 2n und 4n. Apoptotische Zellen mit niedrigerem DNA-Gehalt sammeln sich in der sogenannten sub2N oder auch subG1 genannten Phase. Die je nach Zellzyklusphase unterschiedlich stark emittierten Lichtsignale werden in elektrische Signale umgewandelt und

verstärkt, indem durch Licht freigesetzte Elektronen beschleunigt und über mehrere Dynoden amplifiziert werden (Prinzip des Photomultipliers).

Für die Zellzyklus-Analysen wurden Triplets à 50.000 Zellen pro 24-well ausplattiert. Die Inkubationszeiten der Behandlungen und Ansätze betragen jeweils 72 Stunden. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium der einzelnen Reaktionsgefäße in separate FACS-Röhrchen überführt und die Reaktionsgefäße anschließend mit 500 µl PBS gewaschen und dieses ebenfalls überführt. 100 µl Trypsin-EDTA pro Reaktionsgefäß dienten anschließend zum Ablösen der Zellen. Nachdem diese ebenfalls in die FACS-Röhrchen überführt wurden, wurden diese bei 1500 rpm und 4°C für acht Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen des jeweiligen FACS-Röhrchens mit 200 µl des unten in Tab. 3.7 aufgeführten FACS-Puffers resuspendiert.

Tab. 3. 7: Bestandteile des FACS-Puffers

Inhalt	Menge
Natrium-Citrat	44 mg
Triton X-100	150 µl
PI (10mg/ml)	500 µl
Ribonuclease A	1 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml

Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis im Dunkeln konnte die FACS-Messung mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur der Firma BD Biosciences mit der Geschwindigkeitseinstellung „low“ begonnen werden. Bei der Messung wurden pro Probe 10.000 Ereignisse gezählt. Als Software diente das Programm CellQuest. Zur Auswertung der sub2n-Phase wurde die logarithmische Darstellung in FL2 herangezogen, wohingegen für die Zellzyklus-Analyse die lineare Darstellung FL3 gewählt wurde.

3.2.5 Transfektion

3.2.5.1 miRNA- und siRNA-Transfektionen

Für die miRNA- und siRNA-Experimente mit der Hepatomzelllinie HepG2 wurde als Methode die reverse Transfektion und als Verfahren die Lipofektion gewählt.

Die verwendeten miScript miRNA Mimics und AntagomiRs stammen von der Firma Qiagen. AntagomiRs sind chemisch modifizierte Oligonukleotide, welche eine komplementäre Sequenz zu individuellen miRNAs aufweisen und dazu verwendet werden diese in ihrer Wirkung zu hemmen. AntagomiRs sind sowohl in vitro als auch in vivo funktionell wirksam [305-307]. Für den HDAC4-Knockdown in Kapitel 4.3 wurde eine HDAC4-siRNA von Cell Signaling verwendet. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine RNAiMAX der Firma invitrogen verwendet und das für die hier verwendete Zelllinie vorhandene Protokoll der Firma benutzt. Laut diesem werden wie in Tab. 3.8 aufgelistet, folgende Mengen der Substanzen für die Versuche benötigt.

Tab. 3. 8: Mengenangaben der für die Transfektion benötigten Substanzen

	Medium in ml (DMEM + 10% FCS)	Lösungsmedium in ml (OptiMEM R-Medium)	[Mimic]	[AntagomiR]	Lipofecatime RNAiMAX in µl /well
24-well	0,5	0,1	25nM	100nM	1,125
6-well	2,5	0,5	25nM	100nM	5,625

Als Transfektionsmedium diente OptiMEM R der Firma BioWhitaker. Dieses wurde in jeweils benötigtem Volumen in Falcon-Röhrchen vorgelegt und anschließend Mimics bzw. AntagomiRs und Lipofectamine RNAiMAX der Firma invitrogen hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch aus Transfektionsmedium, Mimics bzw. AntagomiRs und Lipofectamine RNAiMAX vorsichtig gemischt. Die dabei entstehenden Transfektionskomplexe sind dabei bis zu 6 Stunden haltbar. Bevor die zu transfizierenden Zellen trypsiniert, ausgezählt und ausplattiert wurden, wurde das gemischte Transfektionsmedium in schräg stehende 6- bzw. 24-well-Platten übertragen um somit die Bildung von Transfektionskomplexen in dieser Zeit zu erleichtern. In 24-well-Platten wurden pro Reaktionsgefäß 50.000 Zellen ausplattiert und in 6-well-Platten 20.000 Zellen für den β Gal-Assay. Sechs Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die darin noch enthaltenen Transfektionskomplexe und das potentiell toxisch wirkende Lipofecatmine RNAiMAX zu entfernen. Nach der Transfektion erfolgte die 72-stündige Inkubation mit 5-aza-dC oder Doxorubicin.

Als Transfektionskontrolle wurde die non-coding siRNA (nc-siRNA) AllStars Neg. siRNA Alexa Fluor® 488 oder Alexa Fluor® 647 in gleicher Konzentration wie

entsprechende Mimics und AntagomiRs eingesetzt. Laut Hersteller Qiagen sind identische Ergebnisse mit den jeweiligen nc-siRNAs zu erwarten.

Tab. 3.9: Verwendete nc-siRNAs einschließlich der Exzitations- und Emissionshöhepunkte der Fluoreszenzfarbstoffe [308]

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation (nm)	Emission (nm)
AllStars Neg. siRNA AF 488	495	519
AllStars Neg. siRNA AF 647	488	668

Neben der reversen Transfektion, wurde in einem AntagomiR-Experiment mit Anti-hsa-miR-494 der Firma Ambion eine sog. „forward“ Transfektion dem Ambion-Protokoll entsprechend durchgeführt (Kap. 4.2.5, **Abb. 4.14**). Hierbei werden die Zellen zunächst ausgelegt und erst am darauffolgenden Tag transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgte der Mediumwechsel mit anschließendem Behandlungsbeginn. Die verwendeten Konzentrationen und Mengenangaben entsprechen denen in Tab. 3.8.

3.2.5.2 HDAC4-Plasmid-Transfektion

Das in dieser Promotionsarbeit verwendete Plasmid „pcDNA-HDAC4-FLAG“ stammt von Addgene. Addgene ist eine nicht-gewinnorientierte Organisation, die eine Sammlung getesteter und hochwertiger Plasmide verschiedenster Wissenschaftler lagert und zur Verfügung stellt. **Tab. 3.10** und **Abb. 3.3** zeigen das Datenblatt und die Sequenz des verwendeten Plasmids. Für die Transfektion von HepG2-Zellen mit dem HDAC4-Plasmid „pcDNA-HDAC4-FLAG“ wurde eine „forward“-Transfektion mittels Lipofektion durchgeführt. „Forward“ bedeutet, dass zunächst HepG2-Zellen ausgelegt wurden und man diese erst am darauffolgenden Tag transfizierte. Für den β Gal-Assay wurden hierfür 40.000 Zellen pro Reaktionsgefäß in einer 6-well-Platte ausgelegt. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 der Firma invitrogen verwendet und das vorhandene Transfektions-Protokoll der Firma benutzt. Für die Transfektion wurden 4 μ g eines Leervektors oder 4 μ g eines HDAC4-Plasmids mit jeweils einem pEGFP-N1-Plasmid im Verhältnis 5:1 transfiziert. Die benötigte Menge Plasmid wurde zunächst in OptiMEM R-Medium diluiert und vorsichtig

gemischt. Lipofectamine 2000 wurde ebenfalls zunächst in OptiMEM R-Medium diluiert.

Tab. 3.10: Datenblatt zu HDAC4-Plasmid „pcDNA-HDAC4-FLAG“

HDAC4-Plasmid „pcDNA-HDAC4-FLAG“	
Addgene-Nummer	30485
Gene	HDAC4
Spezies	H. sapiens
Fusionsprotein/-Tag	FLAG
Vektor	pcDNA3
Vektorhersteller	Invitrogen
VektorgroÙe ohne Zielgen (bp)	5400
5'-sequenzierender Primer	T7 TAATACGACTCACTATAGGG „forward primer“
3'-sequenzierender Primer	SP6 ATTTAGGTGACACTATAG „forward primer“
Bakterielle Antibiotika-Resistenz	Ampicillin
Wachstumsstamm	DH5alpha (E.coli)
Wachstumstemperatur	37°C
Ansprechpartner/Wissenschaftler	Tso-Pang Yao

```
TGAACTATAGAATAGGGCCCTCTAGATCGAATTCTTATTTATCATCATCATCTTTATAATCCCCAGGGGCGGCTCCTCTTCCA
TGGGCTCCTCATCTGGTCTCTTTTCGGCGGGCTTCACGCCACGGACAGCGAGGCCATGGCGGTGACCGTCTCGGCTTCTT
CGTTCTCGCAAGTCTGAGCCTCGATCAGAGAACGCCCGCTGTGGAGTTGTGCGCTGCAGGCAGCGCCAGTACTTGCTGT
GGATCTCCATGACTTTCCATGGAACGGACAGCGTTTCATTTGGTCTTTGCTGTAACCTTTTCTGGGAGAGGATCAAGC
TCGTTTTCCAGCAAGGCAGAAACACATGCTTCCGAGGCGTCGCAATGGCGGTCAGGTCGTGGCCTCCCTCGAGGGCCAGG
ACAATCCGGCCGCCAGCCAGGCCATCAGCTGCTTCGTACGGTACCCGAAGCATCTGGCGGAGAGGTTGTAGCCCCAAGA
GGGGTGGGGTGGCCCTCCACGGCATCGAAGCCTGATGACACCAGCACCACATCCGGGGCAAACCTCGCTGGCGATCGGCAT
GACCACCGTTTGAAGGCCGCCAAGTACTCAGCGTCTCCATGGGGGGTCCAGGCCGCCGGTGAAGCCATGTTGACGTT
GAAACCCACGCCGGGCCCTGTGCCACCTCATCAGGAGCCCCGCTGCCTGGGAAGAAGTTCCCATCGTCTAGCGGTGGA
GGGACATGTACAGGACGCTAGGGTCGCTGTAGAAAGCCTGCTGGGTCCCGTTTCCATGGTGCACGTCCAGTCCACGATGA
```

Abb. 3. 3: Sequenz des Plasmids „pcDNA-HDAC4-FLAG“ mit 813 Basenpaaren (bp) laut Addgene

Die diluierte DNA wurde nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur von 5 min mit Lipofectamine 2000 im OptiMEM R-Medium vorsichtig im Verhältnis 1:1 vermischt und für weitere 20 min inkubiert. Pro ReaktionsgefaÙ der 6-well-Platte wurden neben 2 ml frischem Medium 500 µl dieses Gemisches hinzugegeben. Nach 4-6 Stunden konnte ein Mediumwechsel durchgeführt werden und anschlieÙend eine Behandlung mit 5-aza-dC oder Doxorubicin begonnen

werden. Für die Versuchsauswertung wird angenommen, dass in jeder erfolgreich GFP-transfizierten Zelle ebenfalls entweder der Leervektor bzw. das HDAC4-Plasmid erfolgreich transfiziert wurde. 72 Stunden nach Behandlungsbeginn wurden Photographien von Zellhäufen und eGFP-produzierender Zellen angefertigt. Auf den Platten wurden diese Bildausschnitte markiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und für weitere 24 Stunden zur Durchführung des β Gal-Assays inkubiert (Kap. 3.2.3). Photographien derselben Bildausschnitte mit SA- β Gal-Färbung und der Zellkerne konnten danach ebenfalls angefertigt werden. Die Auszählung der β Gal-Färbung erfolgte hierbei im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen mit Computerunterstützung und nicht durch eine direkte Zählung am Mikroskop. Ausnahmen bildeten die nicht transfizierte Kontrolle und die nicht transfizierten Behandlungen.

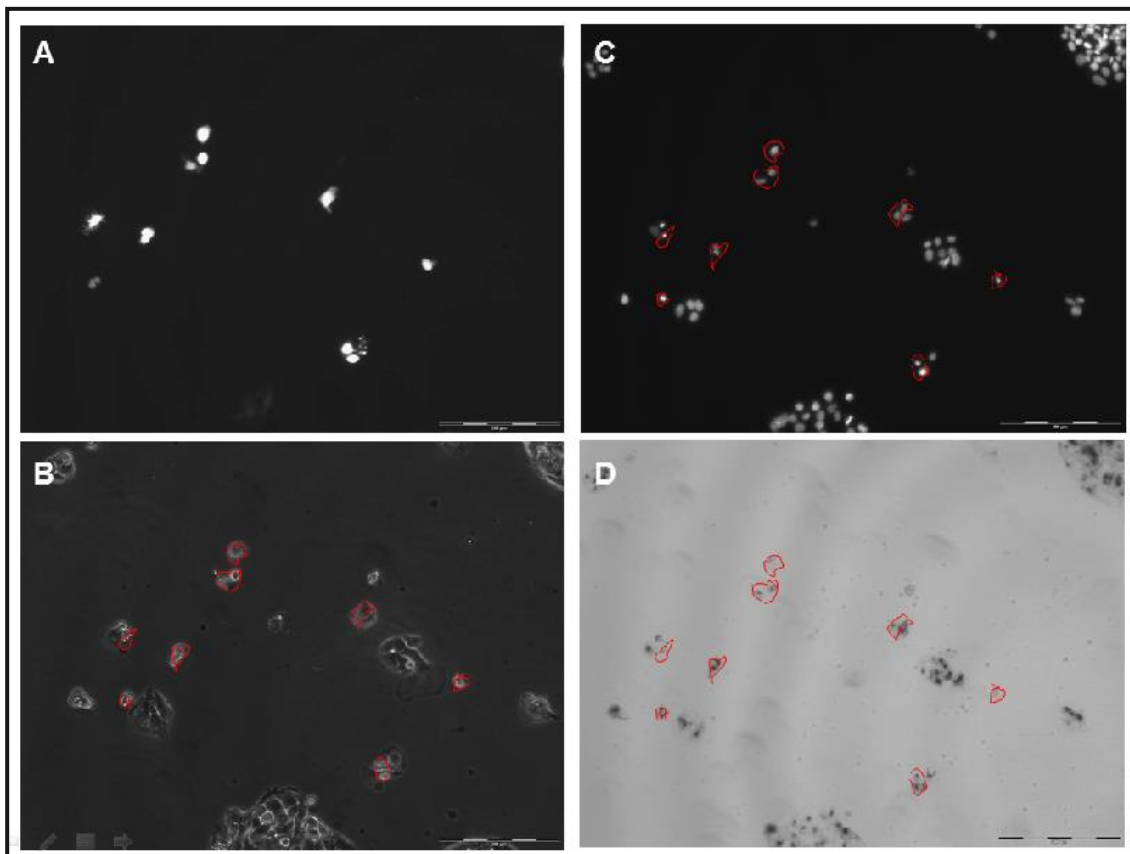


Abb. 3. 4: Versuchslayout zur Auswertung des HDAC4-Plasmid-Versuchs

In HepG2-Zellen wurden entweder 4 μ g pcDNA3-Leervektor oder 4 μ g pcDNA3-HDAC4-Plasmid mit jeweils einem pEGFP-N1-Plasmid im Verhältnis 5:1 mittels Lipofectamine 2000 durch „forward“ Transfektion eingebracht. Vier bis sechs Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Transfektionskomplexe entfernt und eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 μ M] oder Doxorubicin [100 nM] begonnen. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurden Bilder von Zellhäufen bezüglich ihrer eGFP-Expression (A) und Morphologie (B) angefertigt. Nach einer Inkubation mit der SA- β Gal-Lösung für weitere 24 Stunden und Anfärbung der Zellkerne mittels Hoechst 33342 (C) wurden eGFP-exprimierende Zellen (A) auf deren SA- β Gal-Färbung (D) hin überprüft.

Dies hatte damit zu tun, dass nach dem β Gal-Assay von den HepG2-Zellen im für die eGFP-Färbung benötigten Filter des Mikroskops alle Zellen grün angefärbt waren und somit eine Unterscheidung zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen nicht eindeutig möglich war. Durch diese Methode konnten insgesamt deutlich weniger Zellen wie üblich im β Gal-Assay ausgezählt werden, da schlicht die Anzahl der wieder auffindbaren Bildausschnitte begrenzt ist. Die Anzahl der auszählbaren Zellen beschränkte sich dabei auf ca. 100 eGFP-gefärbte Zellen pro Reaktionsgefäß und Versuch. **Abb. 3.4** zeigt eine solche Versuchszusammenstellung. Hieran ist zu erkennen, dass anhand identischer Bildausschnitte die eGFP-produzierenden Zellen (**Abb. 3.4A**) mit der hierzu gehörigen β Gal-Färbung (**Abb. 3.4D**), den Zellkernen (**Abb. 3.4C**) und der Morphologie (**Abb. 3.4B**) am Computer markiert und verglichen wurden.

3.2.6 Proteinchemische Methoden/Western Blot

3.2.6.1 Proteinbestimmung nach Pierce

Die Proteinbestimmung nach Pierce bildet die Grundlage für eine gleichmäßige Proteinmengenbeladung der SDS-Page-Gele und basiert auf einer indirekten, konzentrationsabhängigen Farbreaktion mittels eines zweistufigen Bicinchoninsäure-Assays. Bicinchoninsäure (BCA) ist ein sehr sensitives und hochspezifisches Reagenz für Cu^+ -Ionen. Dieses Verfahren zur Proteinbestimmung stammt von Smith et al. aus dem Jahr 1985 [309]. In dieser Promotionsarbeit wurde das „Pierce BCA Protein Assay Kit“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Im ersten Schritt des BCA-Assays formen die in der Probe enthaltenen Proteine in einer Biuret-Reaktion unter basischen Bedingungen hellblaue Chelat-Komplexe mit Kupfer. Cu^{2+} -Ionen werden hierbei in der Biuret-Reaktion zu Cu^+ -Ionen reduziert. Im zweiten Schritt kommt es zur violetten Komplexbildung zweier BCA-Moleküle mit einem im ersten Schritt gebildeten Cu^+ -Ion. Diese Komplexbildung findet für eine halbe Stunde bei 37°C unter Raumluft statt (**Abb. 3.5**). Der dabei entstehende Komplex zeigt eine stark lineare Absorption bei 562 nm bei steigender Proteinkonzentration. Messbar ist dieser Komplex zwischen 540 und 590 nm. Parallel zur eigentlichen Probe wurde eine

Eichkurve mit Lösungen bekannter Proteinmengen hergestellt (0,5 mg/ml, 0,25 mg/µl, 0,1 mg/µl und 0,05 mg/µl). Dazu wurden diese Lösungen bekannter Proteinkonzentrationen genauso behandelt wie die zu bestimmenden Proben. In den Versuchsreihen wurden 10 µl jeder Probe mit 100 µl der Pierce-Reagenz vermischt. Die im ELISA-Reader Genios plus von Tecan gemessene photometrische Extinktion des Proteinstandards als Funktion der Proteinkonzentration diente als Grundlage der Eichkurve und somit der Proteinmengenbestimmung der eigentlichen Proben.

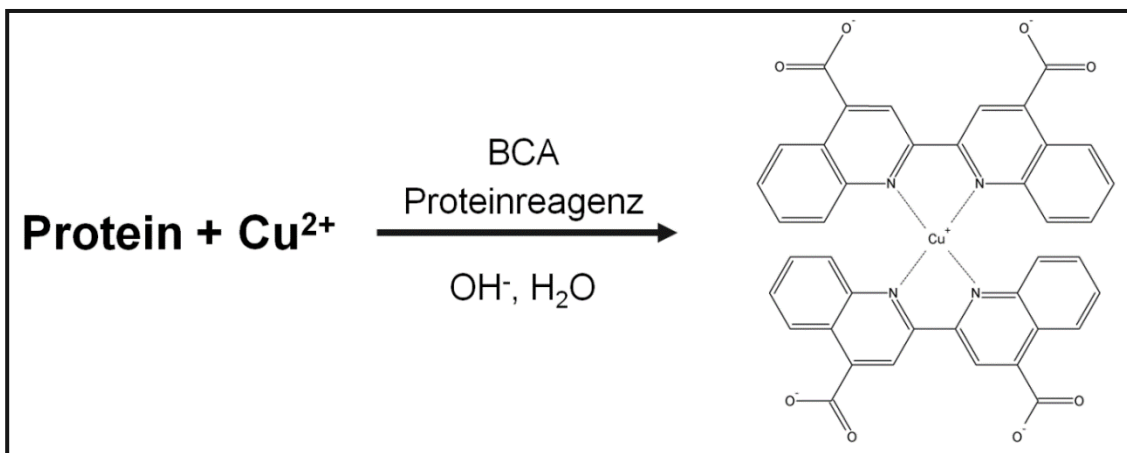


Abb. 3. 5: Biuret -Reaktion und Komplexbildung zweier BCA-Moleküle im Rahmen der Proteinmengenbestimmung nach Pierce
Strukturformel mittels ChemSketch von Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD) gezeichnet.

3.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page)

Dieses Verfahren wurde von Laemmli 1970 entwickelt und dient zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekulargröße [310]. Über eine Vorbehandlung mit β -Mercaptoethanol und Verwendung eines Polyacrylamid-Gels mit dem Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) entstehen stark reduzierende Bedingungen unter denen eine solche Auftrennung erfolgen kann. Das Polyacrylamidgel besteht hierbei aus zwei Schichten unterschiedlicher Porenstruktur und pH-Werte. Zuerst werden die negativ geladenen Polypeptide in einem weitporigen Sammelgel zu einer schmalen Proteinbande aufkonzentriert, bevor sie in einem engporigen Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Große Proteine laufen darin langsamer als kleine Proteine. Zur Herstellung der Proteinlysate wurden pro 6-well 250.000 oder 500.000 Zellen ausgelegt und 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Triton-Lysepuffer lysiert, jeweils dreimal im Wechsel für

zehn Sekunden gevortext, auf Eis gelagert und damit homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei +4°C mit 12.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde mittels Pierce-Assay bestimmt, um die jeweiligen Proben in ihrer Konzentration angleichen zu können (Kap. 3.2.6.1). Nach Hinzugabe eines Probenpuffers wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C erhitzt und kurz zentrifugiert. Durch die im Probenpuffer enthaltenen Stoffe (Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol, SDS) und Hitze werden die Proteine vollständig denaturiert, linearisiert und mit einer Hülle aus negativ geladenen SDS-Molekülen versehen. Dies ermöglicht schließlich eine Auftrennung nach Molekulargröße und nicht nach Eigenladung. Das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau ermöglicht eine optische Kontrolle für die Laufweite der Proteinbande während der Proteinauftrennung im Gel.

Tab. 3.11: Anleitung zur Herstellung eines SDS-Page-Trenngels (10ml) und –Sammelgels (3 ml), Angaben in ml

Inhalt	Trenngel 12% SDS-Polyacrylamid	Sammelgel 5% SDS-Polyacrylamid
H ₂ O _{dd}	3,3	2,1
Acrylamid (30%): Rotiphorese Gel A (Roth), gebrauchsfertig	4,0	0,5
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5	/
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	/	0,38
SDS (10%)	0,1	0,03
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1	0,03
TEMED	0,004	0,003

Die aufbereiteten Proteinlysate wurden zur Proteinauftrennung zunächst im 5%igem Sammelgel des SDS-Polyacrylamid-Gels (PAGE) bei maximal 90V zu einer schmalen Proteinbande aufkonzentriert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse über ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel bei maximal 120V in PAGE-Laufpuffer. Als Marker für die Proteingrößen diente der „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“ von Fermentas Life Sciences. Die zur Proteinauftrennung und elektrophoretischen Übertragung (Western Blot) genutzten Geräte stammen von der Firma BioRad.

3.2.6.3 Western Blotting

Nach der Proteinauftrennung erfolgte eine elektrophoretische Übertragung bei konstant 300mA für eine Stunde auf eine PVDF-Membran in einem speziellen Transferpuffer auf Eis. Diese wurde zuvor mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert. Die über das SDS-Page-Gel aufgetrennten negativen Proteine, werden in Richtung Anode auf die Membran transferiert.

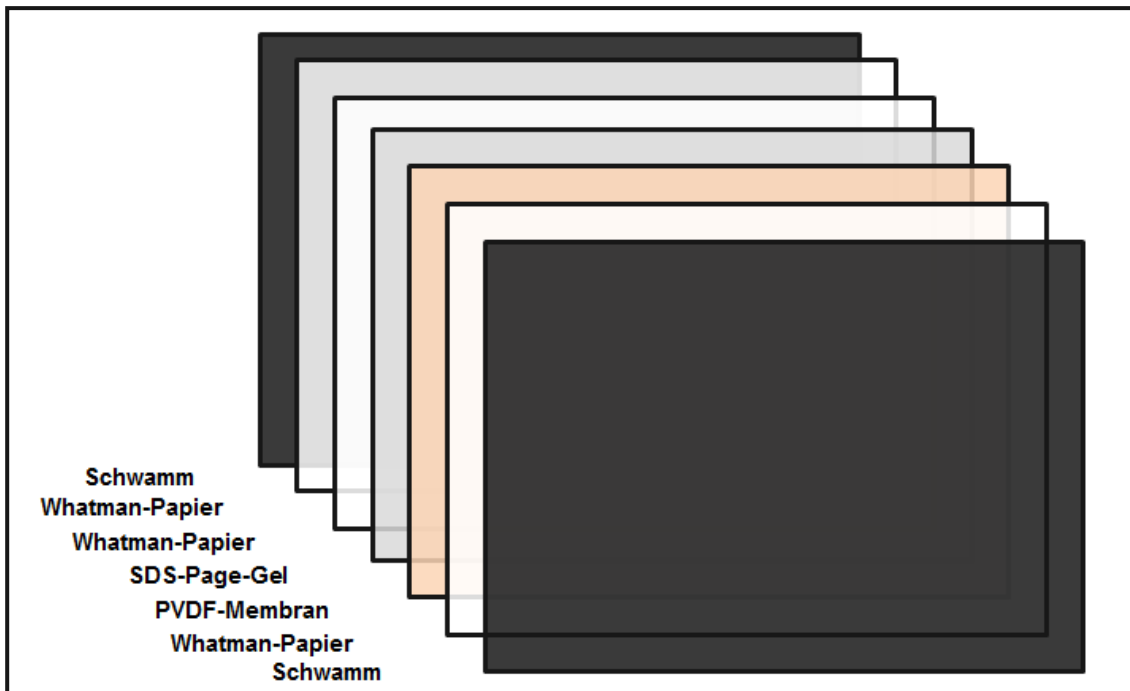


Abb. 3. 6: Aufbau der Kammer zur Proteinübertragung vom SDS-Page-Gel auf die PVDF-Membran im Rahmen des Western Blottings

Dabei ist zu beachten, dass sich keine Luftblasen zwischen der PVDF-Membran und dem Gel befinden, da sonst der Proteintransfer gestört wird. Den genauen Aufbau der Kammer zur Übertragung von Proteinen vom Gel auf die PVDF-Membran zeigt **Abb. 3.6**. Die zur elektrophoretischen Übertragung genutzten Geräte stammen von der Firma BioRad. Nach der einstündigen elektrophoretischen Übertragung wurde die Membran für eineinhalb Stunden mit einer Lösung aus TBS-T und 5% Milchpulver geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen.

3.2.6.4 Proteindetektion mittels ECL-Detektionssystem

Über Nacht wurde die zuvor mit 5% Milchpulver geblockte PVDF-Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mittels

eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (engl. horseradisch peroxidase, Meerrettichperoxidase) und dem ECL-Detektionssystem der Firma Amersham Biosciences sichtbar gemacht.

Nach Inkubation des Primärantikörpers wurde die Membran zunächst dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte anschließend für eine weitere Stunde, bevor die Membran wieder für mindestens eine Stunde lang mehrfach mit TBS-T gewaschen wurde um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das ECL-Detektionssystem von Amersham Biosciences verwendet (engl. enhanced chemoluminescence, verstärkte Chemolumineszenz). Diese ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, welche mit einem HRP-gekoppelten und Spezies-spezifischen Sekundärantikörper gebunden sind. Bei dieser Methode katalysiert die Peroxidase die Oxidation des Diacylhydrazids Luminol unter Umsetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O). Das bei dieser Reaktion entstehende Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand, welches unter Abgabe von Photonen wieder in den Ausgangszustand zurückfällt. Diese Photonenemission kann über einen Autoradiographiefilm sichtbar gemacht werden. Bei dem ECL-Detektionssystem von Amersham Biosciences wurden die Reagenzien ECL1 und ECL2 unter gleichen Volumina gemischt und mit der PVDF-Membran circa eine Minute inkubiert. Anschließend folgte die Entwicklung der Autoradiographiefilme mit einem entsprechenden Filmentwicklungsgerät (FPM 800A, Fujifilm) in der Dunkelkammer.

Die für die Proteindetektion verwendeten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen zeigen Tab. 3.12 und 3.13.

Tab. 3.12: Übersicht der Primär-Antikörper

Primär-Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-Vinculin	Maus (monoklonal)	1:5000 in TBS-T (Tween 0.02%) + Milch (5%)	Sigma-Aldrich Co.
Anti- α -Tubulin	Maus (monoklonal)	1:4000 in TBS-T (Tween 0.02%)	Sigma-Aldrich Co.
Anti-p53	Maus (monoklonal)	1:500 in TBS-T (Tween 0.02%)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Histon Deacetylase 4 (HDAC4)	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 in TBS-T (Tween 0.02%)	Cell Signaling Technology

Tab. 3.13: Übersicht der Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen IgG (H+L)- HRP Konjugat	Ziege (Anti-Kaninchen)	Verschieden (1:5000-1:12000) in TBS-T (Tween 0,02%)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Anti-Maus IgG (H+L)- HRP Konjugat	Ziege (Anti-Maus)	Verschieden (1:5000-1:20000) in TBS-T (Tween 0,02%)	Bio-Rad Laboratories GmbH

3.2.6.5 Herstellungsangaben und Informationen für die zum Western Blot benötigten Lösungen

In Tab. 3.14 folgen die Anleitungen zur Herstellung der zum Western Blot benötigter Puffer, Lösungen und der SDS-Page-Gele.

