

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln  
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

# Einfluss der pharmakologischen Inhibierung der lysinspezifischen Histon-Demethylase LSD1 in Leberkrebszellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Marcel Schmiel  
aus Iserlohn

promoviert am 28. März 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. M. Odenthal  
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. R. T. Ullrich

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials wurde ich von Lingyu Wang, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln unterstützt.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Lingyu Wang und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Hannah Eischeid-Scholz und Frau Ulrike Koitzsch selbst durchgeführt worden.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 18.08.2024

Unterschrift: .....

## Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Margarete Odenthal bedanken, die mir die Durchführung der vorliegenden Arbeit und den Einstieg in die experimentelle Forschung ermöglicht hat. Nur durch ihre Betreuung, Förderung und kritische Begutachtung konnte das Projekt zu dem werden, was hier vorgestellt wird. Zudem haben mir ihre Bemühungen dazu verholfen Teil des Graduiertenprogramms: „Pharmacology and Experimental Therapeutics“ zu werden.

Als nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei Lingyu Wang bedanken, die die Betreuung innerhalb des Labors übernommen hat. Sie hat mich an die Experimente herangeführt und mich angeleitet, sodass ich innerhalb kurzer Zeit selbstständig Versuche planen und durchführen konnte. Vielen Dank auch für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und das gemeinsame Nachdenken, wenn das ein oder andere Experiment doch unerwartete Ergebnisse lieferte.

An dieser Stelle möchte ich auch Hannah Eischeid und Ulrike Koitzsch nicht unerwähnt lassen und ihnen meinen Danke aussprechen. Ihr seid/wart die tragenden Kräfte im Labor und habt durch eure positive Ausstrahlung und Unterstützung ein Umfeld geschaffen in dem man nicht nur gut arbeiten konnte, sondern indem man sich auch stets willkommen gefühlt hat.

Ich möchte auch allen beteiligten des Graduiertenprogramms „Pharmacology and Experimental Therapeutics“, aber insbesondere Marion Rozowski meinen Dank aussprechen. Dieses Programm hat es mit ermöglicht, mich eine Zeit ausschließlich auf das Forschungsprojekt zu konzentrieren. Vielen Dank, Marion, für die Organisation der zahlreichen lehrreichen Seminare und Vorträge.

Zu guter Letzt gebührt mein Dank natürlich allen die an der Arbeit beteiligt waren, auch wenn ich nicht alle namentlich erwähnen kann. Vielen Dank für die Unterstützung, Anleitungen, Diskussionen und manchmal nur für ein offenes Ohr.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
2.1. Das hepatozelluläre Karzinom	11
2.1.1. Epidemiologie	11
2.1.2. Behandlung	12
2.1.3. Molekulare Pathophysiologie des Hepatozellulären Karzinoms	13
2.2. Epigenetik in Krebserkrankungen	13
2.2.1. Die Lysin-Spezifische Demethylase 1 (LSD1)	14
2.2.2. LSD1-Effekte	15
2.2.3. Pharmakologische LSD1-Inhibierung	15
2.3. Zielsetzung	16
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
3.1. Material	17
3.1.1. Geräte	17
3.1.2. Software	17
3.1.3. Kits und Assays	19
3.1.4. Reagenzien und Chemikalien	19
3.1.5. Primer	20
3.1.6. Immunchemikalien	21
3.1.7. Zelllinien	21
3.2. Methoden	21
3.2.1. Zellkultur	21
3.2.2. Expressionsanalysen	22
3.2.3. Mitochondriale Analysen	24
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
4.1. Einfluss der pharmakologischen LSD1-Inhibierung auf den Zellmetabolismus	35
4.1.1. Veränderte Genexpressionsmuster nach LSD1 Hemmung	35

4.1.2.	Die Wirkung der LSD1-Hemmung auf die Expression der Gene des Energiemetabolismus	39
4.1.3.	Einfluss der LSD1 Hemmung auf Expressionsprofile der nukleär kodierten Komponenten der mitochondrialen Atmungskette	40
4.2.	<b>MORPHOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE VERÄNDERUNGEN NACH PHARMAKOLOGISCHER LSD1-INHIBIERUNG</b>	41
4.2.1.	Morphologische mitochondriale Veränderungen in Hepatomazellen nach pharmakologischer LSD1 Hemmung durch den C12-Inhibitor	42
4.2.2.	Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials nach LSD1-Hemmung mittels C12	43
4.2.3.	Metabolische Analyse zeigt verminderte mitochondriale Respiration, ATP-Produktion und Reservekapazität unter C12-Behandlung	47
4.2.4.	Ultrastrukturelle Analyse	50
5.	<b>DISKUSSION</b>	53
5.1.	Einfluss der pharmakologischen LSD1-Inhibierung auf die Genexpression	53
5.2.	Konsequenzen der pharmakologischen LSD1-Hemmung auf den Zellmetabolismus	55
5.3.	Auswirkungen der reduzierten Zellatmung auf die Tumorprogression nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung	57
5.4.	Zusammenfassung und Ausblick	59
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	61
7.	<b>ANHANG</b>	67
7.1.	Abbildungsverzeichnis	67
7.2.	Tabellenverzeichnis	68

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.....	Abbildung
ANOVA.....	analysis of variance
ARID1A .....	AT-Rich Interaction Domain 1A kodierendes Gen
ATP .....	Adenosintriphosphat
BCLC.....	Barcelona Clinic Liver Cancer
BLAST .....	Basic Local Alignment Search Tool
bspw.....	beispielsweise
bzw.....	beziehungsweise
C12.....	Compound 12; LSD1-Inhibitor
CCCP .....	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CDKN2A.....	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/p16 kodierendes Gen
cDNA.....	complementary DNA
CECAD..	Cologne Cluster of Excellence on Cellular stress responses in Aging-associated Diseases
ChIP .....	Chromatin-Immunopräzipitation
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
CoREST .....	Corepressor for RE1-Silencing Transcription Factor
CRISPR/cas9...	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Methode zur Genom-Editierung
CTNNB1 .....	beta-Catenin kodierendes Gen
DMEM .....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonucleic Acid
DNMT1 .....	DNA-Methyltransferase 1
E2F.....	E2F-Transcription-Factor 1
ECAR .....	Extracellular Acidification Rate
et al. ....	et alri
ETC .....	Electron Transport Chain
EtOH .....	Ethanol
FACS.....	FLuorescence Activated Cell Sorting
FAD .....	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP .....	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FCS	Fetal Calf Serum
FSC	forward scatter
ggf.	gegebenenfalls
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
H <sub>2</sub> O	Wasser
H3	Histon 3
H3K4me <sub>1/2</sub>	Mono-/Dimethyliertes Lysin 4 an Histon 3
H3K9me <sub>1/2</sub>	Mono-/Dimethyliertes Lysin 9 an Histon 3
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; Pufferlösung
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; Haushaltsgen
i.d.R.	in der Regel
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; Datenbank, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; Datenbank
Log	Logarithmus
LSD	Lysin-spezifische-Demethylase
M	Molar
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
n.s	nicht signifikant
NADH/NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer, Nanometer
Nrf1	Nuclear Respiratory Factor 1
OCR	Oxygen-Consumption-Rate
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Positronen-Emissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PINK1	PTEN Induced Kinase 1
pmol	Pikomol
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion

RNA.....	Ribonucleic Acid
ROS .....	Reactive Oxygen Species
rpm .....	rounds per minute
shRNA.....	short-hairpin-RNA
siRNA .....	small-interfering-RNA
SSC.....	side scatter
SWIRM.....	Swi3p/Rsc8p/Moira, LSD1-Domäne
TERT .....	Telomerase Reverse Transcriptase
TME.....	Tumor Microenvironment
TMRM .....	Tetramethylrhodamin-methylester
TP53.....	p53 kodierendes Gen
u.a. ....	unter anderem
UPS.....	Ubiquitin-Proteasom-System
UV .....	ultraviolett
WHO .....	World Health Organization
z.B. ....	zum Beispiel
µl .....	Mikroliter
µM.....	mikromolar

### 1. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit gesehen die sechsthäufigste Krebsneuerkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache. Im Vergleich dazu ist die Inzidenz in Deutschland gegenwärtig geringer, jedoch ist von einer Zunahme in Folge von Hyperalimentation und der damit verbundenen nicht-alkoholischen Steatohepatitis auszugehen. Trotz einiger therapeutischer Fortschritte in den letzten Jahren ist die Prognose insgesamt schlecht, was nicht zuletzt auf eine späte Diagnose in fortgeschrittenen Stadien zurückzuführen ist. In diesen Stadien erhalten die Patienten vor allem systemische Therapeutika, wie Chemotherapeutika und Multityrosinkinaseinhibitoren da chirurgisch-interventionelle Verfahren i.d.R. nicht mehr in Frage kommen. Die Entwicklung neuer Pharmakotherapien ist daher essentiell, um das Überleben auch in fortgeschrittenen Tumorstadien zu verbessern.

Die lysinspezifische-Demethylase 1 (LSD1) entfernt Methylgruppen des Lysin 4 und 9 des Histon H3. Je nach Lysin und rekrutierten Co-Faktor kann dadurch eine Hochregulierung oder Repression bestimmter Gene bedingt werden, was zu weitreichenden Expressionsveränderungen der Zelle führt. Aktuelle Studien konnten eine Überexpression von LSD1 in zahlreichen onkologischen Erkrankungen, wie Lungenkrebs oder dem hepatozellulärem Karzinom belegen. Dies hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren zahlreiche pharmakologische Inhibitoren entwickelt wurden, wobei der C12-Inhibitor von Sorna et al. als besonders spezifisch und effektiv hervorgegangen ist.

In Rahmen unserer Studie haben wir untersucht welche Effekte die pharmakologische LSD1-Hemmung mittels C12 in Krebszellen mit Fokus auf das HCC hat. Dazu haben wir Proben unter LSD1-Inhibierung sowie Kontrollproben RNA-sequenziert, wobei hier weitreichende Veränderungen des Transkriptoms zu beobachten waren. Eine bioinformatische Untersuchung der alterierten Gennetzwerke hat hierbei umfangreiche Veränderungen metabolischer Signalwege in HCC-, sowie Lungenadenokarzinom- und Zervixkarzinomzelllinien ergeben. Insbesondere kam es zu einer transkriptionellen Repression zahlreicher Gene die für Untereinheiten des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette codieren, sowie zu einer Expressionszunahme von mitophagieassoziierten Genen, die auch mittels qPCR validiert werden konnten. Funktionelle mikroskopische und durchflusszytometrische Analysen haben zudem eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials belegt und somit eine funktionelle Einschränkung suggeriert. Diese wurde mit Hilfe des „Seahorse XFe96-Device“, weiter untersucht, wobei hier gezeigt werden konnte, dass Zellen unter LSD1-Hemmung einen geringeren basalen Sauerstoffverbrauch, als Ausdruck der basalen mitochondrialen Aktivität, aufweisen. Weiterhin zeigte sich eine deutlich reduzierte ATP-Produktion, maximale Respiration und Reservekapazität. Außerdem konnten

## 1. Zusammenfassung

---

in ultrastrukturellen Analysen der Mitochondrien deutliche morphologische Zeichen der Schädigung, wie eine verminderte Dichte, Verlust der Cristae und ein Ödem beobachtet werden.

Abschließend hat die durchgeführte Arbeit bewiesen, dass die pharmakologische LSD1-Hemmung in Krebszellen, insbesondere Hepatomazelllinien, zu einer Einschränkung der mitochondrialen Respiration, mit der Folge eines dysregulierten Energiehaushalts führt. Es ist anzunehmen, dass die LSD1-Hemmung neben den belegten Effekten auf den Zellzyklus auch über eine ATP-Depletion, verminderte „metabolische Fitness“ und eine verringerte metabolischen Plastizität das Wachstum und die Proliferation von Krebszellen hemmt.

Ob die Effekte direkte Konsequenzen einer LSD1-vermittelten Expressionsregulation sind oder ob indirekte Effekte und veränderte Protein-Protein-Interaktionen ausschlaggebend sind ist bisher nicht abschließend geklärt und Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

## 2. Einleitung

## 2. Einleitung

### 2.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre, maligne Lebertumor und lässt sich gemäß der Tumorklassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in mehrere Subtypen, wie z.B. das fibrolamelläre oder trabekuläre HCC, unterteilen<sup>2,3</sup>. Die Leberzirrhose ist der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung des Tumors, wobei ätiologisch Virushepatitiden und eine äthyltoxische Genese im Vordergrund stehen<sup>3,4</sup>. Aktuell gewinnt auch, insbesondere in Industrienationen, die nicht-alkoholische Steatohepatitis in Folge von Übergewicht und Diabetes mellitus Typ II an Bedeutung<sup>3,4</sup>.

#### 2.1.1 Epidemiologie

In Deutschland tritt das hepatozelluläre Karzinom eher selten auf (Abb. 1)<sup>1</sup>. Die Anzahl an Neuerkrankung betrug 2018 etwa 9500 Fälle, wobei der Großteil auf Männer entfällt<sup>5</sup>. Trotz der vergleichsweise geringen Inzidenz, weist der Tumor eine hohe Mortalität mit circa 8000 Todesfällen pro Jahr auf und ist damit die siebthäufigste Krebstodesursache in Deutschland<sup>5,6</sup>. Es wird mit einer deutlichen Zunahme der Inzidenz in den nächsten Jahren gerechnet<sup>3,7</sup>.

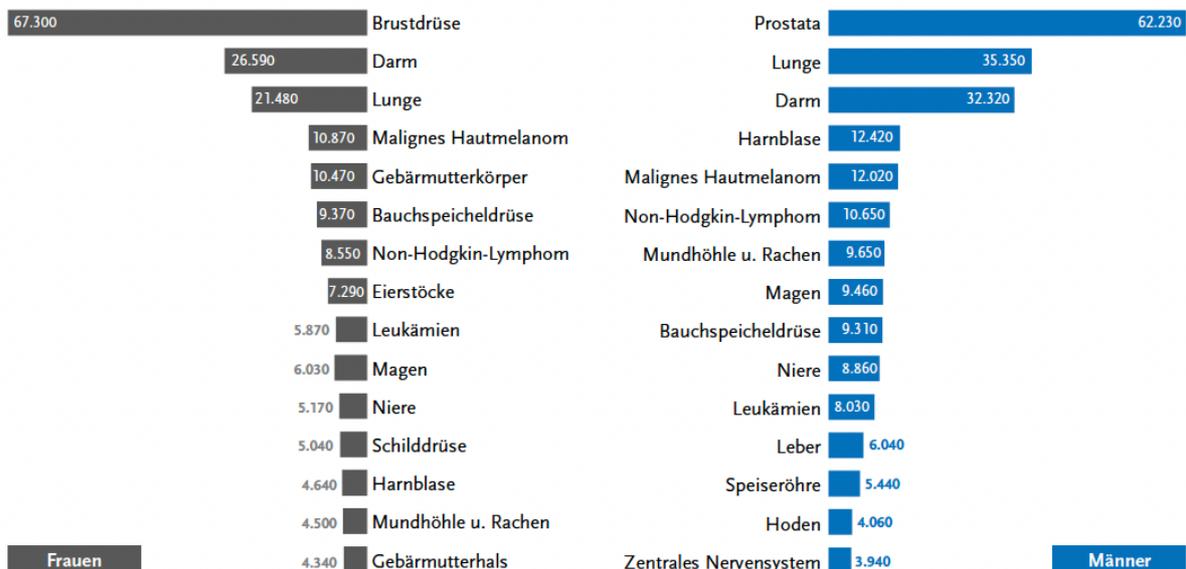
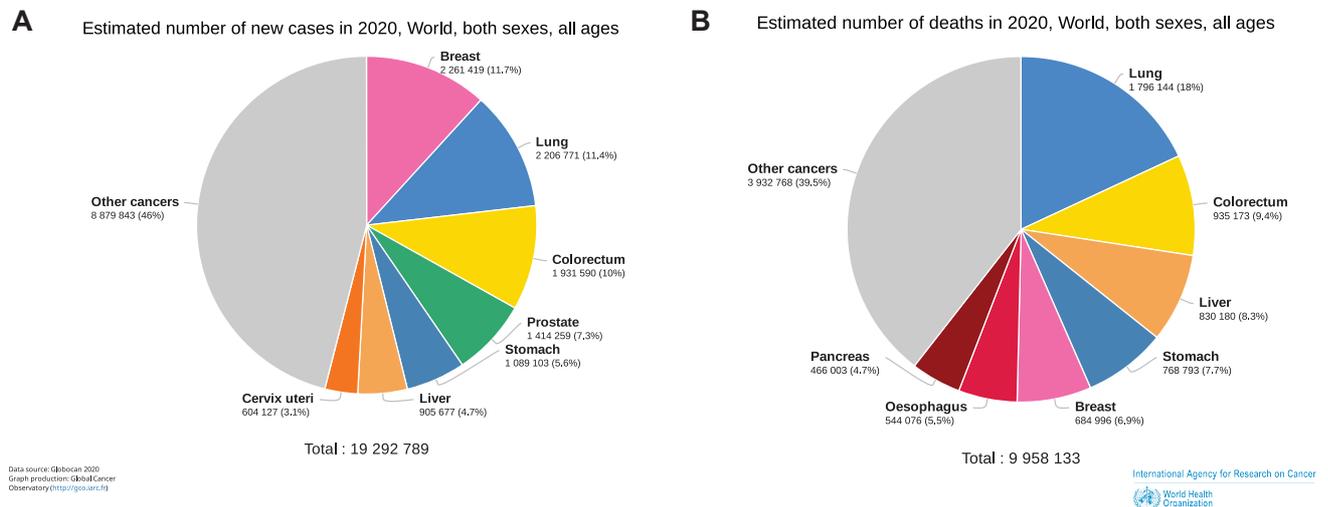


Abbildung 1: Bundesweite Inzidenz von Krebserkrankungen nach Geschlecht in Deutschland<sup>1</sup>

Dargestellt wird die, nach Geschlechtern aufgetrennte, Anzahl bundesweiter Krebsneuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2017. In der Gruppe der Männer wurden 6 040 Leberkrebsneuerkrankungen gefasst, bei den Frauen fällt diese Erkrankung nicht in die Gruppe der häufigsten Krebsneuerkrankungen (Abbildung nach Gurung-Schönfeld I., 2021)<sup>1</sup>.

## 2. Einleitung

Im weltweiten Vergleich ist die Inzidenz des HCC deutlich höher als in Deutschland und liegt, Stand 2020, mit über 900 000 neuen Fällen auf Platz sechs der Krebsneuerkrankungen (Abb. 2A)<sup>8,9</sup>. Aus globaler Sicht ist das HCC die dritthäufigste Krebstodesursache und für 8,3 % der krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich (Abb. 2B)<sup>8,9</sup>.



**Abbildung 2: Weltweite Epidemiologie der häufigsten Krebserkrankungen für alle Geschlechter**

(A) Darstellung der geschätzten Anzahl weltweiter Krebsneuerkrankungen bezogen auf beide Geschlechter und alle Altersgruppen für das Jahr 2020. (B) Geschätzte Anzahl von weltweiten krebsassoziierten Todesfällen für beide Geschlechter und alle Altersgruppen für das Jahr 2020 (Abbildung generiert mittels GLOBOCAN 2020 database, Ferlay J. et al., 2020)<sup>8-10</sup>

### 2.1.2 Behandlung

Die Therapie des hepatozellulären Karzinoms erfolgt stadienabhängig, wobei der bereits 1999 vorgestellte und mehrfach validierte „Barcelona Clinic Liver Cancer“ (BCLC) – „Staging Score“ verwendet wird<sup>4,11,12</sup>. Ausschlaggebend für Einordnung der Patienten in die mittlerweile fünf Stadien sind die Tumorlast, die Leberfunktion und der Allgemeinzustand des Patienten<sup>11,13,14</sup>. Gemäß aktuellen Leitlinien und Empfehlungen werden in den frühen bis intermediären Stadien eine Resektion, ablative Verfahren oder die Lebertransplantation empfohlen. In den fortgeschrittenen Fällen kommen systemische Therapien, wie die Kombination einer Immuncheckpoint-Blockade mit einer antiangiogenetischen Therapie oder eine Behandlung mit Multityrosinkinaseinhibitoren, wie Sorafenib in Frage<sup>4,7,12,14</sup>.

Trotz einiger Fortschritte hinsichtlich der Therapie ist das HCC global gesehen mit einer schlechten Prognose und einer hohen Mortalität assoziiert<sup>8,9</sup>. Wie epidemiologische Daten aus Deutschland belegen werden die meisten Patienten erst in fortgeschrittenen Tumorstadien diagnostiziert, was maßgeblich zur schlechten Prognose beiträgt<sup>5</sup>.

## 2. Einleitung

---

### 2.1.3 Molekulare Pathophysiologie des Hepatozellulären Karzinoms

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die Entstehung der meisten HCC ein sequenzieller Prozess ist, welcher mit der Zirrhose startet und über „low“- und „high-grade“ dysplastische Knoten schließlich im hepatozellulärem Karzinom mündet<sup>7,15</sup>. Während der Karzinogenese kommt es zu einer Akkumulation von somatischen Mutationen in der Läsion. Genetische Untersuchungen konnten hierbei herausarbeiten, dass insbesondere Mutationen im TERT-Promotor, gefolgt von TP53- und CTNNB1-Mutationen die häufigsten somatischen Genalterationen im HCC sind<sup>7,16-18</sup>.

Neben den genetischen Veränderungen im HCC, werden auch zunehmend epigenetische Alterationen beschrieben, die das Transkriptom der Zellen beeinflussen können<sup>19,20</sup>. Diese Veränderungen werden einerseits durch Mutationen epigenetischer Faktoren (z.B. ARID1A)<sup>16,18</sup>, andererseits aber auch durch Expressionsveränderungen dieser Faktoren bedingt<sup>19,20</sup>. Folgen in der Krebszelle sind eine veränderte DNA-Methylierung, abweichende Histonmodifikationen und daraus resultierende weitreichende Expressionsveränderungen deren Auswirkung man gerade erst zu verstehen beginnt<sup>19</sup>.

## 2.2 Epigenetik in Krebserkrankungen

Die Epigenetik befasst sich im Wesentlichen mit Prozessen der Genexpression die nicht durch Veränderungen der Desoxyribonucleinsäuresequenz (DNA) hervorgerufen werden<sup>21</sup>. Hierbei spielen insbesondere die direkte Methylierung der DNA, Histonmodifikationen und nicht-codierende Ribonucleinsäuren (RNA) eine wichtige Rolle<sup>22</sup>. Die Folgen sind eine veränderte Transkriptionsregulation, eine Veränderung der RNA-Prozessierung und der RNA-Stabilität<sup>21-23</sup>.

