

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG DER REGULATION VON AFP DURCH DIE P53-FAMILIE
IM HCC

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Ostheim

2021

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I

Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG DER REGULATION VON AFP DURCH DIE P53-FAMILIE
IM HCC

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der

Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Ostheim

2021

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Dirk Hellwig

1.Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

2.Berichterstatterin: Prof. Dr. med. dent. Marianne Federlin

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	8
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Ätiologie	8
1.1.3 Prävention und Früherkennung	9
1.1.4 Diagnose und Screening	10
1.1.5 Therapie des HCC	11
1.2 Die p53-Familie	14
1.2.1 p53	15
1.2.2 p63 und p73	19
1.2.3 Interaktion zwischen p53, p63 und p73	23
1.3 Das Alpha-Fetoprotein (AFP)	24
1.3.1 Struktur und Regulation	24
1.3.2 Funktion von AFP	27
1.4 AFP als Bestandteil einer p53-Familien-Zielgensignatur mit prognostischer Relevanz für Patienten mit HCC	29
1.5 Zielsetzung	30
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Geräte und Laborbedarf	32
2.1.2 Software	33
2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien	34
2.1.4 Zelllinien	35
2.1.5 Plasmide	36
2.2 Methoden	36

2.2.1	Hep3B-Zellkultur.....	36
2.2.2	Plasmid-Transfektion.....	37
2.2.3	Zellernte und Protein-Isolation.....	37
2.2.4	RNA-Isolation und cDNA-Herstellung für qPCR.....	38
2.2.5	Quantitative Echtzeit-PCR (Real-time-quantitative-Polymerase-chain-reaction, qPCR).....	38
2.2.6	Western Blot.....	39
2.2.7	Bindungsstellenanalyse des humanen <i>AFP</i> -Gens.....	40
2.2.8	Statistische Auswertung.....	41
3	<i>Ergebnisse</i>	42
3.1	Der Einfluss der p53-Familie auf die Expression von <i>AFP</i>	42
3.1.1	Der Einfluss von p53 auf die <i>AFP</i> -Transkription in Hep3B-Zellen.....	42
3.1.2	Der Einfluss von p63 auf die <i>AFP</i> -Synthese in Hep3B-Zellen.....	44
3.1.3	Effekte der TAp73- und Δ Np73-Expression auf die <i>AFP</i> -Transkription in Hep3B-Zellen.....	45
3.1.4	Effekte der p53-Expression auf den AFP-Proteinspiegel.....	48
3.1.5	Effekte der p63-Expression auf die AFP-Proteinspiegel.....	51
3.1.6	Effekte der TAp73- und Δ Np73-Expression auf die AFP-Proteinspiegel.....	54
3.2	<i>In silico</i> Analyse der Bindungsstellen von p53, p63 und p73 im <i>AFP</i>-Gen	57
4	<i>Diskussion</i>	60
5	<i>Ausblick</i>	65
6	<i>Zusammenfassung</i>	66
	<i>Literaturverzeichnis</i>	68

Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen für die Entstehung eines HCC	9
Abbildung 2: Diagnosealgorithmus bei HCC-Verdacht	11
Abbildung 3: Verknüpfung von Diagnosestadium und zugehöriger Therapieoption in der BCLC-Klassifikation.....	13
Abbildung 4: Beeinflussung zellulärer Prozesse durch die p53-Familie und ihrer Zielgene.....	14
Abbildung 5: Struktur des <i>p53</i> -Gens und seiner Isoformen.....	16
Abbildung 6: Transkriptionsabhängiger Antwortmechanismus von p53 auf Stresssignale.....	18
Abbildung 7: Struktur des <i>p63</i> -Gens	20
Abbildung 8: Struktur des <i>p73</i> -Gens	22
Abbildung 9: Strukturdarstellung des murinen (a) und humanen (b) <i>AFP</i> -Gens	25
Abbildung 10: Repression der <i>AFP</i> -Expression durch p53 und p73	26
Abbildung 11: Schematische Darstellung der erarbeiteten Zielgenexpressionsprofile mittels Microarray-Technik.....	30
Abbildung 12: <i>AFP</i> -Expression in p53-transfizierten Hep3B-Zellen	43
Abbildung 13: <i>AFP</i> -Expression in p63-transfizierten Hep3B-Zellen	44
Abbildung 14: <i>AFP</i> -Expression in p73-transfizierten Hep3B-Zellen	46
Abbildung 15: <i>AFP</i> -Expression in Δ Np73-transfizierten Hep3B-Zellen	47
Abbildung 16: Einfluss von p53 auf die <i>AFP</i> -Synthese.....	49
Abbildung 17: Densitometrische Analyse der <i>AFP</i> -Proteinbanden in p53-transfizierten Zellen.....	50
Abbildung 18: Einfluss von p63-Isoformen auf die <i>AFP</i> -Synthese.....	52
Abbildung 19: Densitometrische Auswertung der Proteinbanden in p63-transfizierten Hep3B-Zellen	53
Abbildung 20: Einfluss von p73-Isoformen auf die <i>AFP</i> -Synthese.....	55
Abbildung 21: Densitometrie der Proteinbanden in p73/ Δ Np73-transfizierten Hep3B-Zellen.....	56