Tab. 3.14: Herstellungsangaben für die zum Western Blot benötigten Lösungen, alphabetisch geordnet

Inhalt	[Stamm]	Menge	[End]
Ammonium-Persulfat (APS)			10 % w/v in H ₂ O _{dd}
PAGE-Laufpuffer (5x) (pH 8,3)	Einstellung des pHs der unten hergestellten Lösung mit HCl (37%) auf pH 8,3		
Trizma Base Glycin SDS H ₂ O _{dd}		15,1 g 72 g 5 g ad 1 l	125 mM Tris 950 mM 0,5% w/v
Probenpuffer (6x)	Die unten hergestellte Lösung wird mit β-Mercaptoethanol bis zu einer Endkonzentration von 6% aufgefüllt		
Tris 1,0 M pH 6,8 Glycerol SDS Bromphenolblau H ₂ O _{dd}		37,5 ml 30 ml 12,3 g 60 mg ad 100 ml	
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)			10 % w/v in H ₂ O _{dd}
Stripping-Puffer	Die unten hergestellte Lösung wird mit β-Mercaptoethanol bis zu einer Endkonzentration von 6% aufgefüllt		
Tris 1,0 M pH 6,8 Glycerol SDS Bromphenolblau H ₂ O _{dd}		37,5 ml 30 ml 12,3 g 60 mg ad 100 ml	
TBS: Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. tris-buffered saline) (10x)	Einstellung des pHs der unten hergestellten Lösung mit HCl (37%) auf pH 7,4		
NaCl Trizma Base H ₂ O _{dd}		8,76 g/l 6,06 g/l ad 1 l	150 mM 50 mM
TBS-Tween	Waschpuffer für PVDF-Membranen der Gelelektrophorese (pH 7,4)		
TBS (pH 7,4) 0,02% Tween-20		1 l	
Temed C₆H₁₂N₂			
Transferpuffer (10x)			
Trizma Base Glycin H ₂ O _{dd}		52,8 29,25 ad 1 l	435 mM 390 mM

Inhalt	[Stamm]	Menge	[End]
Transferpuffer (1x)			
Stocklösung Methanol H ₂ O _{dd}		100 ml 200 ml ad 1 l	1x 20%
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	Einstellung des pHs der unten hergestellten Lösung mit HCl (37%)		
Trizma Base H ₂ O _{dd}		181,71 g/l ad 1 l	1,5 M
Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8)	Einstellung des pHs der unten hergestellten Lösung mit HCl (37%) auf pH 6,8		
Trizma Base H ₂ O _{dd}		121 g/l ad 1 l	1 M
Triton-Lysepuffer			
Tris pH 7,5 NaCl Triton X-100 EDTA H ₂ O _{dd}	20 mM 150 mM 1% 0,5 mM	200 µl 300 µl 1 ml 10 µl 8,49 ml	1 M 5 M 10 % 0,5 M

Ammonium Persulfat (APS, 10% w/v)

APS wird in entsprechender Menge in H₂O_{bidest.} gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. APS bildet in wässrigen Lösungen durch einen Basen-katalysierten Mechanismus freie Sauerstoffradikale. Typischerweise als Katalysatoren genutzte Basen sind tertiäre Amine wie Temed. Die gebildeten freien Sauerstoffradikale wiederum stoßen eine Polymerisierung von Acrylamid und bis-Acrylamid an. Dadurch entsteht eine Gel-Matrix, welche für die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht genutzt werden kann.

Stripping-Puffer

Sofern die an die PVDF-Membran gebundenen Antikörper entfernt werden mussten, wurde ein sogenannter Stripping-Puffer verwendet. Dabei wurde die PVDF-Membran für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und mit Stripping-Puffer für 30 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde diese zweimal mit TBS-T zehn Minuten gewaschen und anschließend nochmals mit 5%-igem Milchpulver in TBS-T geblockt.

3.2.7 Molekularbiologische Methoden

3.2.7.1 Materialien und Geräte

Zur miRNA-Detektion mittels qPCR wurden Produkte der Firmen Qiagen, Ambion und ROCHE Applied Science verwendet. Alle Schritte der RNA-Isolation, RT-PCR und qPCR wurden nach Protokollen der aufgeführten Firmen durchgeführt. In Tab. 3.15 findet sich eine Auflistung der verwendeten Produkte.

Tab. 3.15: Produktauflistung für die zur quantitativen real-time PCR benötigten Produkte, nach Hersteller geordnet

Produkt	Firma
miRNeasy Mini Kit (RNA-Isolation)	Qiagen
miScript Reverse Transcription Kit (50)	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen
miScript Primer Assay (100)	Qiagen
Primer Hs_Snord25_1	Qiagen
Primer Hs_RNU44	Qiagen
Primer Hs_miR494_1	Qiagen
Primer Hs_miR1	Qiagen
Rnase freies Wasser	Qiagen
MiRvana Kit	Ambion
LightCycler 480	ROCHE Applied Science
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	ROCHE Applied Science
LightCycler 480 Multiwell Plate 384	ROCHE Applied Science
Nanodrop, Spektrometer	Thermo Scientific
Mastercycler gradient, Heizblock	eppendorf

3.2.7.2 Microarray

Die Expressionsanalyse des miRNoms mittels Microarray und Sequenzierung erfolgte über die Microarray-Facility Tübingen (MFT). Die Microarray-Analyse basierte auf miRBase-Version 11 (Veröffentlichung 2008), die Sequenzierung auf Version 18 (Veröffentlichung November 2011). Die aktuellste miRBase-Version Nummer 22 wurde im Oktober 2018 veröffentlicht. Die miRBase-Versionen unterscheiden sich u.a. darin, dass zunehmend mehr Spezies inkludiert werden. Der MFT wurden RNA-Isolate aus HepG2-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit 5-aza-dC oder Doxorubicin zur Verfügung gestellt. Die RNA-Isolation ist in

Kap. 3.2.7.3 genauer erläutert. Da die Untersuchungen nicht selbst durchgeführt wurden, sollen an dieser Stelle nur Grundprinzipien beider Verfahren kurz und vereinfacht erläutert werden. Die Microarray-basierte miRNA-Analyse (engl. profiling) wurde ursprünglich von Liu et al. entwickelt [209, 311]. Vereinfacht basiert der Microarray auf einem Vergleich unterschiedlicher Signalintensitäten von zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten cDNA-Proben. Vom Ablauf her wird zunächst die RNA in eine cDNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Microarray-Platte enthält entsprechend der jeweiligen miRBase-Version alle korrespondierenden Oligonukleotide. Die cDNA-Probe und die korrespondierenden Oligonukleotide werden hybridisiert. Nach einem Waschvorgang bleiben nur noch die miteinander hybridisierten Oligonukleotide auf dem Microarray zurück. Über die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proben ist nun aufgrund einer normalisierten Signalintensität eine semi-quantitative Aussage über die zuvor in der Probe vorhandenen Transkripte möglich. Es werden zusammenfassend also folgende Schritte durchlaufen: RNA-Isolation und reverse Transkription, Markierung, Hybridisierung, Scan des Microarrays und Analyse.

Im Gegensatz zum Microarray ist über die neueren Sequenzierungsanalysen (engl. RNA-seq) eine deutlich höherwertige und präzisere quantitative Aussage ähnlich einer qPCR möglich. Die Expressionsstärke wird in RPKM-Werten (engl. „reads per kilobase per million reads“) angegeben. Vereinfacht handelt es sich um eine Normalisierung und berücksichtigt beispielsweise die Länge des zu messenden Produktes und die Sequenzierungstiefe einer Probe. Für weitere Informationen bezüglich der Berechnung des RPKM-Wertes und das Verfahren soll an dieser Stelle auf die angegebene Literatur verwiesen werden [312-316].

3.2.7.3 RNA-Isolation

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurde eine Guanidine Thiocyanate-Phenol-Chloroform-Extraktion mittels miRNeasy Mini Kit von Qiagen und dem standardisierten Protokoll durchgeführt. Auf einen zusätzlichen DNA-Verdau wurde verzichtet, so wie es im standardisierten Protokoll von Qiagen als zusätzliche, nicht zwingend durchzuführende Möglichkeit beschrieben ist. Kit-

Komponenten des miRNeasy Mini Kits von Qiagen sind „RNeasy Mini Spin Columns“, „Collection Tubes“, „QIAzol Lysis Reagent“, „Buffer RWT“, „Buffer RPE“ und RNase-freies Wasser. Das „QIAzol Lysis Reagent“ enthält hierbei sowohl Guanidine Thiocyanate als auch Phenol.

Für den Versuch wurden 200.000 Zellen in 6-well Platten ausgelegt und 48 Stunden nach Behandlungsbeginn mit der jeweiligen Substanz mit QIAzol lysiert und homogenisiert. Anschließend wurde durch Zugabe von Chloroform eine Guanidine Thiocyanate-Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung zur RNA-Isolation durchgeführt. Über RNeasy Mini Spin Columns der Firma Qiagen wurde die isolierte RNA aufgefangen und von Ethanol getrennt. Mittels mehrmaliger Reinigung der RNeasy Mini Spin Columns bzw. der RNA mit RPE-Puffer konnte der Reinheitsgehalt der RNA gesteigert werden. Daraufhin wurde die RNA mittels RNase freiem Wasser gelöst. Messungen von Reinheit und Konzentration der gelösten RNA-Isolation erfolgten mit dem Spektrometer NanoDrop ND-1000. Dabei erfolgt die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung in den Absorptionsspektren der Nukleinsäuren und Proteine bei 260 nm bzw. 280 nm. Über eine Quotientenbildung zwischen beiden Absorptionsspektren kann eine Verunreinigung der Proben festgestellt werden. Eine Ratio von 2.0 entspricht der größtmöglichen Güte bzw. Reinheit. Gelagert wurde die RNA bei -80°C.

3.2.7.4 cDNA-Synthese (RT-PCR)

Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurde das miScript PCR System von Qiagen nach standardisiertem Protokoll verwendet. Alle Komponenten einschließlich RNA-Isolat, wurden während der Arbeitsschritte auf Eis gehalten. Die cDNA-Synthese erfolgte in 0,2 ml RT-PCR-Röhrchen im Heizblock Mastercycler gradient der Firma eppendorf. Die Reverse Transkription erfolgte über 60 min bei 37°C. Abschließend wurde die „miScript Transkriptase“ für 5 Minuten bei 95°C inaktiviert. Die angefertigte cDNA wurde anschließend bei -80°C eingelagert. Tabelle 3.16 zeigt den Inhalt eines RT-PCR-Ansatzes.

Kit-Komponenten des miScript PCR Systems von Qiagen:

- miScript RT Buffer, 5x (beinhaltet Mg^{2+} , dNTPs und Primer)

- miScript Reverse Transcriptase Mix
- RNase-free Water

Tab. 3.16: RT-PCR-Ansatz für Masercycler Gradient (Eppendorf AG)

Komponenten	Volumen
miScript RT Buffer, 5x	4µl
RNase-freies Wasser	Variabel
miScript Reverse Transcriptase Mix	1µl
Templete RNA	Variabel (bis zu 1µg)
Gesamtvolumen	20µl

3.2.7.5 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Die qPCR ermöglicht durch eine spezifische Primer-definierte in-vitro-Reaktion eine millionenfache Vervielfältigung einer Zielsequenz. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen kann dies in Echtzeit verfolgt werden. Das hier verwendete Detektionsverfahren beruht auf Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes „SYBR Green“ der Firma Qiagen. Dieser interkaliert mit der DNA-Doppelhelix und emittiert während der Bindung Licht einer Wellenlänge von 521 nm. Das Signal wird in jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase gemessen, wenn die maximal amplifizierte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt. Es können bei dieser Methode jedoch ebenfalls fälschlicherweise unspezifische Produkte und Primer-Dimere als doppelsträngige DNA detektiert werden, sodass eventuell keine genaue Quantifizierung des Zielgens möglich wird. Optimierte qPCR-Bedingungen und die Verwendung von einem Fertigmix ermöglichen in vielen Fällen eine hohe Sensitivität und Spezifität. Trotzdem muss die Produktspezifität der qPCR kontrolliert werden. Dies kann sowohl mit Hilfe der Schmelzkurven erfolgen, als auch mit einer Auftrennung der qPCR-Produkte im Gel. Zeigt sich in der Schmelzkurvenanalyse mehr als ein Gipfel und eine gesamt verschobene Temperaturkurve, deutet dies auf unspezifische Produkte und Primer-Dimere hin. Darüber hinaus zeigen sich bei Unspezifität mehrere Banden bei Auftrennung der qPCR-Produkte mittels Agarosegel.

Zur Durchführung der qPCR wurde das standardisierte Protokoll des „miScript PCR System“ von Qiagen verwendet. Alle Komponenten wurden während der

Arbeitsschritte auf Eis gehalten. Als Gerät wurde der LightCycler 480 von Roche Life Science verwendet. Jede qPCR-Reaktion wurde in Dreifachansätzen durchgeführt. Als Reinheitskontrollen wurde eine -RT-Probe und eine Non-template-Probe hinzugefügt. Zur Auswertung der qPCR diente die $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Kit-Komponenten des miScript PCR Systems von Qiagen:

- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- 10x miScript Universal Primer
- 10x miScript Primer Assay
- RNase-freies Wasser

Die Tab. 3.17 zeigt den Inhalt eines qPCR-Ansatzes im 384-well und 96-well Format und die Tab. 3.18 die Lightcycler 480-Einstellungen für die Durchführung der qPCR.

Tab. 3.17: qPCR-Ansatz für den Lightcycler 480 (Roche Life Scienc)

Komponente	Volumen (384-well)	Volumen (96-well)	[End]
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*	10 μ l	25 μ l	1x
10x miScript Universal Primer	2 μ l	5 μ l	1x
10x miScript Primer Assay	2 μ l	5 μ l	1x
RNase-freies Wasser	Variabel	Variabel	-
Template cDNA	\leq 2 μ l	\leq 5 μ l	1-3ng/Reaktion
Gesamtvolumen	20 μ l	50 μ l	-

Tab. 3.18: qPCR-Zyklus-Programm für den Lightcycler 480 (Roche Life Science)

	Zeit	Temperatur	Zusatzinformation
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase
3-Stufen Zyklus			
Denaturierung	15 sec	94°C	
Anlagerung	30 sec	55°C	
Elongation	30 sec	70°C	Fluoreszenzmessung
Zyklusanzahl	35		

Nach Abschluss der DNA-Vervielfältigung mittels Lightcycler 480 wurden die Proben auf ein qPCR-Gel aufgetragen. Dieses bestand aus einem 4%igem Agarosegel mit TBE-Puffer. TBE-Puffer ergibt bei Auftrennung kleiner DNA-Fragmente eine bessere Auftrennung als TAE-Puffer. Dabei wurden die Triplets

der jeweiligen Probe gepoolt und mit einem DNA-Ladepuffer versetzt. Die Proben liefen im Gel bei 40 V. Danach wurde das Gel in mit Ethidumbromid versetztem TBE-Puffer gelegt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren. Dadurch erhöht sich die Fluoreszenz des Stoffes bei Anregung mit ultraviolettem Licht, sodass bei UV-Exposition des Agarosegels die DNA-Banden aufleuchten. Dieses Verfahren zur DNA-Anfärbung in Gelelektrophoresen wird seit 1972 verwendet [317]. In Tab. 3.19 findet sich die genaue Zusammensetzung des TBE-Puffers und in Tab. 3.20 der Inhalt des DNA-Ladepuffers. Als DNA-Marker für die Gelelektrophorese wurde eine DNA-Leiter mit einer Größe von 100 Basenpaaren von Roche Life Science verwendet, welcher bei -20 °C gelagert wurde.

Tab. 3.19: Zusammensetzung des TBE-Puffers (10x), pH 8,3

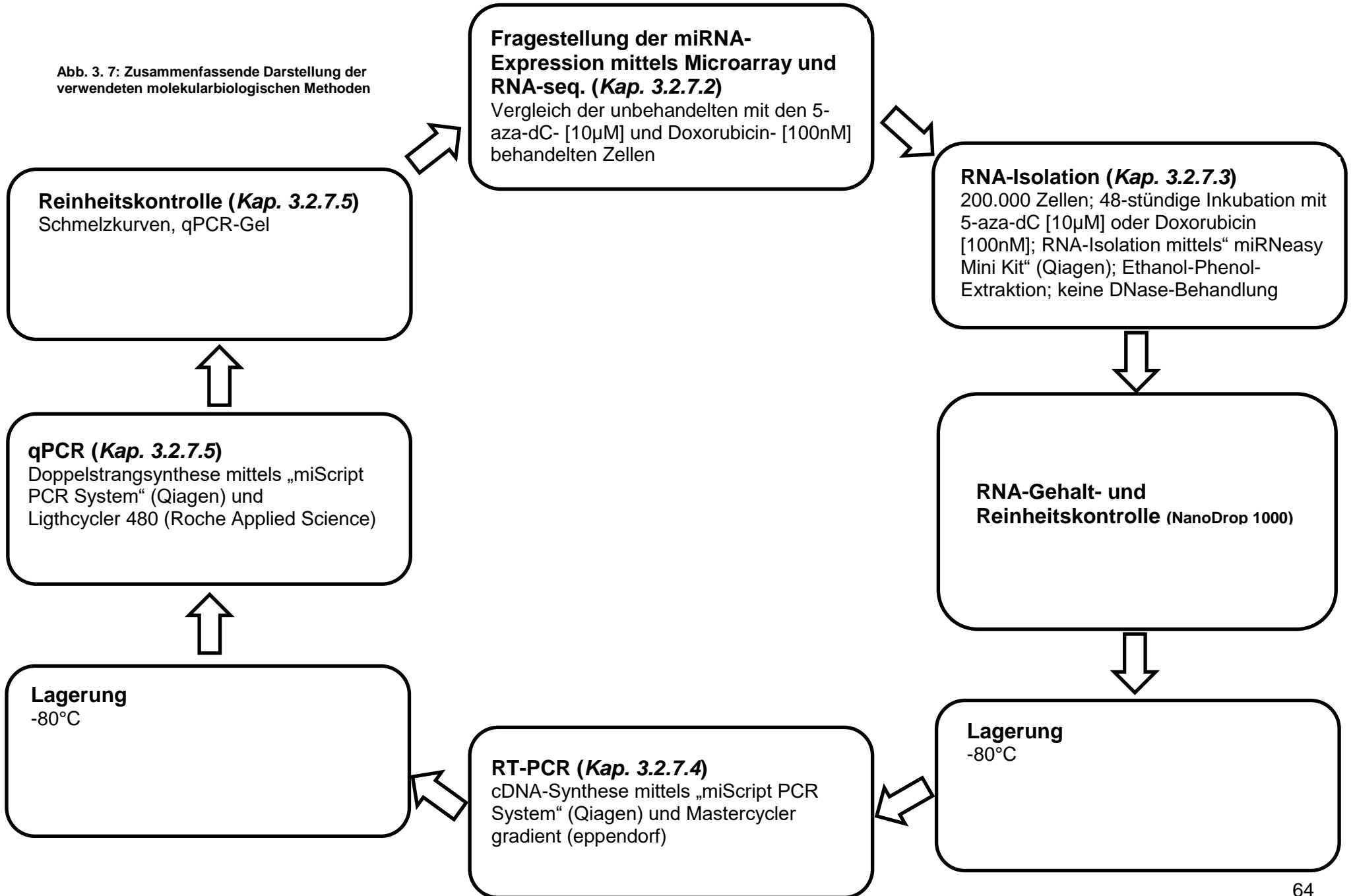
Inhalt	Endkonzentration
Tris	0,89 M
EDTA-Na ₂ -Salz	0,02 M
Borsäure	0,89 M

Tab. 3.20: Inhalt des DNA-Ladepuffers (10x)

Inhalt	Menge	Endkonzentration
Bromphenolblau	20 mg	0,4 % w/v
Xylen-Cyanol FF	20 mg	0,4 % w/v
Orange-G	20mg	0,4 % w/v
Ficoll 400	1g	20 % w/v
H ₂ O _{bidest}	5ml	50 ml

Eine abschließend zusammenfassende Darstellung der Arbeitsschritte der verwendeten molekularbiologischen Methoden ist in **Abb. 3.7** dargestellt.

Abb. 3. 7: Zusammenfassende Darstellung der verwendeten molekularbiologischen Methoden



3.3 Statistik

Die statistische Analyse wurde mittels SPSS (Release 26, IBM, Chicago, IL, USA) und GraphPad Prism (Version 8, Graphpad Software, Inc., CA, USA) durchgeführt. Für die statistische Berechnung der Reduktion der Zellmasse (SRB-Assay), der Zytotoxizität (LDH-Assay) und der SA- β Gal-Aktivität wurden Einwegvarianzanalysen (one-way ANOVA) durchgeführt. Als Post-Hoc-Test wurden Tukey korrigierte p-Werte angegeben. Statistische Berechnungen für die qPCR-Experimente wurden mittels Student's t-test durchgeführt. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanz-Niveau festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$

4. Ergebnisse

4.1 Vorexperimente

4.1.1 Antiproliferative Wirkung in von 5-aza-dC- oder Doxorubicin-behandelten Hepatomzelllinien

Um den Effekt der Substanzen 5-aza-dC und Doxorubicin in Hinblick auf die Proliferationshemmung und Zytotoxizität von Hepatomzelllinien zu untersuchen, wurden HepG2- und Hep3B-Zellen für 72h mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] kultiviert und anschließend die Zellmasse mittels SRB-Assay und die Zytotoxizität mittels LDH-Freisetzung im LDH-Assay gemessen (Abb. 4.1).

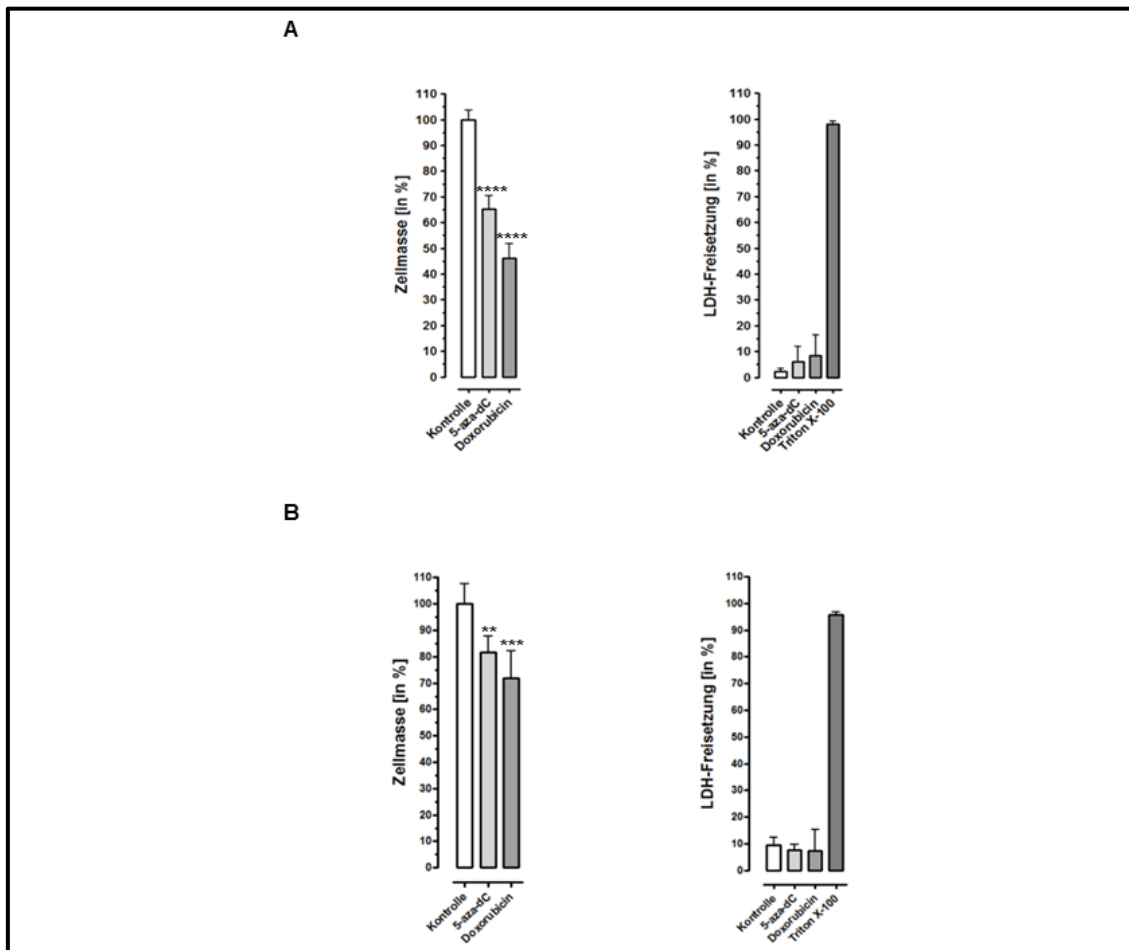


Abb. 4.1: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die Proliferation und Zytotoxizität in HepG2 (A) und Hep3B-Zellen (B)

HepG2- (A) und Hep3B-Zellen (B) wurden für 72 Stunden in 24-well-Platten mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] kultiviert. Es wurde jeweils ein SRB- und LDH-Assay zur photometrischen Messung der Proliferationshemmung und Zytotoxizität durchgeführt. Kontrolle sind jeweils unbehandelte HepG2- oder Hep3B-Zellen. Eine Behandlung mit Triton X-100 nach 72 Stunden gilt als Maßstab maximaler Zytotoxizität. Entsprechend beziehen sich im LDH-Assay die übrigen Werte relativ zu einer Behandlung mit Triton-X, und im SRB-Assay auf die unbehandelte Kontrolle. Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). SRB (Sulforhodamine B), LDH (Laktat-Dehydrogenase). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, „/“ $p > 0,05$. In der Abbildung sind ausschließlich signifikante Änderungen von 5-aza-dC- und Doxorubicin-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle vermerkt.

Der SRB-Assay mit beiden Hepatomzelllinien zeigt jeweils eine ausgeprägte, signifikante Proliferationshemmung von HepG2- und Hep3B-Zellen durch 5-aza-dC und Doxorubicin ohne jedoch eine signifikante LDH-Freisetzung als Zeichen einer Zytotoxizität zu induzieren (**Abb. 4.1A** und **4.1B**, **Tab. 4.1** und **Tab. 4.2**). Diese Kombination deutete auf TIS hin, was nachfolgend weiter untersucht wurde.

Tab. 4.1: Effekte von 5-aza-dC [10 µM] und Doxorubicin [100 nM] auf die Proliferation (A) und Zytotoxizität (B) in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden für 72 Stunden in 24-well-Platten mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] kultiviert. Es wurde jeweils ein SRB- (A) und LDH-Assay (B) zur photometrischen Messung der Proliferationshemmung und Zytotoxizität durchgeführt. Die präsentierten Daten entsprechen den Zahlenwerten der Abb. 4.1A und somit den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

A		Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanzniveau	p-Werte
Tukey's Test					
Kontrolle vs. 5-aza-dC	100 +/- 3,5	65,3 +/- 4,8	****	< 0,0001	
Kontrolle vs. Doxorubicin	100 +/- 3,5	46,3 +/- 5,2	****	< 0,0001	
5-aza-dC vs. Doxorubicin	65,3 +/- 4,8	46,3 +/- 5,2	**	0,0015	

B		Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanzniveau	p-Werte
Tukey's Test					
Kontrolle vs. 5-aza-dC	2,2 +/- 2,8	6,1 +/- 2	/	0,8775	
Kontrolle vs. Doxorubicin	2,2 +/- 2,8	8,5 +/- 7,5	/	0,6452	
5-aza-dC vs. Doxorubicin	6,1 +/- 2	8,5 +/- 7,5	/	0,9639	

Tab. 4.2: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die Proliferation (A) und Zytotoxizität (B) in Hep3B-Zellen

Hep3B-Zellen wurden für 72 Stunden in 24-well-Platten mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] kultiviert. Es wurde jeweils ein SRB- (A) und LDH-Assay (B) zur photometrischen Messung der Proliferationshemmung und Zytotoxizität durchgeführt. Die präsentierten Daten entsprechen den Zahlenwerten der Abb. 4.1B und somit den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

A		Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanzniveau	p-Werte
Tukey's Test					
Kontrolle vs. 5-aza-dC	100 +/- 7,2	81,6 +/- 5,9	**	< 0,0001	
Kontrolle vs. Doxorubicin	100 +/- 7,2	71,9 +/- 9,8	***	< 0,0001	
5-aza-dC vs. Doxorubicin	81,6 +/- 5,9	71,9 +/- 9,8	/	0,0015	

B		Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanzniveau	p-Werte
Tukey's Test					
Kontrolle vs. 5-aza-dC	9,3 +/- 2,8	7,6 +/- 2	/	0,9707	
Kontrolle vs. Doxorubicin	9,3 +/- 2,8	7,4 +/- 7,5	/	0,9582	
5-aza-dC vs. Doxorubicin	7,6 +/- 2	7,4 +/- 7,5	/	> 0,9999	

4.1.2 SA-βGal-Modulation mittels 5-aza-dC und Doxorubicin

Basierend auf den in Kap. 4.1.1 gezeigten Ergebnissen wurde ein βGal-Assay mit den jeweils identischen Konzentrationen von 5-aza-dC und Doxorubicin für

HepG2-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass 5-aza-dC [10 μ M] und Doxorubicin [100 nM] in den verwendeten Konzentrationen in HepG2-Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation zu einer SA- β Gal-Modulation mit den Seneszenz-typischen, morphologischen Merkmalen einer Auflockerung des Zellverbandes mit Zellvergrößerung und -abflachung führen (**Abb. 4.2**). Dieser Effekt von 5-aza-dC auf HepG2-Zellen ist 2013 veröffentlicht worden [285, 286].