Die Forschung der letzten Dekaden hat gezeigt, dass epigenetische Modifikationen nicht nur im Rahmen physiologischer Regulationsprozesse notwendig sind, sondern dass sie auch bei Krebserkrankungen eine entscheidende Rolle spielen<sup>21,24</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Epigenom in Krebszellen deutlich von dem nicht-transformierter Zellen unterscheidet<sup>21,25,26</sup>. Konsequenzen dieser „epigenetischen Umprogrammierung“ können z.B. die Repression bestimmter Tumorsuppressorgene, wie CDKN2A, oder die Aktivierung von Onkogenen sein, die zur malignen Transformation beitragen<sup>21,25</sup>.

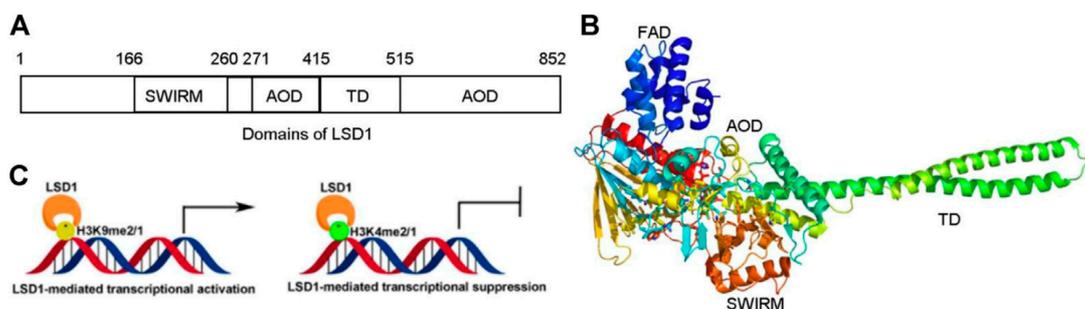
Insbesondere sind hierbei die Histonmodifikationen ein vielschichtiger und komplexer Prozess, der von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird<sup>21,25</sup>. Je nach Histonrest und Faktor können Histone (de-)acetyliert, (de-)methyliert oder (de-)phosphoryliert werden<sup>21,25</sup>. In Zusammenarbeit mit anderen Proteinen bilden die epigenetischen Faktoren übergeordnete Komplexe, wie den Polycomb-Repressor- oder den CoREST-Komplex, die eine tragende

## 2. Einleitung

Rolle bei der „epigenetischen Umprogrammierung“ in verschiedenen Krebserkrankungen spielen<sup>22,27</sup>. Neben genomischen Alterationen gewinnen daher epigenetische Faktoren als Ziele innovativer Therapiestrategien an Bedeutung. So haben zahlreiche Studien die Überexpression der lysinspezifischen Demethylase 1 (LSD1) in zahlreichen Krebserkrankungen nachgewiesen<sup>29-32</sup>.

### 2.2.1 Die Lysin-Spezifische Demethylase 1 (LSD1)

LSD1 wurde 2004 entdeckt und ist die erste beschriebene Histondemethylase, die zu der Familie der Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängigen Aminooxidasen gezählt wird<sup>33</sup>. Das Protein besteht aus 852 Aminosäuren und bildet drei verschiedene strukturelle/funktionelle Domänen aus: Die N-terminale „SWIRM“-Domäne, die „Tower“-Domäne und die katalytisch aktive Aminooxidase-Domäne (Abb. 3A u. B)<sup>34,35</sup>.



**Abbildung 3: Struktur und Funktion von LSD1**

(A) Schematische Darstellung des LSD1-Aufbaus und der verschiedenen Domänen. (B) Dreidimensionale Proteinstruktur mit Bindung des Co-Faktors FAD. (C) Schematische Darstellung der LSD1-vermittelten transkriptionellen Regulation über die Demethylierung von H3K9me2/1 und H3K4me2/1 (Abbildung nach Yang et al., 2022)<sup>36</sup>

Sie kann spezifisch an mono- und dimethylierte Lysinresiduen von Histon 3 (H3K4me1/2; H3K9me1/2) binden, über eine Oxidationsreaktion die Methylreste entfernen und so zu einer transkriptionellen Regulation führen<sup>33,34,37</sup>. Hierbei vermittelt die Aktivität von LSD1 an H3K4me1/2 eine Repression, während die Demethylaseaktivität an H3K9me1/2, in Zusammenschluss mit weiteren Faktoren, eine transkriptionelle Aktivierung bedingt (Abb. 3C)<sup>33,34,37</sup>. Weiterhin konnten aktuelle Arbeiten belegen, dass LSD1 nicht nur über direkte Histonmodifikationen die Genexpression reguliert, sondern auch über die Demethylierung weiterer Proteine, wie z.B. die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) oder TP53<sup>34,38-40</sup>. Neben der katalytischen Aktivität spielen auch, über die „Tower“-Domäne vermittelte, Protein-Protein-Interaktionen eine wesentliche Rolle<sup>41</sup>. Es gibt sogar erste Hinweise darauf, dass die Interaktionen mit Cofaktoren für die Expressionsregulation wichtiger sind, als die direkte Demethylierung von Histonen und anderen Proteinen<sup>41</sup>.

## 2. Einleitung

---

### 2.2.2 LSD1-Effekte

Im physiologischen Kontext spielt LSD1 insbesondere im Rahmen der Embryonalentwicklung, bzw. bei der Differenzierung verschiedener Gewebe eine wichtige Rolle<sup>53</sup>. LSD1 ist hierbei so essentiell, dass ein „knock-out“ letal verläuft<sup>54</sup>. Es konnte zudem gezeigt werden, dass es direkt und indirekt bestimmte Stoffwechsellgene reguliert, umfassende Veränderungen des Zellmetabolismus hervorrufen kann und ein zentraler Faktor im Rahmen der Adipogenese sowie Thermogenese ist<sup>55-57</sup>.

Neben den physiologischen Aspekten, hat LSD1 auch in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen eine Bedeutung<sup>53,58</sup>. Insbesondere konnte in verschiedenen hämatologischen und soliden Neoplasien, wie dem Lungen-, Mamma- und hepatozellulären Karzinom eine Überexpression nachgewiesen werden<sup>29-32,59</sup>, wodurch es ein attraktives Ziel der pharmakologischen Therapie onkologischer Erkrankungen geworden ist<sup>36,50,51</sup>.

### 2.2.3 Pharmakologische LSD1-Inhibierung

Um den Effekt und potentiellen Nutzen der LSD1-Hemmung in onkologischen Erkrankungen zu untersuchen, wurde in den letzten Jahren eine Reihe verschiedener pharmakologischer Inhibitoren erprobt. Da LSD1 eine Aminooxidase-Domäne aufweist<sup>33</sup>, hat man zunächst klinisch etablierte Monoaminooxidase(MAO)-Inhibitoren und deren Derivate getestet<sup>42-44</sup>. Während in hämatologischen Neoplasien und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom eine verminderte Proliferation beobachtet wurde, konnte in den anderen getesteten Entitäten kein überzeugender Effekt auf das Krebszellwachstum und die Proliferation nachgewiesen werden<sup>42,45</sup>.

In einem umfassenden „Screening“-Verfahren hat man eine neue Gruppe von LSD1-Inhibitoren entdeckt: Die N'(-1-Phenylethyliden) - benzohydrazide, mit dem "Compound" 12 (C12, Synonym HCl-2509) als Leitsubstanz<sup>46</sup>. Hierbei handelt es sich um einen reversiblen und spezifischen „small-molecule“- Inhibitor, der in Studien überzeugende antineoplastische Effekte in zahlreichen Tumoren, wie dem Lungen-, Prostata- und Endometriumkarzinom zeigen konnte<sup>45,47-49</sup>.

Aufgrund der positiven Resultate in präklinischen Untersuchungen, wird der Effekt verschiedener Inhibitoren, meist in Kombinationen mit anderen Therapeutika, aktuell in klinischen Studien überprüft<sup>50-52</sup>.

## 2. Einleitung

---

### 2.3 Zielsetzung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine häufige Krebsneuerkrankung, die mit einer steigenden Inzidenz und einer besonders hohen Mortalität verbunden ist. Insbesondere die Tatsache, dass viele Patienten erst in späten Erkrankungsstadien diagnostiziert werden, trägt zu der schlechten Prognose bei und unterstreicht wie wichtig die Entwicklung neuer Therapieansätze ist.

Zielsetzung der vorgestellten Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss die pharmakologische LSD1-Hemmung auf Krebszellen, mit Fokus auf das hepatozelluläre Karzinom, hat. Für den Ansatz standen die Hepatoma Zellen Huh7, Hep3B und HepG2 zur Verfügung. Für die pharmakologische Hemmung von LSD1 sollte der reversible Inhibitor C12 herangezogen werden.

Da LSD1 mittels Demethylierung weitreichende epigenetische Veränderungen hervorruft, sollte zunächst ermittelt werden, wie sich die Hemmung auf das Transkriptom der Zellen auswirkt. Hierzu wurden vorliegende RNA-Sequenzierungs-Daten verschiedener Krebszelllinien ausgewertet. Mittels bioinformatischer Methoden sollte hierbei herausgearbeitet werden, ob bestimmte Signalwege der Zellen unter LSD1-Hemmung signifikanten Änderungen unterliegen. In Abhängigkeit der Resultate war es das weiterführende Ziel der Studie, die funktionellen Auswirkungen auf die Krebszellen mit laborexperimentellen Methoden zu untersuchen.

## 3. Material und Methoden

---

### 3. Material und Methoden

Im Folgenden Kapitel findet sich eine Auflistung der, im Rahmen der vorgestellten Dissertation verwendeten, Materialien, sowie eine Beschreibung der angewandten Methoden.

#### 3.1 Material

Folgende Materialien wurden in der vorgelegten Arbeit verwendet:

##### 3.1.1 Geräte

Die nachfolgend aufgelisteten Geräte wurden für die Durchführung und/oder Auswertung der durchgeführten Experimente benutzt.

**Tabelle 1: Geräte**

Gerät	Hersteller
BD FACS Verse Flow Cytometer	BD Bioscience, San Jose, US
Biometra T3000 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Biozym Sprout Minizentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, München, DE
Centrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, DE
CFX 96 Real Time System	Bio-Rad, München, DE
Fluostar Optima	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, DE
GPR-Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Heraeus Pico 17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
JEM 2100 Plus Elektronenmikroskop	Joel, Akashima, JP
Leica EM UC7 Ultramikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Nikon Eclipse TE300 Inverted Microscope	Nikon Corporation, Tokyo, JP
Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, US
TCS SP8 Konfokales Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Vortex Genie	Scientific Industries Inc., Bohemia, US

##### 3.1.2 Software

Die unten aufgeführte Software wurde im Rahmen der Promotionsarbeit verwendet.

### 3. Material und Methoden

**Tabelle 2: Software**

<b>Methode</b>	<b>Software</b>	<b>Herausgeber</b>
Bildanalyse	Cell <sup>^</sup> P	Olympus, Shinjuku, JPN
	ImageJ	open source ( <a href="https://imagej.nih.gov/ij/download.html">https://imagej.nih.gov/ij/download.html</a> )
	LAS X	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
cDNA Synthese	NanoDrop 1000 Version 3.7.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Durchflusszytometrie	BD FACSuite Software	BD Bioscience, San Jose, US
Primer-Design	Universal Probe Library Assay Design Center	Roche, Basel, CH
	Primer-Basic Local Alignment Search Tool (Primer-BLAST)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, US
qPCR	Bio-Rad CFX Maestro	Bio-Rad, München, DE
RNA-Sequenzierung	Integrative Genomics Viewer	Broad Institute, Cambridge, US
Seahorse XFe96	Seahorse Wave Desktop	Agilent Technologies, Santa Clara, US
Sonstiges	Microsoft Excel 2016	Microsoft, Redmond, US
	GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, US
	R 4.1.0	R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AU URL <a href="https://www.R-project.org/">https://www.R-project.org/</a> .
	R Studio Version 1.4.1717	R Studio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, US URL <a href="http://www.rstudio.com/">http://www.rstudio.com/</a>
	ggplot2	Springer-Verlag New York, US
	Adobe Illustrator 2021	Adobe Inc., San Jose, US

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.3 Kits und Assays

Die im Rahmen der vorgestellten Arbeit verwendeten Kits und Assays sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 3: Kits und Assays**

<b>Methode</b>	<b>Kit/Assay</b>	<b>Herausgeber</b>
Proteinbestimmung	Pierce Protein BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
	Pierce Comassie (Bradford) Protein-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
cDNA-Synthese	TaqMan Micro RNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Forster City, US
qPCR	GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Madison, US
Seahorse XFe96	Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, US

#### 3.1.4 Reagenzien und Chemikalien

In der folgenden Tabelle werde die, für die Durchführung der Experimente benötigten, Reagenzien und Chemikalien tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien**

<b>Methode</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Herausgeber</b>
Elektronenmikroskopie Färbungen	Glutaraldehyd 2,5 %	Herstellung laborintern
	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
	JC1	Invitrogen, Carlsbad, US
	Mitochondrial Staining Kit - NIR Fluorescence - Cytopainter (ab176747)	Abcam, Cambridge, UK
	Phalloidin Atto 488	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
	Roti-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Immunfluoreszenz	Tetramethylrhodamin-methylester	Invitrogen, Carlsbad, US
	Gelatin from cold water fish skin	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
	Paraformaldehyd	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
	Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
	Triton X 100	Merck, KGaA, Darmstadt, DE

### 3. Material und Methoden

LSD1 Hemmung	HCI-2509	Xcess Bioscience Inc, Chicago, US
RNA-Isolierung	Chloroform	Merck KGgA, Darmstadt, DE
	Ethanol (EtOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
	GlycoBlue Coprecipitant (15 mg/mL)	Invitrogen, Carlsbad, US
	Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
	TRI Reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Seahorse XFe96	Agilent Seahorse XF Calibrant	Agilent Technologies, Santa Clara, US
	Seahorse XF DMEM, pH 7,4	Agilent Technologies, Santa Clara, US
	Seahorse XF Glucose (1,0 M solution)	Agilent Technologies, Santa Clara, US
	Seahorse XF L-Glutamine (200mM)	Agilent Technologies, Santa Clara, US
	Seahorse XF Pyruvate (100 mM solution)	Agilent Technologies, Santa Clara, US
	Coomassie Protein Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zellkultur	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
	Fetal Bovine Serum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
	0,05% Trypsine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

#### 3.1.5 Primer

Folgend finden sich die Nukleotidsequenzen der Primer, die zur Durchführung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) Anwendung fanden.

**Tabelle 5: Primer**

Zielgen	Sequenz	Spezies
HPRT_F	GACCAGTCAACAGGGGACAT	Homo sapiens
HPRT_R	GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG	Homo sapiens
NDUFA12_F	GGCAAGATGGAGTTAGTGCAG	Homo sapiens
NDUFA12_R	AACCTTCGCATCATTTGTCC	Homo sapiens
NDUFA2_F	ATGTGCAGCCCAAGCTCT	Homo sapiens
NDUFA2_R	GGCTTCAGGCTTTACCACTTAG	Homo sapiens
NDUFA8_F	ATGCCGGGGATAGTGGAG	Homo sapiens
NDUFA8_R	GCACAGCAGAACTAATTTTCACC	Homo sapiens
NDUFS1_F	CCAGACAGTTTAGCAGAACAGC	Homo sapiens
NDUFS1_R	AAGGCCTTTCTTACAGGTATCCTT	Homo sapiens

### 3. Material und Methoden

NDUFS4_F	AAGATGCAGTTTCCTTTGCAG	Homo sapiens
NDUFS4_R	TTGGACTTGGGTTTTGGAAC	Homo sapiens
NDUFS6_F	GTGGAGACTCGGGTGATAGC	Homo sapiens
NDUFS6_R	GCCGGTTTTTGTTCCTTTGT	Homo sapiens
NDUFS7_F	ATTCCTACTCGGTGGTGAGG	Homo sapiens
NDUFS7_R	TCCCGCTTGATCTTCCTCT	Homo sapiens
NDUFS8_F	TGCTTGGCAAGGCAAGTAG	Homo sapiens
NDUFS8_R	CACCAGGAGGTCCTGCAC	Homo sapiens
NDUFV1_F	CATCCGAGGGGAATTCTACA	Homo sapiens
NDUFV1_R	GCACCACAAACACGTCAAAA	Homo sapiens

#### 3.1.6 Immunchemikalien

Tabelle 6: Immunchemikalien

Ziel	Artikelnummer und Hersteller
Phalloidin Atto 488	Sigma-Aldrich, St. Louis, US, 49409

#### 3.1.7 Zelllinien

Die untenstehenden, humanen Zelllinien wurden für die Durchführung der Experimente in Kultur gehalten.

Tabelle 7: Zelllinien

Name der Zelllinie	Ursprung	Entität
HepG2	Homo sapiens	Hepatozelluläres Karzinom
Huh7	Homo sapiens	Hepatozelluläres Karzinom
HeLa	Homo sapiens	Adenokarzinom Zervix
A549	Homo sapiens	Adenokarzinom Lunge
PC9	Homo sapiens	Adenokarzinom Lunge

### 3.2 Methoden

Im Folgenden sind die in dieser Promotion verwendeten Methoden aufgelistet und beschrieben.

#### 3.2.1 Zellkultur

##### 3.2.1.1 Passagieren der Zellen

### **3. Material und Methoden**

---

Die verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 10% Fetalen Kälber Serum (FCS), kultiviert. Sobald die Zellkonfluenz 80% betrug wurden die Zellen unter Verwendung von 0,05% Trypsin passagiert.

#### **3.2.1.2 HCI-2509 vermittelte LSD1 Hemmung**

Zur pharmakologischen LSD1 Hemmung wurde der Inhibitor HCI-2509/C12 verwendet, welcher im Rahmen eines umfassenden Screenings als spezifischer, reversibler Hemmstoff identifiziert werden konnte<sup>46</sup>. Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen mit einer 2 µM C12-Lösung für 72 Stunden behandelt.

### **3.2.2 Expressionsanalysen**

#### **3.2.2.1 Auswertung Ultra-Deep-RNA-Sequenzierung**

Zur Beurteilung von Expressionsänderungen wurden Ergebnisse von bereits akquirierten RNA-Sequenzierungen ausgewertet. Hierbei wurden unter C12-Behandlung und unter Kontrollbedingungen kultivierte Zellen der Hepatoma-Zelllinien HepG2 und Huh7, der Lungenadenokarzinom-Zelllinien A549 und PC9 sowie der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa verwendet. Alle Proben lagen in Triplikaten vor. Die Vorbereitung der HepG2, Huh7 und HeLa Zellen erfolgte durch Lingyu Wang im Rahmen ihrer Promotionsarbeit<sup>60</sup>, die der A549 und PC9 Zellen durch Priya Dalvi<sup>61</sup>. Anschließend wurden die Sequenzierung der Proben (3'-RNA-Sequenzierung, paired-end, 150 bp) und Erstellung eines Analysereports Novogene (Novogene Co., Ltd, Beijing, CHN) in Auftrag gegeben. Die Sequenzierung erfolgte mittels Illumina HiSeq Systemen (Illumina, San Diego, US). Im Bericht wurden u.a. die Ergebnisse einer KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)<sup>62</sup> Pathway-Analyse dargestellt. Bei KEGG handelt es sich um eine umfassende Datenbank, die es u.a. ermöglicht, die bei der Sequenzierung gewonnenen Daten bestimmten Prozessen der Zelle zuzuordnen<sup>63</sup>. Die weitere Auswertung unterschiedlich exprimierter Gene erfolgte auf Basis dieser Analyse, wobei als Maßstab für die Expressionsunterschiede der Log2 Fold Change (Read Counts C12/Read Counts Kontrolle) herangezogen wurde.

#### **3.2.2.2 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung erfolgte aus Zellkultur Proben, wobei die gewählte Methode auf der „single-step“ RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi basiert<sup>64</sup>. Das Medium wurde entfernt und die adhären Zellen zweimal mit RNase-freiem PBS gespült. Pro 10<sup>6</sup> Zellen wurden 500 µl TriReagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, US) zu der adhären Zellkultur gegeben. Das im Reagenz enthaltene Guanidin-Isothiocyanat lysiert die Zellen, denaturiert

### 3. Material und Methoden

---

Proteine und inaktiviert dementsprechend auch RNasen. Zusätzlich werden Proteine und Nukleinsäuren mittels Phenols getrennt. Die lysierten Zellen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Chloroform zum Lysat hinzugefügt, um eine Trennung der Phasen zu erreichen, sodass nach Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm für 15 Minuten eine untere organische Phase, eine DNA enthaltene Interphase und eine obere RNA-reiche wässrige Phase zu erkennen sind. Im Folgenden wurde die RNA-reiche Phase in ein neues Eppendorf Tube überführt und in 250 µl Isopropanol gefällt. Nach Zugabe von 1,5 µl Glykogen (15mg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, US) wurden die Proben über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, woraufhin das RNA-Präzipitat mit 500 µl Ethanol 75% gereinigt wurde. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 14000 rpm. Der Ethanolüberstand wurde abpipettiert und das RNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 25 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration und Reinheit spectrophotometrisch bestimmt. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

#### 3.2.2.3 cDNA-Synthese

Für die folgende cDNA-Synthese wurde das TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Foster City, US) verwendet. Für einen 10 µl Ansatz wurden 500 ng RNA in 7,1 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurden 1 µl 10X RT Buffer, 1 µl 10X Random Primer, 0,4 µl 25X dNTP-Mix und 0,5 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben. Es folgte die cDNA-Synthese im Thermocycler für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für zwei Stunden bei 37°C. Die resultierende cDNA mit der Konzentration 50 ng/µl wurde bis zu Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.2.2.4 Primer Design

Um Primer für bestimmte Gene zu designen wurde das Assay Design Center der Universal Probe Library von Roche verwendet (Roche, Basel, CH). Die Länge der Primer betrug jeweils 20-25 Nukleotide, die des resultierenden Amplikons 70-110 Nukleotide. Es wurde sich für ein Intron überspannendes Assay entschieden, um Kontaminierung durch genomische DNA zu vermeiden. Nach dem Erstellen der Primer wurde das Primer ‚Basic Local Alignment Search Tool‘ (Primer-BLAST) (NCBI, Bethesda, US) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verwendet, um die Spezifität der Primer Sequenzen, mittels umfassenden Datenbankabgleich, gegenzutesten. Bei einer hohen Spezifität für mehrere Zielgene wurden die Primer verworfen. Für die genauen Sequenzen siehe Kapitel 2.1.5. Primer.