Abbildung 22: Grafische Darstellung der identifizierten potentiellen Bindungsstellen der p53-Proteine am humanen *AFP*-Gen..... 58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Putative Bindungsstellen am <i>AFP</i> -Gen.....	56
--	----

Abkürzungsverzeichnis

AEC-Syndrom	Ankyloblepharon-Ektodermal-Dysplasia-Cleft-Syndrom; Hay-Wells-Syndrom
ADULT-Syndrom	Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth-Syndrom
α mouse pox	α mouse peroxidase
α rabbit pox	α rabbit peroxidase
AFP	Alpha-Fetoprotein
AK	Antikörper
ANKDR11	Ankyrin Repeat Domain 11
AOT	Adenomatoider Odontogener Tumor
ATF	Cyclic AMP-Dependent Transcription Factor
BAX	Blc-2-Associated-X-Protein
BCA	Bicinchoninic Acid
BCL	B-Cell-Lymphoma
BCLC	Barcelona-Clinic-Liver-Cancer
BKLF	Basic Krüppel-Like-Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BUB1	Budding Uninhibited by Benzimidazole 1
BUBR1	Budding Uninhibited by Benzimidazole-related 1
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD95	Cluster of Differentiation 95
CDC25	Cell Division Cycle 25
cDNA	Complementary DNA
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Protein
CE-US	Contrast-enhanced Ultrasound, Kontrastmittelverstärkter Ultraschall
CE-MRT	Kontrastmittelverstärkte (contrast-enhanced) Magnetresonanztomographie
CE-CT	Kontrastmittelverstärkte (contrast-enhanced) Computertomographie
CLT	Cadaveric Liver Transplantation

cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DBD	DNA-bindende Domäne
DNA	Deoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
Dn	Dominant Negativ; Δ negativ; ΔN; n-terminal trunkierte Isoform
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEC-Syndrom	Ectrodactyl-Ectodermal-Dysplasia-Cleft-Syndrom
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLASH	FLICE-associated Huge Protein
FTF	Fetoprotein Tanscription Factor
GADD45α	Growth-Arrest and DNA-Damage-Inducible Protein 45 α
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase
GIP	Growth Inhibitory Peptide
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GLI2/3	GLI Family Zinc Finger 2/3
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDAC	Histone Deacetyltransferase
HAT	Histone Acetyltransferase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma; Hepatozelluläres Karzinom
HCC/ICC	Hepatocellular Carcinoma/ Intrahepatic Cholangiocellular
HIF1α	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HNF 1	Hepatocyte Nuclear Factor 1

HuR	Human Antigen R; ELAV-Like Protein 1
IFN- γ	Interferon γ
IGFBP	Insulin-like Growth Factor-binding Protein
ITCH	Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
MELD	Model End Stage Liver Disease
MEM	Minimum Essential Media
MeOH	Methanol
Min	Minuten
miR 130	MicroRNA 130
miR 205	MicroRNA 205
miR 122	MicroRNA 122
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSX1	Msh Homebox 1
LDLT	Living Donor Liver Transplantation
LEF1	Lymphoid Enhancer-binding Factor 1
LMS-Syndrom	Limb-Mammary-Syndrom
NASH	Nichtalkoholische Fettleber-Hepatitis; Nichtalkoholische Steatohepatitis
NF1	Neurofibromin 1
NFG	Nerve Growth Factor
NOXA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
NSCL	Nonsyndromic Cleft Lip
LMS-Syndrom	Limb-Mammary-Syndrom
OD	Oligomerisierungsdomäne
p	P-Wert
PAX9	Paired Box Gene 9
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCB1	Polychlorinated Biphenyl 1
PEI	Perkutane Ethanol-Injektion
PERP	p53 Apoptosis Effector Related to PMP-22
PITX2	Pituitary Homebox 2
PS	Performance Status