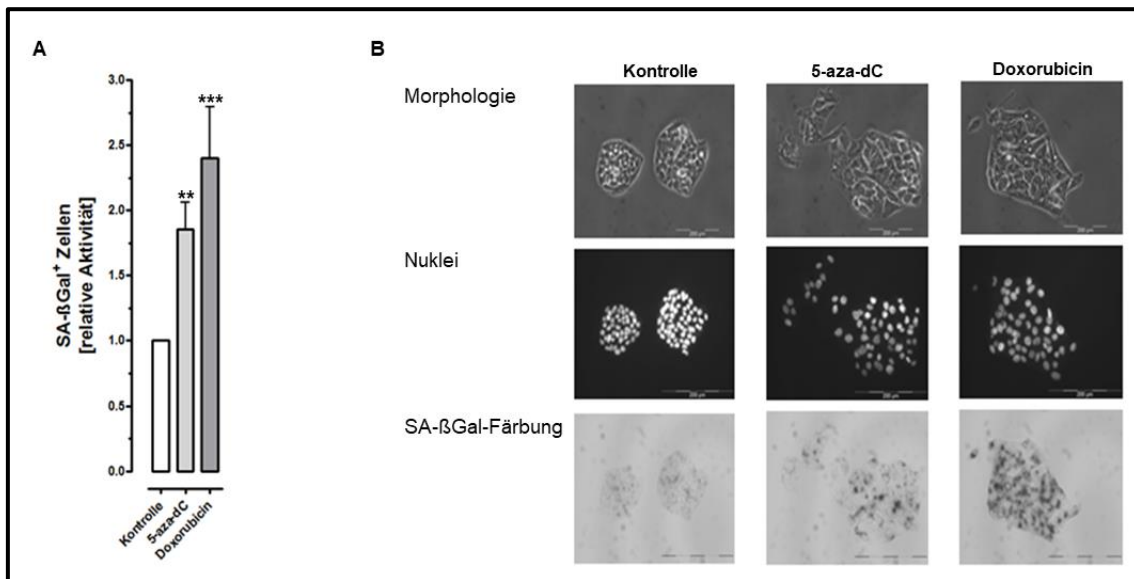


Abb. 4.2: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die SA- β Gal-Aktivität in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden für 72 Stunden in 6-well-Platten mit 5-aza-dC [10 μ M] oder Doxorubicin [100 nM] kultiviert. Es wurde jeweils ein β Gal-Assay (A) zur Messung der SA- β Gal-Modulation durchgeführt und repräsentative Bilder angefertigt (B). Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 μ m. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, „/“ $p > 0,05$.

Ein typisches Merkmal für den Zustand der Seneszenz ist definitionsgemäß ein terminaler Wachstumsarrest. Für einen Langzeitversuch wurden HepG2-Zellen zunächst für die ersten 72 Stunden (3 Tage) mit den jeweiligen Seneszenz-induzierenden Substanzen behandelt. Anschließend wurde ohne Hinzugabe der Substanzen alle drei Tage das Kulturmedium gewechselt für eine Gesamtdauer des Versuches von 9 Tagen. Als wichtiges Ergebnis zeigt **Abb. 4.3**, dass 5-aza-dC und Doxorubicin einen Wachstumsarrest über die Gesamtdauer des Versuches hervorrufen. Die behandelten Zellen flachen ab und die Zellhaufen lockern sich auf. Sowohl 5-aza-dC als auch Doxorubicin hatten über den beobachteten Beobachtungszeitraum für einzelne HepG2-Zellen einen optisch sichtbaren zytotoxischen Effekt. Diese Beobachtungen stimmen mit den FACS-Ergebnissen überein, welche an Tag sechs nach Behandlungsbeginn einen erhöhten sub2N-Gehalt zeigen (**Abb. 4.6**).

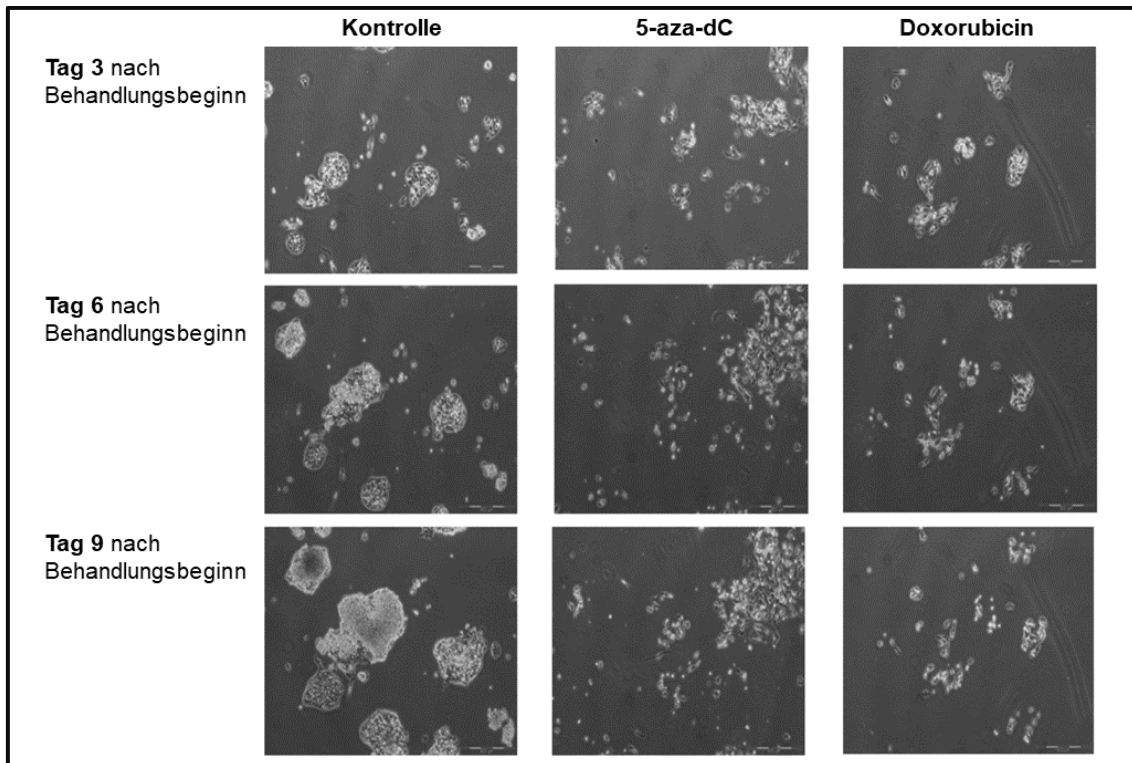


Abb. 4.3: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die Morphologie und das Zellwachstum von HepG2-Zellen über 9 Tage

HepG2-Zellen wurden zunächst für 72 Stunden entweder mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] kultiviert. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt ohne die jeweilige Behandlung weiterzuführen. Die präsentierten Bilder sind repräsentativ. Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 500 µm.

Aufgrund der primär unterschiedlichen Wirkungsweise von 5-aza-dC und Doxorubicin sollte zusätzlich überprüft werden wie lange eine Inkubation mittels 5-aza-dC nötig ist, bis sich eine Änderung der SA-βGal-Färbung einstellt. Daher wurde eine Versuchsreihe mit 5-aza-dC unterschiedlicher Inkubationszeiten erstellt (**Abb. 4.4**). Nach einer Inkubation mit 5-aza-dC von jeweils 3, 6, 12, 18, 24 und 72 Stunden wurde das jeweilige Reaktionsgefäß der Kulturplatte einmal mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium hinzugeführt. Nach 72-stündiger Inkubation wurde der Versuch für alle Inkubationszeiten abgebrochen. Wie anhand **Abb. 4.4** ersichtlich ist, wird mindestens eine initiale 12-stündige Inkubationszeit mit 5-aza-dC für eine starke SA-βGal-Modulation und morphologische Änderung benötigt. Demgegenüber führt in den p53-deletierten Hep3B-Zellen ausschließlich Doxorubicin zu einer sichtbaren SA-βGal-Modulation mit morphologischer Veränderung wie Zellabflachung und Vergrößerung der Zellkerne. 5-aza-dC führt hingegen nicht zu diesen Effekten (**Abb. 4.5**).

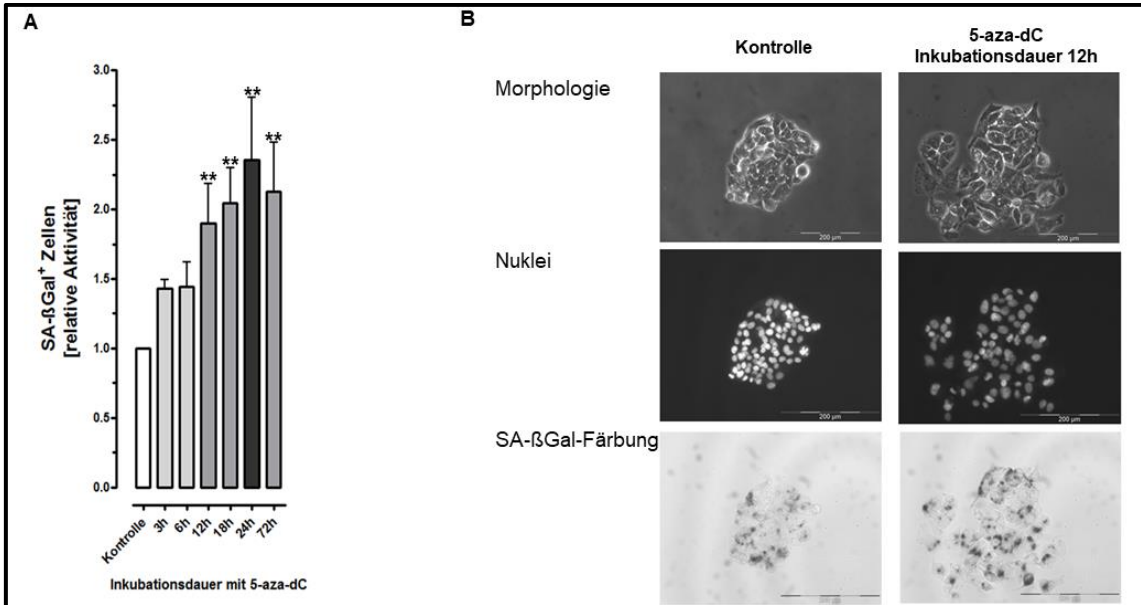


Abb. 4.4: SA-βGal-Modulation von HepG2-Zellen mittels unterschiedlicher Inkubationszeiten mit 5-aza-dC
 HepG2-Zellen wurden für insgesamt 72 Stunden (h) in 6-well-Platten kultiviert. Es erfolgte für die angegebenen Zeiträume von 3, 6, 12, 18, 24 und 72h eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 μM]. Nach der jeweils vorgegebenen Inkubationszeit mit 5-aza-dC wurde das 6-well mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium ersetzt. Nach insgesamt 72h wurde der gesamte Versuch für alle Reaktionsgefäße abgebrochen. Anschließend wurde jeweils ein βGal-Assay zur Messung der βGal-Modulation durchgeführt (A) und repräsentative Bilder angefertigt (B). Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). PBS (engl. Phosphate-Buffered Saline). Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 μm. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05. In der Abbildung sind ausschließlich signifikante Änderungen vermerkt.

Dieser Effekt wurde durch die Arbeitsgruppe, in der diese Promotionsarbeit angefertigt wurde, publiziert und auf den unterschiedlichen p53-Status zurückgeführt [285].

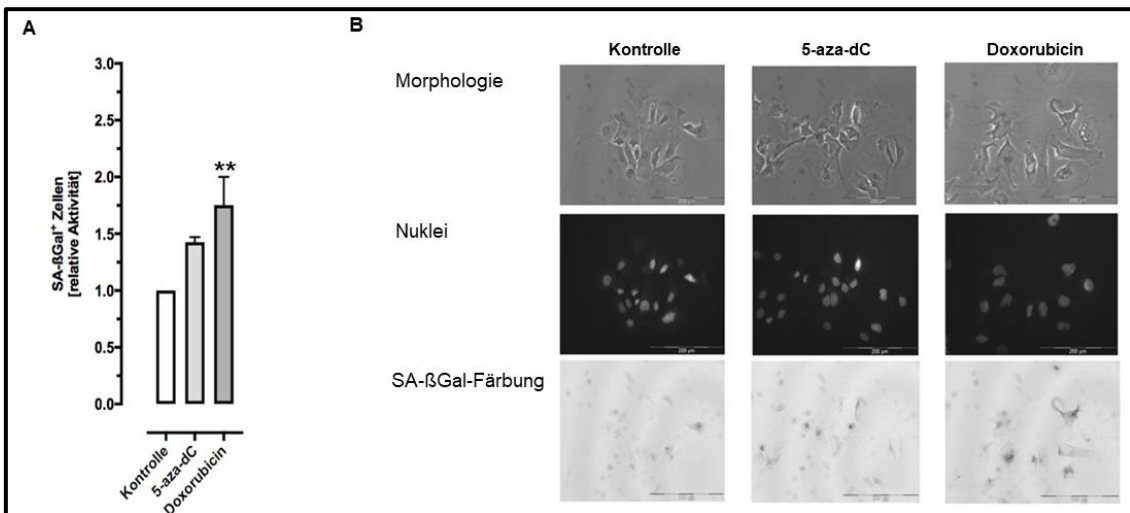


Abb. 4.5: Effekte von 5-aza-dC und Doxorubicin auf die SA-βGal-Aktivität in Hep3B-Zellen
 Hep3B-Zellen wurden für 72 Stunden in 6-well-Platten mit 5-aza-dC [10 μM] oder Doxorubicin [100 nM] kultiviert. Es wurden jeweils ein βGal-Assay zur Messung der βGal-Modulation durchgeführt (A) und repräsentative Bilder angefertigt (B). Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus 3 Experimenten und der Standardabweichung (SD). Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 μm. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05. In der Abbildung sind ausschließlich signifikante Änderungen vermerkt.

4.1.3 Induktion eines Zellzyklus-Arrests in HepG2-Zellen mittels 5-aza-dC und Doxorubicin

Um den Effekt der Substanzen auf die Zellzyklusverteilung zu beurteilen, wurden HepG2-Zellen mit 10 μM 5-aza-dC oder 100 nM Doxorubicin für drei und sechs Tage behandelt (**Abb. 4.6**). Doxorubicin induziert die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Proliferationshemmung, indem es die Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert. Nach einer Fortführung der Inkubation auf insgesamt 6 Tage wird eine Verschiebung der Zellzyklusverteilung in Richtung sub2N-Phase als Zeichen der Apoptoseinduktion beobachtet. Ein G2-Arrest von HepG2- und Hep3B-Zellen in einer vergleichbaren Konzentration von Doxorubicin ist von Choi et al. publiziert worden und konnte an dieser Stelle somit bestätigt werden [318]. Im Gegensatz zum stark ausgeprägten G2-Arrest von Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen, verschiebt sich der Zellzyklus nach Behandlung mit 5-aza-dC nur leicht in die G2-Phase. Da keine Zellzyklussynchronisation unternommen wurde, kann an dieser Stelle zunächst nicht geklärt werden ob neben dem G2-Arrest ein weiterer Arrest in der G1-Phase vorhanden ist.

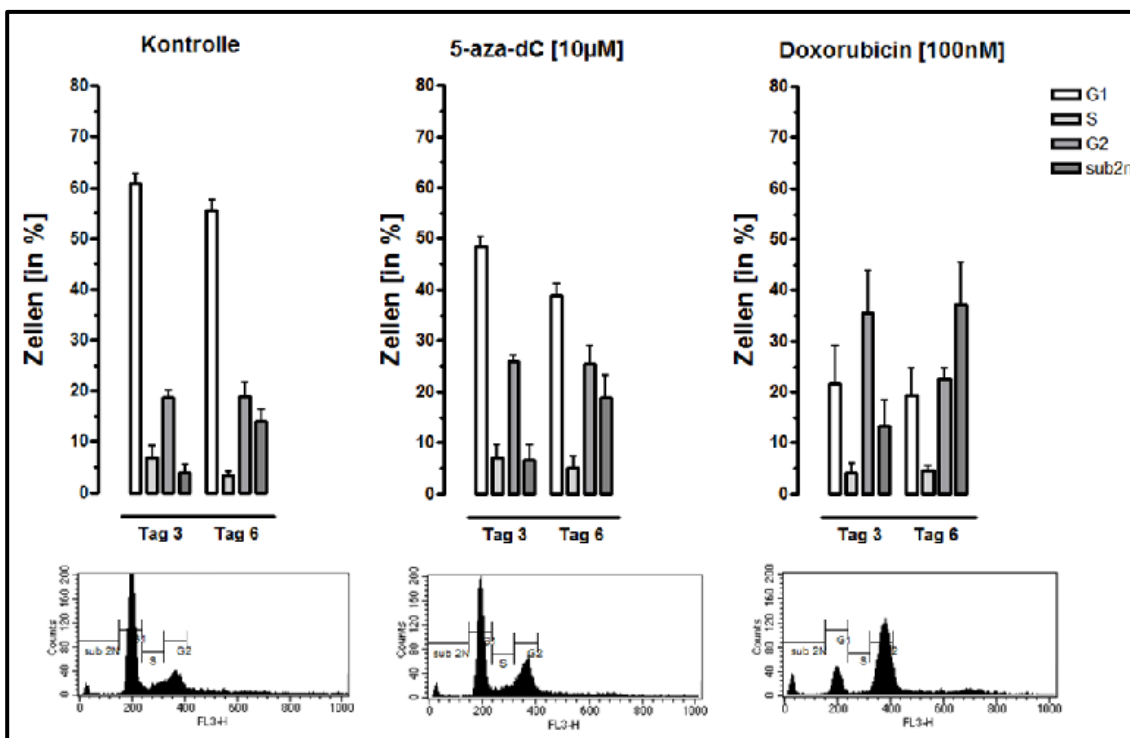


Abb. 4.6: Vergleich der Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Behandlung mit 5-aza-dC und Doxorubicin mittels FACS-Analyse PI-markierter HepG2-Zellen

Mit 5-aza-dC [10 μM] oder Doxorubicin [100 nM] behandelte HepG2-Zellen wurden in 24-well Platten kultiviert und anschließend mittels Propidiumiodid (PI) markiert. Die Fluoreszenz einzelner Kerne wurde mit der Durchflusszytometrie mittels FACScalibur (Becton Dickinson) gemessen. Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Die in zweiter Reihe dargestellten Diagramme entsprechen der Zellzyklusverteilung nach 72 Stunden. PI (Propidiumjodid, engl. Propidium iodide).

4.1.4 Induktion von p53 mittels 5-aza-dC und Doxorubicin in HepG2-Zellen

Ein großer Unterschied zwischen HepG2- und Hep3B-Zellen besteht im Vorhandensein des Zellzyklusregulators p53. Während die HepG2-Zellen ein Wild-Typ p53 besitzen, ist dieses hingegen in Hep3B-Zellen deletiert. Choi et al. untersuchten die Proteinexpression von p53 und p21^{cip/waf} in diesen Zelllinien unter einer Behandlung von Doxorubicin [318]. Hierbei konnte eine Erhöhung des Proteingehalts beider Zellzyklusregulatoren in HepG2-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen p21^{cip/waf} in den p53-deletierten Hep3B-Zellen nicht erhöht war [318]. Diese Untersuchungen wurden jedoch mit einer Konzentration von Doxorubicin von 1 µM und somit unter einer 10-fach höheren Konzentration durchgeführt wie in den in dieser Promotionsarbeit verwendeten Konzentration von 100 nM. Die **Abb. 4.7** zeigt, dass sowohl Doxorubicin als auch 5-aza-dC in den in dieser Promotionsarbeit verwendeten, Seneszenz-induzierenden Konzentrationen zu einem erhöhten Proteingehalt von p53 führen. Nach 24-stündiger Inkubation ist diese Erhöhung bei Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen bereits stark ausgeprägt und ist auch über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Dies stimmt mit bisher veröffentlichten Versuchsergebnissen der Arbeitsgruppe überein [285].

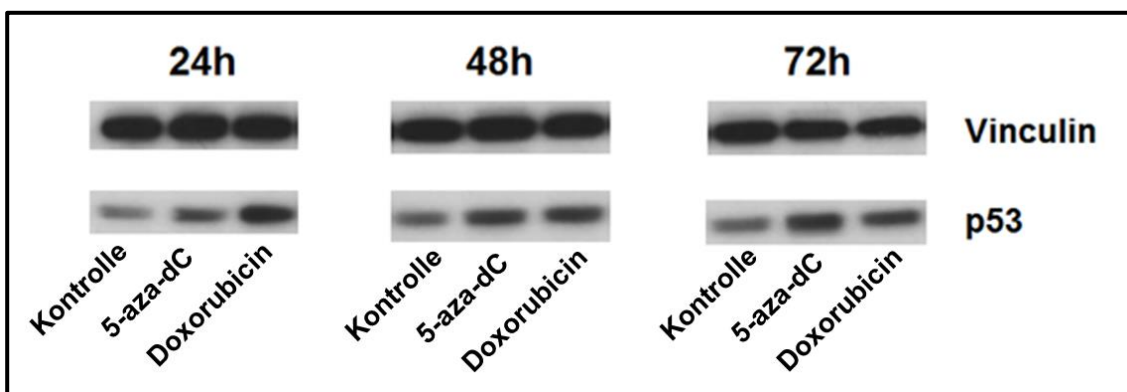


Abb. 4.7: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von p53 der Zelllinie HepG2 nach einer Behandlung durch 5-aza-dC und Doxorubicin

Nach 24, 48 und 72 Stunden (h) wurden Zellextrakte von 5-aza-dC- [10 µM] oder Doxorubicin- [100 nM] behandelten HepG2-Zellen auf den Proteingehalt von p53 mittels Western-Blot untersucht. Vinculin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

4.2 MicroRNA-Expressionsmuster von 5-aza-dC- oder Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen

4.2.1 Mikroarray-Expressions- und Sequenzierungsanalyse des miRNoms von 5-aza-dC und Doxorubicin behandelten HepG2-Zellen

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine miRNom-Analyse mittels zwei unabhängiger Verfahren, der Microarray-Expressionsanalyse und einer Sequenzierungsanalyse, von Doxorubicin und 5-aza-dC behandelten HepG2-Zellen durchgeführt. Beide Verfahren zeigen einen starken Einfluss von 5-aza-dC auf das miRNom. Die **Abb. 4.8A** und **4.8B** zeigen die miRNom-Regulation beider Verfahren mittels relativer Wertzunahmen (engl. fold-change) der hochregulierten miRNAs von 5-aza-dC-behandelten HepG2-Zellen. Die unterschiedlichen Methoden regulieren 16,3% vs. 12,8% aller untersuchten miRNAs wobei die 12,8% 134 von 1046 untersuchten miRNAs entsprechen.

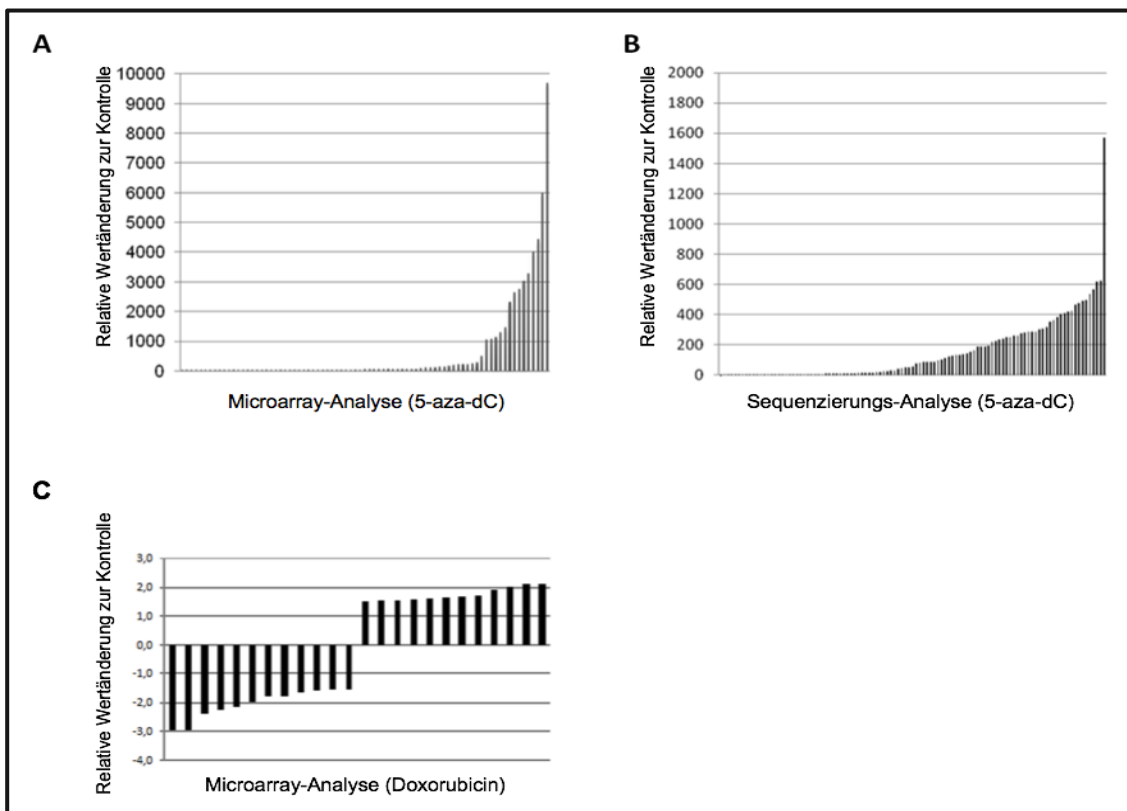


Abb. 4.8: Microarray und Sequenzierungsanalyse von 5-aza-dC- [10 μ M] oder Doxorubicin- [100 nM] behandelten HepG2-Zellen

miRNom-Analyse in HepG2-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 5-aza-dC [10 μ M] (A, B) oder Doxorubicin [100 nM] (C). Die Werte entsprechen jeweils relativen Wertänderungen zur unbehandelten Kontrolle (engl. fold change). 5-aza-dC reguliert 16,3 % aller untersuchten miRNAs in der Microarray-Analyse (A) und 12,8 % in der Sequenzierungsanalyse (B). 12,8% entsprechen 134 von 1046 untersuchten miRNAs. Doxorubicin reguliert 23 miRNAs in der Microarray-Analyse (C), dies entspricht 3,2 % des untersuchten miRNoms. Die präsentierten Daten entsprechen der Auswertung von drei Experimenten.

Hierzu ist zu erwähnen, dass beide Methoden zum Zeitpunkt der Untersuchung auf unterschiedlichen miRBase-Versionen beruhen. Die Sequenzierungsanalyse beruht auf Version 18, die Microarray-Expressionsanalyse hingegen auf Version 11. Die Hauptunterschiede zwischen den miRBase-Versionen liegen in der Gesamtanzahl untersuchter Spezies und unter anderem dadurch ansteigender Vorläufer- und Endstrukturen. Umso interessanter ist es, dass die 12,8% deregulierten miRNAs der miRBase-Versionsnummer 18 bis auf wenige Ausnahmen mit der Microarray-Untersuchung identisch sind. In der Sequenzierungsanalyse werden zur Angabe der Expression RPKM-Werte verwendet. Der RPKM-Wert ist eine englische Abkürzung und steht für „Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads“. Es handelt sich bei dem RPKM-Wert um eine Normalisierung und berücksichtigt beispielsweise die Länge des zu messenden Produktes und die Sequenzierungstiefe einer Probe.

Tab. 4.3: Doxorubicin-regulierte miRNAs in HepG2-Zellen

Signalintensitäten der Microarray-Untersuchung von Doxorubicin-regulierten miRNAs [100 nM] in HepG2-Zellen nach 48-stündiger Inkubation. Die Anordnung erfolgt mittels relativen Wertänderungen (engl. fold change).

miRNA	Kontrolle	Doxorubicin	Relative Änderung
miR-26a-2*	847,4	301,5	-3,0
miR-545*	174,0	64,0	-3,0
miR-96*	178,5	77,5	-2,4
miR-509-5p	149,9	74,4	-2,3
miR-218	200,9	99,3	-2,2
miR-129*	125,1	63,4	-2,0
miR-374b*	572,5	353,6	-1,8
miR-576-3p	416,4	263,3	-1,8
miR-548j	197,8	129,7	-1,6
miR-200c*	134,3	87,8	-1,6
miR-636	217,9	154,1	-1,6
miR-340	1814,9	1223,1	-1,6
miR-125b-1*	98,2	158,4	1,5
miR-369-5p	95,3	151,3	1,5
miR-216b	736,9	1281,8	1,6
miR-20b	113,7	189,5	1,6
miR-297	66,8	102,9	1,6
miR-206	82,1	135,6	1,6
miR-614	193,7	355,8	1,7
miR-218-2*	74,3	122,5	1,7
miR-874	109,4	226,3	1,9
miR-494	67,2	124,7	2,0
miR-548m	87,0	192,4	2,1
miR-328	1631,3	3489,5	2,1

In den durchgeführten Untersuchungen von 5-aza-dC-behandelten HepG2-Zellen waren alle miRNAs bis auf miR-483 hochreguliert. Letztere war nur in der Sequenzierungsanalyse auf hohem Expressionslevel von dem RPKM-Wert 26381 auf 12975 zweifach herunterreguliert. Die am stärksten hochregulierte miRNA in der Sequenzierungsanalyse war miR-127 mit einer 289-fachen

Steigerung der RPKM-Werte von 50 auf 14379. Doxorubicin reguliert, auf der anderen Seite, nur einige wenige miRNAs mit relativen Wertänderungen zwischen -3 bis +2. Interessanterweise sind Doxorubicin-regulierte miRNAs je zur Hälfte hoch- bzw. herunterreguliert. Die insgesamt 24 durch Doxorubicin regulierten miRNAs entsprechen 3,2% des untersuchten miRNoms (**Abb. 4.8C, Tab. 4.3**).