### **3. Material und Methoden**

---

#### **3.2.2.5 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion**

Um die Expressionslevel interessierender Zielgene zu bestimmen und zu vergleichen wurde die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) durchgeführt. Hierbei wurde das kommerziell erwerbbar „GoTaq qPCR Master Mix“-Kit (Promega, Madison, US) verwendet. Das Volumen des Reaktionsansatzes sollte 15 µl betragen, sodass pro Ansatz 5,3 µl nukleasefreies Wasser, 7,5 µl „GoTaq Master Mix“, sowie 0,6 µl der forward und reverse Primer (10 pmol/µl) zusammengegeben wurden. Die cDNA-Proben (50 ng/µl) wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 5-10 ng/µl verdünnt und schließlich wurde je 1 µl der verdünnten cDNA zu jedem Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend zwei Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und folgend in das CFX 96 Real Time System (Bio-Rad, München, DE) gegeben.

Die Ergebnisse wurden mittels Bio-Rad CFX Maestro Software (Bio-Rad, München, DE) dargestellt. Neben den Zielgenen wurde in jedem Experiment auch zur Normalisierung das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (HPRT) aufgrund seiner sehr konstanten Expression untersucht. Schließlich wurde eine relative Quantifizierung mittels delta-delta-Ct Methode durchgeführt, wobei die Expression des Zielgens auf das HPRT-Gen normalisiert wurde<sup>65</sup>.

#### **3.2.2.6 Primer Test**

Bevor neue Primer für weitere Experimente benutzt wurden, wurde ihre Effizienz getestet. Dazu wurde eine qPCR nach dem obigen Protokoll durchgeführt, wobei für jedes Zielgen eine Standardkurve mithilfe einer cDNA-Verdünnungsreihe (20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng und 1,25 ng) angefertigt wurde. Nur solche Primer wurden verwendet, deren Effizienz zwischen 80 und 100% lagen.

### **3.2.3 Mitochondriale Analysen**

In der dargelegten Arbeit wurden zwecks Eruiierung von mitochondrialen Veränderungen in Folge der C12-vermittelten LSD1-Hemmung, morphologische und funktionelle Untersuchungen der Organellen durchgeführt.

#### **3.2.3.2 Konfokale Mikroskopie**

Zelllinien wurden mit potentialabhängigen, mitochondrialen Farbstoffen angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie (durchgeführt in der „Imaging Facility“ des CECAD) hinsichtlich Morphologie und Potentialveränderungen untersucht. Es folgt eine genaue Beschreibung der Methodik.

### 3. Material und Methoden

---

#### Poly-Lysin-Coating

Zunächst erfolgte die Beschichtung der "Chamber Slides" (Ibidi, Fitchburg, US) mit Poly-D-Lysin, damit die später ausgesäten Zellen auf der Oberfläche der „Wells“ gut haften können. Dazu wurde 150 µl einer 0,01 %-igen Poly-D-Lysin-Lösung pro „Well“ gegeben. Nach einer 5 bis 10-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Lösung entfernt und die "Wells" mit 400 µl Zellkultur-Wasser gespült. Anschließend hat man die Chamber Slides zwei Stunden unter UV-Licht trocknen lassen. Bis zur Verwendung wurden sie bei 4°C gelagert.

#### Zellen

Die Experimente wurden mit den Hepatoma Zelllinien HepG2, und Huh7 durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde 72 Stunden mit 2 µM C12 behandelt, der andere Teil diente als Kontrolle.

#### Mitochondriale Färbung

Die Färbung der Mitochondrien erfolgte an lebenden Zellen mit dem Mitochondrial Staining Kit (ab176747) von Abcam. Nachdem der Farbstoff potentialabhängig in den Mitochondrien akkumuliert, wird dieser in der Matrix gebunden, sodass auch eine anschließende Fixierung der Zellen die Färbung nicht aufhebt. Bei der Färbung wurde sich an das Protokoll des Herstellers gehalten (Abcam, Cambridge, UK).

#### Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Nach der Färbung der Mitochondrien erfolgte im nächsten Schritt die Fixierung der Zellen mittels Paraformaldehyd (PFA). Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und folgend mit 400 µl PFA 4% pro "Well" behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit gekühltem PBS gespült. Um die Zellmembranen und die Organellen für die anschließenden Immunfluoreszenzfärbungen durchlässig zu machen erfolgte eine Permeabilisierung mittels Triton-X-100. Die Zellen in jedem "Well" wurden mit 0.25% Triton-X -100 benetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie erneut dreimal mit PBS gewaschen wurden.

#### Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen

Mit dem Ziel unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren und starke Hintergrundsignale bei der anschließenden Immunfluoreszenzfärbung zu vermeiden, wurden die Zellen mit 0.5% Kaltwasserfischgelatine 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3. Material und Methoden

---

#### Immunfluoreszenz-Färbungen

Nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte für alle Zellen eine Gegenfärbung des Zytoskeletts mittels Phalloidin Atto 488 (Sigma-Aldrich, St. Louis, US). Dazu wurde die Immunchemikalie im Verhältnis 1:500 mit 0,5 % Gelatine gemischt und 30 Minuten mit den Zellen inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal für zehn Minuten mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen. Sobald die Objektträger vollständig getrocknet waren wurden die Nuklei der Zellen mit DAPI gegengefärbt und die Präparate mit einem Deckglas bedeckt. Bis zur konfokalen Mikroskopie erfolgte die Lagerung der Objektträger lichtgeschützt bei 4°C. Die anschließende Mikroskopie der Zellen erfolgte mit dem konfokalen Mikroskop SP8 von Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, DE).

#### 3.2.3.3 Ultrastrukturelle Analyse

Um die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien in den Zellen unter pharmakologischer LSD1 Hemmung ultrastrukturell bewerten zu können, wurden sie elektronenmikroskopisch untersucht. Zunächst wurden Aclar®-Folien (Honeywell, Morris Plains, US) autoklaviert. Anschließend wurden zwei bis drei Folien pro "Well" einer 6-"Well"-Zellkulturplatte ausgelegt. Danach folgte die Ausplattierung HepG2 oder Huh7 Hepatomazellen. Nach 24 Stunden wurde überprüft, ob die Zellen auf den Folien angewachsen sind. Folglich wurde ein Teil der Zellen nach oben beschriebenen Protokoll (2.2.1.2) mit C12 behandelt. Nach weiteren 72 Stunden erfolgte die Fixierung der Zellen. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit 37°C-warmen PBS gewaschen und anschließend , mit einer glutaraldehydhaltigen Fixierlösung (2,5 % Glutaraldehyd, 2,5% Saccharose 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM HEPES pH 7,4) für jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur und 4 °C behandelt. Schließlich wurden die Zellen dreimal mit 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,4) gewaschen und der "Imaging-Facility" des CECAD ("Cologne Cluster of Excellence on Cellular stress responses in Aging-associated Diseases") für die weitere Prozessierung übergeben. Hier erfolgte die Osmiumfixierung (1% Osmium, 1,25% Saccharose, 1% Kaliumferrocyanid für eine Stunde auf Eis, dann wurden die Proben erneut dreimal mit Natriumcacodylat-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Proben mittels aufsteigender Ethanolreihe bei 4°C dehydriert (7 Minuten 50% EtOH, 7 Minuten 70% EtOH, 7 Minuten 90% EtOH, 3 x 7 Minuten 100% EtOH) und daraufhin zunächst 1 Stunde bei 4°C mit EPON:Ethanol im Verhältnis 1:1 und dann 2 Stunden bei 4°C mit EPON:Ethanol im Verhältnis 3:1 inkubiert. Übernachten wurden die Proben mit frischem EPON bei 4°C gelagert und die Kulturplatte mit Parafilm® versiegelt. Am nächsten Tag folgte eine weitere Inkubation mit frischem EPON für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit nicht abgedeckter Kulturplatte. Anschließend wurden die Proben zwecks Einbettung für 48 bis 72 Stunden bei 62°C inkubiert.

### 3. Material und Methoden

---

Nach dem Einbettprozess wurden die Proben mit dem UC7 Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, DE) auf 70 nm geschnitten. Um die Zellkulturproben zu kontrastieren, wurden sie abschließend 15 Minuten bei 37°C mit Uranylacetat und darauffolgend 4 Minuten bei Raumtemperatur mit Bleicitrat in CO<sub>2</sub> freier Umgebung inkubiert. Die Auswertung der Schnitte erfolgte am JEM 2100 Plus Elektronenmikroskop (Jeol, Akishima, JP).

#### 3.2.3.4 Durchflusszytometrische Quantifizierung des mitochondrialen

##### Membranpotentials

Zur genauen Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials wurden Zellen mit potentialabhängigen Farbstoffen gefärbt und die Veränderungen durchflusszytometrisch bestimmt. Folgend werden die einzelnen Schritte der Färbung und Messung erläutert.

##### TMRM-Zeitkinetik

TMRM (Invitrogen, Carlsbad, US) ist ein kationischer Farbstoff, der abhängig vom mitochondrialen Membranpotential in der Matrix des Organells akkumuliert. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde eine 100 µM Stock-Lösung hergestellt. In einem nächsten Schritt wurde die optimale Konzentration des Farbstoffs ermittelt. Dazu wurden Zellen mit 350, 250, 200, 150, 100, 70 und 50 nM TMRM in Zellkulturmedium behandelt und 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Evaluation der Lebendzellfärbung mit dem Nikon Eclipse TE300 Inverted Microscope (Nikon Corporation, Tokyo, JP), bei der die Konzentration ermittelt wurde, die eine klare Färbung der Mitochondrien zeigte, bei der es aber nicht zu störenden Hintergrundsignalen kam. Es wurde eine Konzentration von 150 nM gewählt und für die weiteren durchflusszytometrischen Analysen verwendet.

Zunächst wurde mit dieser Methode evaluiert, welchen Einfluss die Dauer der C12 vermittelten LSD1 Hemmung auf das mitochondriale Membranpotential hat. Dementsprechend wurden HepG2 und Huh7 Zellen ausplattiert und unterschiedlich lange mit C12 behandelt. Es wurden nicht-behandelte Kontrollduplikate, sowie Duplikate nach 1, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden unter C12 Behandlung untersucht. Zusätzlich wurde eine nicht behandelte, nicht gefärbte Negativkontrolle verwendet. Nachdem die entsprechende Behandlungsdauer für die jeweilige Probe erreicht wurde, wurden diese dem obigen Protokoll entsprechend gefärbt. Nach erfolgter Färbung wurde das TMRM-haltige Medium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine fluoreszenzmikroskopische Bestätigung der Färbung durchgeführt. War diese erfolgreich, erfolgte die weitere Bearbeitung der Proben. Zunächst wurden die Zellen mittels 0,05% Trypsin von ihrem Untergrund gelöst und in DMEM + 10% FCS resuspendiert. Daraufhin wurden sie in Durchflusszytometer-kompatible Reagenzgefäße

### 3. Material und Methoden

---

überführt und 5 Minuten bei 25°C und 1500 rpm (GPR-Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE) zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen, ohne das Zellpellet zu berühren, und die Zellen in 300 - 500 µl DPBS, je nach Größe des Pellets, gelöst. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte unmittelbar nach diesem Schritt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels Two-Way-ANOVA ermittelt, wobei das Signifikanzniveau mit  $p = 0,05$  angegeben wurde.

#### JC1 –Färbung

Neben dem TMRM wurde noch ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff für die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials gewählt. JC1 (Invitrogen, Carlsbad, US) weist die Besonderheit auf, dass es im Gegensatz zu anderen Farbstoffen, zwei verschiedene Fluoreszenzmodi präsentiert. In Mitochondrien mit einem aufrechterhaltenen Membranpotential emittiert er rotes Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm. Kommt es zu einer Depolarisation der Mitochondrien gibt es ein "Shift" und grünes Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm wird emittiert. Auch hier wurde zunächst ein vorbereitendes Experiment durchgeführt, um die ideale Konzentration des Farbstoffes zu ermitteln. Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers wurde eine Stock-Lösung mit der Konzentration 1 mg/ml in DMSO hergestellt. Anschließend wurden Zellen mit den Konzentrationen 15, 10, 5, 2 und 1 µg/ml in Kulturmedium 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es folgte die mikroskopische Evaluation der Färbung mit dem Nikon Eclipse TE300 Inverted Microscope (Nikon Corporation, Tokyo, JP). Es wurde darauf geachtet, dass die mitochondriale Färbung deutlich und keine ausgeprägten Hintergrundsignale vorhanden waren. Eine Konzentration von 10 µg/ml wurde für die durchflusszytometrische Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials gewählt. Anschließend wurden die Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials nach 72 Stunden LSD1-Hemmung quantifiziert. Dazu wurden HepG2 und Huh7 Zellen, wie bereits beschrieben ausgesät. Neben den nicht behandelten Kontrollen, wurde auch eine nicht behandelte und nicht gefärbte Negativkontrolle verwendet. Dem obigen Protokoll folgend wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlungsdauer gefärbt und für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Es folgte die unmittelbare Messung der Proben. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurde ein Student-t-test durchgeführt, wobei Ergebnisse mit einem p-Wert von  $< 0,05$  als statistisch signifikant galten.

#### Durchflusszytometrie

Um nun den Einfluss der pharmakologischen LSD1 Hemmung quantifizieren zu können, wurde die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Dabei wurde zunächst die nicht behandelte, nicht gefärbte Negativkontrolle gemessen. Dies war notwendig, um das Gerät zu

### 3. Material und Methoden

---

konfigurieren und die "Gates" zu erstellen, die die Identifizierung der richtigen Zellpopulation erlaubte. Zunächst wurde das seitliche („side scatter“, SSC), sowie das vorwärts gerichtete („forward scatter“, FSC) Streulicht gemessen. Dies diente dazu die richtige Zellpopulation anhand der Größe zu identifizieren und die lebenden Zellen vom Zelldebris zu trennen, welcher geringere FSC-Werte aufweist. Anschließend werden die Einzelzellen von Doubletten getrennt, indem die „side scatter height“ (SSC-H) gegen die „side scatter area“ (SSC-A) aufgetragen wird. Während die Zelldoubletten höhere SSC-A-Werte aufweisen, sind die SSC-H-Werte ähnlich<sup>66</sup>. Nach dieser Eingrenzung der Zellpopulation wurden die gefärbten Proben analysiert. Die Exzitation der mit JC1 und TMRM gefärbten Zellen erfolgte bei 488 nm. Zur Detektion der grünen Fluoreszenz des JC1 wurde der FITC-A-Kanal verwendet, zur Messung der roten Fluoreszenz des JC1 und des TMRM der PE-A-Kanal. Die Ergebnisse wurden anschließend auf die Kontrollen bezogen.

#### 3.2.3.5 Metabolische Analyse der Atmungskette

##### Mitochondriale Aktivitätsbestimmung mithilfe des Seahorse XF Mito Stress Test Kits

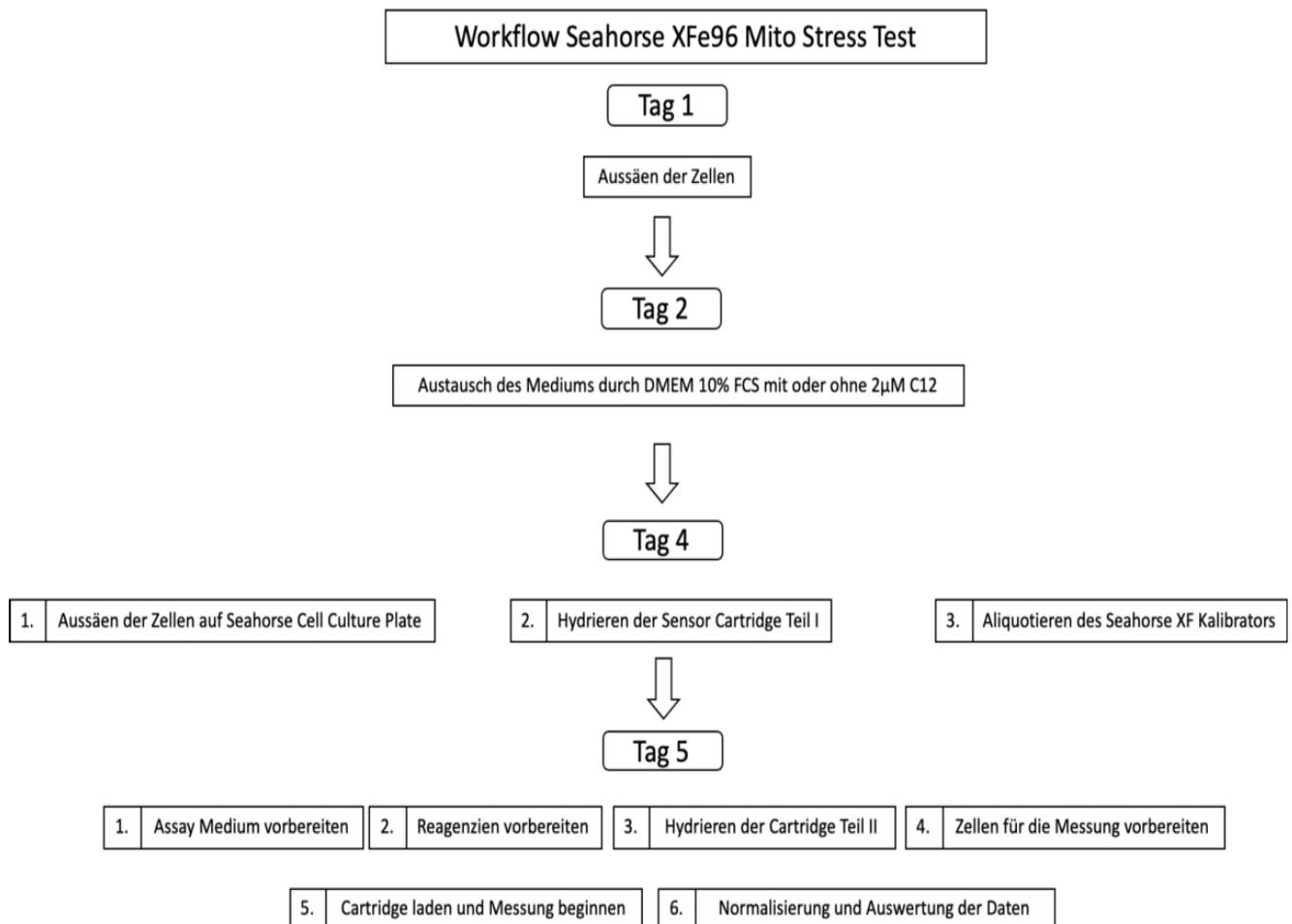
Mit dem Ziel, mögliche Veränderungen der Zellatmung unter C12-vermittelter LSD1 Hemmung zu charakterisieren wurde eine metabolische Analyse mit dem Seahorse XFe96 Analyser (Agilent Technologies, Santa Clara, US) durchgeführt. Dabei misst das Gerät Veränderungen der Sauerstoffkonzentration und des pH-Wertes im Medium der Zellen mit Hilfe verschiedener Fluorophore, die sich an einer "Sensor Cartridge" befinden. Das Gerät regt die Fluorophore an, worauf dieses Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Sauerstoffmoleküle und Protonen schwächen dieses Signal. Dadurch können Rückschlüsse auf die Aktivität der mitochondrialen Atmung und der Glykolyse geschlossen werden<sup>67</sup>. Zur genaueren Evaluation der oxidativen Phosphorylierung wurde das Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, US) verwendet. Das Kit enthält Inhibitoren, die Komplexe der Atmungskette hemmen, bzw. diese entkoppeln, was eine exaktere Einordnung der Stoffwechselveränderungen zulässt. Durch das im Kit enthaltene Oligomycin wird die ATP-Synthetase (Komplex V) gehemmt, wodurch der Teil der Zellatmung, der auf die ATP-Produktion entfällt, bestimmt werden kann. Darauf folgt die Gabe von FCCP, welches die Atmung entkoppelt. Hierdurch kommt es zu einem Reflux der Protonen aus dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix. Die Respiration wird insuffizient und es kommt zu einem kompensatorischen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, sodass die maximale Kapazität der oxidativen Phosphorylierung gemessen werden kann. Im letzten Schritt des Experiments erfolgt die Zugabe von Rotenon/Antimycin A, was die Komplexe I und III der Atmungskette hemmt. Der Transfer der Elektronen wird gestoppt, was

### 3. Material und Methoden

es ermöglicht den Teil der Sauerstoffverbrauchs zu bestimmen, der nicht auf die Zellatmung zurückzuführen ist<sup>68</sup>.

#### Arbeitsschritte des Seahorse XFe96 Mito Stress Test Experiments

Das folgende Flussdiagramm zeigt in vereinfachter Darstellung die einzelnen Arbeitsschritte des Experiments in chronologischer Reihenfolge.



**Abbildung 4: Workflow Seahorse XF Mito Stress Test**

Die Abbildung zeigt die einzelnen Arbeitsschritte des Seahorse XF Mito Stress Test Experiments in chronologischer Reihenfolge.

#### Vorbereitung der Zellen

Zunächst wurden die Zellen wie oben beschrieben in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde ein Teil der Zellen mit 2 µM C12 behandelt, während die Kontrollgruppe weiterhin mit FCS-haltigem DMEM kultiviert wurde. Nach 48 Stunden LSD1-Hemmung, also am Tag vor der Analyse, wurden die Zellen mittels 0,05% Trypsin gelöst und in DMEM mit 2 µM C12 bzw. in DMEM ohne den Inhibitor resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf der der „Seahorse Cell Culture Plate“ (Agilent

### **3. Material und Methoden**

---

Technologies, Santa Clara, US) ausgesät. Hierbei wurden abhängig vom verwendeten Zelltyp 10 000-15 000 Zellen pro "Well" benutzt. Pro "Well" wurde auf ein Gesamtvolumen von 80 µl Medium aufgefüllt. Am nächsten Tag wurden die Zellen für die metabolische Analyse verwendet.

#### **Vorbereitung der "Sensor Cartridge"**

Am Tag vor dem Assay wurde, wie vom Hersteller vorgesehen die Sensor Cartridge (Agilent Technologies, Santa Clara, US) vorbereitet. Um die einwandfreie Funktion zu gewährleisten, ist es nötig die Cartridge ausreichend zu hydrieren. Dazu wird der Aufsatz abgenommen und die "Wells" der Platte mit 200 µl sterilem Wasser aufgefüllt. Daraufhin wird der Aufsatz wieder auf die Platte gesetzt, wobei sichergestellt werden muss, dass die Sensoren der "Cartridge" vollständig in die Flüssigkeit eingetaucht sind. Über Nacht wird sie bei 37°C ohne CO<sub>2</sub> Zusatz inkubiert. Darüber hinaus wurde ein 20 ml Aliquot des XF Kalibrators (Agilent Technologies, Santa Clara, US) angefertigt. Auch dieser wird über Nacht in einem Inkubator bei 37°C ohne CO<sub>2</sub> gelagert.