PSSM	Position-Specific-Score-Matrix
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
qPCR	Real-time-Quantitative-Polymerase Chain Reaction
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RFA	Radiofrequenzablation
RH-Syndrom	Ramsay-Hunt-Syndrom
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonucleic Acid; Ribonukleinsäure
RNPC1	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 1
SAM	Sterile Alpha Motif
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Natrium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SHFM-Syndrom	Split Hand/Foot Malformation-Syndrom
SHH	Sonic Hedgehog
SLUG	Zinkfingerprotein SNAI2
SOD3	Superoxide Dismutase 3
SRB1	Scavenger Receptor B1
SREC	Scavenger Receptor Expressed by Endothelial Cells
SSC5D	Soluble Scavenger Receptor Cysteine-rich domain-containing Protein SSC5D
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAF	TATA-binding Protein-Associated Factor
TBS, TBST	Tris-buffered Saline, Tris-buffered Saline with Tween20
TFBS	Transcription Factor Binding Sites
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TNM	Tumor, Nodus (=Lymphknoten), Metastasen
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
YY1	Yin Yan
ΔN	Dominant negativ; n-terminal trunkierte Isoform

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt weltweit zu den häufigsten Malignomen. Pro Jahr werden rund 905 677 Neuerkrankungen und fast genauso viele Todesfälle weltweit erfasst, wobei das HCC die dritthäufigste Todesursache in Folge einer Tumorerkrankung darstellt (EASL Clinical Practice Guidelines 2018).

Es bestehen deutliche geographische Unterschiede bezüglich der globalen Inzidenz- und Sterberate: In Süd-Ostasien und West- und Mittelafrrika sind die Inzidenzraten im Vergleich zu den westlichen Ländern deutlich höher. Dies ist unter anderem auf hohe Infektionsraten mit dem Hepatitis B-Virus und Hepatitis C-Virus sowie eine meist deutlich schlechtere medizinische Versorgung in Bezug auf Früherkennung, Diagnose und Therapie zurückzuführen (Yang et al. 2019). Männer sind im Durchschnitt mehr als doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 74 Jahren und bei Männern bei 71 Jahren (Zentrum für Krebsregisterdaten 2020). Die Inzidenz des HCC ist weltweit steigend (EASL Clinical Practice Guidelines 2018). Dies ist insbesondere auf die steigende Zahl von Patienten mit Fettlebererkrankung und hierdurch bedingter maligner Transformation zurückzuführen.

1.1.2 Ätiologie

Der Großteil der HCC-Fälle entsteht auf dem Boden einer chronischen Lebererkrankung (Yang et al. 2019) (siehe Abbildung 1). Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC sind Virusinfektionen mit Hepatitis-B (HBV), Hepatitis-C (HCV), Fettlebererkrankungen sowie eine vorbestehende Leberzirrhose durch chronischen Alkoholkonsum (EASL Clinical Practice Guidelines 2018). Seltener Ursachen sind Erkrankung an Hämochromatose, Morbus Wilson,

Porphyrie oder die Exposition mit Aflatoxin B1, einem Mykotoxin von *Aspergillus flavus* (Wild et al. 2020).

In Ländern mit einer hohen Inzidenzrate für HCC ist vor allem die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus oder Hepatitis-C-Virus Ursache für die Entstehung des Malignoms (Yang et al. 2019).