4.2.3 Hochregulation von miR-494 und miR-369-5p in 5-aza-dC- und Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen

Sowohl in der Microarray-Expressionsanalyse als auch der Sequenzierungsanalyse werden ausschließlich zwei miRNAs, miR-494 und miR-369-5p, in HepG2-Zellen über 5-aza-dC und Doxorubicin gleichsam reguliert (**Tab. 4.4 bis Tab. 4.6**).

Tab. 4.4: Signalintensitäten von miR-494 und miR-369-5p in 5-aza-dC oder Doxorubicin behandelten HepG2-Zellen

Tab. 4.5: RPKM-Werte von miR-494 und miR-369-5p in 5-aza-dC behandelten HepG2-Zellen

Tab. 4.6: Signalintensitäten von miR-494 und miR-369-5p in unbehandelten primären humanen Hepatozyten (PHH)

Die Tab. 4.4 zeigt die Signalintensitäten des Microarrays und Tab. 4.5 die RPKM-Werte der Sequenzierung der von 5-aza-dC [10 µM] und Doxorubicin [100 nM] gleich regulierten miRNAs miR-369-5p und miR-494 nach einer 48-stündigen Behandlung. Tab. 4.6 zeigt die Signalwerte der entsprechenden miRNAs in unbehandelten PHHs (engl. primary human hepatocytes).

Tab. 4.4: Signalintensitäten von 5-aza-dC oder Doxorubicin behandelten HepG2-Zellen								
miRNA	5-aza-dC [10µM]				Doxorubicin [100nM]			
	Kontrolle	5-aza-dC	Relative Änderung	Regulation	Kontrolle	Doxorubicin	Relative Änderung	Regulation
miR-494	53	5406	143	up	67	125	2.0	up
miR-369-5p	62	430	15	up	95	151	1.5	up

Tab. 4.5: RPKM-Werte von 5-aza-dC [µM] behandelten HepG2-Zellen				
miRNA	Kontrolle	5-aza-dC	Relative Änderung	Regulation
miR-494	1	428	567	up
miR-369-5p	2	503	503	up

Tab. 4.6: Signalintensitäten von miR-494 und miR-369-5p in primären Hepatozyten (PHH)	
miRNA	Signalintensitäten
miR-494	110
miR-369-5p	92

In der Microarray-Expressionsanalyse sind die Signalintensitäten von miR-494 und miR-369-5p um das 143- bzw. 15-fache durch 5-aza-dC hochreguliert (**Tab. 4.4**). Die Sequenzierungsanalyse zeigt für beide miRNAs Resultate mit relativen

Wertänderungen um das 567- bzw. 503-fache (**Tab. 4.5**). Doxorubicin reguliert miR-494 und miR-369-5p um das 2- bzw. 1,5-fache. Beide miRNAs sind sowohl in unbehandelten HepG2-Zellen als auch in primären Hepatozyten nur gering exprimiert (**Tab. 4.6**). Um die Hochregulation von miR-494 in HepG2-Zellen über 5-aza-dC und Doxorubicin zu quantifizieren, wurde eine qPCR durchgeführt. Wie in **Abb. 4.9** ersichtlich ist, zeigten sich die von der Firma Qiagen verwendeten Primer jedoch unspezifisch. Nach dem Auftragen der qPCR-Proben auf ein Elektrophorese-Gel (**Abb. 4.9A**) wurden mehrere Banden sowohl in der Kontrolle als auch in den Behandlungen sichtbar. Dies deutet auf eine Vervielfältigung mehrerer Nukleinsäure-Produkte hin. Zudem hat der Peak der dazugehörigen Schmelzkurve eine Schulter (**Abb. 4.9B**). Anders ausgedrückt ist die Schmelzkurve zweihügelig und nach rechts verschoben. Auch dies deutet auf das Vorhandensein mehrerer Nukleinsäureprodukte hin. Da zwei unabhängige Methoden, die Microarray-Expressionsanalyse und die moderne Sequenzierungsanalyse, eine deutliche Hochregulation von miR-494 anzeigen, ist von einem technischen Versagen der eingesetzten Primer in diesem Fall auszugehen.

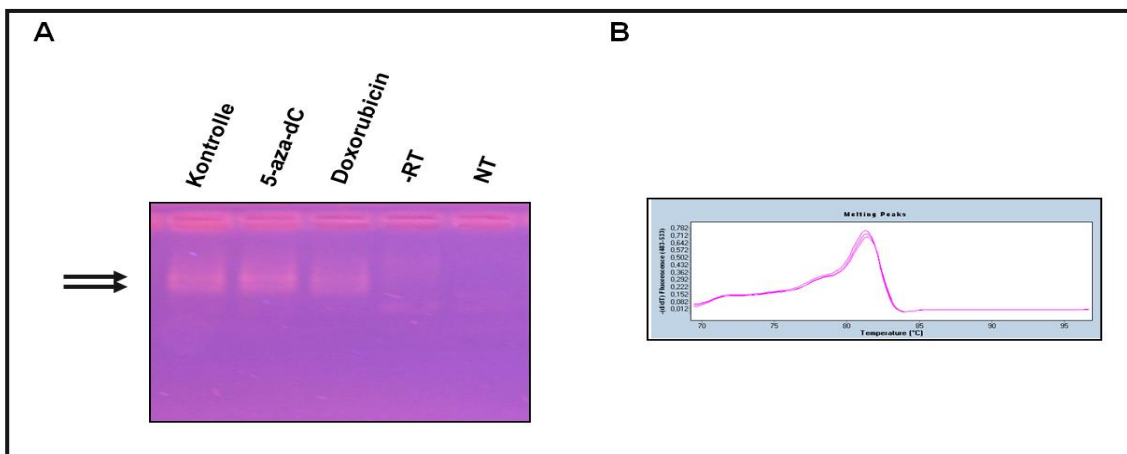


Abb. 4.9: Reinheitskontrolle der qPCR von miR-494 mittels Auftragen der qPCR-Proben auf ein Elektrophorese-Gel (A) und Betrachten der Schmelzkurve (B) in 5-aza-dC und Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden nach einer 48-stündigen Inkubation mit 5-aza-dC einer RNA-Isolation, RT-PCR und qPCR unterzogen. Reinheitskontrollen im Rahmen der durchgeführten Gelelektrophorese (A) sind „NT“ (engl. no transcript, kein Transkript) und „-RT“ (bis auf Reverse Transkription alle Schritte durchgeführt).

4.2.4 Modulation der Zellproliferation und Induktion eines Seneszenz-ähnlichen Zustandes über miR-494 in HepG2-Zellen

Um die Funktion von miR-494 und miR-369-5p besser zu verstehen und zu charakterisieren, wurden künstlich hergestellte miRNAs, sog. Mimics, in einer finalen Konzentration von 25 nM in HepG2-Zellen mittels Lipofektion transfiziert. Die somit transfizierten HepG2-Zellen zeigten eine signifikante Abnahme in der Proliferation mit Mimic-494 (**Abb. 4.10A**, **Tab. 4.7**, $p = 0.0057$). Auf dieser Grundlage wurde ein β Gal-Assay mit Mimic-494-transfizierten Zellen durchgeführt. Dadurch sollte überprüft werden, ob über diese spezifische Überexpression auch eine SA- β Gal-Modulation und Ausprägung eines seneszenten Phänotyps moduliert wird. Die in **Abb. 4.10B** und **4.10C** ersichtlichen Ergebnisse demonstrieren, dass eine Überexpression von Mimic-494, aber nicht von Mimic-369-5p, eine Veränderung des Phänotyps herbeiführt und zu einem Anstieg der SA- β Gal-Aktivität in HepG2-Zellen führt. Die Kombination von Mimic-494 mit 5-aza-dC führt hingegen nicht zu einer weiteren Proliferationshemmung oder Steigerung der SA- β Gal-Aktivität. Eine Kombination von Mimic-494 und Mimic-369-5p zeigte nach Transfektion, keinen Effekt, der über die alleinige Transfektion von Mimic-494 hinausgeht (Daten nicht gezeigt). Somit können diese Experimente einer unter den Behandlungen mit 5-aza-dC und Doxorubicin hochregulierten miRNA eine Seneszenz-induzierende Wirkung zuschreiben.

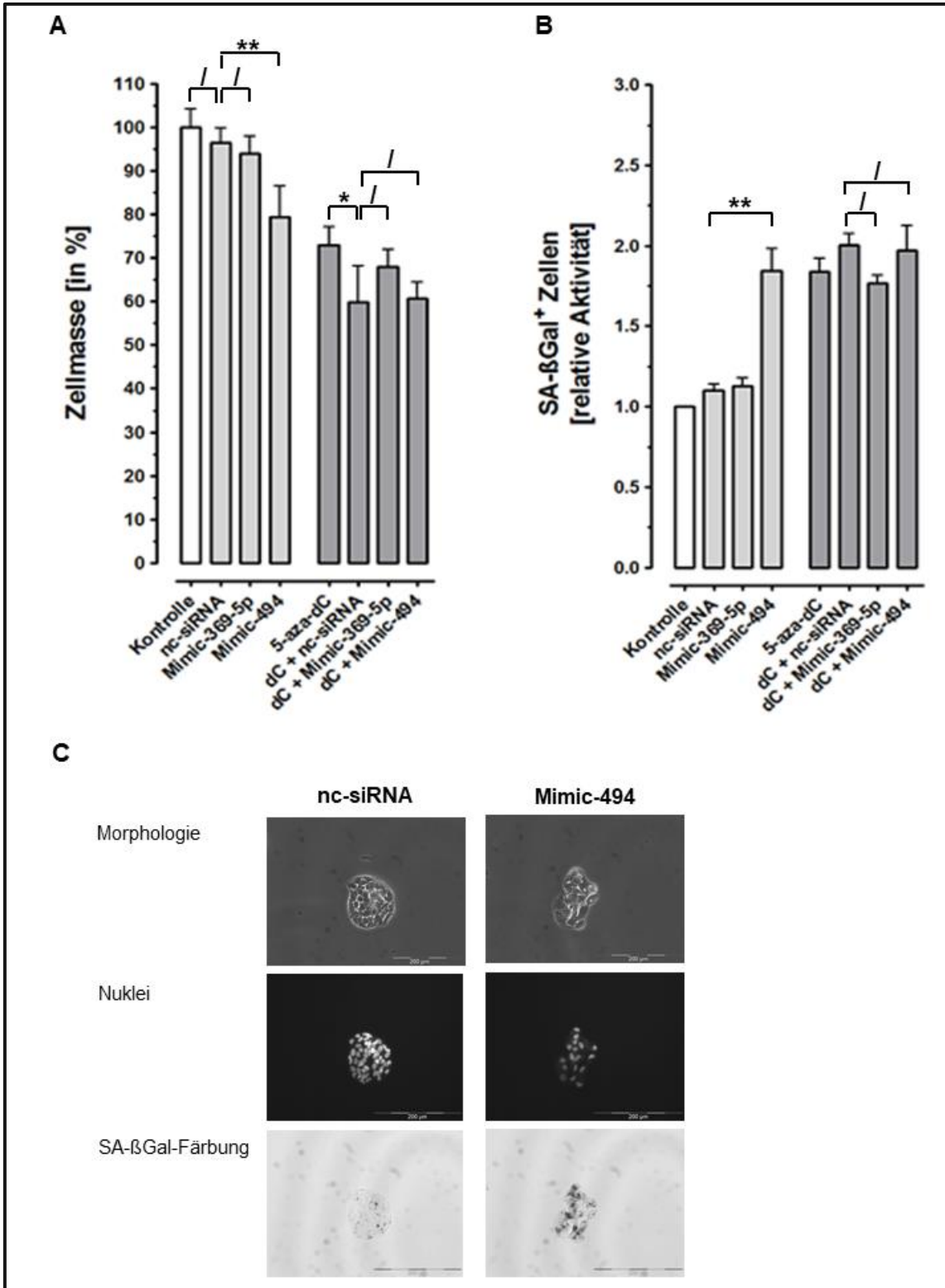


Abb. 4.10: Effekte einer Mimic-494- bzw. 369-5p-vermittelten Transfektion auf die Proliferation und SA-βGal-Aktivität von HepG2-Zellen

Reverse Transfektion von HepG2-Zellen mit Mimic [25 nM] oder nc-siRNA (engl. non-coding) [25 nM]. 6 Stunden (h) nach initialer Transfektion wurden die Transfektionskomplexe entfernt und später eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 μM] begonnen. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. Es wurden ein SRB-Assay zur Messung der Zellmasse (A) und ein βGal-Assay zur Bestimmung der SA-βGal-Aktivität (B) durchgeführt sowie repräsentative Bilder angefertigt (C). Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 μm. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

Tab. 4.7: Effekte einer Mimic-494 bzw. 369-5p Transfektion auf die Proliferation von HepG2-Zellen

Reverse Transfektion von HepG2-Zellen mit Mimic [25 nM] oder nc-siRNA (engl. non-coding) [25 nM]. 6 Stunden (h) nach initialer Transfektion wurden die Transfektionskomplexe entfernt und später eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 µM] begonnen. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. Die präsentierten Daten entsprechen den Zahlenwerten der Abb. 4.11A und somit den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

Tukey's Test	Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanzniveau	p-Werte
Kontrolle vs. nc-siRNA	100 +/- 3,9	96,5 +/- 3,2	/	0,9786
Kontrolle vs. 5-aza-dC	100 +/- 3,9	72,9 +/- 4,1	****	< 0,0001
nc-siRNA vs. Mimic-369-5p	96,5 +/- 3,2	94,1 +/- 3,6	/	0,997
nc-siRNA vs. Mimic-494	96,5 +/- 3,2	79,4 +/- 6,6	**	0,0057
nc-siRNA vs. dC + nc-siRNA	96,5 +/- 3,2	58,9 +/- 7,8	****	< 0,0001
nc-siRNA vs. dC + Mimic-369-5p	96,5 +/- 3,2	67,9 +/- 3,8	****	< 0,0001
nc-siRNA vs. dC + Mimic-494	96,5 +/- 3,2	60,3 +/- 6,6	****	< 0,0001
Mimic-369-5p vs. dC + nc-siRNA	94,1 +/- 3,6	58,9 +/- 7,8	****	< 0,0001
Mimic-369-5p vs. dC + Mimic-369-5p	94,1 +/- 3,6	67,9 +/- 3,8	****	< 0,0001
Mimic-369-5p vs. dC + Mimic-494	94,1 +/- 3,6	60,3 +/- 6,6	****	< 0,0001
Mimic-494 vs. dC + nc-siRNA	79,4 +/- 6,6	58,9 +/- 7,8	***	0,001
Mimic-494 vs. dC + Mimic-369-5p	79,4 +/- 6,6	67,9 +/- 3,8	/	0,1011
Mimic-494 vs. dC + Mimic-494	79,4 +/- 6,6	60,3 +/- 6,6	**	0,0021
5-aza-dC vs. dC + nc-siRNA	72,9 +/- 4,1	58,9 +/- 7,8	*	0,0284
5-aza-dC vs. dC + Mimic-369-5p	72,9 +/- 4,1	67,9 +/- 3,8	/	0,8713
5-aza-dC vs. dC + Mimic-494	72,9 +/- 4,1	60,3 +/- 6,6	/	0,0593
dC + nc-siRNA vs. dC + Mimic-369-5p	58,9 +/- 7,8	67,9 +/- 3,8	/	0,2945
dC + nc-siRNA vs. dC + Mimic-494	58,9 +/- 7,8	60,3 +/- 6,6	/	> 0,9999
dC + Mimic-369-5p vs. dC + Mimic-494	67,9 +/- 3,8	60,3 +/- 6,6	/	0,4917

4.2.5 Effekt von miR-494 auf die 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierte Wachstumshemmung und Seneszenzinduktion

Um die Effekte einer Inhibition von miR-494 in 5-aza-dC und Doxorubicin-behandelten Zellen zu untersuchen, wurden Experimente mittels AntagomiRs mit einer finalen Konzentration von 100 nM durchgeführt durchgeführt. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die Hochregulation von miR-494 unter 5-aza-dC oder Doxorubicin ein kritischer Faktor für die Seneszenz-Induktion darstellt. Es konnte über die AntagomiR-Transfektion jedoch hierbei kein signifikanter Effekt auf die 5-aza-dC induzierte Proliferationshemmung (**Abb. 4.11A**) oder SA-βGal-Aktivität (**Abb. 4.11B**) herbeigeführt werden konnte. Die AntagomiRs in **Abb. 4.11A** und **4.11B** wurden über das Biotechnologieunternehmen Qiagen bezogen. Um die erzielten Ergebnisse weiter unabhängig zu validieren, wurde der βGal-Assay mit

AntagomiRs eines zweiten Unternehmens, Ambion Biotechnologies, wiederholt (Abb. 4.11C).

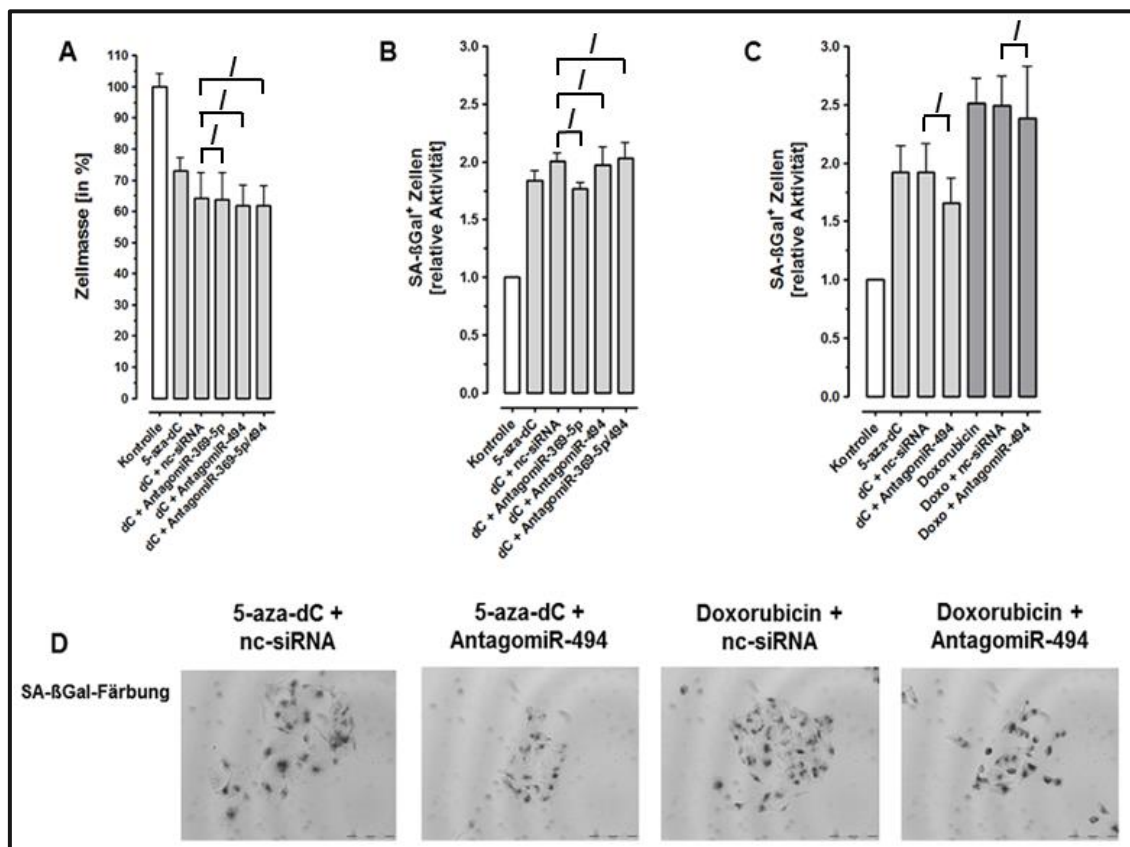


Abb. 4.11: Effekte einer AntagomiR-494 und AntagomiR-369-5p-Transfektion auf die 5-aza-dC- oder Doxorubicin-induzierte Proliferationsminderung (A) und SA-βGal-Aktivität (B-D) von HepG2-Zellen

Transfektion von HepG2-Zellen mit AntagomiR [100 nM] oder nc-siRNA (engl. non-coding) [100 nM]. In (A) und (B) Verwendung von AntagomiRs der Firma Qiagen mit Durchführung einer reversen Transfektion und Entfernung der Transfektionskomplexe 6 Stunden (h) nach initialer und Beginn einer Inkubation mit 5-aza-dC [10 μM] oder Doxorubicin [100 nM] nach weiteren 24h. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. In (C) Verwendung von AntagomiRs der Firma Ambion Biotechnologies mit „forward“-Transfektion nach Herstelleranleitung und Beginn der 72-stündigen Inkubation mit 5-aza-dC [10 μM] und Doxorubicin [100 nm] unmittelbar nach dem für die Transfektion benötigten Mediumwechsels. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 μm. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05. In (A) – (C) ist das Signifikanzniveau der AntagomiR-transfizierten Zellen mit der jeweiligen, hierzu passenden Kontrolle angegeben.

(A) Proliferationshemmung quantifiziert mittels SRB-Assay (AntagomiR der Firma Qiagen)

(B) βGal-Assay (AntagomiR der Firma Qiagen)

(C) βGal-Assay (AntagomiR der Firma Ambion Biotechnologies)

(D) SA-βGal-Färbung von AntagomiR-494 oder nc-siRNA transfizierten HepG2-Zellen unter Behandlung mit 5-aza-dC oder Doxorubicin (AntagomiR der Firma Ambion Biotechnologies)

Hier zeigte sich bei 5-aza-dC im Gegensatz zu Doxorubicin eine leichte, statistisch nicht signifikante Reduktion der SA-βGal-Färbung (p = 0,866). Somit scheint entweder die Hemmung von miR-494 durch AntagomiRs technisch nicht ausreichend effektiv gewesen zu sein oder die durch 5-aza-dC und Doxorubicin induzierte TIS in HepG2-Zellen wird durch einen multifaktoriellen Prozess reguliert, in der miR-494 keinen essentiellen Faktor darstellt. Weitere

Experimente zu diesem Thema wurden nicht durchgeführt, eine alternative Hemmung von miR-494 stand im Rahmen der Promotionsarbeit nicht zur Verfügung.

4.2.7 miR-494: Ist die Proliferationshemmung und Seneszenz durch die Zellzyklus-regulierenden Proteine Cdk4/6 vermittelt?

Die Zellzyklus-regulierenden Proteine Cdk4/6 (engl. cyclin-dependent kinase) gelten als validierte Zielstrukturen von miR-494 und als potentielle Zielstrukturen einer Tumorthherapie [319, 320]. Es stellte sich daher im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob die beobachteten Reaktionsmuster von Hepatomzellen ebenfalls auf eine Modulation von Cdk4/6 zurückgeführt werden können. Der spezifische Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib (PD0332991) zeigte in einer Publikation von Anders et al. eine Wachstumshemmung und eine Erhöhung der SA- β Gal-Modulation von Zelllinien verschiedener Tumorentitäten [321]. Eine Inhibition von Cdk 4/6 und deren Potential einer Proliferationsminderung und Seneszenzinduktion zeigte sich in weiteren Zelllinien verschiedener Entitäten [78, 320, 322, 323]. Cdk4/6 sind an der Zellzyklus-Regulation und dem G1-Checkpoint über das Retinoblastom-Protein (Rb) beteiligt [78]. Rivadeneira et al. zeigten in Hepatomzelllinien, dass Palbociclib trotz eines Rb-Knockdowns wachstumshemmend wirken kann [296]. In Hep3B-Zellen wirkt der Inhibitor bei deletiertem Rb jedoch nicht, dementsprechend wird in dieser Zelllinie von weiteren Mutationen und Dysregulationen von Signalwegen ausgegangen [296]. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden aus diesem Grund nur HepG2-Zellen mit Palbociclib behandelt. Es wurden hierbei die in der Literatur verwendeten Konzentrationen von 500 nM und 1 μ M übernommen. Als interessantes Ergebnis zeigte sich, dass Palbociclib in den jeweiligen Konzentrationen eine Wachstumshemmung und eine Verstärkung der SA- β Gal-Färbung hervorruft (**Abb. 4.12**). Bei Konzentrationen von 1 μ M sind die Effekte jeweils ähnlich denen von 500 nM. In Kombination mit 5-aza-dC ist eine zusätzliche, jedoch nicht signifikante Wachstumshemmung ersichtlich (**Abb. 4.12A**). Die SA- β Gal-Färbung ist sowohl bei 5-aza-dC als auch Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen in der Kombinationsbehandlung nicht signifikant

stärker ausgeprägt als bei einer alleinigen Behandlung mit Palbociclib (Abb. 4.12B).

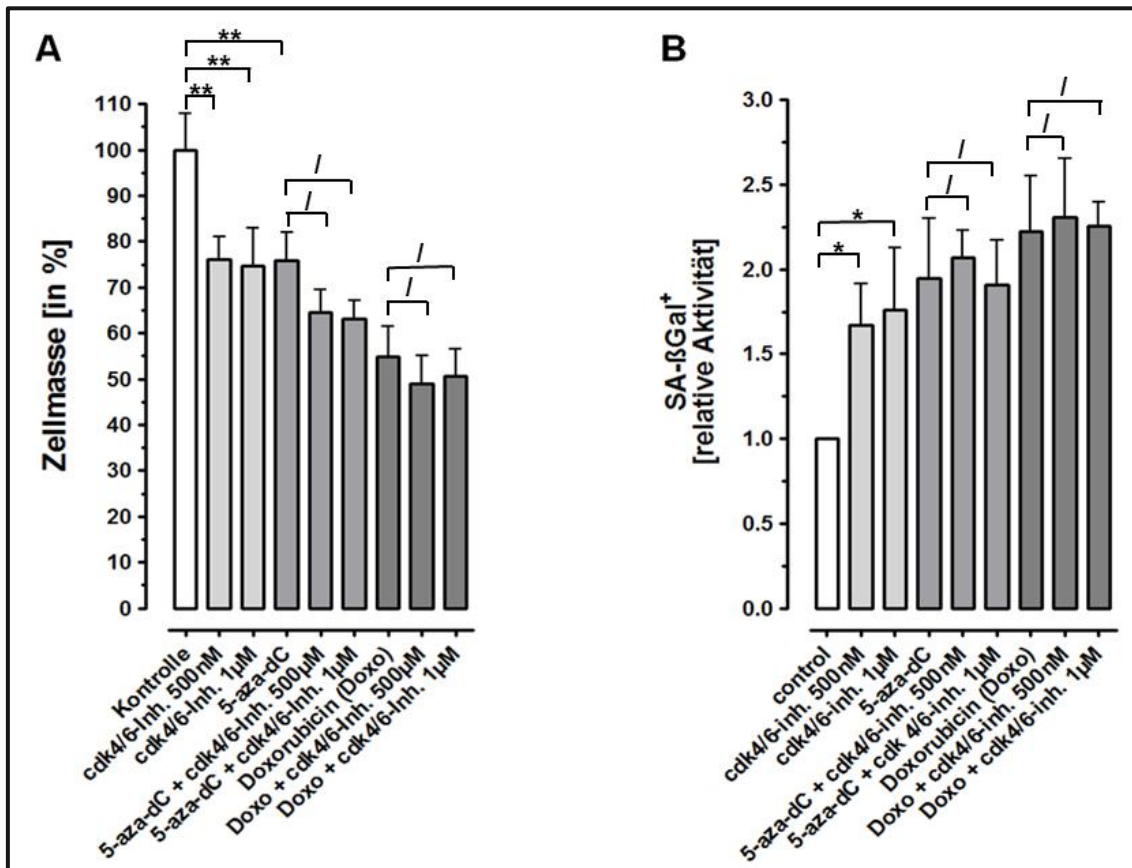


Abb. 4.12: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib alleine und in Kombination mit 5-aza-dC oder Doxorubicin auf die Proliferation (A) und SA-βGal-Aktivität (B) auf HepG2-Zellen

Behandlung von HepG2-Zellen mit dem Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib in Konzentrationen von 500 nM oder 1 μM alleine und als Kombinationsbehandlung mit 5-aza-dC [10 μM] oder Doxorubicin [100 nM] für insgesamt 72 Stunden. Anschließend Durchführung eines SRB-Assay (A) zur Proliferationsmessung und ein SA-βGal-Assay (B). Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

Tab. 4.8: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib alleine und in Kombination mit 5-aza-dC oder Doxorubicin auf die Proliferation auf HepG2-Zellen

Behandlung von HepG2-Zellen mit dem Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib in Konzentrationen von 500 nM oder 1 µM alleine und als Kombinationsbehandlung mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] für insgesamt 72 Stunden.