Am darauffolgenden Tag, 45-60 Minuten vor dem Beladen der "Cartridge", wurde das Wasser aus dieser entfernt und durch 200 µl der Kalibrierflüssigkeit ersetzt. Dann wurde sie erneut bei 37°C in dem nicht-CO<sub>2</sub> enthaltenden Inkubator gelagert.

#### **Vorbereitung des Assay Mediums**

Am Tag der Analyse wurde das Assay Medium vorbereitet. Dazu wurden 97 ml des Assay Mediums (Agilent Technologies, Santa Clara, US) in ein steriles Gefäß gefüllt. Anschließend wird es gemäß den Herstellervorgaben mit je einem Milliliter einer 1 M Glucose-, 200 mM Glutamin- und 100 mM Pyruvatlösung (alle von Agilent Technologies, Santa Clara, US) versetzt, sodass das Medium schließlich 10 mM Glucose, 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat enthält. Bis zum Gebrauch wurde das Assay Medium in einem 37°C warmen Wasserbad gelagert.

#### **Vorbereitung der Reagenzien**

In diesem Schritt wird das Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, US) verwendet. Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A werden geöffnet und in einer definierten Menge des vorbereiteten Assay Mediums gelöst. Oligomycin wird in 630 µl des Assay Mediums gelöst, um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten. FCCP in 720 µl, sodass eine Konzentration von 100 µM resultiert. Das Rotenon/Antimycin A wird in 540 µl Medium gelöst und liegt anschließend in einer Konzentration von 50 µM vor. Alle Lösungen wurden anschließend gevortext um sicherzustellen, dass sich die Reagenzien vollständig lösen. Folgend werden die Stock-Lösungen weiter mit Assay Medium verdünnt, um die

### 3. Material und Methoden

---

Arbeitslösungen herzustellen. Hierzu werden 450 µl Oligomycin mit 2550 µl Assay Medium verdünnt, um eine 15 µM Lösung zu erhalten. 300 µl des der FCCP-Lösung werden mit 2700 µl Medium auf 10 µM verdünnt. Die Konzentration des Rotenon/Antimycin A wird mit 2700 µl Medium auf 5 µM gebracht. Die ideale Aussähdichte für die Hepatoma Zelllinien wurden mit Hilfe vorbereitender Experimente ermittelt.

#### Vorbereiten der Zellen für die Analyse

Nach Vorbereitung der "Cartridge" und der Reagenzien wurden in dem nächsten Schritt die Zellen für die mitochondriale Analyse vorbereitet. Nachdem ein Teil der Zellen nun 72 h mit C12 behandelt wurde und der andere Teil als Kontrolle dient wurden die Zellen erneut mikroskopisch kontrolliert, um die Konfluenz und die Morphologie zu betrachten. Hat sich eine gleichmäßige Monolayer bei etwa 80-90% Konfluenz ausgebildet wurde weiter mit den Zellen gearbeitet. Zunächst wurde das Medium bis auf einen Rest von 20 µl aus den "Wells" entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zweimal mit dem aufgewärmten Assay Medium gewaschen. Nach jedem Waschschrift verblieben 20 µl des Mediums in den "Wells". Im letzten Schritt wurden 160 µl Medium hinzugefügt, sodass das Volumen in jedem "Well" 180 µl betrug. Die Zellen wurden anschließend nochmals für 45-60 Minuten bei 37°C ohne CO<sub>2</sub> Zusatz inkubiert.

#### Laden der "Cartridge" und Kalibrieren des "Seahorse-Device"

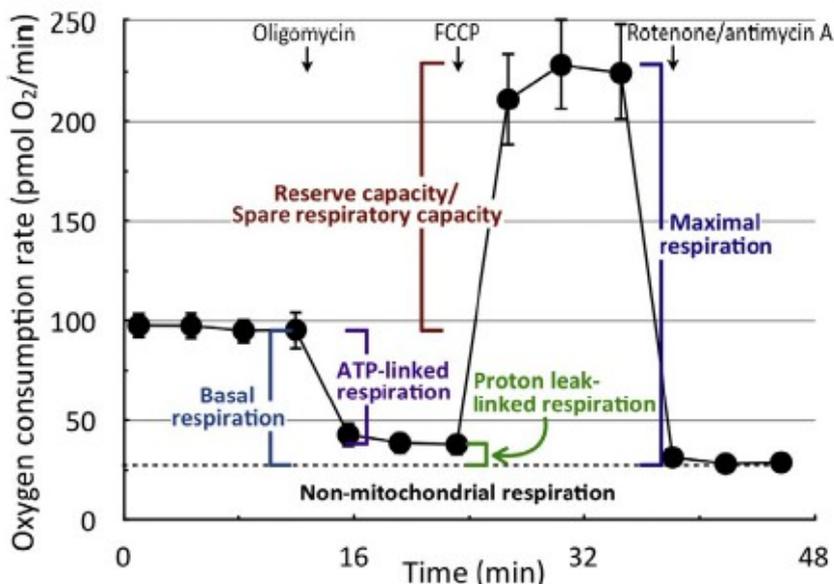
Nach 45-60 Minuten wird die Cartridge aus dem Inkubator genommen und beladen. Dazu wurde die mitgelieferte Pipettierhilfe verwendet. Diese wird auf die Cartridge gesetzt, sodass man nun mit einer Multikanalpipette die entsprechenden Ports mit den Reagenzien befüllen kann. In Port A wird 20 µl der Oligomycin-Lösungen pipettiert, sodass eine finale Konzentration von 1,5 µM resultiert. Port B wird mit 22 µl der FCCP-Lösung geladen. Die finale Konzentration beträgt demnach 1 µM. Port C belädt man mit 25 µl der Rotenon/Antimycin A-Lösung, um eine finale Konzentration von 0,5 µM zu erhalten. Beim Bewegen der Cartridge und Pipettieren der Lösungen wurde sehr darauf geachtet, die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, um die Kalibration des Seahorse XFe96 Device und die anschließende metabolische Analyse der Zellen nicht zu verfälschen. Im nächsten Schritt wurde die beladene Cartridge in das Seahorse XFe96 Device gegeben und die circa 30-minütige Kalibrierung gestartet.

#### Assay-Durchführung

Im Anschluss an die Kalibrierung des Gerätes konnte die Analyse der Zellatmung beginnen. Das Gerät wirft die Platte mit der Kalibrierflüssigkeit aus, während die Cartridge mit den Sensoren im Gerät verbleibt. Nun wird die 96-"Well" Platte mit den Zellen in das Seahorse

### 3. Material und Methoden

Device gebracht. Die Analyse beginnt. Zunächst wird die basale „Oxygen-Consumption-Rate“ (OCR) der Kontrollen und der C12 behandelten Zellen gemessen. Dabei wird über vier Zyklen das Medium in den "Wells" gemischt, woraufhin die Messung der OCR erfolgt. Im nächsten Schritt wird das im Port A enthaltene Oligomycin ins Medium injiziert. Nun wird die OCR unter Hemmung von Komplex V der Atmungskette gemessen. Nachdem dies erfolgt ist wird Port B entleert und das FCCP ins Medium gegeben, was zu einer Entkopplung der Atmungskette führt. Auch hier wird wie bereits beschrieben die OCR gemessen. Im letzten Schritt der metabolischen Analyse wird die mitochondriale Atmungskette komplett inhibiert, indem mit dem in Port C enthaltenem Rotenon/Antimycin A die Komplexe I und III gehemmt werden. Die darauffolgende Analyse des Sauerstoffverbrauchs ist der letzte Schritt der Messung. Anschließend können die Ergebnisse mit Hilfe der „Wave-Software“ dargestellt und analysiert werden.



**Abbildung 5: Ablauf der mitochondrialen Funktionsanalyse**

Die Abbildung zeigt den Ablauf des mitochondrialen Stresstests. Zunächst wird der basale Sauerstoffverbrauch gemessen, dann wird Komplex V der Atmungskette ausgeschaltet. Anschließend wird die Zellatmung entkoppelt, um die maximale respiratorische Kapazität zu messen. Die Zugabe von Rotenon/Antimycin A dient dazu die Komplexe I und III zu hemmen, um den Teil des Sauerstoffverbrauchs zu bestimmen, der nicht auf die Atmungsaktivität zurückzuführen ist (Abbildung nach Divakaruni et al.<sup>68</sup>)

#### Normalisierung

Um die erhobenen Daten vergleichbar zu machen wurde nach der Analyse eine Normalisierung auf die Proteinmenge durchgeführt. Hierzu wurde ein Bradford Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) angewendet. Als Standard diente eine wässrige Albuminlösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) mit den Konzentrationen 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 und 0 µg/ml. Nach der Messung wurde die Vitalität der Zellen

### 3. Material und Methoden

---

zunächst mikroskopisch evaluiert. Waren die Zellen in allen "Wells" weitestgehend intakt wurde das Assay Medium entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl Bradford Reagenz pro "Well". Zu den Proteinstandards in wässriger Lösung wurden 250 µl Bradford Reagenz gegeben. Nach einer Wartezeit von 15-20 Min wurden je 250 µl der Proben auf die 96 "Well" Platte, welche die Standards enthielt, übertragen und die Absorption mittels Microplate Reader bei 595 nm gemessen. Die gemessenen Werte wurden mittels der Negativkontrollen korrigiert. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der Proteinstandards eine Standardkurve erstellt und die Proteinmengen pro "Well" bestimmt. Folgend wurde der Mittelwert der Proteinmassen pro Gruppe berechnet und die Ergebnisse in das Analyseprogramm Wave übertragen, sodass nun die normalisierten Werte dargestellt werden konnten.

#### Auswertung

Für die Auswertung wurden neben der oben beschriebenen OCR auch spezielle Werte berechnet, um die Funktion der mitochondrialen Atmungskette genauer evaluieren zu können. Die basale Respiration, definiert als die Differenz zwischen letztem Wert vor Oligomycingabe und niedrigstem Wert nach Rotenon/Antimycin A Applikation, dient als generalisierter Parameter zur Beschreibung der Zellatmung. Die ATP-Produktion wird ermittelt indem der niedrigste Sauerstoffverbrauch nach Oligomycingabe von dem letzten Wert vor Oligomycingabe subtrahiert wird. Dabei wird berechnet welcher Teil der OCR auf die ATP-Produktion entfällt und diese Differenz wird als Surrogat Parameter für die ATP-Produktion verwendet. Die respiratorische Reservekapazität ist definiert als die Differenz zwischen maximaler Atmung und der basalen Zellatmung, wobei die maximale Atmung seinerseits berechnet wird, indem man den niedrigsten Wert nach Rotenon/Antimycin A-Gabe von dem Maximalwert nach FCCP-Zugabe abzieht<sup>68</sup>.

## 4. Ergebnisse

---

### 4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der C12-vermittelten, pharmakologischen LSD1-Inhibierung auf das zelluläre Transkriptom untersucht. Hierbei wurden zunächst die Expressionsprofile von Zellkulturproben nach LSD1-Inhibierung mit denen unter Kontrollbedingungen miteinander verglichen und anschließend morphologische und funktionelle Analysen durchgeführt. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

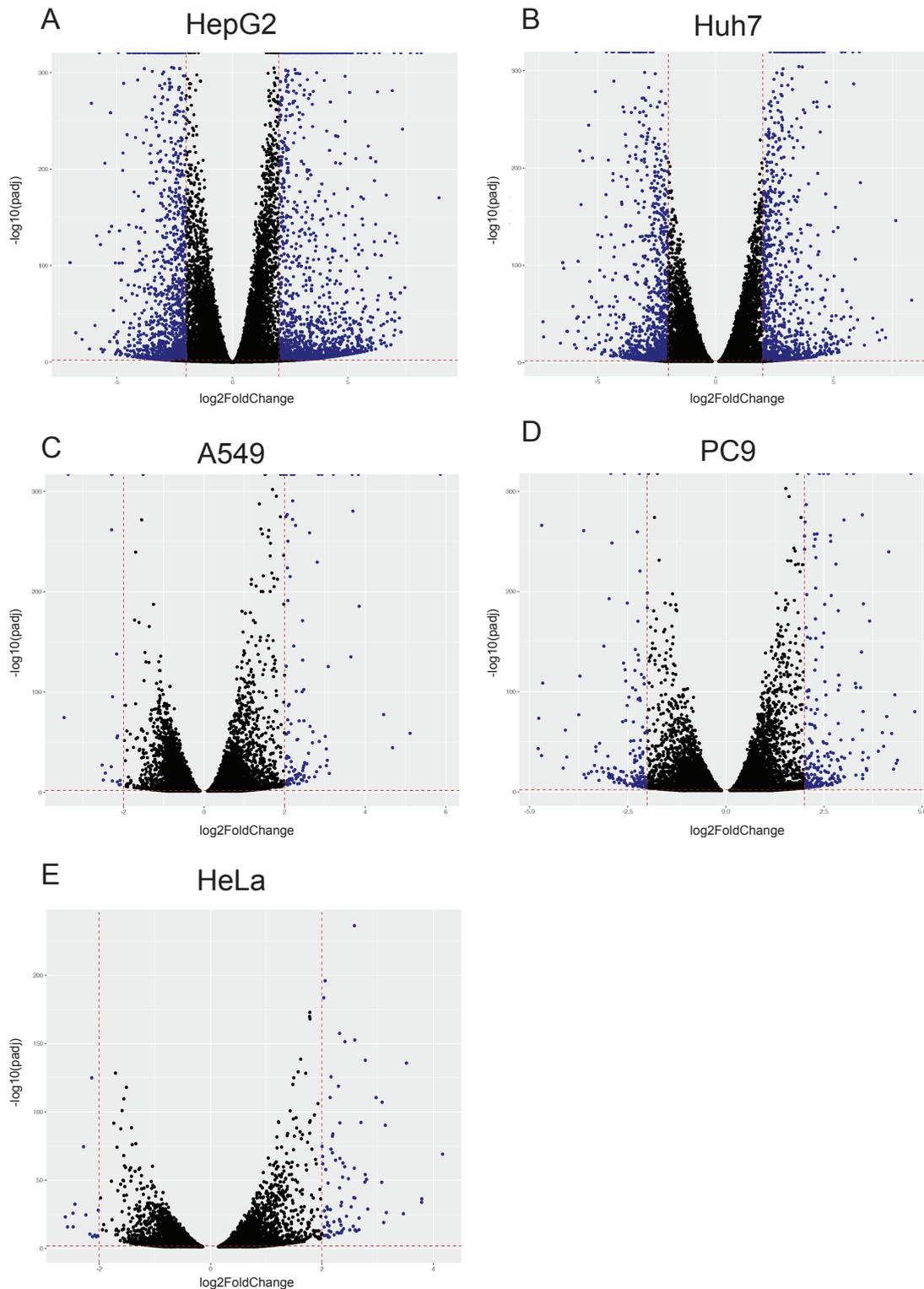
#### 4.1 Einfluss der pharmakologischen LSD1-Inhibierung auf den Zellmetabolismus

Zunächst wurde das Transkriptom verschiedener Zelllinien unter LSD1-Hemmung und unter Kontrollbedingungen mittels RNA-Sequenzierung analysiert und hinsichtlich Alterationen in den wesentlichen Signalwegen verglichen. Die Ergebnisse wurden folgend für ausgewählte Gene mittels qPCR überprüft.

##### 4.1.1. Veränderte Genexpressionsmuster nach LSD1 Hemmung

Initial erfolgte die Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten der Hepatoma- (HepG2, Huh7), der Lungenadenokarzinom- (A549, PC9) und der Zervixkarzinomzelllinie (HeLa) hinsichtlich differentiell exprimierter Gene unter C12-vermittelter LSD1-Inhibierung. Hier wurde bereits ersichtlich, dass sich das Transkriptom der C12-behandelten Zellen deutlich von denen der Kontrollgruppe unterscheidet, wobei ein Teil der Gene signifikant herab- und ein anderer Teil signifikant heraufreguliert ist (Abb. 1A-E).

## 4. Ergebnisse



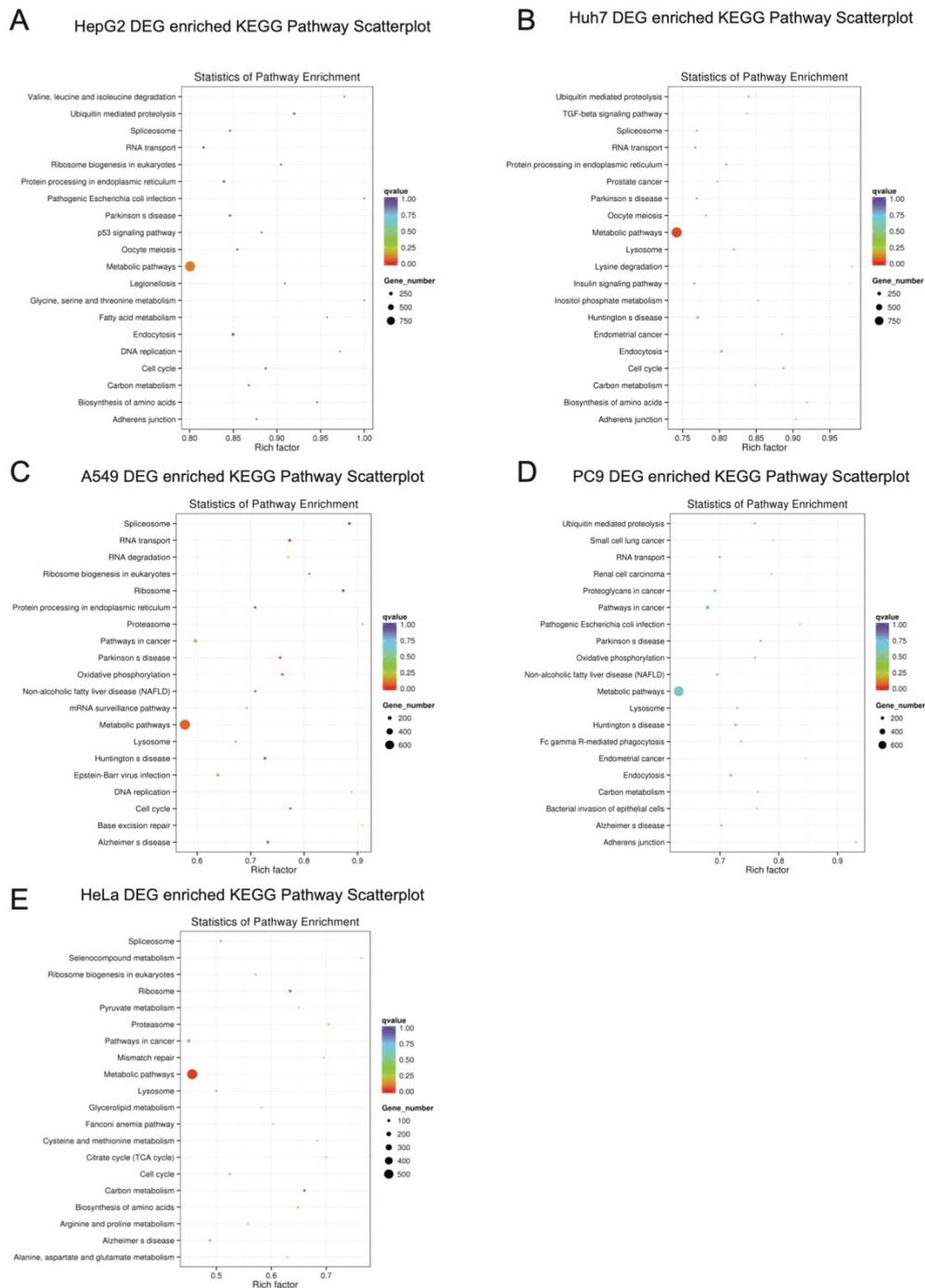
**Abbildung 6: Differenziell exprimierte Gene nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung** in den HCC Zelllinien HepG2 (A), Huh7 (B), den Lungenadenokarzinomzelllinien A549 (C) und PC9 (D) und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa (E). Dargestellt sind Volcanoplots mit dem  $\log_2\text{Fold Change}$  auf der x-Achse und dem  $-\log_{10}$  (korrigierter p-Wert) auf der y-Achse. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Gene, in blau eingefärbt sind solche mit einem  $\log_2\text{Fold Change} > 2$  oder  $< -2$  und einem korrigierten p-Wert  $< 0.01$ . Die vertikalen Linien markieren den  $\log_2\text{Fold Change}$  bei 2 und -2, die horizontale Linie kennzeichnet den  $-\log_{10}(0,01)$ .

## 4. Ergebnisse

---

Die anschließende Auswertung der von Novogene zur Verfügung gestellten „KEGG Pathway“-Analyse zeigte weiterhin, dass es unter pharmakologischer LSD1-Hemmung zu Expressionsveränderungen von an zahlreichen Zellprozessen beteiligten Genen kommt, wobei ein deutlicher Effekt auf den Metabolismus aller untersuchten Zelllinien festgestellt werden konnte. Dieser Effekt ist in den PC9 Zellen weniger signifikant als in allen anderen untersuchten Zelllinien (Abb. 7).