Anschließend Durchführung eines SRB-Assay Die präsentierten Daten entsprechen den Zahlenwerten der Abb. 4.13A und somit den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

Tukey's Test	Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanz- niveau	p-Werte
Kontrolle vs. cdk4/6-Inh. 500nM	100 +/- 7,4	76,1 +/- 4,8	**	0,0041
Kontrolle vs. cdk4/6-Inh. 1µM	100 +/- 7,4	74,8 +/- 7,8	**	0,0024
Kontrolle vs. 5-aza-dC	100 +/- 7,4	75,9 +/- 5,7	**	0,0038
Kontrolle vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 500µM	100 +/- 7,4	64,6 +/- 4,6	****	< 0,0001
Kontrolle vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 1µM	100 +/- 7,4	63 +/- 3,8	****	< 0,0001
Kontrolle vs. Doxorubicin (Doxo)	100 +/- 7,4	54,8 +/- 6,2	****	< 0,0001
Kontrolle vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 500µM	100 +/- 7,4	48,9 +/- 5,7	****	< 0,0001
Kontrolle vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 1µM	100 +/- 7,4	50,5 +/- 5,9	****	< 0,0001
cdk4/6-Inh. 500nM vs. cdk4/6-Inh. 1µM	76,1 +/- 4,8	74,8 +/- 7,8	/	> 0,9999
cdk4/6-Inh. 500nM vs. 5-aza-dC	76,1 +/- 4,8	75,9 +/- 5,7	/	> 0,9999
cdk4/6-Inh. 500nM vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 500µM	76,1 +/- 4,8	64,6 +/- 4,6	/	0,4124
cdk4/6-Inh. 500nM vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 1µM	76,1 +/- 4,8	63 +/- 3,8	/	0,2595
cdk4/6-Inh. 500nM vs. Doxorubicin (Doxo)	76,1 +/- 4,8	54,8 +/- 6,2	*	0,0119
cdk4/6-Inh. 500nM vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 500µM	76,1 +/- 4,8	48,9 +/- 5,7	**	0,0011
cdk4/6-Inh. 500nM vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 1µM	76,1 +/- 4,8	50,5 +/- 5,9	**	0,0021
cdk4/6-Inh. 1µM vs. 5-aza-dC	74,8 +/- 7,8	75,9 +/- 5,7	/	> 0,9999
cdk4/6-Inh. 1µM vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 500µM	74,8 +/- 7,8	64,6 +/- 4,6	/	0,5601
cdk4/6-Inh. 1µM vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 1µM	74,8 +/- 7,8	63 +/- 3,8	/	0,3774
cdk4/6-Inh. 1µM vs. Doxorubicin (Doxo)	74,8 +/- 7,8	54,8 +/- 6,2	*	0,0202
cdk4/6-Inh. 1µM vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 500µM	74,8 +/- 7,8	48,9 +/- 5,7	**	0,0019
cdk4/6-Inh. 1µM vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 1µM	74,8 +/- 7,8	50,5 +/- 5,9	**	0,0036
5-aza-dC vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 500µM	75,9 +/- 5,7	64,6 +/- 4,6	/	0,427
5-aza-dC vs. 5-aza-dC + cdk4/6-Inh. 1µM	75,9 +/- 5,7	63 +/- 3,8	/	0,2705
5-aza-dC vs. Doxorubicin (Doxo)	75,9 +/- 5,7	54,8 +/- 6,2	*	0,0126
Doxorubicin (Doxo) vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 500µM	54,8 +/- 6,2	48,9 +/- 5,7	/	0,9579
Doxorubicin (Doxo) vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 1µM	54,8 +/- 6,2	50,5 +/- 5,9	/	0,9939
Doxo + cdk4/6-Inh. 500µM vs. Doxo + cdk4/6-Inh. 1µM	48,9 +/- 5,7	50,5 +/- 5,9	/	> 0,9999

Abb. 4.13 zeigt die Morphologie, Nuklei und SA-βGal-Färbung der mit dem Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib behandelten HepG2-Zellen. Im Vergleich zu einer Behandlung mit 5-aza-dC oder Doxorubicin zeigt sich bei Palbociclib ebenfalls eine starke, signifikante SA-βGal-Färbung bei zunächst nur geringer morphologischer Änderung nach dreitägiger Behandlung. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Beobachtungszeitraum nach Inkubation mit Palbociclib verlängert. Im Verlauf des verlängerten Beobachtungszeitraum zeigten sich etwas ausgeprägtere morphologische Veränderungen, jedoch wurde durch eine einmalige Gabe von Palbociclib kein terminaler Wachstumarrest induziert. Werden HepG2-Zellen jedoch kontinuierlich über neun Tage mit Palbociclib behandelt, wird deren Proliferation gehemmt (**Abb. 4.14**).

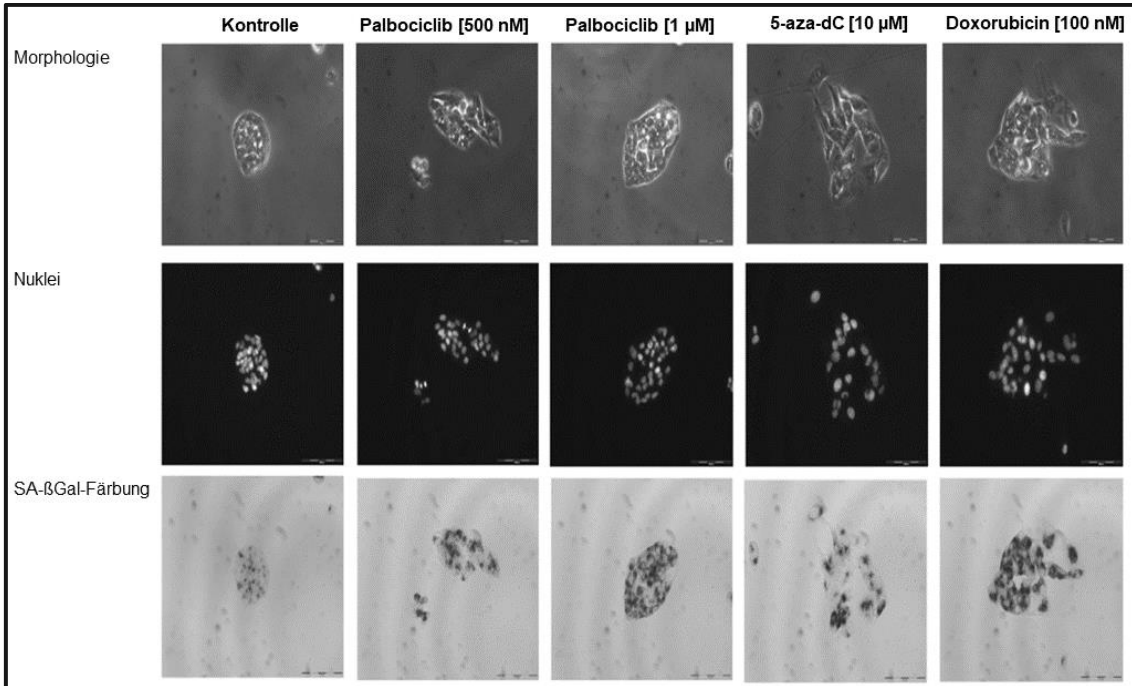


Abb. 4.13: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib auf die Morphologie und SA-βGal-Aktivität von HepG2-Zellen
 Behandlung von HepG2-Zellen mit dem Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib in Konzentrationen von 500 nM oder 1 µM alleine und als Kombinationsbehandlung mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] für insgesamt 72 Stunden. Anschließend Durchführung eines SA-βGal-Assays. Die Bilder sind repräsentativ für die Versuchsreihe. Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 µm.

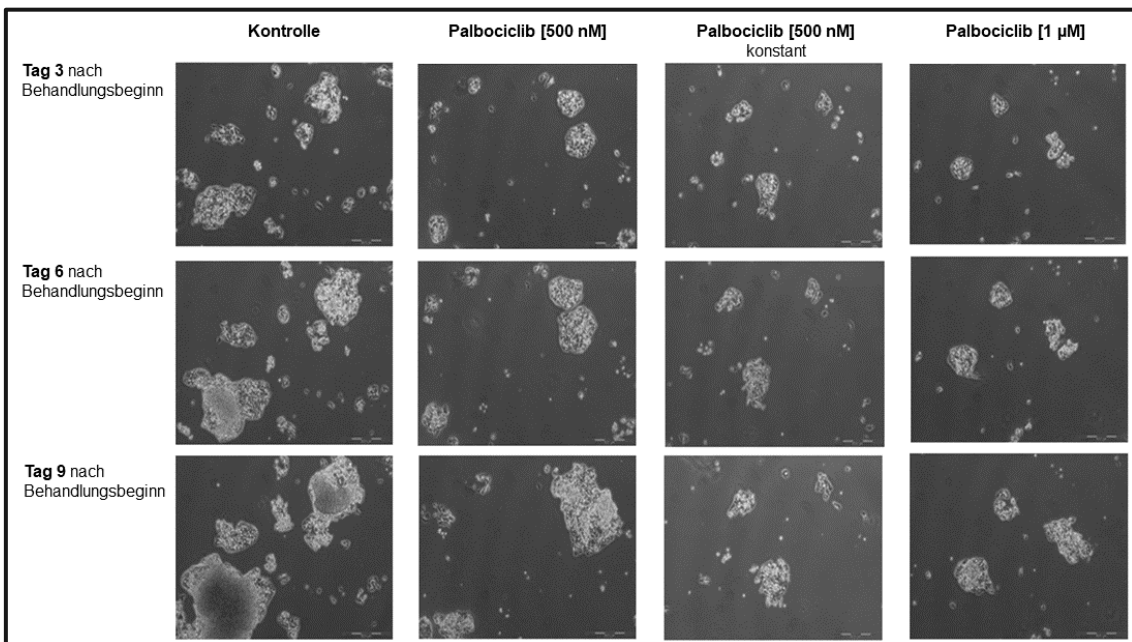


Abb. 4.14: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib auf die Morphologie und das Wachstum von HepG2-Zellen über 9 Tage
 Behandlung von HepG2-Zellen mit dem Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib in Konzentrationen von 500 nM oder 1 µM. Die Zellen wurden mit der Substanz zunächst für die ersten 72 Stunden (h) kultiviert. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Kultivierung entweder ohne weitere Behandlung weitergeführt oder die HepG2-Zellen wurden mit dem Mediumwechsel auch neu behandelt (CDK4/6-Inh. konstant). Die präsentierten Bilder sind repräsentativ für die Versuchsreihe. Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 500 µm.

Abb. 4.15 zeigt den direkten Vergleich von HepG2-Zellen mit jeweils initialer Behandlung mit Palbociclib [1 μM], 5-aza-dC [10 μM] und Doxorubicin [100nM] über einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 9 Tage. Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes zeigt sich bei den HepG2-Zellen mit initialer Palbociclib eine zunehmende Zellvermehrung im Sinne eines temporären Wachstumsstoppes. Die Inhibition von Cdk4/6 führt jedoch zu einzelnen Eigenschaften seneszenten Zellen wie eine erhöhte SA- β Gal-Färbung. In Zusammenschau mit den im Rahmen in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimenten zeigt sich also, dass die Zielstruktur Cdk4/6 nicht als Hauptfaktor der 5-aza-dC und Doxorubicin induzierten Seneszenz gelten kann.

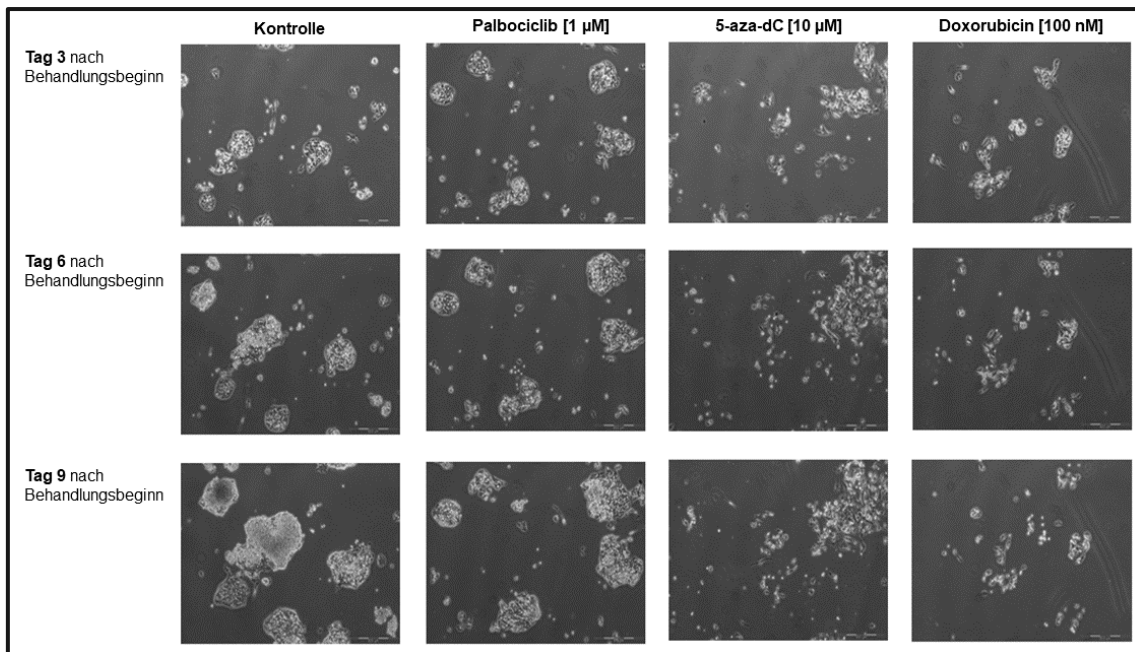


Abb. 4.15: Effekte des Cdk4/6-Inhibitors Palbociclib [1 μM] auf die Morphologie und das Wachstum in HepG2-Zellen im Vergleich zu 5-aza-dC [10 μM] und Doxorubicin [100 nM] über 9 Tage
HepG2-Zellen wurden entweder mit 5-aza-dC [10 μM], Doxorubicin [100 nM] oder dem Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib [1 μM] für insgesamt 72 Stunden (h) kultiviert. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt ohne die jeweilige Behandlung weiterzuführen. Repräsentative Bilder der Versuchsreihe. Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 500 μm .

4.2.8 Induktion eines G1-Arrests in HepG2-Zellen über den Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib

Um die Wirkung von Palbociclib [500 nM] in HepG2-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels FACS durchgeführt. Während der Vergleich von unbehandelten Zellen zu Palbociclib, 5-aza-dC- oder kombinatorisch behandelten Zellen keine wesentlichen Änderungen in der Zellzyklusverteilung ergeben, kommt es bei der Kombination von Palbociclib mit

Doxorubicin zu einer Verschiebung in Richtung G1-Phase von dem unter Doxorubicin induzierten G2-Arrest (**Abb. 4.16**). Außerdem zeigt sich in der FACS-Analyse, dass der sub2N-Anteil als Apoptose-Marker in der Kombination von Doxorubicin und Palbociclib im Vergleich zu Doxorubicin alleine an Tag 6 der Behandlung verringert ist. Dies deutet auf unterschiedlich bedingte Wachstumshemmungen beider Substanzen im Zellzyklus hin.

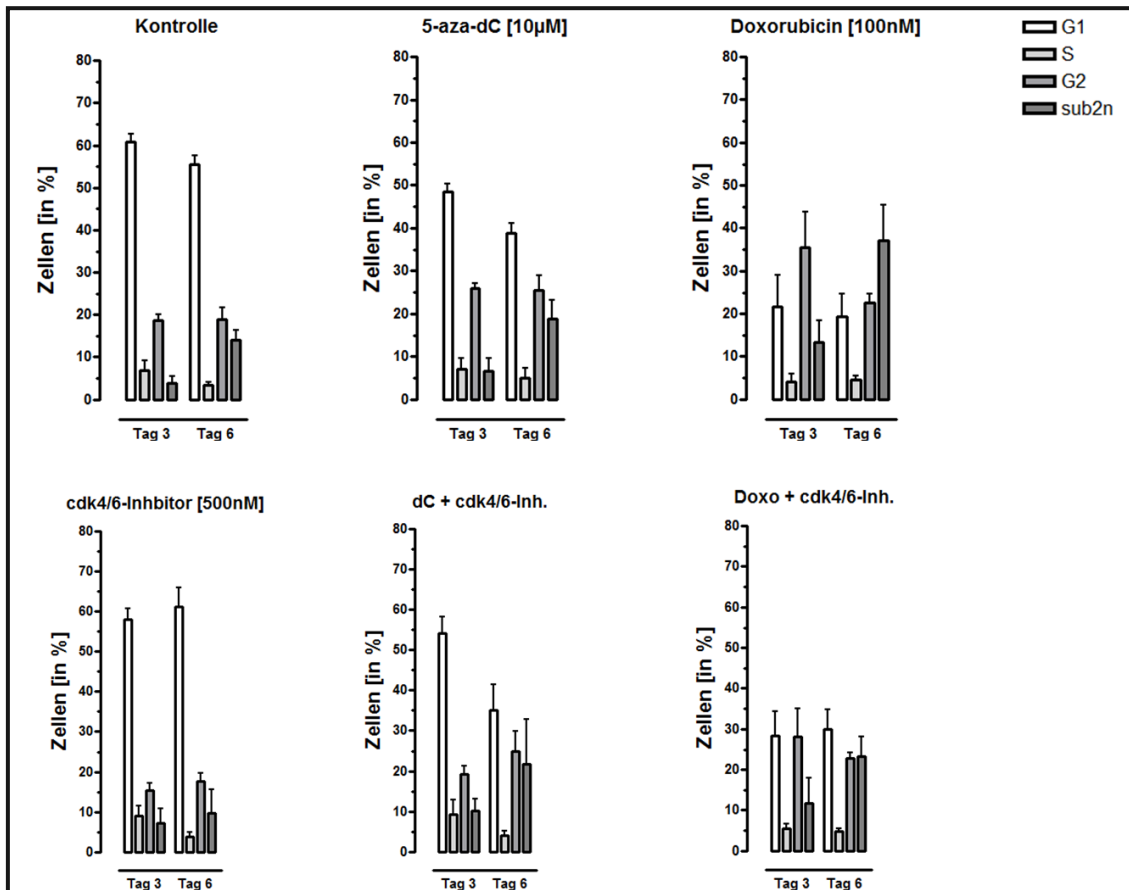


Abb. 4.16: Vergleich der Zellzyklusverteilung in HepG2-Zellen nach Behandlung mit 5-aza-dC [10 µM] und Doxorubicin [100 nM] alleine oder in Kombination mit dem Cdk4/6-Inhibitor Palbociclib [500 nM] für drei bzw. sechs Tage

HepG2-Zellen wurden in 24-well Platten mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] für drei oder sechs Tage kultiviert und anschließend mittels Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Fluoreszenz einzelner Kerne wurde mit der Durchflusszytometrie mittels FACSCalibur (Becton Dickinson) gemessen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD).

4.3 Die Rolle der HDAC4-Inhibition in der Proliferationshemmung und Seneszenzinduktion in Hepatomzelllinien

4.3.1 Verminderung des HDAC4-Gehalts in HCC-Zelllinien nach einer Behandlung mit 5-aza-dC oder Doxorubicin

Um den Einfluss der Substanzen 5-aza-dC (Decitabin) und Doxorubicin auf spezifische Regulatoren der Histonacetylierung zu untersuchen, wurde HDAC4 ausgewählt. Dieses HDAC der Klasse IIa ist typischerweise im HCC hochreguliert [48, 127, 128]. Eine Behandlung der Zelllinien HepG2 und Hep3B mit 5-aza-dC und Doxorubicin mit den in den Vorexperimenten Seneszenz-induzierenden zeigte jeweils eine deutlich verminderte Proteinexpression von HDAC4 in beiden behandelten Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abb. 4.17**).

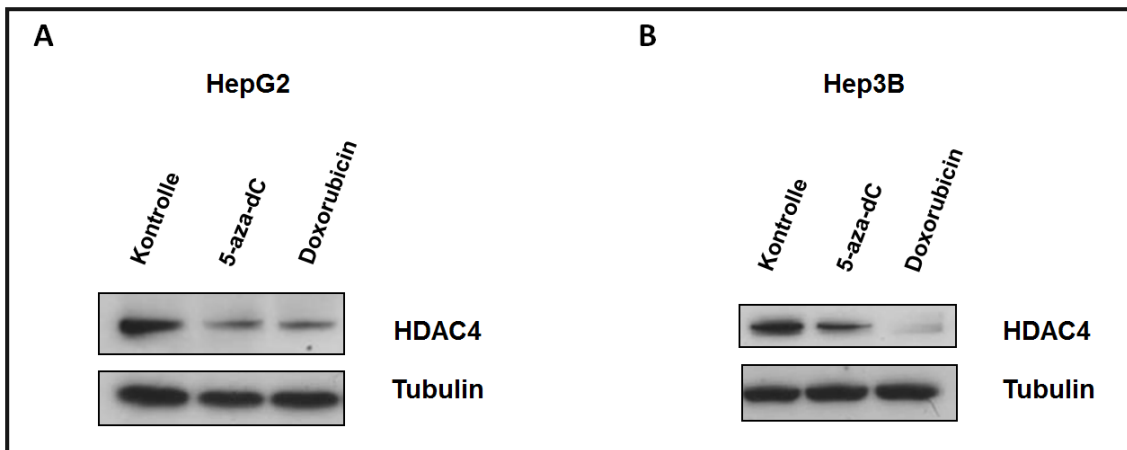


Abb. 4.17: Western Blot-Analyse von HDAC4 in 5-aza-dC- [10 μ M] oder Doxorubicin- [100 nM] behandelten HepG2- und Hep3B-Zellen

Nach 72 Stunden wurden Zellextrakte von 5-aza-dC [10 μ M] oder Doxorubicin [100 nM] behandelten HepG2- (A) und Hep3B-Zellen (B) auf den Proteingehalt von HDAC4 mittels Western Blot untersucht. Als Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung diente die Detektion von Tubulin auf demselben Blot.

4.3.2 Nachahmung von 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierter Effekte mittels siRNA-vermitteltem HDAC4-Knockdown in HepG2-Zellen

Sowohl 5-aza-dC als auch Doxorubicin bewirken eine Reduktion der Proteinmenge von HDAC4 (**Abb. 4.17**). Um festzustellen, ob diese Herunterregulation ein Begleitphänomen oder potentiell auslösender Faktor der 5-aza-dC und Doxorubicin induzierten Seneszenz ist, sollte untersucht werden, ob ein spezifischer HDAC4-Knockdown mittels siRNA vergleichbare Effekte auf die Proliferationshemmung und SA- β Gal-Färbung von HepG2-Zellen hervorrufen kann. Der zeitliche Endpunkt der Experimente war wie bei den vorhergehenden

Experimenten 72 Stunden nach Behandlungsbeginn mit 5-aza-dC oder Doxorubicin.

Wie die **Abb. 4.18A, 4.18C** und **Tab. 4.9** veranschaulichen, führt ein siRNA-vermittelter Knockdown der endogenen HDAC4-Expression zu einer starken, signifikanten Inhibition des Zellwachstums und einer verstärkten SA-βGal-Expression in HepG2-Zellen, vergleichbar zum Proliferations-hemmenden und SA-βGal-induzierenden Niveau von 5-aza-dC. Über einen spezifischen HDAC4-Knockdown können somit mit 5-aza-dC und Doxorubicin phänotypisch vergleichbare Effekte erzielt werden.

Tab. 4.9: Effekte eines siRNA-vermittelten Knockdowns von HDAC4 auf die Proliferation von HepG2-Zellen
Reverse Transfektion von HDAC4- oder nc-siRNA (engl. non-coding) [100 nM] in HepG2-Zellen. Vier Stunden (h) nach initialer Transfektion wurden die Transfektionskomplexe entfernt und eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 μM] oder Doxorubicin [100 nM] begonnen. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. Die präsentierten Daten entsprechen den Zahlenwerten der Abb. 4.19A und somit den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

Tukey's Test	Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanzniveau	p-Werte
Kontrolle vs. nc-siRNA	100 +/- 4,2	94,6 +/- 7,9	/	0,7739
Kontrolle vs. HDAC4-siRNA	100 +/- 4,2	63,9 +/- 9,5	***	0,0001
Kontrolle vs. 5-aza-dC	100 +/- 4,2	75,2 +/- 3,3	**	0,0026
Kontrolle vs. Doxorubicin	100 +/- 4,2	56,2 +/- 3,7	****	< 0,0001
nc-siRNA vs. HDAC4-siRNA	94,6 +/- 7,9	63,9 +/- 9,5	***	0,0005
nc-siRNA vs. 5-aza-dC	94,6 +/- 7,9	75,2 +/- 3,3	*	0,014
nc-siRNA vs. Doxorubicin	94,6 +/- 7,9	56,2 +/- 3,7	****	< 0,0001
HDAC4-siRNA vs. 5-aza-dC	63,9 +/- 9,5	75,2 +/- 3,3	/	0,1906
HDAC4-siRNA vs. Doxorubicin	63,9 +/- 9,5	56,2 +/- 3,7	/	0,5106
5-aza-dC vs. Doxorubicin	75,2 +/- 3,3	56,2 +/- 3,7	*	0,0157

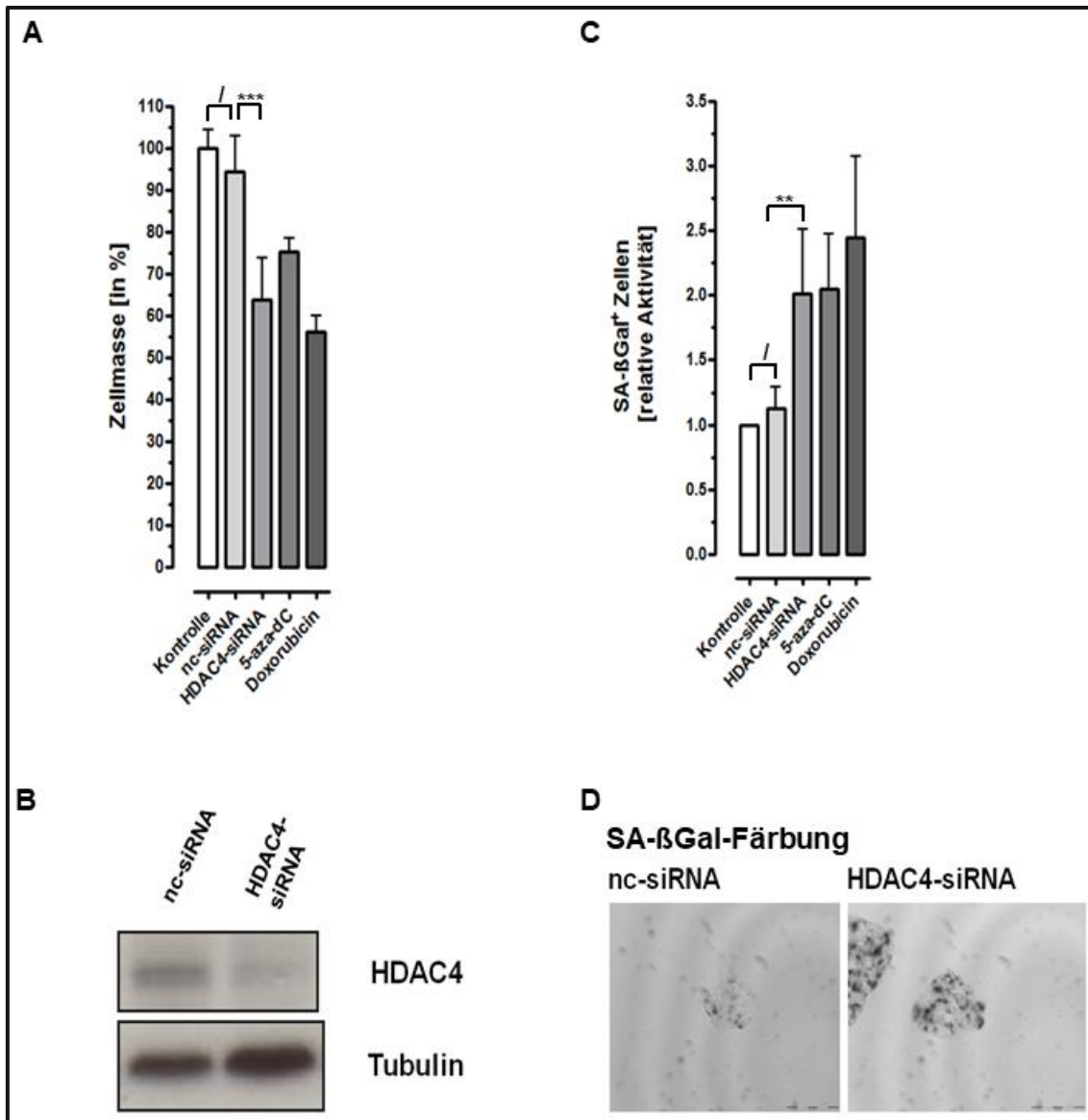


Abb. 4.18: Effekte eines siRNA-vermittelten Knockdowns von HDAC4 auf HepG2-Zellen

Reverse Transfektion von HDAC4- oder nc-siRNA (engl. non-coding) [100 nM] in HepG2-Zellen. Vier Stunden (h) nach initialer Transfektion wurden die Transfektionskomplexe entfernt und eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] begonnen. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 µm. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05. In (A) und (C) ist das Signifikanzniveau der HDAC4-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (nc-siRNA transfizierten Zellen) sowie der nc-siRNA-transfizierten Zellen zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

- (A) Proliferationshemmung quantifiziert mittels SRB-Assay
- (B) Proteinexpression von HDAC4 mittels Western-Blot bei einem siRNA-vermittelten Knockdown 48h nach initialer Transfektion als Kontrolle der inhibitorischen Effizienz
- (C) βGal-Assay
- (D) SA-βGal-Färbung von nc-siRNA oder HDAC4-siRNA transfizierten HepG2-Zellen

4.3.3 Reduktion der 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierten SA- β Gal-Aktivität mittels einer HDAC4-Überexpression in HepG2-Zellen

In Kapitel 4.3.2 wurde gezeigt, dass ein siRNA-vermittelter HDAC4-Knockdown mit den 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierenden Effekten phänotypisch weitgehend vergleichbar ist. Daher sollte überprüft werden inwieweit eine HDAC4-Überexpression mittels Plasmidtransfektion, die über die beiden Substanzen verstärkte SA- β Gal-Färbung abschwächen kann. **Abb. 4.19** zeigt, dass eine HDAC4-Überexpression eine tendenzielle Abschwächung der 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierten SA- β Gal-Färbung hervorruft. Dieses Ergebnis weist zusammen mit den zuvor durchgeführten Versuchen darauf hin, dass die Modulation von HDAC4 an der Entstehung einer TIS durch 5-aza-dC und Doxorubicin beteiligt sein könnte.

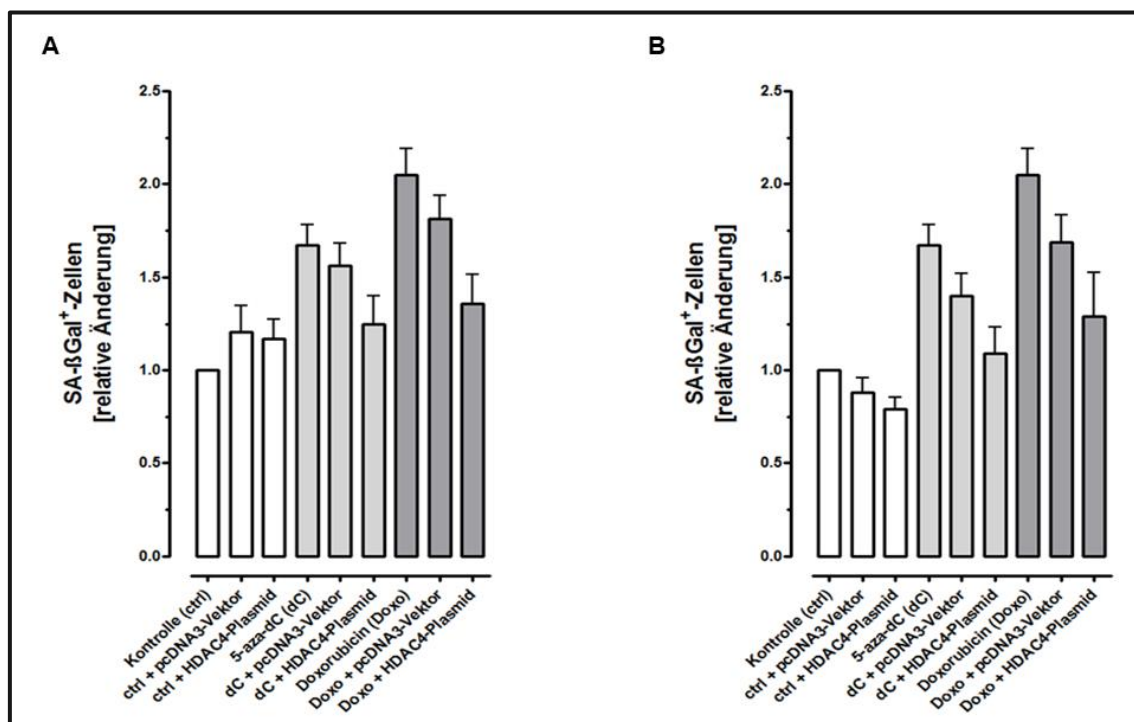


Abb. 4.19: Effekte einer HDAC4-Überexpression auf die SA- β Gal-Färbung von 5-aza-dC oder Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden entweder mit 4 μ g pcDNA3-Leervektor oder 4 μ g pcDNA3 HDAC4-Plasmid transfiziert. Sowohl (A) als auch (B) entsprechen zwei unabhängigen Auswertungen desselben Versuchsaufbaus, welche über einen Abstand von mehreren Monate erfolgte. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD) und zeigen eine relative Änderung der SA- β Gal-Aktivität.

4.3.4 Proliferationsinhibition und Induktion eines Seneszenz-ähnlichen Zustandes mittels miR-1-vermitteltem HDAC4-Knockdown in HepG2-Zellen

Auf der Suche nach Faktoren, die zu einer Regulation von HDAC4 beitragen können, erfolgte aufgrund der Beobachtung, dass HDAC4 eine Zielstruktur von miR-1 darstellt, die weitere Untersuchung der Rolle einer möglichen miR-1 Regulation durch 5-aza-dC und Doxorubicin [128].

Die Proliferation von miR-1-transfizierten HepG2-Zellen ist im Vergleich zur Transfektionskontrolle signifikant reduziert (**Abb. 4.20A, Tab. 4.10**). Um darüberhinausgehend einen Zusammenhang zwischen der 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierten Seneszenz herstellen zu können, haben wir die Abhängigkeit einer Seneszenzinduktion durch miR-1 in einem SA-βGal Assay untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die miR-1-induzierte Proliferationshemmung mit einer Modulation der SA-βGal-Expression einhergeht (**Abb. 4.20C und 4.20D**). Während die Kombination aus 5-aza-dC und miR-1 nicht zu einer vermehrten SA-βGal-Aktivität führte, wurde auf Proliferationsebene ein verstärkter Kombinationseffekt sichtbar (**Abb. 4.20A und 4.20C, Tab. 4.10**).

Tab. 4.10: Effekte einer miR-1 Überexpression auf die Proliferation von HepG2-Zellen

Reverse Transfektion von miR-1- oder nc-siRNA (engl. non-coding-siRNA) [25 nM] in HepG2-Zellen. 6h nach initialer Transfektion wurden die Transfektionskomplexe entfernt und eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 μM] oder Doxorubicin [100 nM] begonnen. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. Die präsentierten Daten entsprechen den Zahlenwerten der Abb. 4.21 und somit den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05.

Tukey's Test	Mittelwert +/- Standardabweichung		Signifikanzniveau	p-Werte
Kontrolle vs. nc-siRNA	100 +/- 3,8	93,3 +/- 4,4	/	0,7433
Kontrolle vs. 5-aza-dC	100 +/- 3,8	78,1 +/- 2,9	**	0,0074
nc-siRNA vs. miR-1	93,3 +/- 4,4	75,5 +/- 5,8	*	0,0303
nc-siRNA vs. 5-aza-dC + nc-siRNA	93,3 +/- 4,4	69,1 +/- 7,3	**	0,0034
nc-siRNA vs. 5-aza-dC + miR-1	93,3 +/- 4,4	58,7 +/- 8,1	***	0,0001
miR-1 vs. 5-aza-dC + nc-siRNA	75,5 +/- 5,8	69,1 +/- 7,3	/	0,7732
miR-1 vs. 5-aza-dC + miR-1	75,5 +/- 5,8	58,7 +/- 8,1	*	0,0427
5-aza-dC vs. 5-aza-dC + nc-siRNA	78,1 +/- 2,9	58,7 +/- 8,1	/	0,478
5-aza-dC + nc-siRNA vs. 5-aza-dC + miR-1	69,1 +/- 7,3	58,7 +/- 8,1	*	0,0128

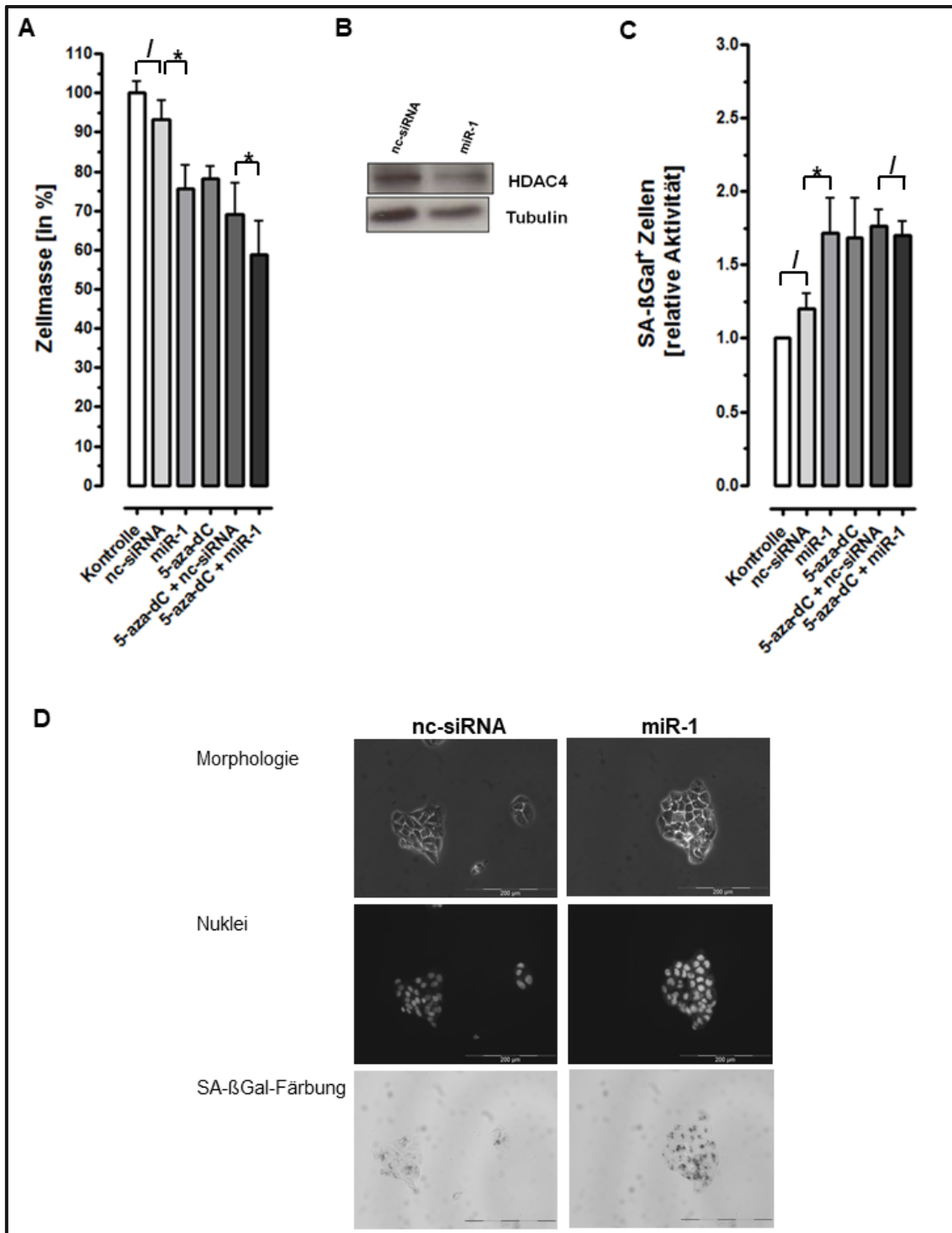


Abb. 4.20: Effekte einer miR-1 Überexpression auf HepG2-Zellen

Reverse Transfektion von miR-1- oder nc-siRNA (engl. non-coding-siRNA) [25 nM] in HepG2-Zellen 6h nach initialer Transfektion wurden die Transfektionskomplexe entfernt und eine Inkubation mit 5-aza-dC [10 µM] oder Doxorubicin [100 nM] begonnen. Die HepG2-Zellen wurden anschließend für 72h kultiviert. Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Balkengröße innerhalb der Bilder entspricht 200 µm. Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001, „/“ p > 0,05. In (A) und (C) ist das Signifikanzniveau der miR-1 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (nc-siRNA transfizierten Zellen) sowie der nc-siRNA-transfizierten Zellen zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

(A) Proliferationshemmung quantifiziert mittels SRB-Assay

(B) Proteinexpression von HDAC4 mittels Western-Blot bei einem miR-1-vermittelten Knockdown nach 48h als Kontrolle der inhibitorischen Effizienz

(C) βGal-Assay

(D) SA-βGal-Färbung von nc-siRNA oder miR-1-transfizierten HepG2-Zellen

4.3.5 Expressionsänderungen von miR-1 und HDAC4 mittels qPCR

Da der Proteingehalt von HDAC4 durch eine Behandlung der Seneszenz-induzierenden Substanzen 5-aza-dC und Doxorubicin vermindert wird, sollte in einem weiteren Versuch sowohl die Expressionsänderung von miR-1 als auch die Expressionsänderung der HDAC4-mRNA nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung der jeweiligen Substanz mittels qPCR überprüft werden. Zu erwähnen ist, dass weder der durchgeführte Microarray noch der Ansatz einer vertieften Sequenzierungsanalyse eine Regulation von miR-1 in unbehandelten oder 5-aza-dC- bzw. Doxorubicin-behandelten HepG2-Zellen aufzeigten. In der qPCR dienten Glyceinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase (GADPH) als endogene Kontrolle für HDAC4 und die cDNA-Expression von RNU44 für miR-1. RNU44 ist eine sog. snoRNA, die typischerweise als endogene Kontrolle für eine miRNA-Expression verwendet wird. Die qPCR zeigt eine signifikant erhöhte Expression von miR-1 nach einer 48-stündigen Behandlung sowohl von 5-aza-dC als auch von Doxorubicin ($p < 0,01$), **Abb. 4.21A**. Darüberhinaus zeigt sich ebenfalls eine signifikante Expressionsreduktion der HDCA4-mRNA unter einer Behandlung mit 5-aza-dC nach 24 und 48 Stunden ($p < 0,01$), **Abb. 4.21B**.

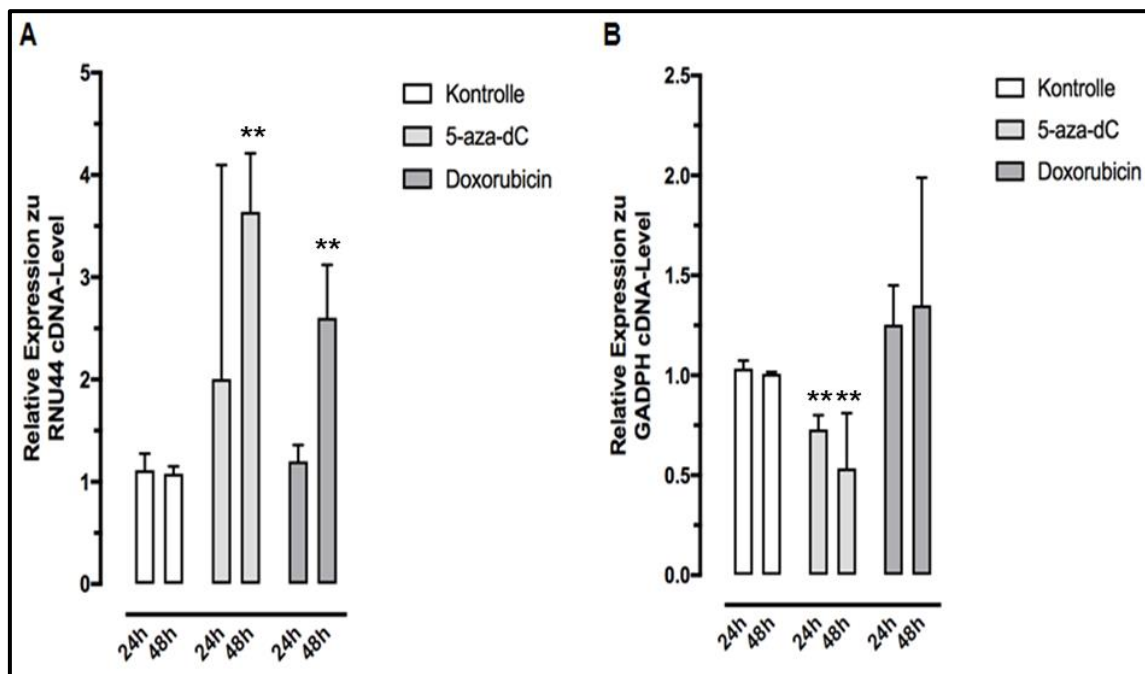


Abb. 4.21: Vergleich der Expression von miR-1 und HDAC4 unter Behandlung von 5-aza-dC und Doxorubicin in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mit 5-aza-dC [10 μ M] oder Doxorubicin [100 nM] für die miR1-Expressionsanalyse (A) und für die HDAC4-mRNA Expressionsanalyse (B) für 24 und 48h behandelt. Die präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten und der Standardabweichung (SD). Vier verschiedene p-Werte wurden für das Signifikanzniveau festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. In (A) und (B) ist das Signifikanzniveau der jeweils behandelten Zellen zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

5. Diskussion

Viele Tumorthapeutika lösen heterogene Reaktionen aus, darunter Apoptose, Seneszenz und andere Formen des Zelltods. Ein Ziel aktueller Tumorforschung und -therapie ist es, Medikamente zu entwickeln, die in homogener Weise zelluläre Seneszenz in Tumoren induzieren [78]. Epigenetische Erkenntnisse können bei Entwicklungen von Wirkstoffen und Wirkstoffkombinationen beitragen, die im Rahmen einer Strategie der Präzisionsmedizin eingesetzt werden können [96]. Epigenetische Zielstrukturen und Regulationsmechanismen bieten hierbei angesichts der schier unendlichen Anzahl vieler potenzieller Ansätze [81]. Da aktuelle Systemtherapien beim HCC im palliativen Status im Durchschnitt nur zu einer Überlebensverlängerung weniger Monate führen zeigt den Bedarf an neuartigen Zielstrukturen und Therapien [4].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei epigenetisch wirkende, Seneszenz-induzierende Zielstrukturen in Hepatomzelllinien aufgedeckt. Hierzu gehören miR-494 und miR-1 als posttranskriptionale Regulatoren und HDAC4, eine Histondeacetylase der Klasse IIa. Diese Zielstrukturen werden von den Seneszenzauslösenden Substanzen 5-aza-dC (DMNTi) und dem klassischen Chemotherapeutikum Doxorubicin (Topoisomerase II-Inhibitor) trotz primär unterschiedlichem Wirkmechanismus gleichsinnig reguliert.

5.1 miRNom-Regulation mittels 5-aza-dC und Doxorubicin

Das miRNom bildet ein komplexes Netzwerk mit vielen Überschneidungen und einer Vielzahl regulierter Proteine und Signalwege [82, 83]. Ausgehend von der Überlegung, dass eine miRNom-Regulation an der Entwicklung eines seneszenten Phänotyps und der Fähigkeit einer Therapie-induzierten Seneszenz (TIS) beteiligt sein könnte, wurde das miRNom der Hepatomzelllinie HepG2 unter einer Behandlung von 5-aza-dC und Doxorubicin mit ihren grundlegend unterschiedlichen Wirkmechanismen untersucht. Auffallend zeigte sich ein deutlich stärkerer Einfluss von 5-aza-dC auf das miRNom. Als mögliche Erklärung kommt der demethylierende Effekt von 5-aza-dC und die darauf konsequente Freilegung von Promotoren in Frage. Ausschließlich zwei miRNAs,

miR-494 und miR-369-5p, wurden durch beide Substanzen in den durchgeführten Microarrays gemeinsam und auch gleichsinnig reguliert. Im Gegensatz zu miR-494, finden sich für miR-369-5p weder in den in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimenten als auch in der Literatur Hinweise auf einen Proliferationsarrest in Tumorzellen.

5.1.1 miR-494

5.1.1.1 Potential einer Therapie-induzierten Seneszenz (TIS) über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen

miR-494 wurde als eine in der Hepatomzelllinie HepG2 durch 5-aza-dC und Doxorubicin hochregulierte miRNA identifiziert. Der antitumorale Effekt der Seneszenz-induzierenden Substanzen konnte durch eine alleinige Transfektion des Mimic-494 nachgeahmt werden.

Im HCC ist keine signifikante Herunterregulation von miR-494 im Vergleich zu nicht-tumorösem Gewebe nachweisbar, da die basale Expression sehr gering ist [217]. Dies ist vereinbar mit den im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Microarray-Daten. In den Pankreaskarzinom-Zelllinien BxPC-3 und Capan-1 ist miR-494 in der näheren Umgebung einer CpG-Insel gelegen und wird über eine epigenetische Behandlung mit dem HDACi TSA und der demethylierenden Substanz 5-aza-dC hochreguliert [324]. Vergleichbare Effekte durch 5-aza-dC in Hepatomzelllinien sind denkbar. Die Herunterregulation von miR-494 gegenüber nicht-entartetem Normalgewebe und der pro-seneszente Effekt von miR-494 in HepG2-Zellen zeigen, dass miRNAs das therapeutische Potential einer zielgerichteten Therapie bzw. einer TIS über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen besitzen.

Interessanterweise ist miR-494 auch in vielen anderen Tumorentitäten im Vergleich zu nicht-entartetem Gewebe herunterreguliert. Beispiele sind Zelllinien des Cholangiokarzinoms [319, 325], des ösophagealen Adenokarzinoms [326], des Prostatakarzinoms [327], des Ovarialkarzinoms und der squamös-zelligen Kopf-Hals-Tumore [328]. Je nach Zelllinie und Tumorentität sind unterschiedliche und auch gegenteilige Effekte mittels einer miR-494-Überepression beschrieben. Dies ist einerseits durch eine Variabilität der miRNA- und mRNA-Expression zwischen unterschiedlichen Zellen und Gewebearten und andererseits über die

Vielzahl an Zielstrukturen einer miRNA erklärbar. Eine Überexpression von miR-494 zeigte eine antitumorale Wirkung in mehreren Tumorzelllinien und Entitäten. In Cholangiokarzinomzellen führt eine Überexpression zu einem Zellzyklusarrest [319, 325]. In gastrointestinalen Stromazelltumoren besteht eine inverse Korrelation zwischen miR-494 und der Expression der Rezeptor-Tyrosin-Kinase KIT. MiR-494 führt hierbei zu einer Proliferationsinhibition und ahmt damit den Effekt der aktuellen Standardtherapie von Imatinib nach [329]. Darüber hinaus wird in der alveolären Adenokarzinom-Zelllinie A549 und der humanen Fibroblastenzelllinie IMR90 über eine DNA schädigende Wirkung Seneszenz induziert [330, 331]. Espinosa-Diez et al. konnten zeigen, dass über eine Bestrahlung von Mammakarzinom-Zellen eine Überexpression von mir-494 induziert wird [332]. Im entsprechenden Mammakarzinom-Mausmodell führt miR-494 zu einem verminderten Tumorwachstum, einer reduzierten Tumorangio-genese und einer verminderten Anzahl von Lungenmetastasen [332]. Hingegen wird in anderen Tumorzelllinien und Entitäten der maligne Phänotyp über eine Überexpression von miR-494 gefördert. Hierzu gehören die Lungenkarzinom-Zelllinie NH460, die Glioblastom-Zelllinie U-251 und die Endometriumkarzinomzelllinien HHUA und JEC [333-335].

In der Literatur wurde miR-494 eine regulatorische Rolle des Tumorsuppressors PTEN [336], HDAC1 [319], der Zellzyklusregulatoren Cdk 4/6 [319], der Rezeptor-Tyrosin-Kinase KIT, der Topoisomerase 2A [325] und sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Faktoren [337, 338] zugeordnet. Als interessante Zielstruktur wurde von die Zellzyklusregulatoren Cdk 4/6 über einen spezifischen Inhibitor Palbociclib supprimiert. Cdk4/6 können eine Rolle in der Seneszenzinduktion spielen und sind potentielle Zielstrukturen einer Tumorthherapie [78, 320, 322, 323]. Trotz initial bestehender Proliferationsminderung der Hepatomzelllinie HepG2, konnte durch den Inhibitor kein terminaler Wachstumsarrest induziert werden. Interessanterweise zeigen Experimente von Yoshida et al., dass ein terminaler Wachstumsarrest in Melanomzelllinien nur über eine längerfristige Inhibition von Cdk4/6 über 8 Tage induziert wird [323]. Eine Testung und selektive Inhibition weiterer Zielstrukturen von miR-494 wäre Ziel weiterer Experimente, die den Rahmen dieser

Promotionsarbeit jedoch übersteigen. Zusammenfassend zeigt sich, dass miR-494 das therapeutische Potential einer zielgerichteten Therapie bzw. einer TIS für einzelne Tumorentitäten besitzt.

5.1.1.2 Bewertung der AntagomiR-494-Transfektion

Wäre miR-494 essentiell für den von 5-aza-dC als auch von Doxorubicin induzierten Wachstumsstopp und die Seneszenzinduktion, könnte theoretisch eine Inhibition von miR-494 diesen rückgängig machen oder abschwächen. Trotz mehrfacher Transfektionsversuche eines AntagomiRs konnte dies jedoch nicht gezeigt werden. Hierbei ist jedoch vorauszusetzen, dass die AntagomiR-Transfektion erfolgreich war und funktionelle Aktivität entwickelt hat. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde zur Überprüfung einer technisch erfolgreichen Transfektion zusätzlich eine fluoreszierende siRNA als Kontrolle transfiziert. Trotzdem besteht keine Sicherheit, dass tatsächlich eine funktionelle Wirksamkeit der Transfektion bestand. Betrachtet man insbesondere die durch 5-aza-dC regulierte Vielzahl an miRNAs, erscheint es möglich, dass durch eine Hemmung von miR-494 alleine nicht der erwartete Effekt einer Abschwächung der Seneszenz erreicht werden kann, da zu viele einzelne Komponenten in der komplexen Regulation mit eingreifen dürften. Zusätzlich gibt es eine Vielzahl miRNA-unabhängiger Effekte der beiden eingesetzter Substanzen 5-aza-dC und Doxorubicin, wie eine sog. „DNA damage response“ (engl. Gesamtheit aller zellulären Mechanismen, die nach einem DNA-Schaden aktiviert werden) und eine Modulation weiterer epigenetischer Mechanismen, wie die Regulation von HDAC4.

5.1.2 Modulation weiterer, ausgewählter miRNAs durch 5-aza-dC und Doxorubicin

Unabhängig von den in dieser Promotionsarbeit weitergehend überprüften miRNAs ist besonders bei 5-aza-dC allein aufgrund der Menge aller regulierten miRNAs von weiteren, an wichtigen Signalwegen beteiligten miRNAs auszugehen. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass in den Expressionsanalysen weitere, potentiell relevante miRNAs durch Doxorubicin

und 5-aza-dC reguliert werden, und in weiteren Experimenten einer genaueren Untersuchung bedürften. Dadurch besteht das Potential noch weitere proliferationshemmende und Seneszenz-induzierende miRNAs aufzudecken. Eine dieser interessanten miRNAs ist miR-483, die als einzige von 5-aza-dC in der Sequenzierungsanalyse herunterreguliert wird mit RPKM-Werten von 26381 auf 12975. Diese ist in circa 30% aller von Veronese et al. getesteter Kolon-, Brust- und Lebertumore stark bis sehr stark exprimiert [207]. Das Zellwachstum von HepG2-Zellen in vitro wurde durch eine spezifische Inhibition von miR-483 zwischen 30-40% gehemmt [207]. Zusätzlich zeigten in vivo Experimente eine signifikante Reduktion der Anzahl und Größe induzierter Tumore im Vergleich zur Kontrolle [207]. Eine weitere interessante miRNA ist miR-127, welche in der Sequenzierungsanalyse mit einer 289-fachen Steigerung der RPKM-Werte von 50 auf 14379 hochreguliert wird. Saito et al. haben 2006 die epigenetische Ruhigstellung von miR-127 in 75% aller getesteter Tumorzelllinien beschrieben [339]. Eine potentielle Zielstruktur von miR-127 ist das Proto-Onkogen BCL-6. BCL-6 kann die durch DNA-Schäden induzierte Apoptose in den Reifungszentren der B-Zellen regulieren [339]. In der HCC-Zelllinie MHCC97H führte eine Überexpression von miR-127, welche typischerweise auch in HCC herunterreguliert ist, zu einer Inhibition der Zellmigration, der Invasion und des Tumorwachstums in vivo im Xenograft-Modell [340].

miR-26a ist bezüglich der relativen Expressions- bzw. Wertänderung (engl. fold change) die am stärksten herunterregulierte miRNA mit Änderungen der Signalstärke von 847 auf 302 durch Doxorubicin. Die Rolle von miR-26a in der Karzinogenese ist nicht einheitlich beschrieben, da sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Effekte in Tumoren in der Literatur berichtet werden [341-347]. Yang et al. zeigten 2013, dass miR-26a wiederkehrend im HCC herunterreguliert ist und dies mit einer schlechten Prognose korreliert [343]. In den getesteten HCC-Zelllinien HCC-LM3 und MHCC97-H induzierte miR-26a einen G1-Arrest und Apoptose in vitro, und auch in vivo konnte miR-26a das Tumorwachstum hemmen. In der Studie Jin et al. sensitiviert eine Überexpression von miR-26 Hepatomzelllinien auf das Chemotherapeutikum Doxorubicin und fördert die Apoptose [348]. Yang et al. berichten, dass HepG2-Zellen im Vergleich zu

anderen HCC-Zelllinien eine relativ hohe Expression an miR-26a aufweisen [343]. Wird miR-26a in HepG2-Zellen und PLC-Zellen (engl. primary liver cells, primäre humane Hepatozyten) ausgenockt, führt dies zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation [343]. Die Abnahme von miR-26a im Microarray durch Doxorubicin ist also zunächst eine primär widersprüchliche Regulation.