## 4. Ergebnisse



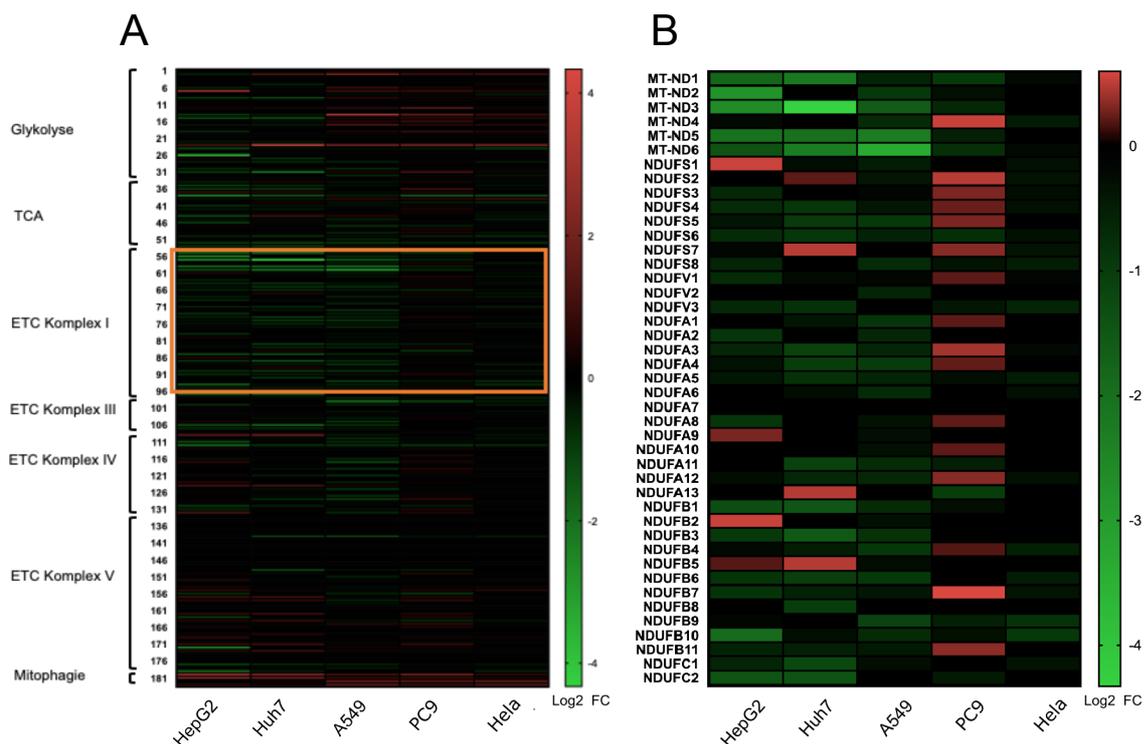
**Abbildung 7: Verändertes Signalmuster nach pharmakologischer LSD1-Hemmung in Lungenadeno-, Leber-, und Gebärmutterkarzinomzellen.**

Die 20 nach "KEGG Pathway Enrichment Analyse" am deutlichsten von der veränderten Expression betroffenen Zellprozesse in HCC (HepG2 **(A)**, und Huh7 **(B)**), in Lungenadenokarzinomzellen (A549 **(C)**) und PC9 **(D)**) und HeLa Zervixkarzinomzellen **(E)**. Die Größe des Kreises gibt die Anzahl der betroffenen Gene an. Der "Rich-Faktor" zeigt das Verhältnis der verändert exprimierten Gene zu der Gesamtheit der an dem Prozess beteiligten Gene. Die Höhe des q-Wertes korreliert invers mit der Signifikanz der Ergebnisse. Unter C12 vermittelter LSD1 Hemmung kommt es zu deutlichen Expressionsunterschieden diverser Zellprozessen, wobei der Effekt auf metabolische Prozesse am deutlichsten ist und in allen getesteten Hepatoma- (A, B), Lungenadenokarzinom- (C, D) und Zervixkarzinomzelllinien (E) präsent ist.

## 4. Ergebnisse

### 4.1.2. Die Wirkung der LSD1-Hemmung auf die Expression der Gene des Energiemetabolismus

Im nächsten Schritt der Evaluation der RNA-Sequenzierungsdaten wurden die Einflüsse der LSD1-Inhibierung auf den Energiemetabolismus genauer analysiert. Dazu wurde die Expression von Genen untersucht, die an der Glykolyse, dem Citratzyklus und der mitochondrialen Zellatmung beteiligt sind, wobei der "Log2 Fold Change" (Log2FC) als Maß für die Expressionsunterschiede herangezogen wurde. Die resultierenden Daten zeigen, dass es zahlreiche differentiell exprimierte Gene in allen untersuchten Stoffwechselwegen des Energiemetabolismus gibt (Abb. 8A). Auffällig ist hierbei, dass viele der Gene unter pharmakologischer LSD1-Hemmung herunterreguliert werden. Insbesondere trifft dies auf die nukleär codierten Untereinheiten des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette zu. Interessanterweise zeigte sich auch ein ähnlicher Effekt bei der Expression der mitochondrial codierten Untereinheiten. Mit Ausnahme der PC9-Zellen weisen alle analysierten Zelllinien eine konsistente Herabregulierung der Genexpression der Untereinheiten des Komplex I auf (Abb. 8B).



**Abbildung 8: Darstellung differentiell exprimierter Gene des Energiemetabolismus**

**(A)** Dargestellt ist die differentielle Expression verschiedener Gene des Energiemetabolismus mit Fokus auf die Glykolyse, den Zitronensäurezyklus (TCA) und den verschiedenen Komplexen der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETC). 1-33 Glykolyse; 34-54 Citratzyklus; 55-97 Komplex I; 98-108 Komplex III; 109-132 Komplex IV; 133-179 Komplex V; 180-183 Mitophagie Effektoren **(B)** Darstellung der Expressionsunterschiede aller nukleär und mitochondrial codierten Untereinheiten des Komplexes I der Atmungskette. Alle Expressionsunterschiede werden als Log 2 Fold Change angegeben.

## 4. Ergebnisse

---

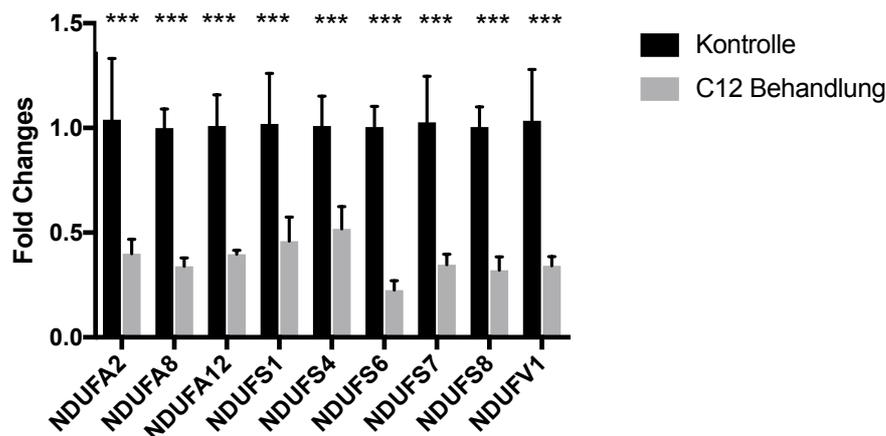
### 4.1.3. Einfluss der LSD1 Hemmung auf Expressionsprofile der nukleär kodierten Komponenten der mitochondrialen Atmungskette

Mittels quantitativer PCR wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung validiert, wobei sich auf die Hepatomazelllinien HepG2 und Huh7 fokussiert wurde. Der ausgeprägte Effekt der C12-Behandlung auf den Komplex I der Atmungskette begründet die schwerpunktmäßige Untersuchung der nukleär kodierten Gene eben dieses Komplexes. Zudem konnten die Ergebnisse einer divergenten Expression der Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe nach C12-Behandlung auch auf Proteinebene durch Proteomanalysen der Arbeitsgruppe bestätigt werden

Zunächst wurde zur Validierung der RNA-Sequenzierungsergebnisse eine qPCR durchgeführt. Dabei zeigte sich besonders in den HepG2 Zellen eine durchweg signifikante Herabregulierung der Genexpression von ETC Komplex I Untereinheiten, während der Effekt in den Huh7 Zellen weniger ausgeprägt war (Abb. 9). Im Gegensatz zu allen anderen Untereinheiten legen die qPCR-Ergebnisse dar, dass in Huh7-Zellen sogar eine signifikante Erhöhung der Expression des NDUFS4-Gens unter LSD1-Inhibierung vorliegt, wobei die RNA-Sequenzierungsdaten auch hier eine Herabregulation ergaben.

## 4. Ergebnisse

### ETC Komplex I Untereinheiten HepG2 Ctr vs C12



### ETC Komplex I Untereinheiten Huh7 Ctr vs C12

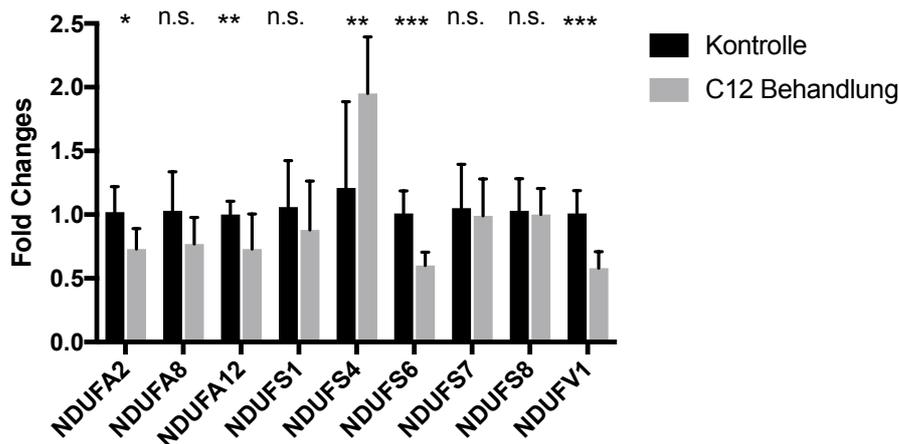


Abbildung 9: Ergebnisse der quantitativen PCR für die Expression von Komplex I Untereinheiten der Atmungskette.

Die Balkendiagramme zeigen die relativen Expressionsveränderungen ausgewählter ETC Komplex I Untereinheiten nach pharmakologischer LSD1 Hemmung bezogen auf die Expression unter Kontrollbedingungen. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. C12 Behandlung: C12 2 $\mu$ M für 72 h. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Student-t-Test. \* p-Wert < 0,05; \*\* p-Wert < 0,01; \*\*\* p-Wert < 0,001; n.s.: nicht signifikant.

## 4.2 Morphologische und funktionelle Veränderungen nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung

Nachdem die Expressionsanalyse belegt hatte, dass zahlreiche, für den Komplex I der Atmungskette kodierende Gene unter LSD1-Hemmung differentiell exprimiert werden, sollte

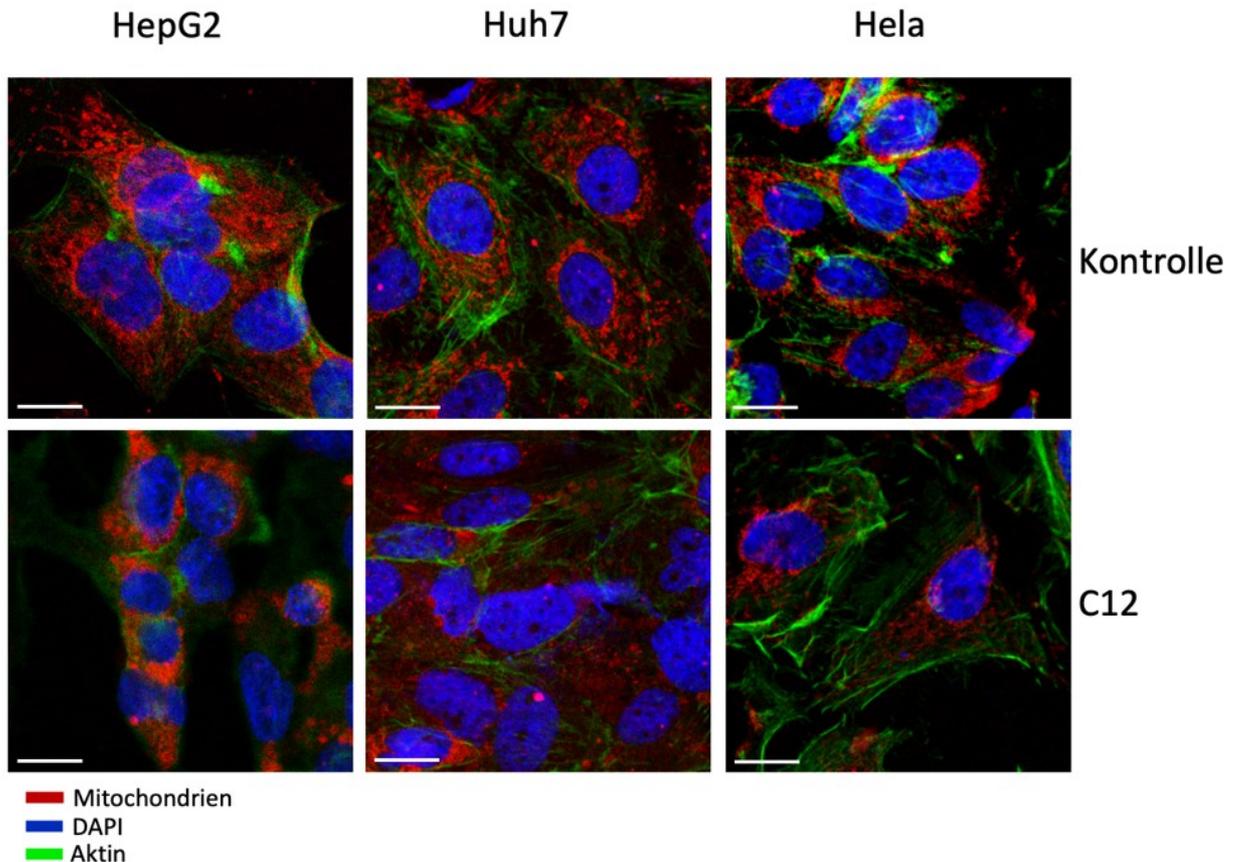
## 4. Ergebnisse

---

genauer überprüft werden, welche morphologischen Veränderungen und funktionelle Konsequenzen dies für die Mitochondrien der Zelllinien hat.

### **4.2.1 Morphologische mitochondriale Veränderungen in Hepatomazellen nach pharmakologischer LSD1 Hemmung durch den C12-Inhibitor**

Mit der Intention, den Einfluss der gezeigten Expressionsveränderungen auf die mitochondriale bzw. respiratorische Aktivität zu untersuchen, wurde eine mikroskopische Analyse der Organellen vorgenommen. Die Mitochondrien wurden dazu mit einem Farbstoff behandelt, der in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential in deren Matrix akkumuliert (siehe Kapitel 3.1.4). Die Auswertung der Färbung am konfokalen Mikroskop zeigte in den Kontrollen ein perinukleäres Netzwerk aus Mitochondrien mit überwiegend tubulärer Morphologie. Unter pharmakologischer LSD1-Hemmung waren jedoch diverse Veränderungen zu beobachten. Besonders deutlich war der Effekt in den HCC- Zelllinien. Hier kam es zu einem Verlust der regulären Netzwerke um den Nukleus, sowie zu einer Veränderung der Morphologie. Anstelle der tubulär formierten Organellen waren vor allem in den HepG2-Zellen lobulär strukturierte Mitochondrien zu erkennen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sich in den Huh7-Zellen unter C12-Behandlung nur noch wenige Mitochondrien anfärben ließen und die verbliebenen Signale vorwiegend unspezifisch waren (Abb. 10). Da der verwendete Farbstoff membranpotentialabhängig ist, ist dies ein Hinweis auf einen Verlust der mitochondrialen Potentialdifferenz und somit auf eine veränderte Funktionalität des Organells<sup>69</sup>.



**Abbildung 10: Repräsentative Bildausschnitte der konfokalen Mikroskopie der HepG2, Huh7 und HeLa Zellen. Angefärbt wurden die Mitochondrien, das Zytoskelett und die Nuclei.**

Die Färbung der Mitochondrien erfolgte mit einem TMRM-Farbstoff, der in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential in Matrix gelangt. Die Mitochondrien sind in rot, die Aktinfilamente in grün und die Zellkerne in blau dargestellt. Vergrößerung: 400x, Messbalken: 10  $\mu$ m

### 4.2.2 Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials nach LSD1-Hemmung mittels C12

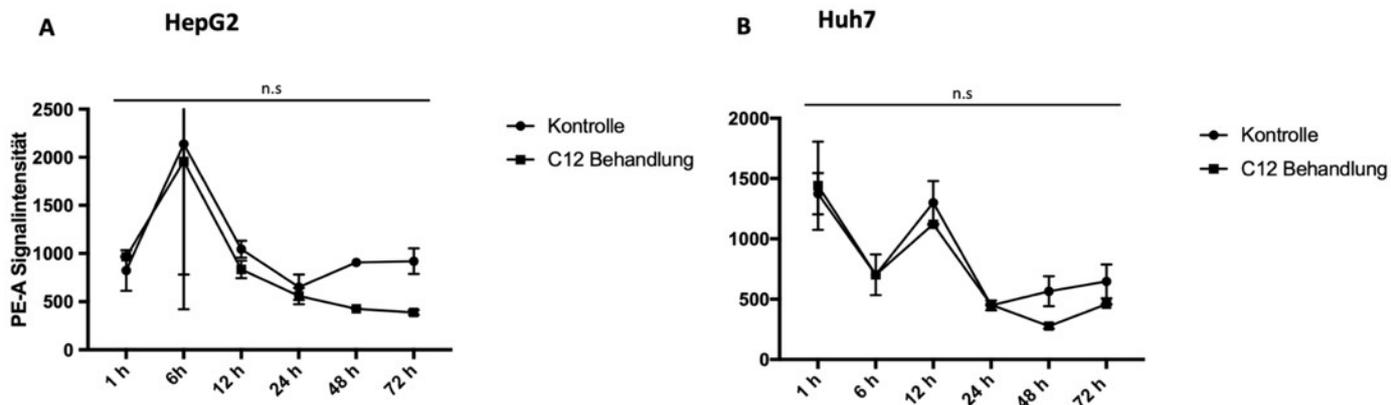
Da die vorangegangenen Färbungen einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials suggeriert haben, wurden konsekutive durchflusszytometrische Analysen angeschlossen, um den Effekt zu quantifizieren und die Zeitabhängigkeit des C12-Einflusses auf das mitochondriale Membranpotential zu charakterisieren.

#### 4.2.2.1 Durchflusszytometrische Untersuchung des Einflusses der C12 Behandlung auf das mitochondriale Membranpotential im zeitlichen Verlauf

## 4. Ergebnisse

Die mikroskopische Beobachtung einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials unter LSD1-Hemmung sollte durchflusszytometrisch validiert und quantifiziert werden. Dabei wurde zunächst der zeitliche Einfluss der C12-Behandlung auf das Membranpotential untersucht. Zu diesem Zweck wurden die untersuchten HepG2- und Huh7-Zellen unterschiedlich lange (1h-72 h) mit dem LSD1-Hemmstoff behandelt und anschließend mit dem kationischen TMRM gefärbt. Die TMRM-Färbung wurde anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert.

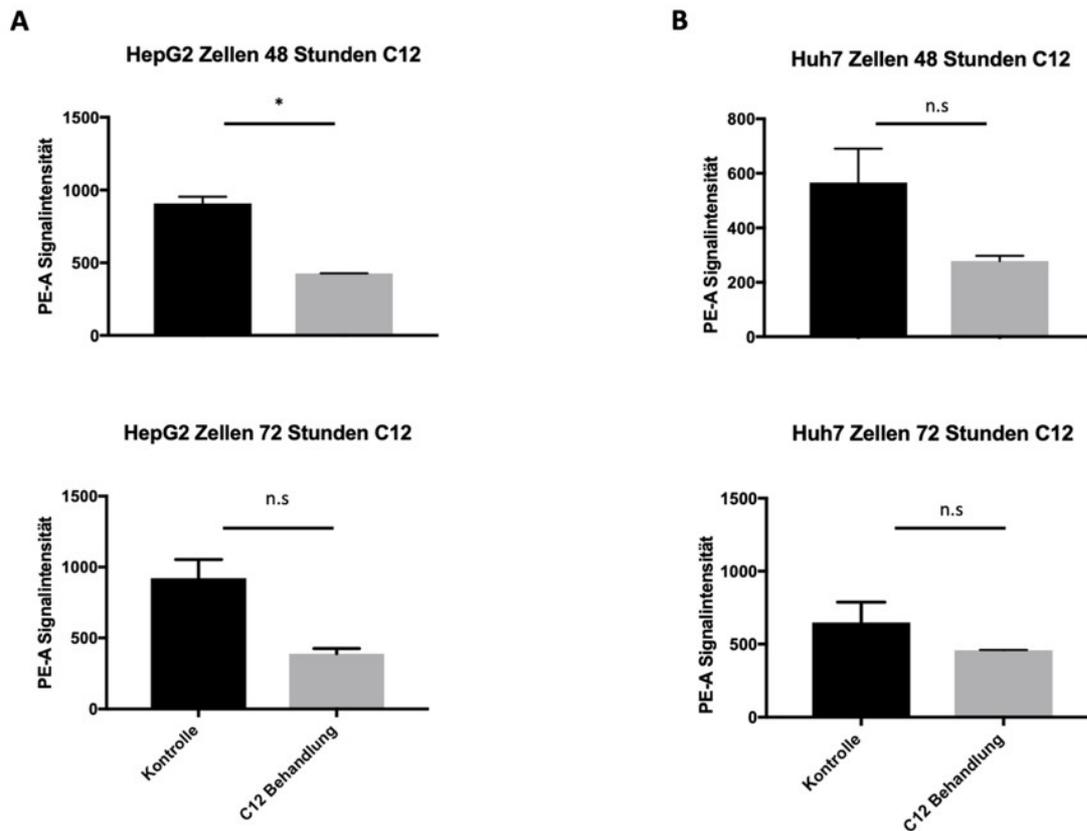
Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten zunächst, dass die Werte zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten variierten, wobei zwischen den LSD1-inhibierten Zellen und den Kontrollzellen nach 1, 6, 12 und 24 Stunden Behandlung keine Differenzen zu messen waren. Erst nach 48 Stunden war ein Unterschied des Membranpotentials in C12-behandelten Zellen zu den Kontrollen in beiden Zelllinien festzustellen (Abb. 11 u. 12). Allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Die erhobenen Daten konnten allerdings belegen, dass die verminderte LSD1-Funktion keinen unmittelbaren Einfluss auf die Mitochondrien hat, sondern Veränderungen erst verzögert nach 48 Stunden messbar waren.