5.2 HDAC4

Die epigenetische Reprogrammierung spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der zellulären Seneszenz und des Alterns. Es ist bekannt, dass wichtige epigenetische Modulatoren der Seneszenz und der Zellalterung während des Beginns der Seneszenz herunterreguliert werden [349-351]. In diesem Zusammenhang wurde auch ein Beitrag von HDACs der Klasse IIa in der Literatur diskutiert [352-354]. Darüberhinaus können Dysregulationen von HDACs der Klasse IIa zur Entstehung von Krebs und anderen Krankheiten beitragen [355, 356]. Di Giorgio et al. untersuchten als Modell für die Alterung und replikativen Seneszenz die Konzentrationen von HDACs der Klasse IIa in der Dermis und in der Leber von jungen (4 Monate) und alten (25 Monate) weiblichen Mäusen [354]. Die Proteinexpression von HDAC4 und HDAC9 sinkt sowohl in der gealterten Dermis als auch in der Leber. Weitere Studien zeigen, dass HDAC4 in Leber-Normalgewebe im Vergleich zu anderen Gewebearten typischerweise deutlich geringer exprimiert ist und dass im HCC eine HDAC4-Überexpression vorliegt [48, 128, 357].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte interessanterweise eine Abnahme des HDAC4-Gehaltes in den Hepatomzelllinien HepG2 und Hep3B durch die Seneszenzauslösenden Substanzen 5-aza-dC und Doxorubicin gezeigt werden. Neben den in dieser Promotiosarbeit verwendeten Sustanzen führt in der Literatur auch die demethylierende Substanz 5-Azazytidin zu einer Abnahme des Proteingehalts von HDAC4 in HCC-Zelllinien [128]. Datta et al. beschreiben diese Abnahme als ein Mechanismus von 5-Azazytidin in der Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion in HCC-Zelllinien [285, 358]. 5-Azazytidin interferiert mit der Proteinbiosynthese und blockiert diese über einen Einbau in RNA [153, 169]. Liu et al. führten Versuche mit den Proteinbiosynthese-Inhibitoren Actinomycin

und Cyclohexamid durch, die innerhalb von 12 Stunden zu einer fast vollständigen Abnahme von HDAC4 in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten führten. Ursächlich hierfür ist, dass HDAC4 und die dazugehörige mRNA im Gegensatz zu anderen HDACs über eine sehr kurze Halbwertszeit von weniger als 8 bzw. 4 Stunden verfügt [359]. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass eine Abnahme von HDAC4 in Tumorzellen lange vor Veränderungen der Zellmorphologie oder Zeichen eines Zelltods stattfindet [359]. Die Wirkung von Doxorubicin auf HDAC4 könnte ebenfalls durch einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese zu erklären sein [360]. 5-aza-dC hingegen stört vom Wirkmechanismus die Proteinbiosynthese primär nicht. Dennoch kommt es überraschend ebenfalls zu einer sehr starken Abnahme des HDAC4-Gehalts in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. Liu et al. und Paroni et al. zeigten, dass HDAC4 Restriktionsschnittstellen für Caspasen besitzt und eine HDAC4-Degradierung mittels eines Caspase 3-Inhibitors unter Behandlung von Cyclohexamid oder UV-Bestrahlung stark vermindert wird [359, 361]. Da 5-aza-dC im Gegensatz zu 5-Azacytidin in HepG2- und Hep3B-Zellen selbst in hohen Konzentrationen nicht zu einer Caspase 3- oder 7-Aktivierung führt und nicht apoptotisch wirkt, kann auch dieser Mechanismus der HDAC4-Degradierung für 5-aza-dC ausgeschlossen werden [285].

Zusammenfassend kann im Kontext der Literatur kein gemeinsamer Mechanismus für eine HDAC4-Degradierung in HepG2- und Hep3B-Zellen mittels 5-aza-dC und Doxorubicin identifiziert werden. Nichtsdestotrotz ist es interessant, dass beide Substanzen über eine HDAC4-Regulation epigenetische Mechanismen für eine transkriptionelle Aktivität modulieren können, die nicht ihrem primären Wirkmechanismus entsprechen.

5.2.1 HDAC4 als zentrale Schnittstelle Therapie-induzierter Seneszenz

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit mit Hepatomzelllinien ergänzen bisher veröffentlichte Erkenntnisse, dass eine Herunterregulation von HDAC4 eine zentrale Rolle in der Proliferationshemmung und auch Seneszenzinduktion von Tumorzellen spielt. Was diese Promotionsarbeit von bisherigen Arbeiten u.a. unterscheidet ist die Erkenntnis, dass die Substanzen 5-aza-dC und Doxorubicin

trotz primär unterschiedlichem Wirkmechanismus hierüber epigenetisch wirksam werden. Um die Rolle von HDAC4 detaillierter zu untersuchen, wurde einerseits eine Inhibition über miR-1 und ein HDAC4-Knockdown mittels siRNA durchgeführt und andererseits eine Überexpression von HDAC4 mittels eines Plasmids in der Hepatomzelllinie HepG2. Ziel war es hierüber trotz einer Chemotherapeutika-bedingten Herunterregulation von HDAC4 einen gewissen HDAC4-Gehalt aufrecht zu erhalten. Trotz der methodisch bedingten Einschränkungen, bestärkt das Ergebnis einer Abnahme der SA- β Gal-Färbung eine wichtige Rolle von HDAC4 in der Seneszenzinduktion in der Hepatomzelllinie HepG2. Dieses Ergebnis sollte jedoch mit weiteren Verfahren und Zelllinien validiert werden.

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass nukleär aktives HDAC4 einhergeht mit einem transformierten Phänotyp einschließlich veränderter Morphologie mit spindelartiger Ausbreitung und reduzierter Zellgröße, Verlust der Kontaktinhibition und Tumorigenität [362]. Weitere Studien zeigten, dass eine HDAC4-Überexpression in nicht malignen Zellen die Zellmotilität fördert, welche unkontrolliert ein Kennzeichen bösartiger Tumore ist [363, 364]. Interessanterweise zeigt ein HDAC4-Knockdown keinen Einfluss auf die Proliferation von nicht malignen Hautfibroblasten, myeloischen Progenitorzellen oder Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 [357]. In einer Studie von Giorgio et al. konnte gezeigt werden, dass die HDAC4-Expression in verschiedenen Modellen der Onkogen-induzierten (OIS) und der replikativen Seneszenz herunterreguliert wird und HDAC4 eine zentrale Rolle in der Seneszenzinduktion einnimmt [354]. Eine Deletion von HDAC4 induzierte Seneszenz sowohl in transformierten und prätransformierten Zellen verschiedener Abstammungslinien wie Melanomen und Leiomyosarkomen. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Wiedereinführung von HDAC4 in einem RAS-abhängigen Modell (OIS) der Seneszenz effizienter entgegenwirkt als die Hemmung von p53. In der Literatur konnte in weiteren Studien mit Tumorzelllinien gezeigt werden, dass HDAC4 eine wichtige Rolle im Rahmen des Zellwachstum und der Seneszenzinduktion einnimmt. In der Glioblastomzelllinie U87MG förderte ein HDAC4-Knockdown eine Radiotherapie-

induzierte Seneszenz [353]. Ein HDAC4-Knockdown in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 in vivo im Xenograft-Modell und in der Glioblastomzelllinie U87-MG führte zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums [365, 366]. Die lentiviral HDAC4-ausgenockte Prostatazelllinie LNCaP zeigte selbst über einen Beobachtungszeitraum von über 55 Tagen keine Wachstumstendenz im Mausmodell [367]. Bei Nasopharynxkarzinomzelllinien führte eine HDAC4-Inhibition ebenfalls zu einer Proliferationsminderung [368]. Ein HDAC4-Knockdown geht darüberhinaus mit einer Re-Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika einher. Geng et al. beschreiben dies für Prostatakarziom-Zelllinien C42B gegenüber Docetaxel [361]. In dieser Zelllinie verstärkt ein HDAC4-Knockdown die p16-Expression und SA- β Gal-Modulation [363]. Stronach et al. veranschaulichten in Ovarialkarzinom-Zelllinien, dass bei diesen eine HDAC4-Überexpression mit einer Chemotherapie (Cisplatin)-Resistenz einhergeht und ein Knockdown zu einer Re-Sensitivierung gegenüber Cisplatin führt [364].

5.2.2 Potentielle Mechanismen der HDAC4-Regulation

Bei Wirbeltieren sind HDACs der Klasse IIa katalytisch inaktive epigenetische Leser, die schnell an H3K27ac-Loci der Histone rekrutiert werden [369-372]. Hier können sie den Acetylierungsstatus von H3K27 durch die Interaktion mit Klasse I-HDACs und über Bildung intrazellulär Multiproteinkomplexe überwachen, außerhalb derer sie häufig keine intrinsische katalytische Aktivität besitzen [9[355]5]. HDAC4 (Klasse IIb) und HDAC3 (Klasse I) bilden intrazellulär solch einen Multiproteinkomplex [359]. Darüberhinaus bindet der Amino-Terminus von HDACs der Klasse IIa verschiedene Transkriptionsfaktoren wie die MEF2-Familie [372, 373]. Klasse IIa HDACs überwachen spezifische Differenzierungsprogramme und verschiedene adaptive Reaktionen. Wang et al. veranschaulichten die Bedeutung eines HDAC3- und HDAC4-Knockdowns für die Seneszenzinduktion in der p53-kompetenten Lungenkrebszelllinien NCI-H460 über eine erhöhte Expression von p16 [374]. Die Expression von p21^{cip/waf} als weiterer wichtiger Zellzyklusinhibitor wird von HDAC1, HDAC3 und HDAC4 reguliert [365, 366, 375]. HDAC4 interagiert neben p16, p21^{cip/waf} und p53 mit

einer Vielzahl weiterer wichtiger Faktoren in der Zellzyklusregulation. Daten von Di Giorgio et al. für mehrere Tumorzelllinien verschiedener Entitäten deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 und die Histon-Acetyltransferase p300 eine wichtige Rolle in der Seneszenzinduktion nach einer HDAC4-Herunterregulation einnehmen [354]. Weitere Studien zeigen, dass eine Abnahme des HDAC4-Gehalts und die darauffolgende verstärkte Acetylierung von HIF α zu einem Abfall dessen Stabilität führt und die Transkription von Zielgenen wie VEGF α , der Laktatdehydrogenase A und dem pro-survival Faktor glut-1 kompromittiert [376, 377]. Jüngste Studien deuten darauf hin, dass auch MELK (engl. maternal embryonic leucine zipper kinase) und weitere Proteine eines malignen Phänotyps und Transformation durch HDAC4 reguliert werden können [373, 378, 379].

In der Literatur wird in der Wirkung eines HDAC4-Knockdowns teils zwischen p53-kompetenten und -inkompetenten Tumorzellen unterschieden [357, 373]. Dabei sei ein chromosomaler Segregationseffekt während der Mitose, bedingt durch einen HDAC4-Knockdown, spezifisch für die untersuchten p53-inkompetenten Tumorzelllinien. Ein HDAC4-Knockdown in der p53-inaktivierten Zervixkarzinomzelllinie HeLa führte zu einer sog. DNA damage response, mitotischem Zellzyklus-Arrest, chromosomalen Segregationsdefekten und Caspase-abhängiger Apoptose. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde ein HDAC4-Knockdown ausschließlich mit der p53-kompetenten Hepatomzelllinie HepG2 durchgeführt. Weiterführende Experimente mit der p53-inkompetenten Zelllinie Hep3B oder der p53-mutierten Zelllinie Huh7 wurden nicht durchgeführt und muss als eine Limitation dieser Arbeit angesehen werden.

Zusammenfassend spielt HDAC4 eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation. Über den durch HDAC4-vermittelten Acetylierungsstatus kann somit eine Vielzahl von Proteinen bzw. potentiellen Zielstrukturen einer Tumorthherapie reguliert werden.

5.2.3 Verfügbare antitumorale Substanzen mit HDAC4-Wirkkomponente

Aktuell gibt es weder kommerziell erhältliche oder zugelassene, spezifische HDAC4-Inhibitoren. Substanzen mit HDAC4-Wirkkomponente könnten jedoch äußerst effektiv in der Tumorthherapie sein. Marek et al. synthetisierten den

Hydroxamat-basierten HDACi 19i, der in Testungen eine inhibitorische Selektivität gegenüber HDAC4 und HDAC5 bereits in nanomolaren Konzentrationen zeigte [380]. 19i verbesserte die Zytotoxizität Cisplatin-sensitiver Tumorzelllinien und konnte über eine Vorbehandlung Cisplatin-resistente Tumorzelllinien wieder re-sensitivieren. Weitere Inhibitoren mit einer nicht-spezifischen Inhibition sind MC 1568 (HDAC4, HDAC6) und LMK 235 (HDAC4, HDAC5). Bezüglich des antiangiogenetischen Medikaments Tasquinimod zeigten Isaacs et al. 2013, dass dieses allosterisch die Zn²⁺-Bindungsstelle von HDAC4 bindet und sich dadurch der HDAC4/N-CoR/HDAC3-Wirkkomplex nicht bilden kann [367]. Tasquinimod wird somit aufgrund seiner HDAC4-Inhibition mutmaßlich nicht nur antiangiogenetisch wirken, sondern auch weitere Effekte erzielen. Tasquinimod zeigte in einer Phase III-Studie für das metastasierte Prostata-Karzinom eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens [367, 381]. Isaacs et al. zeigten darüberhinaus in Xenograft-Modellen eine Proliferationsminderung um bis zu 50% in der Kolontumor-Zelllinie HCT116 und der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 [367]. In einer Phase 2-Studie mit HCC-Patienten zeigte Tasquinimod jedoch keinen messbaren antitumoralen Effekt [382].

6. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung epigenetischer Wirkmechanismen einer Therapie-induzierten Seneszenz in Tumorzellen. Um mögliche intrazelluläre, Seneszenz-induzierende Signalwege aufzudecken, sollten potentielle Überschneidungen der Wirkmechanismen der primär unterschiedlich wirkenden Substanzen 5-aza-dC und des Topoisomerase II-Inhibitors Doxorubicin auf Ebene der Zellkultur in den Hepatomzelllinien HepG2 und Hep3B phänotypisch untersucht werden.

Der erste Schwerpunkt der Promotionsarbeit lag in einer vergleichenden Betrachtung des miRNoms beider Substanzen. 5-aza-dC als DNMTi reguliert je nach verwendeter Methode und miRBase-Version 16,3% bzw. 12,8% aller miRNAs und somit deutlich mehr und zusätzlich stärker als Doxorubicin mit 3,2%. Es konnte gezeigt werden, dass miR-494 und miR-369-5p die einzig gemeinsam regulierten miRNAs darstellen. miR-494 war zudem in der Lage, Effekte der Chemotherapeutika bezüglich der Proliferationshemmung und der SA- β Gal-Modulation nachzuahmen. Eine AntagomiR-494-Transfektion führte jedoch nicht zur Aufhebung der 5-aza-dC- und Doxorubicin-vermittelten Effekte, so dass die Therapie-induzierte Seneszenz dieser beiden Substanzen nicht ausschließlich auf eine Modulation von miR-494 zurückgeführt werden konnte.

Der zweite Schwerpunkt der Promotionsarbeit lag auf der Untersuchung des Einflusses von HDAC4 in der Wirkungsweise von 5-aza-dC und Doxorubicin, da beide Chemotherapeutika zu einer Abnahme des Proteingehalts von HDAC4 führten. Beide Substanzen können somit über eine HDAC4-Regulation epigenetische Mechanismen für eine transkriptionelle Aktivität regulieren, die nicht ihrem primären Wirkmechanismus entsprechen. Neben einer miR-1 vermittelten Abnahme des Proteingehaltes von HDAC4, ahmte ebenfalls ein spezifischer siRNA-vermittelter HDAC4-Knockdown die Proliferationshemmung und die SA- β Gal-Modulation von 5-aza-dC und Doxorubicin in HepG2-Zellen nach. Eine HDAC4-Überexpression führte zudem zu einer Abnahme der von 5-aza-dC- und Doxorubicin-induzierten SA- β Gal-Färbung als Surrogat-Parameter einer Therapie-induzierten Seneszenz. Es ergeben sich Hinweise darauf, dass die HDAC4-Regulation maßgeblich an der Seneszenzinduktion durch 5-aza-dC

und Doxorubicin beteiligt sein könnte. Dass HDAC4 hierfür ein wesentlicher Faktor sein dürfte, kann durch dessen pleiotrope Wirkungsweise erklärt werden. Eine Überprüfung eines HDAC4-Knockdowns weiterer p53-kompetenter und – nicht-kompetenter Tumorzelllinien in vitro und in vivo sollte als Ausblick zur weiteren Bestätigung dieser Beobachtung durchgeführt werden. Im Gegensatz zu den bisher klinisch eingesetzten HDACi, welche meist mehrere HDACs inhibieren und als Pan-HDACi gelten, hätte ein selektiver HDAC4-Knockdown bzw. -Inhibierung den Vorteil eines potentiell geringeren Nebenwirkungsprofils und nach unseren Daten das Potential einer gezielten Auslösung einer Therapie-induzierten Seneszenz.

Zusammenfassend konnte in dieser Promotionsarbeit die Modulation der Faktoren miR-494, miR-1 und HDAC4 als molekulare Mechanismen einer Therapie-induzierten Seneszenz identifiziert werden. Inwieweit eine gezielte Modulation dieser Zielstrukturen für therapeutische Zwecke ausgenutzt werden kann, bedarf einer über den Rahmen dieser Promotionsarbeit hinausgehenden Überprüfung.

7. Literaturverzeichnis

1. Global Burden of Disease Liver Cancer, C., et al., *The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015*. JAMA Oncol, 2017. **3**(12): p. 1683-1691.
2. Marrero, J.A., et al., *Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases*. Hepatology, 2018. **68**(2): p. 723-750.
3. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
4. Vogel, A., et al., *Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2018. **29**(Suppl 4): p. iv238-iv255.
5. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
6. Ahmed, F., et al., *National trends and disparities in the incidence of hepatocellular carcinoma, 1998-2003*. Prev Chronic Dis, 2008. **5**(3): p. A74.
7. Bruix, J. and J.M. Llovet, *Major achievements in hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2009. **373**(9664): p. 614-6.
8. Rahbari, N.N., et al., *Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future*. Ann Surg, 2011. **253**(3): p. 453-69.
9. Tanaka, Y., et al., *A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15584-9.
10. Venook, A.P., et al., *The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective*. Oncologist, 2010. **15 Suppl 4**: p. 5-13.
11. Llovet, J.M., *Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol, 2005. **40**(3): p. 225-35.
12. Bruno, S., et al., *Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 754-8.
13. Fattovich, G., et al., *Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. The EUROHEP Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis*. Hepatology, 1995. **21**(1): p. 77-82.
14. Ioannou, G.N., et al., *Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(8): p. 938-45, 945 e1-4.
15. Sangiovanni, A., et al., *The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients*. Hepatology, 2006. **43**(6): p. 1303-10.
16. Bruix, J., M. Sherman, and A.A.f.t.S.o.L.D. Practice Guidelines Committee, *Management of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1208-36.
17. Tinkle, C.L. and D. Haas-Kogan, *Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools*. Biologics, 2012. **6**: p. 207-19.
18. Gomaa, A.I., et al., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(27): p. 4300-8.
19. Montalto, G., et al., *Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **963**: p. 13-20.
20. Ohishi, W., et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma in a Japanese population: a nested case-control study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(4): p. 846-54.
21. Sanyal, A.J., S.K. Yoon, and R. Lencioni, *The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment*. Oncologist, 2010. **15 Suppl 4**: p. 14-22.

22. Yuen, M.F., et al., *Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(3): p. 346-53.
23. Schlesinger, S., et al., *Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort*. Ann Oncol, 2013. **24**(9): p. 2449-55.
24. Tsilidis, K.K., et al., *Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies*. BMJ, 2015. **350**: p. g7607.
25. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
26. Chen, C.L., et al., *Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 111-21.
27. Yu, M.W., et al., *Influence of Metabolic Risk Factors on Risk of Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Death in Men With Chronic Hepatitis B: A Large Cohort Study*. Gastroenterology, 2017. **153**(4): p. 1006-1017 e5.
28. Dyson, J., et al., *Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team*. J Hepatol, 2014. **60**(1): p. 110-7.
29. Kanwal, F., et al., *Trends in the Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a United States Cohort of Veterans*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2016. **14**(2): p. 301-8 e1-2.
30. Younossi, Z.M., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009*. Hepatology, 2015. **62**(6): p. 1723-30.
31. European Association for the Study of the L., D. European Association for the Study of, and O. European Association for the Study of, *EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Obes Facts, 2016. **9**(2): p. 65-90.
32. Llovet, J.M., et al., *Hepatocellular carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2021. **7**(1): p. 6.
33. Villanueva, A., et al., *Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(1): p. 55-76.
34. Zender, L., et al., *Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2010. **52**(6): p. 921-9.
35. Yang, W., et al., *Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4287-95.
36. Tien, L.T., et al., *Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(16): p. 2398-401.
37. Roberts, L.R. and G.J. Gores, *Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(2): p. 212-25.
38. Joo, M., et al., *Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma*. Liver, 2001. **21**(2): p. 89-95.
39. Bhat, M., N. Sonenberg, and G.J. Gores, *The mTOR pathway in hepatic malignancies*. Hepatology, 2013.
40. Matsuda, Y., *Molecular mechanism underlying the functional loss of cyclindependent kinase inhibitors p16 and p27 in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(11): p. 1734-40.
41. Zang, J.J., et al., *P16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(25): p. 3043-8.
42. Calvisi, D.F., et al., *Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: relationship with genomic instability and prognosis*. Int J Cancer, 2007. **121**(11): p. 2410-20.

43. Teufel, A., et al., *Genetics of hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(16): p. 2271-82.
44. Herath, N.I., B.A. Leggett, and G.A. MacDonald, *Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(1 Pt 1): p. 15-21.
45. Rudolph, K.L., D. Hartmann, and O.G. Opitz, *Telomere dysfunction and DNA damage checkpoints in diseases and cancer of the gastrointestinal tract*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 754-62.
46. Quint, K., et al., *Clinical significance of histone deacetylases 1, 2, 3, and 7: HDAC2 is an independent predictor of survival in HCC*. Virchows Arch, 2011. **459**(2): p. 129-39.
47. Zhao, J., et al., *Unmasking the pathological and therapeutic potential of histone deacetylases for liver cancer*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019. **13**(3): p. 247-256.
48. Freese, K., et al., *Histone Deacetylase Expressions in Hepatocellular Carcinoma and Functional Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Liver Cancer Cells In Vitro*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
49. But, D.Y., C.L. Lai, and M.F. Yuen, *Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(11): p. 1652-6.
50. Bharadwaj, M., et al., *Tackling hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma-the future is now*. Cancer Metastasis Rev, 2012.
51. Mas, V.R., et al., *Genes involved in viral carcinogenesis and tumor initiation in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma*. Mol Med, 2009. **15**(3-4): p. 85-94.
52. Farazi, P.A. and R.A. DePinho, *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 674-87.
53. Wu, K., et al., *Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions*. Cancer Res, 2009. **69**(20): p. 8067-75.
54. Calderaro, J., et al., *Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features*. Hepatology, 2016. **64**(6): p. 2038-2046.
55. Dai, X., et al., *Positive Expression of Programmed Death Ligand 1 in Peritumoral Liver Tissue is Associated with Poor Survival after Curative Resection of Hepatocellular Carcinoma*. Transl Oncol, 2017. **10**(4): p. 511-517.
56. Long, J., et al., *Expression of programmed death ligand-1 and programmed death 1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance*. J Cancer Res Ther, 2018. **14**(Supplement): p. S1188-S1192.
57. Zhou, Y., et al., *Repeat hepatectomy for recurrent hepatocellular carcinoma: a local experience and a systematic review*. World J Surg Oncol, 2010. **8**: p. 55.
58. Mazzaferro, V., et al., *Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis*. N Engl J Med, 1996. **334**(11): p. 693-9.
59. Vogel, A., et al., *Updated treatment recommendations for hepatocellular carcinoma (HCC) from the ESMO Clinical Practice Guidelines*. Ann Oncol, 2021. **32**(6): p. 801-805.
60. Llovet, J.M., et al., *Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021. **18**(5): p. 293-313.
61. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e. and L. European Association for the Study of the, *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2018. **69**(1): p. 182-236.

62. Peck-Radosavljevic, M., et al., *Consensus on the current use of sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010. **22**(4): p. 391-8.
63. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1312-27.
64. Bruix, J., M. Sherman, and D. American Association for the Study of Liver, *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 1020-2.
65. Bruix, J., et al., *Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2017. **389**(10064): p. 56-66.
66. Kudo, M., et al., *Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial*. Lancet, 2018. **391**(10126): p. 1163-1173.
67. Finn, R.S., et al., *Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma*. N Engl J Med, 2020. **382**(20): p. 1894-1905.
68. Galle, P.R., et al., *Patient-reported outcomes with atezolizumab plus bevacizumab versus sorafenib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (IMbrave150): an open-label, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2021. **22**(7): p. 991-1001.
69. Pommier, Y., *DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition*. Chem Rev, 2009. **109**(7): p. 2894-902.
70. Li, T.K. and L.F. Liu, *Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 53-77.
71. Pommier, Y., *Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 789-802.
72. Nitiss, J.L., *DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 327-37.
73. Berger, J.M., *Type II DNA topoisomerases*. Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(1): p. 26-32.
74. Nitiss, J.L., *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 338-50.
75. McClendon, A.K. and N. Osheroff, *DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer*. Mutat Res, 2007. **623**(1-2): p. 83-97.
76. Marnett, L.J., *Oxyl radicals and DNA damage*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 361-70.
77. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(2): p. 185-229.
78. Frey, N., et al., *Cellular senescence in gastrointestinal diseases: from pathogenesis to therapeutics*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(2): p. 81-95.
79. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-8.
80. Waddington, C.H., *The Epigenotype*. International Journal of Epidemiology, 2012. **41**(1): p. 10-13.
81. Bates, S.E., *Epigenetic Therapies for Cancer*. N Engl J Med, 2020. **383**(7): p. 650-663.
82. Gebert, L.F.R. and I.J. MacRae, *Regulation of microRNA function in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 21-37.
83. Treiber, T., N. Treiber, and G. Meister, *Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 5-20.
84. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
85. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.

86. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
87. Taby, R. and J.P. Issa, *Cancer epigenetics*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(6): p. 376-92.
88. Ellis, L., P.W. Atadja, and R.W. Johnstone, *Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(6): p. 1409-20.
89. Sulas, P., et al., *A Large Set of miRNAs Is Dysregulated from the Earliest Steps of Human Hepatocellular Carcinoma Development*. Am J Pathol, 2018. **188**(3): p. 785-794.
90. Oura, K., A. Morishita, and T. Masaki, *Molecular and Functional Roles of MicroRNAs in the Progression of Hepatocellular Carcinoma-A Review*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
91. Morishita, A., et al., *MicroRNAs in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Review*. Cancers (Basel), 2021. **13**(3).
92. Anastopoulos, I., et al., *Epigenetic therapy as a novel approach in hepatocellular carcinoma*. Pharmacol Ther, 2015. **145**: p. 103-19.
93. Petronis, A., *Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 721-7.
94. Urdinguio, R.G., J.V. Sanchez-Mut, and M. Esteller, *Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies*. Lancet Neurol, 2009. **8**(11): p. 1056-72.
95. Kelly, T.K., D.D. De Carvalho, and P.A. Jones, *Epigenetic modifications as therapeutic targets*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1069-1078.
96. Jones, P.A., et al., *Epigenetic therapy in immune-oncology*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(3): p. 151-161.
97. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
98. Yee, A.J. and N.S. Raje, *Panobinostat and Multiple Myeloma in 2018*. Oncologist, 2018. **23**(5): p. 516-517.
99. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
100. Kornberg, R.D. and Y. Lorch, *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell, 1999. **98**(3): p. 285-94.
101. Mahlknecht, U. and D. Hoelzer, *[Epigenetic regulators as novel therapeutic targets in hematology/oncology]*. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(46): p. 2423-6.
102. Hayashi, M.T. and H. Masukata, *Regulation of DNA replication by chromatin structures: accessibility and recruitment*. Chromosoma, 2011. **120**(1): p. 39-46.
103. Li, G., G. Sudlow, and A.S. Belmont, *Interphase cell cycle dynamics of a late-replicating, heterochromatic homogeneously staining region: precise choreography of condensation/decondensation and nuclear positioning*. J Cell Biol, 1998. **140**(5): p. 975-89.
104. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell 5th ed*. Garland Publishing, Inc., New York, 2008.
105. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
106. Wu, J. and M. Grunstein, *25 years after the nucleosome model: chromatin modifications*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(12): p. 619-23.
107. Klug, A., et al., *A low resolution structure for the histone core of the nucleosome*. Nature, 1980. **287**(5782): p. 509-16.
108. Peserico, A. and C. Simone, *Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 371832.