**Abbildung 11: Messung des mitochondrialen Membranpotentials zu unterschiedlichen Zeitpunkten der LSD1-Hemmung.**

(A) HepG2, (B) Huh7. Die x-Achse zeigt die Dauer der C12-Behandlung. Die y-Achse gibt die Signalstärke der TMRM-Färbung, gemessen im PE-A Channel an. Die Zellen waren mit 150 nM TMRM gefärbt worden und die Intensität des TMRM-Färbesignals wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Das Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels Two-Way-ANOVA berechnet. p-Werte > 0,05 wurden als nicht signifikant (n.s.) gewertet.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 12: Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials nach 48, und 72 Stunden C12 vermittelter LSD1-Hemmung**

(A) HepG2, (B) Huh7. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch bestimmte TMRM-Signalstärke (PE-A Kanal) nach 48 h und 72 h pharmakologischer LSD1 Hemmung. Im Balkendiagramm werden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz wurde mittels paarweisen T-Test bestimmt. \*  $p < 0,05$ ,  $p > 0,05$ ; n.s. (nicht signifikant)

### 4.2.2.2 Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC1

Eine gängige Empfehlung, um die Kohärenz der Ergebnisse des vorangegangenen Experiments zu überprüfen, ist ein komplementäres Experiment mit einem weiteren Farbstoff durchzuführen<sup>70</sup>. Daher wurde eine Durchflusszytometrie nach Färbung der C12-behandelten und -unbehandelten Kontrollzellen mit dem JC1-Farbstoff angeschlossen. Aufgrund dessen, dass in der vorherigen Testung erst nach 48 und 72 Stunden C12-Behandlung eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials zu erkennen war, wurde hier die übliche Behandlungsdauer von 72 Stunden gewählt. Im Gegensatz zu dem TMRM, hat das JC1 die Eigenschaft, je nach Funktion der Mitochondrien, Signale unterschiedlicher Wellenlänge zu emittieren. In Mitochondrien mit erhaltenem Membranpotential bilden die JC1-Moleküle Aggregate, die Signale von 590 nm (rot) Wellenlänge emittieren. Ein Verlust des Potentials verhindert die Bildung ebendieser Aggregate und Licht der Wellenlänge 525 nm (grün) wird emittiert<sup>71</sup>. Um das Ausmaß der mitochondrialen Depolarisation innerhalb einer Zelle

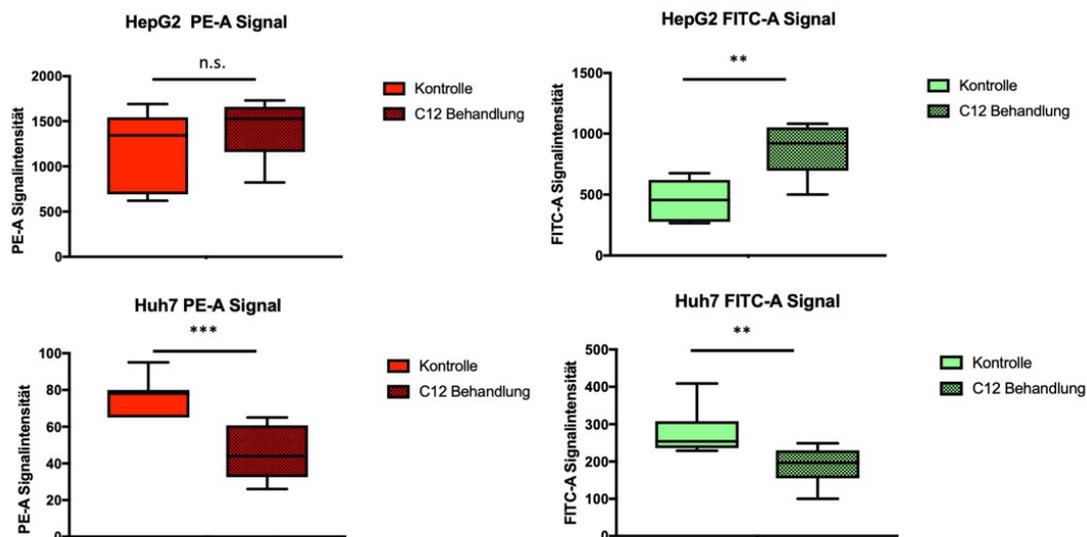
## 4. Ergebnisse

beurteilen zu können, kann man das Verhältnis der Signale bei 590 nm und 525 nm berechnen. Eine Reduktion dieses Wertes zeigt einen vorwiegenden Verlust der Potentialdifferenz an.

Die Resultate dieses Experiments zeigen, dass es in den HepG2-Zellen unter LSD1-Hemmung zu keiner signifikanten Veränderung des Signals von 590 nm Wellenlänge (rotes Signal) kommt. Im Gegensatz hierzu lässt sich jedoch eine Zunahme des Signals bei 525 nm messen (Abb. 13).

In den Huh7-Zellen dagegen führte die 72-stündige Behandlung mit 2  $\mu$ M C12 zu einer signifikanten Verminderung beider Signale (Abb. 13).

Obwohl die roten und grünen Fluoreszenzintensitäten in HepG2 und Huh7 unterschiedlich von C12 beeinflusst wurden, wurde in beiden Zelllinien nach 72-stündiger Inhibierung, eine signifikante Reduktion des Rot/Grün Ratios festgestellt (Abb. 14) und damit einhergehend eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials in den Zellen.



**Abbildung 13: Durchflusszytometrische Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC1 Färbung.**

Dargestellt sind die Ergebnisse für HepG2 und Huh7 Zellen. Die Messung der Signalintensität bei 590 nm erfolgte im PE-A Kanal. Für das Signal bei 525 nm wurde der FITC-A Kanal verwendet. HepG2 Kontrolle n= 6; HepG2 C12 Behandlung n= 5; Huh7 Kontrolle n= 9; Huh7 C12 Behandlung n= 8; statistische Signifikanz wurde mittels Student-t-Test berechnet. \* p-Wert < 0,05; \*\* p-Wert < 0,01; \*\*\* p-Wert < 0,001; n.s.: nicht signifikant.

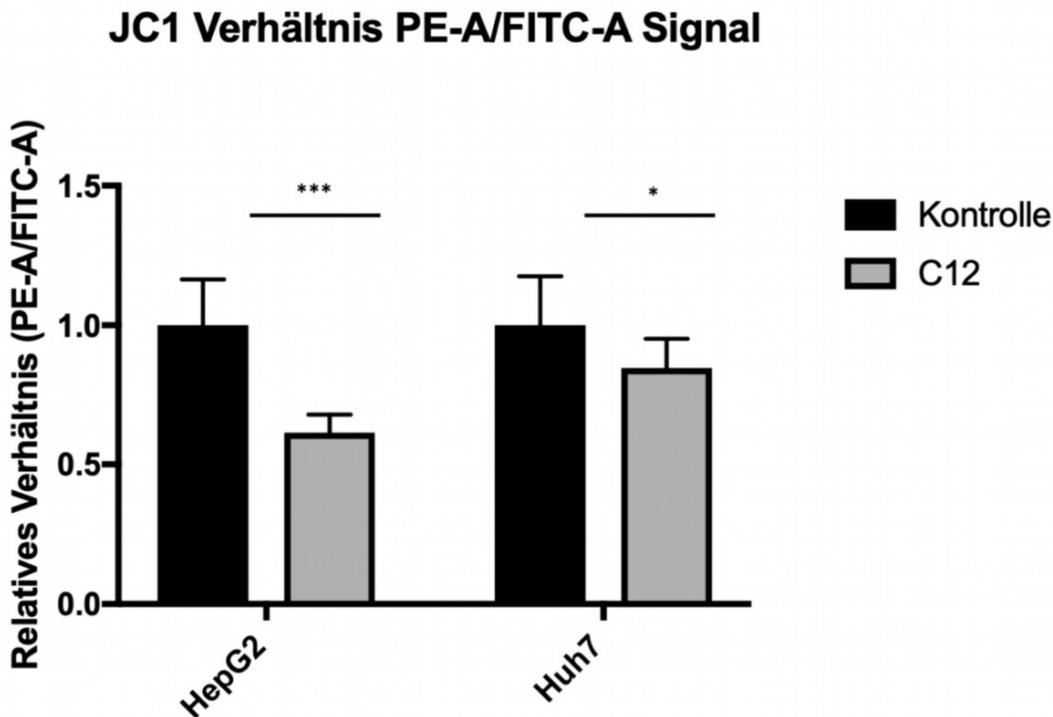


Abbildung 14: Veränderung des Membranpotentials nach 72-stündiger LSD1-Inhibierung.

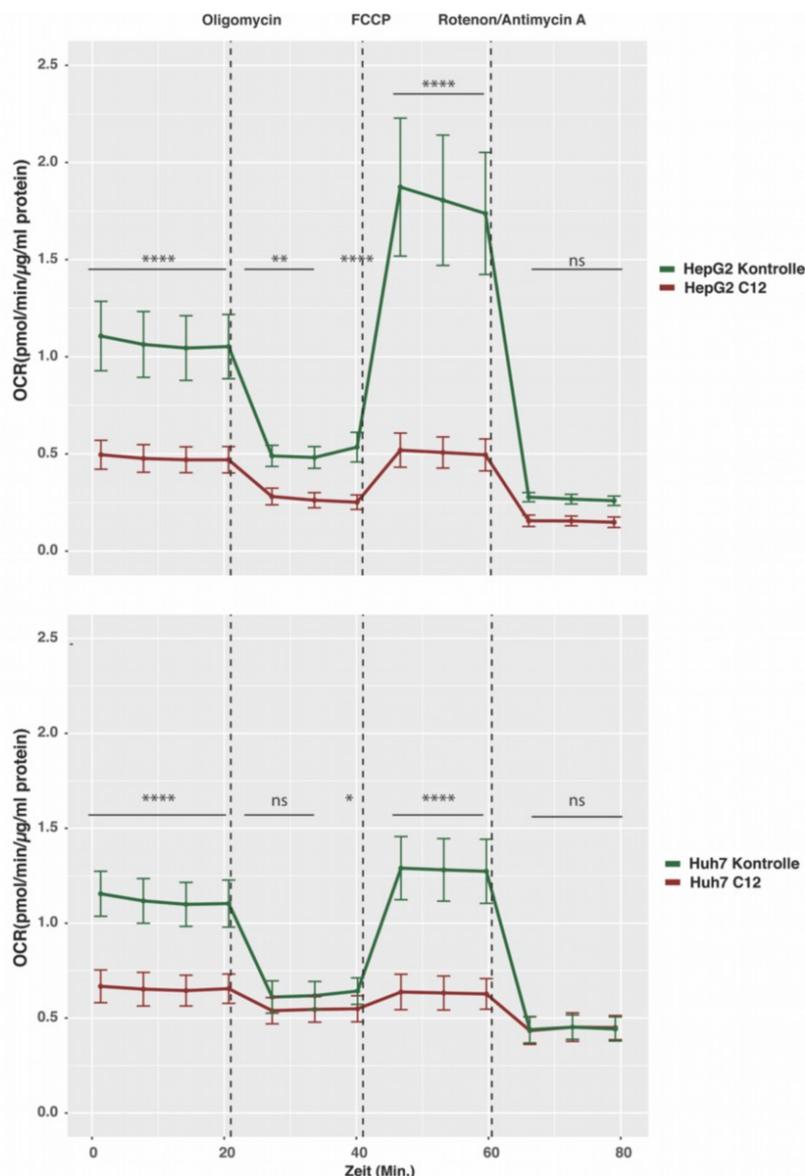
Dargestellt sind die Ergebnisse für die HepG2 und Huh7 Zellen. Die Ergebnisse der C12 behandelten Proben wurden auf die Kontrollen normalisiert. HepG2 Kontrolle n= 6; HepG2 C12 Behandlung n= 5; Huh7 Kontrolle n= 9; Huh7 C12 Behandlung n= 8; statistische Signifikanz wurde mittels Student-t-Test berechnet. \* p-Wert < 0,05; \*\* p-Wert < 0,01; \*\*\* p-Wert < 0,001; n.s.: nicht signifikant.

### 4.2.3 Metabolische Analyse zeigt verminderte mitochondriale Respiration, ATP-Produktion und Reservekapazität unter C12-Behandlung

Nachdem gezeigt wurde, dass nach C12-Behandlung in Hepatomazellen ein vermindertes Membranpotential vorlag, wurde, mit dem Ziel, den Effekt der C12-Behandlung auf die mitochondriale Atmung genauer zu untersuchen, eine Analyse der einzelnen Komponenten der Atmungskette in zwei HCC-Zelllinien vorgenommen. Hierzu wurde die "Seahorse Xf96 " Plattform unter Verwendung des „Mito Stress Test Assays“ herangezogen. Zusammengefasst erfolgt hier eine funktionelle Analyse der Atmungskette, wobei die „oxygen consumption rate“ (OCR) als Schlüsselparameter der mitochondrialen Aktivität verwendet wird. Bei der Durchführung des Assays werden unterschiedliche Komponenten der Atmungskette, in LSD1-inhibierten und Kontrollzellen, gehemmt und der Einfluss auf die OCR gemessen, wodurch eine differenzielle Analyse der Funktionalität einzelner Atmungskettenbestandteile in den zu vergleichenden Gruppen ermöglicht wird (für das detaillierte Protokoll siehe Kapitel 3.2.3.5).

## 4. Ergebnisse

Die Resultate verdeutlichen, dass unter pharmakologischer LSD1-Hemmung der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe vermindert ist. Darüber hinaus ist auch zu erkennen, dass nach Applikation des Komplex V-Inhibitors Oligomycin, sowie nach Entkopplung der Atmungskette mittels FCCP die OCR in den behandelten Zelllinien geringer ist, als in den unbehandelten Proben (Abb. 15). Im Gegensatz dazu ist kein signifikanter Unterschied zwischen der LSD1-inhibierten und der Kontrollgruppe nach Hemmung der Komplexe I und III mit Rotenon und Antimycin A zu erkennen, was bedeutet, dass es keine Unterschiede hinsichtlich des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs gibt.



**Abbildung 15: Ergebnisse des Seahorse XF Mito-Stress Tests**

Die Abbildung zeigt den Sauerstoffverbrauch (oxygen consumption rate, OCR) in den beiden Zelllinien HepG2 (oben) und Huh7 (unten) unter Kontrollbedingungen, sowie nach 72-stündiger C12 vermittelter LSD1-Hemmung. Die ersten vier Messpunkte zeigen die basale OCR. Darauf folgen je drei Messungen nach Oligomycin, FCCP, bzw. Rotenon/Antimycin A Gabe. HepG2 Kontrolle n= 12; HepG2 C12 n= 12; Huh7 Kontrolle n= 12, Huh7 C12 n= 12. Statistische Signifikanz wurde mittels Two-way-ANOVA mit

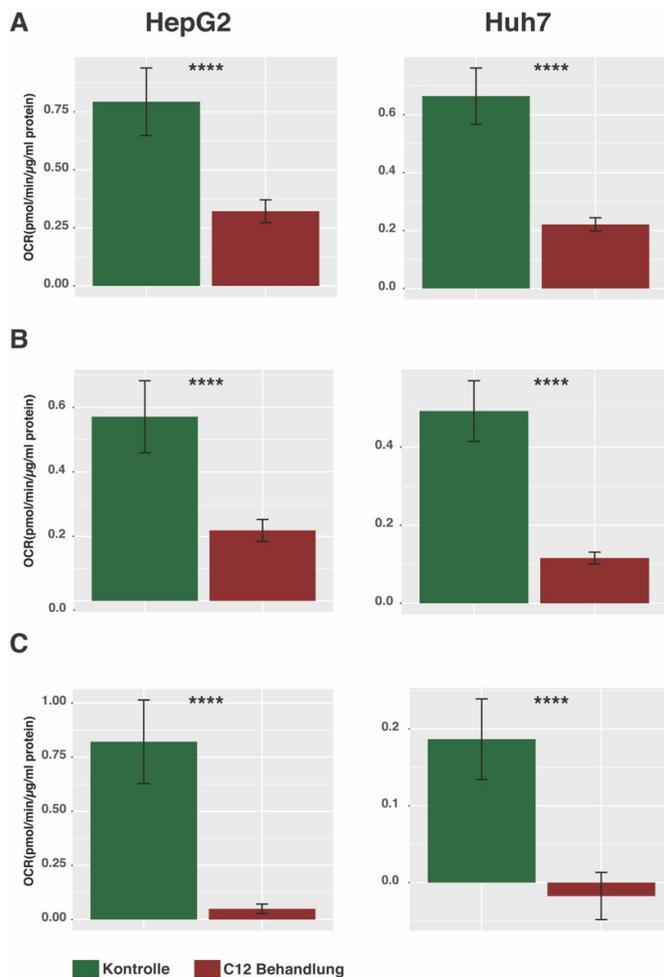
## 4. Ergebnisse

---

multipler Testung ermittelt; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ; ns: nicht signifikant,  $p > 0.05$ . Die Fehlerbalken geben zeigen die Standardabweichung.

Nachdem der Seahorse XF Mito Stress Test bereits globale Unterschiede zwischen den beiden Gruppen verdeutlicht hat, wurden die Werte aus der Messung herangezogen, um den basalen Sauerstoffverbrauch, die ATP-Produktion, sowie die Reservekapazität der Zellatmung zu quantifizieren. Hierbei wurde deutlich, dass bereits Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der basalen Atmung bestanden. Genauer heißt dies, dass unter C12-Behandlung die basale OCR im Vergleich zur Kontrolle reduziert war (Abb. 16A). Damit einhergehend konnte auch beobachtet werden, dass der Teil des Sauerstoffverbrauchs, der auf die ATP-Produktion entfällt, unter LSD1-Hemmung vermindert war, was bedeutet, dass die Zellen unter C12-Behandlung weniger ATP produzieren (Abb. 16B). Die Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette durch Zugabe von FCCP, stimuliert die Zellatmung, sodass der maximale Sauerstoffverbrauch erreicht wird. Die maximale Sauerstoffverbrauchsrate wurde nun herangezogen, um die respiratorische Reservekapazität der C12-behandelten und der unbehandelten Zellen zu ermitteln. Auch hier erkennt man eine deutliche Abnahme der Reservekapazität, nachdem LSD1 in den Zellen gehemmt wurde (Abb. 16C). Dabei ist nach der FCCP-Zugabe in den C12-behandelten Gruppen kaum eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs, bezogen auf die basale Rate, festzustellen.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 16: Basaler Sauerstoffverbrauch, ATP-Produktion und der respiratorischen Reservekapazität in Hepatomazellen nach pharmakologischer LSD1-Hemmung mit C12.**

**(A)** Basale OCR (= letzte Messung vor Oligomycin Gabe - niedrigster Wert nach Rotenon/Antimycin A Gabe) in den Zelllinien HepG2 und Huh7 unter Kontrollbedingungen und nach 72h Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  C12. **(B)** Ergebnisse der Berechnung der ATP-Produktion (= letzte Messung vor Oligomycin Gabe - niedrigster Wert nach Oligomycin Gabe) für die verwendeten Zelllinien in der Kontroll- und C12 Gruppe. **(C)** Respiratorische Reservekapazität (= maximale Respiration – basale Respiration) für HepG2 und Huh7 Zellen unter Kontrollbedingungen und C12 Behandlung. HepG2 Kontrolle n= 12; HepG2 C12 Behandlung n= 12; Huh7 Kontrolle n= 12; Huh7 C12 Behandlung n= 12; statistische Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt; \*\*\*\* = p- Wert < 0.0001, Fehlerbalken geben Standardabweichung an.

### 4.2.4 Ultrastrukturelle Analyse

Die bisher erhobenen Daten verdeutlichen, dass es durch die pharmakologische LSD1-Hemmung zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kam, sowie, dass die Funktion der Atmungskette deutlich eingeschränkt war. Ein weithin bekannter Mechanismus, wie die Zelle auf mitochondriale Dysfunktion reagiert ist die gerichtete Autophagie dieser Organellen, die Mitophagie<sup>72</sup>. Die Expressionsanalyse (siehe Kapitel 4.1.)

## 4. Ergebnisse

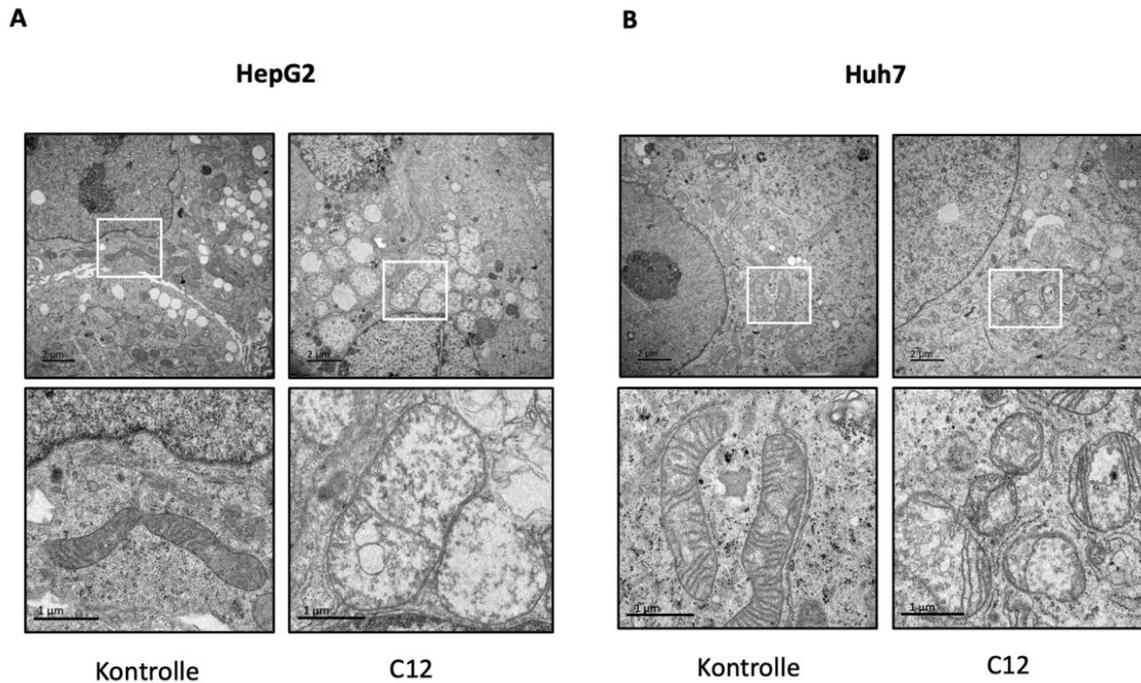
---

zeigte bereits eine Hochregulierung bestimmter, mitophagievermittelnder, Gene und suggerierte eine Aktivität dieses Signalwegs. Um das Vorhandensein dieses Prozesses zu überprüfen wurde eine ultrastrukturelle Untersuchung der Zellen unter Behandlung mit dem LSD1-Hemmstoff C12 vorgenommen. Darüber hinaus wurde auch nach weiteren morphologisch sichtbaren Zeichen für die Dysfunktion bzw. Schädigung der Mitochondrien gefahndet. Für das Experiment wurden die HCC-Zelllinien HepG2 und Huh7 verwendet, wobei möglichst alle mit einem Schnitt erfassten Zellen, mit Fokus auf mitochondriale Veränderungen, beurteilt wurden.

In den nicht behandelten Kontrollen konnten weitestgehend Mitochondrien mit tubulärer Morphologie beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich eine elektronendichte Matrix mit zahlreichen Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran (Cristae). Weiterhin erkannte man in der Elektronenmikroskopie auch verzweigte Mitochondrien, die Netzwerke untereinander ausbildeten. Bei der Evaluation der Organellen unter LSD1-Hemmung ließen sich zahlreiche Veränderungen der Struktur feststellen. So kam es zu einer deutlichen Größenzunahme der Mitochondrien, mit einer ödematös geschwollenen Matrix. Neben der Größenzunahme war auch eine veränderte Struktur der einzelnen Organellen zu verzeichnen, wobei tubulär formierte Mitochondrien, genau wie netzwerkartige Verzweigungen kaum mehr erkennbar waren. Auch hinsichtlich der Elektronendichte der Matrix ließen sich Unterschiede ausmachen, wobei die Dichte unter C12-Behandlung geringer war, als in den Kontrollen (Abb. 17).

Weiterhin konnte insbesondere in den HepG2-Zellen beobachtet werden, dass es unter Inhibierung der Demethylase zu einer Reduktion der Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran gekommen ist, wie der Verlust der Cristae anzeigte (Abb. 17). Es ist anzunehmen, dass diese Reduktion der Oberfläche auch mit einer verminderten respiratorischen Aktivität einhergeht, da die Dissimilation vor allem an der inneren Membran stattfindet. Insgesamt ließen sich die genannten Alterationen bei beiden Zelllinien unter Inhibierung von LSD1 feststellen, der Effekt war in den HepG2-Zellen jedoch stärker ausgeprägt als in den Huh7-Zellen.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 17: Transmissionselektronmikroskopie von Hepatomazellen nach 72 h pharmakologische LSD1-Hemmung sowie unter Kontrollbedingungen.**

**(A) HepG2, (B) Huh7.** Hier wird die Ultrastruktur der Mitochondrien dargestellt. Die erste Reihe zeigt eine Übersichtsvergrößerung. Die in dem Inlet eingefassten Areale werden in der zweiten Reihe in Detailansicht gezeigt. Messbalken obere Reihe: 2 µm; Messbalken unterer Reihe: 1 µm.

### 5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass eine pharmakologische Inhibierung von LSD1 in Krebszelllinien zu einem veränderten Genexpressionsprofil führt. Hierbei zeigten sich deutliche Effekte auf die Expression von Mediatoren metabolischer Signalwege. Insbesondere wurde die Expression der nukleär codierten Untereinheiten des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette durch die pharmakologischen LSD1-Inhibierung reprimiert, wodurch es zu einem mitochondrialen Funktionsverlust kam. Damit konnten in der vorgelegten Studie erstmals Indizien gesammelt werden, dass die LSD1-Inhibierung nicht nur das Tumorzellwachstum durch Einfluss auf den Zellzyklus hemmt, sondern auch durch eine energetische Blockade aufgrund der inhibierten mitochondrialen Aktivität.

#### 5.1 Einfluss der pharmakologischen LSD1-Inhibierung auf die Genexpression

Die pharmakologische Inhibierung von LSD1 führt zu umfangreichen Veränderungen des Genexpressionsprofils (vgl. Kapitel 4.1.1). Insbesondere konnte eine Herabregulation von nukleär codierten Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette, sowie eine Heraufregulation von Mitophagie-Effektoren gezeigt werden. Die in dieser Arbeit gefundenen weitreichenden Alterationen sind im Einklang mit Beobachtungen, dass LSD1 in Abhängigkeit von Interaktionspartnern unterschiedlich rekrutiert wird und folgend die Genexpression transkriptionell vielfältig beeinflussen kann<sup>34,58</sup>. Aktuelle Forschungsergebnisse, bei denen unterschiedliche LSD1-Domänen mittels CRISPR/cas9 alteriert wurden, legen nahe, dass die Protein-Protein-Interaktionen über die „Tower“-Domäne sogar einen größeren Einfluss auf die Genregulation haben als die katalytische Funktion, wobei hier auch der genaue Kontext zu berücksichtigen ist<sup>41</sup>.

Da LSD1 ebenfalls für die lysinspezifische Demethylierung von Transkriptionsfaktoren wie TP53 und E2F verantwortlich ist, kann LSD1 nicht nur durch direkte bzw. in Zusammenschluss mit Co-Faktoren durchgeführte Histonmodifikationen, sondern auch über Modifikationen anderer regulatorisch aktiver Proteine das Expressionsprofil beeinflussen<sup>34,38-40</sup>.

Die bisherigen Forschungsergebnisse deuten auf eine komplexe und auf verschiedenen Ebenen LSD1-vermittelte Genregulation hin, wodurch die weitreichenden Veränderungen des Transkriptoms der hier untersuchten Zelllinien unter LSD1-Inhibierung erklärt werden.

In der hier vorgelegten Studie wurde der LSD1-Inhibitor C12 (Synonym: HCI-2509) verwendet. LSD1 weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Monoaminoxidasen (MAO) auf<sup>33</sup>, welche bereits im Rahmen psychiatrischer Erkrankung klinisch verwendet wurden<sup>73</sup>. Daher hat man zunächst

## 5. Diskussion

---

Derivate dieser, wie bspw. GSK-690 und GSK2879552, zwecks LSD1-Hemmung entwickelt<sup>42-44</sup>. Während in hämatologischen Erkrankungen und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom teilweise ausgeprägte Effekte auf die Proliferation nachgewiesen werden konnten, zeigten sich in weiteren untersuchten soliden Tumoren keine oder nur geringe proliferationsinhibierende Effekte<sup>42,45</sup>. In nicht-tumorassoziierten Zellkultursystemen allerdings zeigte der GSK-690-Inhibitor bei der Behandlung von Adipozyten im Rahmen von metabolischen Studien Wirkung und konnte den LSD1-induzierten Einfluss aufheben<sup>55</sup>.

In einem umfassenden virtuellen "Screening" und folgenden biochemischen Analysen haben Sorna et al. eine neue Gruppe von spezifischen und reversiblen LSD1-Inhibitoren entdeckt, die N'(-1-Phenylethyliden) - benzohydrazide, wobei der C12-Inhibitor als Leitsubstanz hervorging<sup>46</sup>. Im Gegensatz zu den MAO-basierten Inhibitoren konnten unter C12-Behandlung auch überzeugende Effekte auf solide Tumoren wie dem Adenokarzinom der Lunge, Ewing-Sarkome, Prostata- und Endometriumkarzinome gezeigt werden<sup>45,47-49,74</sup>.

Die genaue Bindungsstelle des Inhibitors ist nicht bekannt; die Zunahme von dimethyl-H3K4/9 in Zelllinien und in *in-vivo* Experimenten weist jedoch auf eine Hemmung der katalytischen Funktion hin<sup>45,46</sup>.

In hauseigenen Studien konnte gezeigt werden, dass die C12-Behandlung die LSD1-Expression selbst herunterreguliert, was auf einen positiven „Feedback“-Mechanismus hindeutet. Weiterhin kommt es, unter Inhibierung, zu einer verkürzten Halbwertszeit von LSD1 in Lungenadenokarzinomzellen und Hepatomazellen<sup>45,60</sup>. LSD1 wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) streng reguliert<sup>75-77</sup>, was zu der Annahme führt, der beschleunigte LSD1-Turnover sei möglicherweise Folge einer alterierten Interaktion mit UPS-Proteinen. In Einklang mit diesen Beobachtungen legt eine von Sehrawat et al. durchgeführte *in-silico* Untersuchung der Inhibitor/LSD1-Bindung nahe, dass der Hemmstoff nicht an der katalytischen Domäne, sondern an der H3-Bindungsstelle ansetzt, wodurch die veränderten Proteininteraktionen erklärt werden könnten<sup>78</sup>.

Zusammenfassend weisen die durchgeführten Studien darauf, dass C12 die LSD1-Funktion auf mehreren Ebenen verändert:

- Die direkte Hemmung der katalytischen Funktion
- Alteration der Protein-Protein-Interaktion
- Transkriptionelle Repression von LSD1 durch positiven Feedback-Mechanismus
- Verkürzte Halbwertszeit

Aus der vielfältigen Wirkung des C12-Inhibitors resultiert eine Herunterregulation von 6071/5529 Genen - und Heraufregulation von 6494/5832 Genen in Hepatomazellen

## 5. Diskussion

---

(HepG2/Huh7,  $p_{adj} \leq 0,01$ ). In Lungenadenokarzinomzelllinien wurden 4313/4514 Gene negativ und 3933/4861 Gene positiv reguliert (A549/PC9,  $p_{adj} \leq 0,01$ ). Vergleichende Analysen der Expressionsprofile zeigen hierbei, dass krebs- und organspezifische Veränderungen auftreten, aber auch zelltypübergreifend Signalwege der Proliferation, des Zellmetabolismus und der Mitochondrienfunktion bzw. -homöostase von den Expressionsveränderungen beeinflusst wurden.

### 5.2 Konsequenzen der pharmakologischen LSD1-Hemmung auf den Zellmetabolismus

Die durch C12-Behandlung betroffenen Signalwege wurden in der vorgelegten Arbeit hinsichtlich ihrer Folgen für die analysierten Krebszelllinien untersucht.

Dabei weisen die Ergebnisse auf eine akzentuierte Herunterregulation von Genen der Glykolyse und des mitochondrialen Elektronentransports in den Hepatomazellen. Dieser Effekt war in den anderen Zelllinien ebenfalls vorhanden, aber deutlich weniger stark ausgeprägt. In allen untersuchten Zelllinien, konnte eine Induktion von mitophagieassoziierten Genen festgestellt werden.

In der Tat konnten Duteil et. al bereits in Zellkultursystemen und *in-vivo* Mausstudien beweisen, dass LSD1 mannigfaltige Effekte auf den Zellstoffwechsel in Adipocyten hat. Die pharmakologische Hemmung, sowie die Anwendung adipozytenspezifischer LSD1-„knock-out“ Konstrukte führten zu einer Repression von Genen der OXPHOS und zu einer Positivregulation von glykolyseassoziierten Genen<sup>55-57</sup>. Der Einfluss von LSD1 auf den Metabolismus konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden<sup>79</sup>. Letztendlich konnte der transkriptionelle Einfluss von LSD1 mithilfe der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) belegt werden. So konnte gezeigt werden, dass die Promotoren metabolischer, insbesondere glykolyseassoziiertes, Gene nach LSD1-Inhibierung ein verändertes H3-Methylierungsmuster zeigen und damit direkte Ziele der LSD1-Regulation sind. Weitere divergent exprimierte Gene scheinen jedoch indirekt reguliert zu werden; hier wurde z.B. das Zusammenspiel mit dem Transkriptionsfaktor Nrf1 beobachtet<sup>55,57</sup>. Es ist daher anzunehmen, dass die von uns gefundenen Veränderungen des metabolischen Expressionsprofils ebenso Folge einer Kombination aus direkten LSD1-vermittelten und indirekten Effekten ist. In der hier vorgestellten Arbeit zeigt sich bezüglich der Gene der Glykolyse ein konträrer Effekt. Unsere Ergebnisse zeigen, v.a. in den Hepatomazellen, nach LSD1-Hemmung eine transkriptionelle Repression; in der von Duteil et al. durchgeführten Studie wurde in den Adipocyten eine Heraufregulation beobachtet, was im Rahmen des Kontextes und des grundlegend veränderten Metabolismus von Krebszellen gewertet wird<sup>80,81</sup>.

## 5. Diskussion

---

Da sowohl epigenetische Veränderungen als auch die metabolische Umprogrammierung in Krebszellen zu den von Weinberg und Hanahan vorgeschlagenen „Hallmarks“ gehören, ist der beobachtete LSD1-Einfluss für mögliche therapeutische Einsatzmöglichkeiten von besonderem Interesse<sup>24,82</sup>. Bereits Otto Warburg hatte vor etwa 100 Jahren erkannt, dass Krebszellen Stoffwechseleränderungen aufweisen. Die Hypothese, dass Zellen unter bestimmten Bedingungen eine aerobe Glykolyse durchführen, ist unter dem „Warburg-Effekt“ bekannt<sup>83</sup>. Die Komplexität unserer Ergebnisse weist jedoch auf Veränderungen die über diesen Effekt, bzw. seine Konversion hinausgehen. In dieser Arbeit wurde unter LSD1-Inhibierung eine Suppression von Genen, die für Untereinheiten der Atmungskette kodieren, sowie - weniger ausgeprägt - eine Suppression glykolytischer Gene beobachtet. Die Resultate sprechen für eine Aktivität beider Wege in nicht behandelten Krebszellen. Entgegen der Annahme, dass es unter einem reduzierten oxidativen Stoffwechsel zu einer Fokussierung der Glykolyse kommt, zeigen unsere Ergebnisse keinen Wechsel auf Transkriptionsebene. Damit einhergehend konnten auch in Hepatomazellen durchgeführte präliminäre funktionelle Analysen eine Verminderung der glykolytischen Aktivität, gemessen an der extrazellulären Azidifizierung, („extracellular acidification rate“, ECAR), zeigen (Daten nicht gezeigt). Passend zu unseren Daten belegen weitere Studien, dass in malignen entarteten Zellen die mitochondriale Atmung für das Wachstum und insbesondere für die Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps notwendig ist<sup>84-87</sup>.

Unabhängig von dem Energiestoffwechsel ist anzunehmen, dass die pharmakologische LSD1-Inhibierung durch die Hemmung der genannten Signalwege zu einer Reduktion von Intermediärprodukten führt, die für den Zellanabolismus notwendig sind und so eine verminderte Proliferation bedingen<sup>88,89</sup>.

Zudem stellt sich die Frage, wie sich unter Hemmung von LSD1 das Tumormikromilieu (TME) verändert, wobei im Rahmen der durchgeführten Zellkulturstudien keine konkreten Aussagen getroffen werden können. Allgemein hin ist aber bekannt, dass Krebszellen Metabolite aus dem TME verwenden, selber Moleküle sezernieren und im Wettbewerb sowie im „Cross-talk“ mit anderen Zellen des Mikromilieus stehen<sup>80,90</sup>. Insbesondere die Auswirkungen auf Immunzellen sind interessant, da gezeigt werden konnte, dass ein Verbrauch bestimmter Aminosäuren aus dem TME durch Krebszellen den T-Zellmetabolismus und ihre Funktion einschränkt<sup>91</sup>. Eine zu überprüfende Hypothese wäre inwiefern der unter LSD1-Inhibierung reduzierte Metabolismus zu einem verminderten Wettbewerb um Metabolite im TME führt und ob sich dies positiv auf die T-Zellfunktion auswirkt und eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort unterstützt.

Letztlich belegen unsere Resultate, dass die pharmakologische LSD1-Hemmung einen ausgeprägten metabolischen Einfluss in Hepatomazellen hat und v.a. die mitochondriale

## 5. Diskussion

---

Zellatmung supprimiert. Neben den Effekten auf die ATP-Produktion sind hier auch weitere Aspekte, wie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit ihren pro- und antitumorigenen Effekten zu bedenken<sup>92</sup>. Diese und weitere Aspekte sollen im nächsten Kapitel im Kontext der LSD1-Hemmung in Krebszellen mit Fokus auf Hepatomazellen diskutiert werden.

### 5.3 Auswirkungen der reduzierten Zellatmung auf die Tumorprogression nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung

Nachdem meine Resultate belegt hatten, dass unter pharmakologischer LSD1-Inhibierung mittels C12, eine deutliche transkriptionelle Herabregulation von Genen der Atmungskette vorliegt, zeigten die funktionellen Analysen, dass mit der verminderten Expression auch das mitochondriale Membranpotential reduziert, der basale Sauerstoffverbrauch erniedrigt und die ATP-Produktion sowie die maximale Respiration und Reservekapazität vermindert sind. Einhergehend mit diesen Veränderungen konnten auch deutliche ultrastrukturelle Alterationen beobachtet werden.

Der mitochondriale Elektronentransport mit der oxidativen Phosphorylierung ist von zentraler Bedeutung für den zellulären Energiestoffwechsel<sup>93,94</sup>. Dementsprechend konnten zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre belegen, dass die Respiration in diversen Krebserkrankungen, u.a. im hepatozellulären Karzinom eine wichtige Rolle spielt und die Hemmung therapeutisch genutzt werden kann<sup>95-98</sup>. Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen, unter LSD1-Hemmung, eine Kombination aus einem verminderten basalen Sauerstoffverbrauch der Krebszellen, eine verminderte ATP-Produktion, maximale Respiration und Reservekapazität sowie eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials. Hierbei weist die Konstellation der Ergebnisse eher auf eine mitochondriale Dysfunktion, als auf einen nur verringerten Energiebedarf der Zellen hin<sup>68,69,99</sup>. Die Genexpressionsdaten der vorgelegten Studie, sowie in unserem Labor durchgeführte proteomische Analysen<sup>100</sup> beweisen eine signifikante Herabregulation verschiedener Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette nach LSD1-Inhibierung. Aufgrund dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass die beobachteten Effekte auf eine verminderte Produktion und ggf. Assemblierung dieses Komplexes zurückzuführen sind. Mögliche Folgen sind daher eine geringere ATP-Produktion, eine gesteigerte ROS-Produktion sowie ein Verlust der NADH/NAD<sup>+</sup>-Homöostase, die wiederum negative Folgen auf die Nucleotidsynthese hat, wobei weitere Untersuchungen nötig sind um ein besseres Verständnis der zahlreichen Effekte zu erlangen<sup>101-103</sup>. Wie oben bereits erwähnt gibt es ähnliche metabolische Effekte in Adipocyten nach LSD1-Hemmung bzw. bei zellspezifischen „Knock-Outs“, wobei hier nachgewiesen werden konnte, dass LSD1

## 5. Diskussion

---

metabolische Gene direkt, bzw. in Zusammenspiel mit anderen Faktoren regulieren kann, sodass wir von einem ähnlichen Mechanismus in Krebszellen ausgehen<sup>57</sup>.

Die andauernde mitochondriale Dysfunktion mit dem Zusammenbruch des Membranpotentials ist ein weithin bekannter Trigger der Mitophagie, ein Prozess bei dem die dysfunktionalen Organellen abgebaut werden<sup>104,105</sup>. Wie erwartet zeigen die Daten der Expressionsanalyse eine Hochregulierung verschiedener Mitophagie-Effektoren, u.a. PINK1, wobei der Effekt auf das Krebszellwachstum und die Proliferation Gegenstand aktueller Diskussionen ist<sup>106,107</sup>. Um die Hypothese der Mitophagieinduktion zu überprüfen wurden ultrastrukturelle Untersuchungen angeschlossen, wobei hier keine direkte Darstellung des Prozesses möglich war. Jedoch waren deutliche morphologische Veränderungen, wie eine Schwellung der Organellen, eine verminderte Elektronendichte, ein Verlust der Cristae und eine weniger tubuläre Erscheinung erkennbar. Interessanterweise wurden ähnliche Veränderungen bereits im Kontext von bakteriellen Infektionen und hypoxischen Schäden beobachtet<sup>108-110</sup>. Insbesondere die Schwellung der mitochondrialen Matrix wird hierbei auf eine gestörte Homöostase des Ionen-Haushalts zurückgeführt und kann letztendlich zur Apoptose der Zelle führen<sup>111</sup>. Die beschriebenen Veränderungen scheinen das morphologische Korrelat der pharmakologischen LSD1-Inhibierung mit der Dysregulation des Komplex I, dem konsekutiven Verlust des Membranpotentials und den damit einhergehenden Verlust der mitochondrialen Integrität darzustellen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen bisher auf eine verminderte metabolische Funktion und Plastizität der Zellen unter LSD1-Hemmung hin. Daneben ist belegt, dass LSD1-Inhibierung zu einem verringerten Krebszellwachstum und einer verminderten Proliferationsaktivität führt<sup>95-98</sup>. Bisher wurden die Effekte der LSD1-Hemmung auf das Tumorstadium und die Dedifferenzierung in Krebserkrankungen auf Expressionsveränderungen zellzyklusassoziierter und differenzierungsmodifizierender Gene zurückgeführt<sup>45,49,112,113</sup>. Die Ergebnisse lassen allerdings auch die Hypothese zu, dass die Einflüsse auf den Energiestoffwechsel und Metabolismus ebenfalls zum verringerten Krebszellwachstum beitragen, was wiederum den therapeutischen Nutzen der LSD1-Inhibierung unterstreicht. Bislang ist die therapeutische Applikation von direkten Inhibitoren der Zellatmung bzw. des Stoffwechsels allgemein schwierig, da eine spezifische Hemmung in malignen Zellen kaum möglich ist und die Anwendung mit einer hohen Toxizität einhergeht<sup>114,115</sup>. Da LSD1 in zahlreichen Krebsentitäten überexprimiert wird<sup>29-32,116,117</sup> und die Stoffwechseleränderungen als Folge einer transkriptionellen Regulation gesehen werden, stellt sich die Frage, ob die Auswirkungen auf Wachstum und Proliferation krebsspezifisch sind und daher unerwünschte Auswirkungen auf ruhende, proliferativ inaktive Nicht-Krebszellen ausbleiben. Allerdings besteht auch die Möglichkeit eines physiologischen LSD1-

## 5. Diskussion

---

„Schwellenwertes“ in nicht-entarteten Zellen, der unter Hemmung unterschritten wird und noch unbekannte Folgen in den Zellen des Normalgewebes hat. Bisher zeigt die LSD1-Hemmung unter Verwendung von C12 jedoch ein günstiges Nebenwirkungsprofil<sup>45,48,74</sup>.

Der durch LSD1-Hemmung hervorgerufene anti-neoplastische Effekt kann zudem durch eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika bzw. zielgerichteten Medikamenten gesteigert werden, was gegenwärtig auch in klinischen Studien evaluiert wird<sup>45,50,51,118,119</sup>. Ein ähnlicher Kombinationsansatz mit Chemotherapeutika wird auch für direkte Inhibitoren des mitochondrialen Stoffwechsels vorgeschlagen<sup>86,115</sup>.