109. Copeland, R.A., M.P. Moyer, and V.M. Richon, *Targeting genetic alterations in protein methyltransferases for personalized cancer therapeutics*. *Oncogene*, 2013. **32**(8): p. 939-46.
110. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 693-705.
111. Gronbaek, K., C. Hother, and P.A. Jones, *Epigenetic changes in cancer*. *APMIS*, 2007. **115**(10): p. 1039-59.
112. Pollock, R.M. and V.M. Richon, *Epigenetic approaches to cancer therapy*. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2009. **6**(2): p. 71-79.
113. Copeland, R.A., M.E. Solomon, and V.M. Richon, *Protein methyltransferases as a target class for drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(9): p. 724-32.
114. Marks, P.A. and W.S. Xu, *Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy*. *J Cell Biochem*, 2009. **107**(4): p. 600-8.
115. Gregory, P.D., K. Wagner, and W. Horz, *Histone acetylation and chromatin remodeling*. *Exp Cell Res*, 2001. **265**(2): p. 195-202.
116. Codd, R., et al., *Zn(II)-dependent histone deacetylase inhibitors: suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(4): p. 736-9.
117. Gershey, E.L., G. Vidali, and V.G. Allfrey, *Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of epsilon-N-acetyllysine in the f2a1 histone*. *J Biol Chem*, 1968. **243**(19): p. 5018-22.
118. Kleff, S., et al., *Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(42): p. 24674-7.
119. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
120. Mai, A., *The therapeutic uses of chromatin-modifying agents*. *Expert Opin Ther Targets*, 2007. **11**(6): p. 835-51.
121. Schrupp, D.S., *Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(12): p. 3947-57.
122. Guardiola, A.R. and T.P. Yao, *Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3350-6.
123. Hubbert, C., et al., *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. *Nature*, 2002. **417**(6887): p. 455-8.
124. Gao, L., et al., *Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25748-55.
125. Gregoret, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. *J Mol Biol*, 2004. **338**(1): p. 17-31.
126. Witt, O., et al., *HDAC family: What are the cancer relevant targets?* *Cancer Lett*, 2009. **277**(1): p. 8-21.
127. Yuan, J.H., et al., *The histone deacetylase 4/SP1/microrna-200a regulatory network contributes to aberrant histone acetylation in hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2011. **54**(6): p. 2025-35.
128. Datta, J., et al., *Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(13): p. 5049-58.
129. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. *Nature*, 1999. **401**(6749): p. 188-93.
130. Sun, W.J., et al., *Histone acetyltransferases and deacetylases: molecular and clinical implications to gastrointestinal carcinogenesis*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2012. **44**(1): p. 80-91.

131. Delcuve, G.P., D.H. Khan, and J.R. Davie, *Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors*. Clin Epigenetics, 2012. **4**(1): p. 5.
132. Yang, X.J. and E. Seto, *Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications*. Mol Cell, 2008. **31**(4): p. 449-61.
133. Villar-Garea, A. and M. Esteller, *Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents*. Int J Cancer, 2004. **112**(2): p. 171-8.
134. <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Trichostatin+A>.
135. Mai, A. and L. Altucci, *Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(1): p. 199-213.
136. Azad, N., et al., *The future of epigenetic therapy in solid tumours--lessons from the past*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(5): p. 256-66.
137. Marks, P.A. and R. Breslow, *Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 84-90.
138. Gahr, S., et al., *Combination of the deacetylase inhibitor panobinostat and the multi-kinase inhibitor sorafenib for the treatment of metastatic hepatocellular carcinoma - review of the underlying molecular mechanisms and first case report*. J Cancer, 2012. **3**: p. 158-65.
139. Yeo, W., et al., *Epigenetic therapy using belinostat for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a multicenter phase I/II study with biomarker and pharmacokinetic analysis of tumors from patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Research Group*. J Clin Oncol, 2012. **30**(27): p. 3361-7.
140. Bitzer, M., et al., *Resminostat plus sorafenib as second-line therapy of advanced hepatocellular carcinoma - The SHELTER study*. J Hepatol, 2016. **65**(2): p. 280-8.
141. Llovet, J.M. and V. Hernandez-Gea, *Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(8): p. 2072-9.
142. Kristensen, L.S., H.M. Nielsen, and L.L. Hansen, *Epigenetics and cancer treatment*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 131-42.
143. Baylin, S.B., et al., *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 687-92.
144. Fernandez, A.F., et al., *A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples*. Genome Res, 2012. **22**(2): p. 407-19.
145. Kim, J.K., M. Samaranyake, and S. Pradhan, *Epigenetic mechanisms in mammals*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(4): p. 596-612.
146. Wang, Y. and F.C. Leung, *An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers*. Bioinformatics, 2004. **20**(7): p. 1170-7.
147. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
148. Mund, C., B. Brueckner, and F. Lyko, *Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications*. Epigenetics, 2006. **1**(1): p. 7-13.
149. Herman, J.G., et al., *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9700-4.
150. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(7): p. 564-9.
151. Brueckner, B., D. Kuck, and F. Lyko, *DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy*. Cancer J, 2007. **13**(1): p. 17-22.
152. Mund, C. and F. Lyko, *Epigenetic cancer therapy: Proof of concept and remaining challenges*. Bioessays, 2010. **32**(11): p. 949-57.

153. Issa, J.P. and H.M. Kantarjian, *Targeting DNA methylation*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(12): p. 3938-46.
154. Sorm, F., et al., *5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic*. Experientia, 1964. **20**(4): p. 202-3.
155. Christman, J.K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5483-95.
156. Liu, M., et al., *Integrative Epigenetic Analysis Reveals Therapeutic Targets to the DNA Methyltransferase Inhibitor Guadecitabine (SGI-110) in Hepatocellular Carcinoma*. Hepatology, 2018. **68**(4): p. 1412-1428.
157. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
158. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
159. Robertson, K.D., et al., *The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(11): p. 2291-8.
160. Daniel, F.I., et al., *The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer*. Cancer, 2011. **117**(4): p. 677-87.
161. Rhee, I., et al., *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 552-6.
162. Rhee, I., et al., *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 1003-7.
163. Yoo, C.B. and P.A. Jones, *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(1): p. 37-50.
164. Kaminskas, E., et al., *Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(10): p. 3604-8.
165. Sorm, F. and J. Vesely, *The Activity of a New Antimetabolite, 5-Azacytidine, against Lymphoid Leukaemia in Ak Mice*. Neoplasma, 1964. **11**: p. 123-30.
166. Sorm, F. and J. Skoda, *The Mechanism of Action of Cancerostatically Important Azapyrimidines*. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1964. **20**: p. 37-8.
167. Winkler, A., et al., *The Sensitivity of Human Leukaemias to 6-Azauridine and Its Relation to Uridine-Kinase Activity*. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1964. **20**: p. 100-2.
168. Karahoca, M. and R.L. Momparler, *Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy*. Clin Epigenetics, 2013. **5**(1): p. 3.
169. Stresemann, C. and F. Lyko, *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 8-13.
170. Guil, S. and M. Esteller, *DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(1): p. 87-95.
171. Davalos, V. and M. Esteller, *MicroRNAs and cancer epigenetics: a macrorevolution*. Curr Opin Oncol, 2010. **22**(1): p. 35-45.
172. Kunej, T., et al., *Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature*. Mutat Res, 2011. **717**(1-2): p. 77-84.
173. Sato, F., et al., *MicroRNAs and epigenetics*. FEBS J, 2011. **278**(10): p. 1598-609.
174. Saetrom, P., O. Snove, Jr., and J.J. Rossi, *Epigenetics and microRNAs*. Pediatr Res, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 17R-23R.
175. Pogribny, I.P., et al., *Differential expression of microRNAs during hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats*. Nutr Rev, 2008. **66 Suppl 1**: p. S33-5.

176. Baer, C., R. Claus, and C. Plass, *Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 473-7.
177. Pavicic, W., et al., *Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach*. *Mol Med*, 2011. **17**(7-8): p. 726-35.
178. Karpf, A.R., et al., *Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine*. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(4): p. 751-7.
179. Wang, H., et al., *An ATM- and Rad3-related (ATR) signaling pathway and a phosphorylation-acetylation cascade are involved in activation of p53/p21Waf1/Cip1 in response to 5-aza-2'-deoxycytidine treatment*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(5): p. 2564-74.
180. Zhu, W.G., et al., *5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 15161-6.
181. Juttermann, R., E. Li, and R. Jaenisch, *Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(25): p. 11797-801.
182. Pina, I.C., et al., *Psammaplins from the sponge Pseudoceratina purpurea: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase*. *J Org Chem*, 2003. **68**(10): p. 3866-73.
183. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(2): p. 126-39.
184. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
185. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 855-62.
186. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(1): p. D68-73.
187. Ro, S., et al., *Tissue-dependent paired expression of miRNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(17): p. 5944-53.
188. Lee, E.J., et al., *Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors*. *RNA*, 2008. **14**(1): p. 35-42.
189. Liang, Y., et al., *Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues*. *BMC Genomics*, 2007. **8**: p. 166.
190. Roux, J., M. Gonzalez-Porta, and M. Robinson-Rechavi, *Comparative analysis of human and mouse expression data illuminates tissue-specific evolutionary patterns of miRNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(13): p. 5890-900.
191. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1401-14.
192. Davis, B.N. and A. Hata, *Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms*. *Cell Commun Signal*, 2009. **7**: p. 18.
193. Lujambio, A. and M. Esteller, *CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(12): p. 1455-9.
194. Khare, S., Q. Zhang, and J.A. Ibdah, *Epigenetics of hepatocellular carcinoma: role of microRNA*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(33): p. 5439-45.
195. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.

196. Huang, S. and X. He, *The role of microRNAs in liver cancer progression*. Br J Cancer, 2011. **104**(2): p. 235-40.
197. Shivdasani, R.A., *MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3646-53.
198. Rottiers, V. and A.M. Naar, *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 239-50.
199. Kloosterman, W.P. and R.H. Plasterk, *The diverse functions of microRNAs in animal development and disease*. Dev Cell, 2006. **11**(4): p. 441-50.
200. Chen, B., et al., *Roles of microRNA on cancer cell metabolism*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 228.
201. Cao, X., et al., *Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 77-103.
202. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
203. Shenouda, S.K. and S.K. Alahari, *MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?* Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(3-4): p. 369-78.
204. Mirnezami, A.H., et al., *MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets*. Eur J Surg Oncol, 2009. **35**(4): p. 339-47.
205. Mott, J.L., *MicroRNAs involved in tumor suppressor and oncogene pathways: implications for hepatobiliary neoplasia*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 630-7.
206. Ladeiro, Y., et al., *MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 1955-63.
207. Veronese, A., et al., *Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3140-9.
208. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
209. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
210. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
211. Hou, J., et al., *Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma*. Cancer Cell, 2011. **19**(2): p. 232-43.
212. Gramantieri, L., et al., *MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6A): p. 2189-204.
213. Bala, S., M. Marcos, and G. Szabo, *Emerging role of microRNAs in liver diseases*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(45): p. 5633-40.
214. Varnholt, H., *The role of microRNAs in primary liver cancer*. Ann Hepatol, 2008. **7**(2): p. 104-13.
215. Toffanin, S., et al., *MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a*. Gastroenterology, 2011. **140**(5): p. 1618-28 e16.
216. Pineau, P., et al., *miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 264-9.
217. Huang, Y.S., et al., *Microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues without viral hepatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23**(1): p. 87-94.
218. Pogribny, I.P., et al., *Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure*. Mutat Res, 2007. **619**(1-2): p. 30-7.

219. Alpini, G., et al., *Regulation of placenta growth factor by microRNA-125b in hepatocellular cancer*. J Hepatol, 2011. **55**(6): p. 1339-45.
220. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 647-58.
221. Zhang, J., et al., *microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumourigenicity*. Br J Cancer, 2010. **103**(8): p. 1215-20.
222. Yamamoto, Y., et al., *MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma*. Biomarkers, 2009. **14**(7): p. 529-38.
223. Li, D., et al., *MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36677-85.
224. Hou, Y.Y., et al., *MicroRNA-519d targets MKi67 and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703*. Cancer Lett, 2011. **307**(2): p. 182-90.
225. He, X.X., et al., *MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo*. Oncogene, 2012. **31**(28): p. 3357-69.
226. Zhang, S., et al., *MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF-kappaB-inducing kinase (NIK)*. Oncogene, 2012. **31**(31): p. 3607-20.
227. Furuta, M., et al., *miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma*. Carcinogenesis, 2010. **31**(5): p. 766-76.
228. Wang, W., et al., *MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma*. Carcinogenesis, 2012. **33**(5): p. 1113-20.
229. Braconi, C. and T. Patel, *MicroRNA expression profiling: a molecular tool for defining the phenotype of hepatocellular tumors*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 1807-9.
230. Chang, R.M., et al., *miRNA-487a Promotes Proliferation and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(10): p. 2593-2604.
231. Chen, F., et al., *Clinical potential of miRNA-221 as a novel prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma*. Cancer Biomark, 2017. **18**(2): p. 209-214.
232. Liu, Z., et al., *MicroRNA-1468 promotes tumor progression by activating PPAR-gamma-mediated AKT signaling in human hepatocellular carcinoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 49.
233. Yang, W., et al., *MicroRNA-92a contributes to tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting FBXW7*. Oncol Rep, 2015. **34**(5): p. 2576-84.
234. Teufel, M., et al., *Biomarkers Associated With Response to Regorafenib in Patients With Hepatocellular Carcinoma*. Gastroenterology, 2019. **156**(6): p. 1731-1741.
235. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
236. Okamura, K., *Diversity of animal small RNA pathways and their biological utility*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(3): p. 351-68.
237. Yang, J.S., T. Maurin, and E.C. Lai, *Functional parameters of Dicer-independent microRNA biogenesis*. RNA, 2012. **18**(5): p. 945-57.
238. Liu, X., et al., *Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2013. **32**(1): p. 96.
239. Fabbri, M., et al., *MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15805-10.
240. Garzon, R., et al., *MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6411-8.

241. Qin, H., et al., *MicroRNA-29b contributes to DNA hypomethylation of CD4+ T cells in systemic lupus erythematosus by indirectly targeting DNA methyltransferase 1*. J Dermatol Sci, 2013. **69**(1): p. 61-7.
242. Wang, Y., et al., *The role of miRNA-29 family in cancer*. Eur J Cell Biol, 2013. **92**(3): p. 123-8.
243. Weber, B., et al., *Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells*. Cell Cycle, 2007. **6**(9): p. 1001-5.
244. Desvignes, T., et al., *miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants*. Trends Genet, 2015. **31**(11): p. 613-626.
245. Bartel, D.P. and C.Z. Chen, *Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(5): p. 396-400.
246. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
247. Acosta, J.C. and J. Gil, *Senescence: a new weapon for cancer therapy*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(4): p. 211-9.
248. Collado, M. and M. Serrano, *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 51-7.
249. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
250. Di Micco, R., et al., *Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 75-95.
251. Blagosklonny, M.V., *Cell cycle arrest is not senescence*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(2): p. 94-101.
252. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
253. Zhang, R. and P.D. Adams, *Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy*. Cell Cycle, 2007. **6**(7): p. 784-9.
254. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
255. Collado, M. and M. Serrano, *The power and the promise of oncogene-induced senescence markers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 472-6.
256. Majumder, P.K., et al., *A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression*. Cancer Cell, 2008. **14**(2): p. 146-55.
257. Anwar, T., S. Khosla, and G. Ramakrishna, *Increased expression of SIRT2 is a novel marker of cellular senescence and is dependent on wild type p53 status*. Cell Cycle, 2016. **15**(14): p. 1883-97.
258. Althubiti, M., et al., *Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1528.
259. Collado, M., et al., *Tumour biology: senescence in premalignant tumours*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 642.
260. Ewald, J.A., et al., *Therapy-induced senescence in cancer*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(20): p. 1536-46.
261. Childs, B.G., et al., *Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy*. Nat Med, 2015. **21**(12): p. 1424-35.
262. Paradis, V., et al., *Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas*. Hum Pathol, 2001. **32**(3): p. 327-32.
263. Funayama, R. and F. Ishikawa, *Cellular senescence and chromatin structure*. Chromosoma, 2007. **116**(5): p. 431-40.

264. Chandeck, C. and W.J. Mooi, *Oncogene-induced cellular senescence*. *Adv Anat Pathol*, 2010. **17**(1): p. 42-8.
265. Michaloglou, C., et al., *BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 720-4.
266. Chen, Z., et al., *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 725-30.
267. Eggert, T., et al., *Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(4): p. 533-547.
268. Kang, T.W., et al., *Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development*. *Nature*, 2011. **479**(7374): p. 547-51.
269. Coppe, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. *Annu Rev Pathol*, 2010. **5**: p. 99-118.
270. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(9): p. 729-40.
271. Mallette, F.A. and G. Ferbeyre, *The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(15): p. 1831-6.
272. Yaswen, P. and J. Campisi, *Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry*. *Cell*, 2007. **128**(2): p. 233-4.
273. Mallette, F.A., M.F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre, *The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence*. *Genes Dev*, 2007. **21**(1): p. 43-8.
274. Monsuez, J.J., et al., *Cardiac side-effects of cancer chemotherapy*. *Int J Cardiol*, 2010. **144**(1): p. 3-15.
275. Davidson, M.B., et al., *Pathophysiology, clinical consequences, and treatment of tumor lysis syndrome*. *Am J Med*, 2004. **116**(8): p. 546-54.
276. Rebbaa, A., et al., *The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(11): p. 1960-7.
277. Zhang, Y., et al., *DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(3): p. 551-61.
278. Roninson, I.B., *Tumor cell senescence in cancer treatment*. *Cancer Res*, 2003. **63**(11): p. 2705-15.
279. Chang, B.D., et al., *Role of p53 and p21^{waf1/cip1} in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs*. *Oncogene*, 1999. **18**(34): p. 4808-18.
280. Nardella, C., et al., *Pro-senescence therapy for cancer treatment*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(7): p. 503-11.
281. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* *Cancer Cell*, 2005. **7**(6): p. 505-12.
282. Roberson, R.S., et al., *Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers*. *Cancer Res*, 2005. **65**(7): p. 2795-803.
283. te Poele, R.H., et al., *DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo*. *Cancer Res*, 2002. **62**(6): p. 1876-83.
284. Haugstetter, A.M., et al., *Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(4): p. 505-9.
285. Venturelli, S., et al., *Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumor cells*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(10): p. 2226-36.

286. Weiland, T., et al., *Kinetic tracking of therapy-induced senescence using the real-time cell analyzer single plate system*. *Assay Drug Dev Technol*, 2012. **10**(3): p. 289-95.
287. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(4): p. 378-90.
288. Cervello, M., et al., *Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon*. *Oncotarget*, 2012. **3**(3): p. 236-60.
289. Ocker, M., et al., *Immunomodulatory Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma: From Checkpoint Inhibitors Now to an Integrated Approach in the Future*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(7).
290. Watt, P.M. and I.D. Hickson, *Structure and function of type II DNA topoisomerases*. *Biochem J*, 1994. **303 (Pt 3)**: p. 681-95.
291. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=de&slp=1#generalinformation.
292. http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4032/e4044/index_eng.html.
293. Vashist, Y.K., et al., *Inhibition of hepatic tumor cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by taltobulin, a synthetic analogue of the tripeptide hemiasterlin*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(42): p. 6771-8.
294. http://www.amsbio.com/brochures/Determination_of_Cell_Number_and_Growth_Characteristics_within_alvetex_3D_Scaffold_using_the_PicoGreen_Assay.PDF.
295. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8064.aspx#generalinformation>.
296. Rivadeneira, D.B., et al., *Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(5): p. 1920-30.
297. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
298. Vichai, V. and K. Kirtikara, *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(3): p. 1112-6.
299. Korzeniewski, C. and D.M. Callewaert, *An enzyme-release assay for natural cytotoxicity*. *J Immunol Methods*, 1983. **64**(3): p. 313-20.
300. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*. *J Immunol Methods*, 1988. **115**(1): p. 61-9.
301. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. *J Cell Sci*, 2000. **113 (Pt 20)**: p. 3613-22.
302. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. *Aging Cell*, 2006. **5**(2): p. 187-95.
303. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 1991. **139**(2): p. 271-9.
304. Darzynkiewicz, Z., H.D. Halicka, and H. Zhao, *Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **676**: p. 137-47.
305. Stenvang, J., et al., *Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides*. *Silence*, 2012. **3**(1): p. 1.
306. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. *Nature*, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
307. Cheng, A.M., et al., *Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(4): p. 1290-7.

308. Panchuk-Voloshina, N., et al., *Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates*. *J Histochem Cytochem*, 1999. **47**(9): p. 1179-88.
309. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
310. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
311. Liu, C.G., et al., *An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(26): p. 9740-4.
312. Wagner, G.P., K. Kin, and V.J. Lynch, *Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples*. *Theory Biosci*, 2012. **131**(4): p. 281-5.
313. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. *Nat Methods*, 2008. **5**(7): p. 621-8.
314. Pepke, S., B. Wold, and A. Mortazavi, *Computation for ChIP-seq and RNA-seq studies*. *Nat Methods*, 2009. **6**(11 Suppl): p. S22-32.
315. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(1): p. 57-63.
316. Martin, J.A. and Z. Wang, *Next-generation transcriptome assembly*. *Nat Rev Genet*, 2011. **12**(10): p. 671-82.
317. Borst, P., *Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(11): p. 745-7.
318. Choi, S.Y., et al., *Mitomycin C and doxorubicin elicit conflicting signals by causing accumulation of cyclin E prior to p21WAF1/CIP1 elevation in human hepatocellular carcinoma cells*. *Int J Oncol*, 2012. **40**(1): p. 277-86.
319. Olaru, A.V., et al., *MicroRNA down-regulated in human cholangiocarcinoma control cell cycle through multiple targets involved in the G1/S checkpoint*. *Hepatology*, 2011. **54**(6): p. 2089-98.
320. Sherr, C.J., *A New Cell-Cycle Target in Cancer - Inhibiting Cyclin D-Dependent Kinases 4 and 6*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(20): p. 1920-1923.
321. Anders, L., et al., *A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(5): p. 620-34.
322. Rader, J., et al., *Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(22): p. 6173-82.
323. Yoshida, A., E.K. Lee, and J.A. Diehl, *Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6*. *Cancer Res*, 2016. **76**(10): p. 2990-3002.
324. Hanoun, N., et al., *The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis*. *Clin Chem*, 2010. **56**(7): p. 1107-18.
325. Yamanaka, S., et al., *Coordinated effects of microRNA-494 induce G(2)/M arrest in human cholangiocarcinoma*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(14): p. 2729-38.
326. Yang, H., et al., *MicroRNA expression signatures in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(18): p. 5744-52.
327. Ambs, S., et al., *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(15): p. 6162-70.
328. Chang, S.S., et al., *MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(12): p. 2791-7.

329. Kim, W.K., et al., *MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(24): p. 7584-94.
330. Ohdaira, H., et al., *MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells*. Cell Prolif, 2012. **45**(1): p. 32-8.
331. Faraonio, R., et al., *A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts*. Cell Death Differ, 2012. **19**(4): p. 713-21.
332. Espinosa-Diez, C., et al., *MicroRNA regulation of the MRN complex impacts DNA damage, cellular senescence, and angiogenic signaling*. Cell Death Dis, 2018. **9**(6): p. 632.
333. Romano, G., et al., *MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(41): p. 16570-5.
334. Kwak, S.Y., et al., *Ionizing radiation-inducible miR-494 promotes glioma cell invasion through EGFR stabilization by targeting p190B RhoGAP*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1843**(3): p. 508-516.
335. Zhu, L., et al., *miR4943p promotes the progression of endometrial cancer by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway*. Mol Med Rep, 2019. **19**(1): p. 581-588.
336. Liu, L., et al., *Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide*. Life Sci, 2010. **86**(5-6): p. 192-8.
337. Diakos, C., et al., *TEL-AML1 regulation of survivin and apoptosis via miRNA-494 and miRNA-320a*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4885-93.
338. Wang, X., et al., *MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury*. Circulation, 2010. **122**(13): p. 1308-18.
339. Saito, Y., et al., *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(6): p. 435-43.
340. Yang, Z., Y. Zhang, and L. Wang, *A feedback inhibition between miRNA-127 and TGFbeta/c-Jun cascade in HCC cell migration via MMP13*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65256.
341. Zhang, B., et al., *Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer*. Carcinogenesis, 2011. **32**(1): p. 2-9.
342. Shen, W., et al., *MiR-26a promotes ovarian cancer proliferation and tumorigenesis*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86871.
343. Yang, X., et al., *MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway*. Hepatology, 2013. **58**(1): p. 158-70.
344. Lu, J., et al., *MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2*. Cancer Res, 2011. **71**(1): p. 225-33.
345. Zhu, Y., et al., *MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(10): p. 4615-25.
346. Gao, J. and Q.G. Liu, *The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review)*. Oncol Lett, 2011. **2**(6): p. 1019-1023.
347. Dang, X., et al., *MicroRNA-26a regulates tumorigenic properties of EZH2 in human lung carcinoma cells*. Cancer Genet, 2012. **205**(3): p. 113-23.
348. Jin, F., et al., *MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy*. Cell Death Dis, 2017. **8**(1): p. e2540.

349. Chen, J., et al., *Cathepsin cleavage of sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence*. *Am J Pathol*, 2012. **180**(3): p. 973-983.
350. Ito, T., et al., *Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways*. *Cell Rep*, 2018. **22**(13): p. 3480-3492.
351. Tasdemir, N., et al., *BRD4 Connects Enhancer Remodeling to Senescence Immune Surveillance*. *Cancer Discov*, 2016. **6**(6): p. 612-29.
352. Mason, D.X., T.J. Jackson, and A.W. Lin, *Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence*. *Oncogene*, 2004. **23**(57): p. 9238-46.
353. Marampon, F., et al., *HDAC4 and HDAC6 sustain DNA double strand break repair and stem-like phenotype by promoting radioresistance in glioblastoma cells*. *Cancer Lett*, 2017. **397**: p. 1-11.
354. Di Giorgio, E., et al., *HDAC4 degradation during senescence unleashes an epigenetic program driven by AP-1/p300 at selected enhancers and super-enhancers*. *Genome Biol*, 2021. **22**(1): p. 129.
355. Di Giorgio, E. and C. Brancolini, *Regulation of class IIa HDAC activities: it is not only matter of subcellular localization*. *Epigenomics*, 2016. **8**(2): p. 251-69.
356. Parra, M., *Class IIa HDACs - new insights into their functions in physiology and pathology*. *FEBS J*, 2015. **282**(9): p. 1736-44.
357. Cadot, B., et al., *Loss of histone deacetylase 4 causes segregation defects during mitosis of p53-deficient human tumor cells*. *Cancer Res*, 2009. **69**(15): p. 6074-82.
358. Venturelli, S., et al., *Dual antitumour effect of 5-azacytidine by inducing a breakdown of resistance-mediating factors and epigenetic modulation*. *Gut*, 2011. **60**(2): p. 156-65.
359. Liu, F., et al., *Caspase-mediated specific cleavage of human histone deacetylase 4*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34537-46.
360. Momparler, R.L., et al., *Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells*. *Cancer Res*, 1976. **36**(8): p. 2891-5.
361. Paroni, G., et al., *Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(6): p. 2804-18.
362. Di Giorgio, E., et al., *MEF2 is a converging hub for histone deacetylase 4 and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-induced transformation*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(22): p. 4473-91.
363. Cernotta, N., et al., *Ubiquitin-dependent degradation of HDAC4, a new regulator of random cell motility*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(2): p. 278-89.
364. Wells, A., et al., *Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis*. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(5): p. 283-9.
365. Wilson, A.J., et al., *HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(10): p. 4062-75.
366. Mottet, D., et al., *HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism*. *Oncogene*, 2009. **28**(2): p. 243-56.
367. Isaacs, J.T., et al., *Tasquinimod Is an Allosteric Modulator of HDAC4 survival signaling within the compromised cancer microenvironment*. *Cancer Res*, 2013. **73**(4): p. 1386-99.
368. Cheng, C., et al., *HDAC4 promotes nasopharyngeal carcinoma progression and serves as a therapeutic target*. *Cell Death Dis*, 2021. **12**(2): p. 137.
369. Stasevich, T.J., et al., *Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells*. *Nature*, 2014. **516**(7530): p. 272-5.

370. Di Giorgio, E., et al., *Different class IIa HDACs repressive complexes regulate specific epigenetic responses related to cell survival in leiomyosarcoma cells*. *Nucleic Acids Res*, 2020. **48**(2): p. 646-664.
371. Cutano, V., et al., *HDAC7-mediated control of tumour microenvironment maintains proliferative and stemness competence of human mammary epithelial cells*. *Mol Oncol*, 2019. **13**(8): p. 1651-1668.
372. Azagra, A., et al., *In vivo conditional deletion of HDAC7 reveals its requirement to establish proper B lymphocyte identity and development*. *J Exp Med*, 2016. **213**(12): p. 2591-2601.
373. Ma, Q., et al., *Coupling HDAC4 with transcriptional factor MEF2D abrogates SPRY4-mediated suppression of ERK activation and elicits hepatocellular carcinoma drug resistance*. *Cancer Lett*, 2021. **520**: p. 243-254.
374. Wang, X., et al., *YY1 restrained cell senescence through repressing the transcription of p16*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(10): p. 1876-83.
375. Wilson, A.J., et al., *Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13548-58.
376. Geng, H., et al., *HDAC4 protein regulates HIF1alpha protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(44): p. 38095-102.
377. Clocchiatti, A., et al., *Beside the MEF2 axis: unconventional functions of HDAC4*. *Cell Signal*, 2013. **25**(1): p. 269-76.
378. Fan, Q., et al., *A Novel ZIP4-HDAC4-VEGFA Axis in High-Grade Serous Ovarian Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(15).
379. Zhou, L., et al., *A synthetic lethal screen identifies HDAC4 as a potential target in MELK overexpressing cancers*. *G3 (Bethesda)*, 2021. **11**(12).
380. Marek, L., et al., *Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells*. *J Med Chem*, 2013. **56**(2): p. 427-36.
381. Sternberg, C., et al., *Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study of Tasquinimod in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(22): p. 2636-43.
382. Escudier, B., et al., *A Phase II Multicentre, Open-Label, Proof-of-Concept Study of Tasquinimod in Hepatocellular, Ovarian, Renal Cell, and Gastric Cancers*. *Target Oncol*, 2017. **12**(5): p. 655-661.