In einem kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikel wurde herausgearbeitet, dass Tumorzellen nach durchlaufener Therapie eine Abhängigkeit vom oxidativen Metabolismus entwickeln und resistent gegen die angewendeten Medikamente werden<sup>86</sup>, wobei dies sowohl in hämatologischen, als auch in soliden Tumoren nachgewiesen wurde<sup>120-123</sup>. Da die hier vorgelegten Daten eine mitochondriale Dysfunktion in Folge der pharmakologischen LSD1-Inhibierung belegen, stellt sich die Frage inwiefern eine kombinierte Therapie mit einem weiteren Wirkstoff in der Erstlinie suffizient wäre, um eben auch diese, vom oxidativen Metabolismus abhängigen Zellen zu erfassen und das Risiko einer Resistenz bzw. eines Rezidivs zu senken. Entsprechend könnte man auch für einen Einsatz von LSD1-Inhibitoren in der Zweitlinie, zur Bekämpfung der resistenten Zellpopulation, argumentieren. Zudem ist davon auszugehen, dass in Zukunft weitere Methoden zur Verfügung stehen, um den Erfolg einer gegen LSD1 gerichteten Therapie abzuschätzen. So sind aktuell Tracer-Moleküle für die Positronen-Emissionstomographie (PET) in Testung, die eine *in-vivo* Messung des mitochondrialen Membranpotentials ermöglichen und in Zukunft, neben dem LSD1-Expressionslevel, als Therapieprädiktor genutzt werden können<sup>124</sup>.

### 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit belegt, dass die pharmakologische LSD1-Inhibierung mittels C12 zu weitreichenden Veränderungen des Expressionsprofils in Krebszellen führt. Vor allem zeigten sich deutliche Alterationen von metabolischen Signalwegen, wobei eine Repression von Genen verschiedener Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette vordergründig war. Damit einhergehend konnte auch auf funktioneller Ebene eine mitochondriale Dysfunktion nachgewiesen werden, welche von ultrastrukturellen Veränderungen begleitet wurde.

Limitationen der präsentierten Studie sind, dass es trotz der berichteten Spezifität des C12-Inhibitors Hinweise auf unspezifische Effekte gibt und geklärt werden muss, inwiefern diese zu den Auswirkungen auf den Metabolismus beitragen. Um diese Frage zu adressieren, sollten

## 5. Diskussion

---

Experimente mit weiteren Inhibitoren einer anderen Klasse, sowie transiente oder stabile LSD1-„knock-down“-Experimente mit „small interfering“ oder „small hairpin“ Ribonucleinsäuren (siRNA, shRNA) durchgeführt werden. Ein weiterer interessanter Ansatz wäre auch, den Einfluss der verschiedenen LSD1-Domänen auf die metabolischen Effekte zu untersuchen, indem man die verschiedenen Bereiche, bspw. die „Tower-Domäne, mit einem CRISPR/Cas9-basierten Ansatz perturbiert. Um die komplizierten Auswirkungen auf und Wechselwirkungen mit dem TME besser zu verstehen wären längerfristig auch *in-vivo* Experimente eine wertvolle Ergänzung.

Trotz der genannten Limitationen konnten die Resultate der durchgeführten Studie nachweisen, dass die pharmakologische LSD1-Hemmung mannigfaltige Effekte auf den Stoffwechsel maligner Zellen hat. Hierbei vermuten wir, dass die bereits bekannten Auswirkungen der LSD1-Inhibierung auf den Zellzyklus und die mitochondriale Dysfunktion einen synergistischen Effekt haben und so auf mehreren Ebenen das Krebszellwachstum und die Proliferation hemmen<sup>45,49</sup>. Die Wichtigkeit einer, gegen den Stoffwechsel maligner Zellen gerichtete Therapie wird durch aktuelle Studien unterstrichen. Es wurde beobachtet, dass Krebszellen nach stattgehabter Therapie und im Rezidiv eine Abhängigkeit vom oxidativen Metabolismus entwickeln können<sup>120-123</sup>. Die gezielte LSD1-Blockade mit dem Einfluss auf den Stoffwechsel könnte bei der Behandlung dieser Tumore eine sinnvolle Ergänzung zur Bekämpfung ebensolcher Zellpopulationen darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

---

### 6. Literaturverzeichnis

1. Guring-Schönfeld I KK. Krebsregistrierung heute: zwischen Epidemiologie, Qualitätssicherung und Forschung. *Epid Bull* 2021 2021; **4**: 3-9.
2. Mickael T YN, Michiee S, Massimo R, Irene N. In: P S, editor. Hepatocellular carcinoma WHO Classification of Tumors Editorial Board Digestive system tumors [internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019 [cited 2023 06 10]; 2019.
3. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2021; **7**(1): 6.
4. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018; **69**(1): 182-236.
5. Zentrum für Krebsregisterdaten EKDeV. Krebs in Deutschland für 2017/2018; 2021.
6. (Destatis) SB. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs. 2021. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html> (accessed 2023 06 10 2023).
7. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2019; **380**(15): 1450-62.
8. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**(3): 209-49.
9. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 2021.
10. Ferlay J EM, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today> (zuletzt aufgerufen am 10 06 2023 2023).
11. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; **19**(3): 329-38.
12. Onkologie L. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome 2022. [https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-053OLI\\_S3\\_Diagnostik-Therapie-Hepatozellulaere-Karzinom-biliaere-Karzinome\\_2022-07.pdf2022](https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-053OLI_S3_Diagnostik-Therapie-Hepatozellulaere-Karzinom-biliaere-Karzinome_2022-07.pdf2022) (zuletzt aufgerufen am 07 07 2022)
13. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2018; **391**(10127): 1301-14.
14. Reig M, Forner A, Rimola J, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol* 2022; **76**(3): 681-93.
15. International Consensus Group for Hepatocellular NeoplasiaThe International Consensus Group for Hepatocellular N. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009; **49**(2): 658-64.
16. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2015; **149**(5): 1226-39 e4.
17. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015; **47**(5): 505-11.
18. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012; **44**(6): 694-8.
19. Braghini MR, Lo Re O, Romito I, et al. Epigenetic remodelling in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2022; **41**(1): 107.
20. Gentilini D, Scala S, Gaudenzi G, et al. Epigenome-wide association study in hepatocellular carcinoma: Identification of stochastic epigenetic mutations through an innovative statistical approach. *Oncotarget* 2017; **8**(26): 41890-902.
21. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; **358**(11): 1148-59.

## 6. Literaturverzeichnis

---

22. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 2016; **17**(8): 487-500.
23. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013; **38**(1): 23-38.
24. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022; **12**(1): 31-46.
25. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; **128**(4): 683-92.
26. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; **301**(5895): 89-92.
27. Laugesen A, Helin K. Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. *Cell Stem Cell* 2014; **14**(6): 735-51.
28. Nam AS, Chaligne R, Landau DA. Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics. *Nat Rev Genet* 2021; **22**(1): 3-18.
29. Lim SY, Macheleidt I, Dalvi P, et al. LSD1 modulates the non-canonical integrin beta3 signaling pathway in non-small cell lung carcinoma cells. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 10292.
30. Lim S, Janzer A, Becker A, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis* 2010; **31**(3): 512-20.
31. Lv T, Yuan D, Miao X, et al. Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2012; **7**(4): e35065.
32. Harris WJ, Huang X, Lynch JT, et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell* 2012; **21**(4): 473-87.
33. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004; **119**(7): 941-53.
34. Perillo B, Tramontano A, Pezone A, Migliaccio A. LSD1: more than demethylation of histone lysine residues. *Exp Mol Med* 2020; **52**(12): 1936-47.
35. Chen Y, Yang Y, Wang F, et al. Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(38): 13956-61.
36. Yang GJ, Liu YJ, Ding LJ, et al. A state-of-the-art review on LSD1 and its inhibitors in breast cancer: Molecular mechanisms and therapeutic significance. *Front Pharmacol* 2022; **13**: 989575.
37. Metzger E, Wissmann M, Yin N, et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 2005; **437**(7057): 436-9.
38. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, et al. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 2007; **449**(7158): 105-8.
39. Huang J, Dorsey J, Chuikov S, et al. G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 2010; **285**(13): 9636-41.
40. Kontaki H, Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell* 2010; **39**(1): 152-60.
41. Hatzi K, Geng H, Doane AS, et al. Histone demethylase LSD1 is required for germinal center formation and BCL6-driven lymphomagenesis. *Nat Immunol* 2019; **20**(1): 86-96.
42. Mohammad HP, Smitheman KN, Kamat CD, et al. A DNA Hypomethylation Signature Predicts Antitumor Activity of LSD1 Inhibitors in SCLC. *Cancer Cell* 2015; **28**(1): 57-69.
43. Mould DP, Alli C, Bremberg U, et al. Development of (4-Cyanophenyl)glycine Derivatives as Reversible Inhibitors of Lysine Specific Demethylase 1. *J Med Chem* 2017; **60**(19): 7984-99.
44. Mould DP, Bremberg U, Jordan AM, et al. Development and evaluation of 4-(pyrrolidin-3-yl)benzoxazole derivatives as inhibitors of lysine specific demethylase 1. *Bioorg Med Chem Lett* 2017; **27**(20): 4755-9.
45. Macheleidt IF, Dalvi PS, Lim SY, et al. Preclinical studies reveal that LSD1 inhibition results in tumor growth arrest in lung adenocarcinoma independently of driver mutations. *Mol Oncol* 2018; **12**(11): 1965-79.
46. Sorna V, Theisen ER, Stephens B, et al. High-throughput virtual screening identifies novel N'-(1-phenylethylidene)-benzohydrazides as potent, specific, and reversible LSD1 inhibitors. *J Med Chem* 2013; **56**(23): 9496-508.

## 6. Literaturverzeichnis

---

47. Gupta S, Weston A, Bearrs J, et al. Reversible lysine-specific demethylase 1 antagonist HCl-2509 inhibits growth and decreases c-MYC in castration- and docetaxel-resistant prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2016; **19**(4): 349-57.
48. Theisen ER, Gajiwala S, Bearss J, Sorna V, Sharma S, Janat-Amsbury M. Reversible inhibition of lysine specific demethylase 1 is a novel anti-tumor strategy for poorly differentiated endometrial carcinoma. *BMC Cancer* 2014; **14**: 752.
49. Dalvi PS, Macheleidt IF, Lim SY, et al. LSD1 Inhibition Attenuates Tumor Growth by Disrupting PLK1 Mitotic Pathway. *Mol Cancer Res* 2019; **17**(6): 1326-37.
50. Noce B, Di Bello E, Fioravanti R, Mai A. LSD1 inhibitors for cancer treatment: Focus on multi-target agents and compounds in clinical trials. *Front Pharmacol* 2023; **14**: 1120911.
51. Fang Y, Liao G, Yu B. LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects. *J Hematol Oncol* 2019; **12**(1): 129.
52. Hollebecque A, Salvagni S, Plummer R, et al. Clinical activity of CC-90011, an oral, potent, and reversible LSD1 inhibitor, in advanced malignancies. *Cancer* 2022; **128**(17): 3185-95.
53. Maiques-Diaz A, Somerville TC. LSD1: biologic roles and therapeutic targeting. *Epigenomics* 2016; **8**(8): 1103-16.
54. Wang J, Scully K, Zhu X, et al. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 2007; **446**(7138): 882-7.
55. Duteil D, Metzger E, Willmann D, et al. LSD1 promotes oxidative metabolism of white adipose tissue. *Nat Commun* 2014; **5**: 4093.
56. Duteil D, Tomic M, Willmann D, Georgiadi A, Kanouni T, Schule R. Lsd1 prevents age-programmed loss of beige adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**(20): 5265-70.
57. Duteil D, Tomic M, Lausecker F, et al. Lsd1 Ablation Triggers Metabolic Reprogramming of Brown Adipose Tissue. *Cell Rep* 2016; **17**(4): 1008-21.
58. Kim D, Kim KI, Baek SH. Roles of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in homeostasis and diseases. *J Biomed Sci* 2021; **28**(1): 41.
59. Zhao ZK, Dong P, Gu J, et al. Overexpression of LSD1 in hepatocellular carcinoma: a latent target for the diagnosis and therapy of hepatoma. *Tumour Biol* 2013; **34**(1): 173-80.
60. Wang J. The Role of the Lysine-Specific Demethylase 1 in the Development of Hepatocellular Carcinoma: University of Cologne; 2022.
61. Dalvi P. unpublished: University Hospital Cologne, Germany 2017.
62. <https://www.kegg.jp>. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <https://www.kegg.jp> (zuletzt aufgerufen am 08.02.2020).
63. Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**(Database issue): D480-4.
64. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**(1): 156-9.
65. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004; **1**(04): 92-5.
66. Bio-Rad. Flow Cytometry Basics Guide.
67. Agilent Technologies SC, US. Measuring Cell Metabolism - Transient Micro-chamber Video. <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-analyzers/cell-analysis-measuring-cell-metabolism-transient-micro-chamber> (accessed 08/02 2020).
68. Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol* 2014; **547**: 309-54.
69. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 2018; **552**: 50-9.
70. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 2011; **50**(2): 98-115.
71. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(9): 3671-5.
72. Rugarli EI, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J* 2012; **31**(6): 1336-49.

## 6. Literaturverzeichnis

---

73. Baker GB, Coutts RT, McKenna KF, Sherry-McKenna RL. Insights into the mechanisms of action of the MAO inhibitors phenelzine and tranylcypromine: a review. *J Psychiatry Neurosci* 1992; **17**(5): 206-14.
74. Sankar S, Theisen ER, Bearss J, et al. Reversible LSD1 inhibition interferes with global EWS/ETS transcriptional activity and impedes Ewing sarcoma tumor growth. *Clin Cancer Res* 2014; **20**(17): 4584-97.
75. Zhou A, Lin K, Zhang S, et al. Nuclear GSK3beta promotes tumorigenesis by phosphorylating KDM1A and inducing its deubiquitylation by USP22. *Nat Cell Biol* 2016; **18**(9): 954-66.
76. Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* 2005; **19**(6): 857-64.
77. Wu Y, Wang Y, Yang XH, et al. The deubiquitinase USP28 stabilizes LSD1 and confers stem-cell-like traits to breast cancer cells. *Cell Rep* 2013; **5**(1): 224-36.
78. Sehrawat A, Gao L, Wang Y, et al. LSD1 activates a lethal prostate cancer gene network independently of its demethylase function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115**(18): E4179-E88.
79. Ramms B, Pollow DP, Zhu H, et al. Systemic LSD1 Inhibition Prevents Aberrant Remodeling of Metabolism in Obesity. *Diabetes* 2022; **71**(12): 2513-29.
80. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer* 2021; **21**(10): 669-80.
81. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2016; **2**(5): e1600200.
82. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**(5): 646-74.
83. Warburg O. über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klinische Wochenschrift* 1925; **4**(12): 534-6.
84. DeBerardinis RJ, Chandel NS. We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab* 2020; **2**(2): 127-9.
85. Krall AS, Mullen PJ, Surjono F, et al. Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth. *Cell Metab* 2021; **33**(5): 1013-26 e6.
86. Vasan K, Werner M, Chandel NS. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metab* 2020; **32**(3): 341-52.
87. Hollinshead KER, Parker SJ, Eapen VV, et al. Respiratory Supercomplexes Promote Mitochondrial Efficiency and Growth in Severely Hypoxic Pancreatic Cancer. *Cell Rep* 2020; **33**(1): 108231.
88. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* 2017; **168**(4): 657-69.
89. Ghergurovich JM, Lang JD, Levin MK, et al. Local production of lactate, ribose phosphate, and amino acids within human triple-negative breast cancer. *Med* 2021; **2**(6): 736-54.
90. Elia I, Haigis MC. Metabolites and the tumour microenvironment: from cellular mechanisms to systemic metabolism. *Nat Metab* 2021; **3**(1): 21-32.
91. Bian Y, Li W, Kremer DM, et al. Cancer SLC43A2 alters T cell methionine metabolism and histone methylation. *Nature* 2020; **585**(7824): 277-82.
92. Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol* 2020; **30**(6): 440-51.
93. Bratic I, Trifunovic A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1797**(6-7): 961-7.
94. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 2018; **20**(7): 745-54.
95. Yang Q, Wang L, Liu J, Cao W, Pan Q, Li M. Targeting the complex I and III of mitochondrial electron transport chain as a potentially viable option in liver cancer management. *Cell Death Discov* 2021; **7**(1): 293.
96. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med* 2018; **24**(7): 1036-46.
97. Schockel L, Glasauer A, Basit F, et al. Targeting mitochondrial complex I using BAY 87-2243 reduces melanoma tumor growth. *Cancer Metab* 2015; **3**: 11.

## 6. Literaturverzeichnis

---

98. Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, et al. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med* 2017; **23**(10): 1234-40.
99. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J* 2020; **34**(10): 13106-24.
100. Wang L. Epigenetic Modifications by the Histone Demethylase LSD1 in Hepatic Stellate Cells: University of Cologne; 2022.
101. Urra FA, Munoz F, Lovy A, Cardenas C. The Mitochondrial Complex(I)ty of Cancer. *Front Oncol* 2017; **7**: 118.
102. Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* 2015; **162**(3): 540-51.
103. Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, Bush LN, Freinkman E, Vander Heiden MG. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* 2015; **162**(3): 552-63.
104. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol* 2018; **20**(9): 1013-22.
105. Onishi M, Yamano K, Sato M, Matsuda N, Okamoto K. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J* 2021; **40**(3): e104705.
106. Denisenko TV, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitophagy in carcinogenesis and cancer treatment. *Discov Oncol* 2021; **12**(1): 58.
107. Bernardini JP, Lazarou M, Dewson G. Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene* 2017; **36**(10): 1315-27.
108. Mendelsohn DH, Niedermair T, Walter N, Alt V, Rupp M, Brochhausen C. Ultrastructural Evidence of Mitochondrial Dysfunction in Osteomyelitis Patients. *Int J Mol Sci* 2023; **24**(6).
109. Giusti S, Converso DP, Poderoso JJ, Fiszer de Plazas S. Hypoxia induces complex I inhibition and ultrastructural damage by increasing mitochondrial nitric oxide in developing CNS. *Eur J Neurosci* 2008; **27**(1): 123-31.
110. Zhang D, Liu Y, Tang Y, et al. Increased mitochondrial fission is critical for hypoxia-induced pancreatic beta cell death. *PLoS One* 2018; **13**(5): e0197266.
111. Javadov S, Chapa-Dubocq X, Makarov V. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. *Mitochondrion* 2018; **38**: 58-70.
112. Leiendecker L, Jung PS, Krecioch I, et al. LSD1 inhibition induces differentiation and cell death in Merkel cell carcinoma. *EMBO Mol Med* 2020; **12**(11): e12525.
113. Nicosia L, Boffo FL, Ceccacci E, et al. Pharmacological inhibition of LSD1 triggers myeloid differentiation by targeting GSE1 oncogenic functions in AML. *Oncogene* 2022; **41**(6): 878-94.
114. Sanchez M, Gastaldi L, Remedi M, Caceres A, Landa C. Rotenone-induced toxicity is mediated by Rho-GTPases in hippocampal neurons. *Toxicol Sci* 2008; **104**(2): 352-61.
115. Sainero-Alcolado L, Liano-Pons J, Ruiz-Perez MV, Arsenian-Henriksson M. Targeting mitochondrial metabolism for precision medicine in cancer. *Cell Death Differ* 2022; **29**(7): 1304-17.
116. Kahl P, Gullotti L, Heukamp LC, et al. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res* 2006; **66**(23): 11341-7.
117. Schulte JH, Lim S, Schramm A, et al. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res* 2009; **69**(5): 2065-71.
118. Alhousami T, Diny M, Ali F, et al. Inhibition of LSD1 Attenuates Oral Cancer Development and Promotes Therapeutic Efficacy of Immune Checkpoint Blockade and YAP/TAZ Inhibition. *Mol Cancer Res* 2022; **20**(5): 712-21.
119. Welch D, Kahen E, Fridley B, Brohl AS, Cubitt CL, Reed DR. Small molecule inhibition of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylase (HDAC) alone and in combination in Ewing sarcoma cell lines. *PLoS One* 2019; **14**(9): e0222228.
120. Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* 2014; **514**(7524): 628-32.

- 
121. Farge T, Saland E, de Toni F, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov* 2017; **7**(7): 716-35.
  122. Lee KM, Giltane JM, Balko JM, et al. MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab* 2017; **26**(4): 633-47 e7.
  123. Henkenius K, Greene BH, Barckhausen C, et al. Maintenance of cellular respiration indicates drug resistance in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2017; **62**: 56-63.
  124. Momcilovic M, Jones A, Bailey ST, et al. In vivo imaging of mitochondrial membrane potential in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2019; **575**(7782): 380-4.

### 7. Anhang

#### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bundesweite Inzidenz von Krebserkrankungen nach Geschlecht in Deutschland <sup>1</sup> .....	11
Abbildung 2: Weltweite Epidemiologie der häufigsten Krebserkrankungen für alle Geschlechter.....	12
Abbildung 3: Struktur und Funktion von LSD1 .....	14
Abbildung 4: Workflow Seahorse XF Mito Stress Test.....	30
Abbildung 5: Ablauf der metabolischen Analyse.....	33
Abbildung 6: Differentiell exprimierte Gene nach pharmakologischer LSD1-Inhibierung .....	36
Abbildung 7: Verändertes Signalmuster nach pharmakologischer LSD1-Hemmung in Lungenadeno-, Leber-, und Gebärmutterkarzinomzellen.....	38
Abbildung 8: Darstellung differentiell exprimierter Gene des Energiemetabolismus.....	39
Abbildung 9: Ergebnisse der quantitativen PCR für die Expression von Komplex I Untereinheiten der Atmungskette.....	41
Abbildung 10: Repräsentative Bildausschnitte der konfokalen Mikroskopie der HepG2, Huh7 und HeLa Zellen. Anfärbt wurden die Mitochondrien, das Zytoskelett und die Nuclei.....	43
Abbildung 11: Messung des mitochondrialen Membranpotentials zu unterschiedlichen Zeitpunkten der LSD1 Hemmung.....	44
Abbildung 12: Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials nach 48, und 72 Stunden C12 vermittelter LSD1 Hemmung .....	45
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC1 Färbung.....	46
Abbildung 14: Veränderung des Membranpotentials nach 72-stündiger LSD1-Inhibierung.....	47
Abbildung 15: Ergebnisse des Seahorse XF Mito-Stress Tests .....	48
Abbildung 16: Basaler Sauerstoffverbrauch, ATP-Produktion und der respiratorischen Reservekapazität in Hepatomazellen nach pharmakologischer LSD1-Hemmung mit C12.....	50
Abbildung 17: Transmissionselektronenmikroskopie von Hepatomazellen nach 72 h pharmakologische LSD1-Hemmung sowie unter Kontrollbedingungen. ....	52

### 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Geräte</b> .....	17
<b>Tabelle 2: Software</b> .....	18
<b>Tabelle 3: Kits und Assays</b> .....	19
<b>Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien</b> .....	19
<b>Tabelle 5: Primer</b> .....	20
<b>Tabelle 6: Immunchemikalien</b> .....	21
<b>Tabelle 7: Zelllinien</b> .....	21