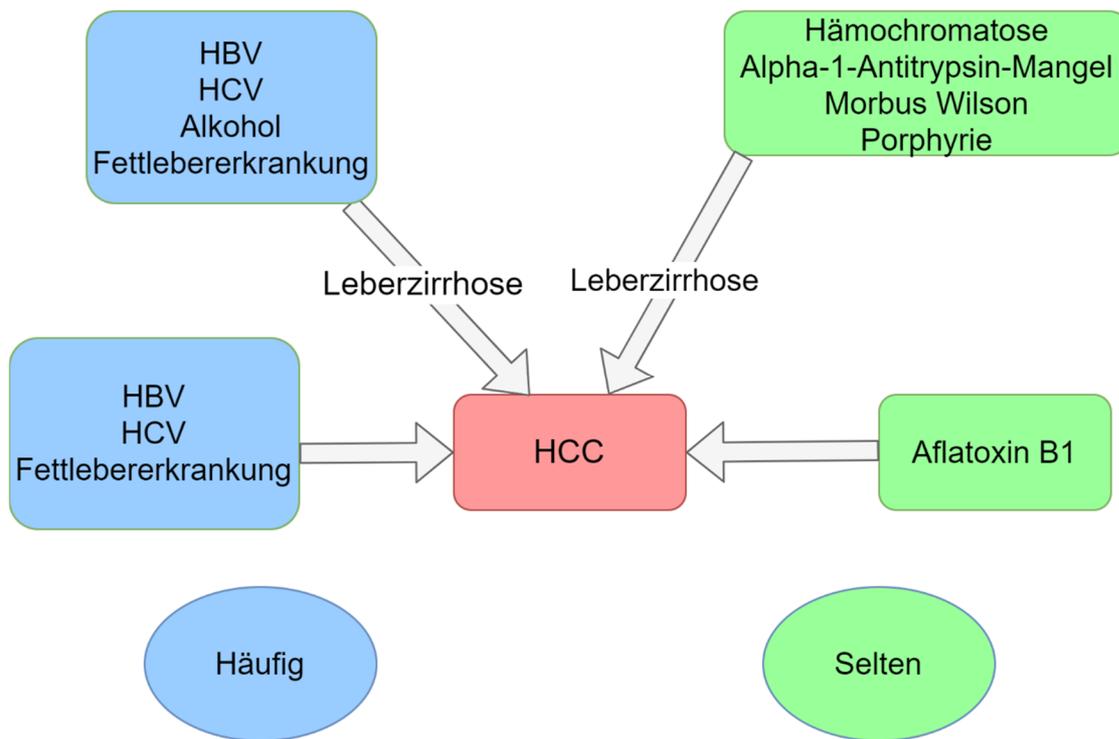


Abbildung 1: Ursachen für die Entstehung eines HCC

1.1.3 Prävention und Früherkennung

Eine entscheidende Maßnahme der Primärprävention des HCC ist die Impfung gegen Hepatitis B (EASL Clinical Practice Guidelines 2018) und die Therapie einer chronischen Hepatitis C-Erkrankung. Patienten mit einer Leberzirrhose, chronischen Hepatitis B-Erkrankung oder Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung sollten zur Sekundärprophylaxe halbjährlich eine Sonographie der Leber erhalten. Diese besitzt eine hohe Sensitivität (60-80%) und Spezifität (>90%) für die Früherkennung eines HCC (EASL Clinical Practice Guidelines 2018).

1.1.4 Diagnose und Screening

Für die Diagnosestellung kommen grundsätzlich bildgebende und/oder histologische sowie serologische Untersuchungen in Frage. Aufgrund des charakteristischen Kontrastmittelverhaltens kann die Diagnose eines HCCs mit bildgebenden Verfahren gestellt werden. Mit kontrastmittelverstärktem Ultraschall (CE-US, contrast enhanced ultrasound), kontrastmittelverstärkter Computertomographie (CT) (CE-CT, contrast enhanced computed tomography) oder kontrastmittelverstärkter Magnetresonanztomographie (MRT) (CE-MRI, contrast enhanced magnetic resonance imaging) kann das HCC auf Grund tumorspezifischer vaskulärer Shunts identifiziert werden, da das Kontrastmittel in der arteriellen Phase angereichert, in der spätvenösen aber wieder „ausgewaschen“ wird („wash-out“), sodass der Tumor kontrastarm im Vergleich zum umliegenden Gewebe erscheint. Bei untypischem Kontrastmittelverhalten in der Bildgebung sollte bei Malignitätsverdacht zur Klärung der Diagnose eine Biopsie erfolgen. Auch bei allen Patienten mit HCC-verdächtiger Läsion ohne zugrundeliegende Leberzirrhose wird eine Biopsie zur Sicherung der Diagnose empfohlen (EASL Clinical Practice Guidelines 2018).

Bei malignitätsverdächtigen Läsionen kleiner als 1 cm ist eine sichere Diagnose schwierig. Hierzu wird eine regelmäßige sonographische Kontrolle alle 3-4 Monate empfohlen, um einen eventuellen progressiven Verlauf zu dokumentieren. Ist nach 12 Monaten kein Größenzuwachs zu verzeichnen, so kann das Screening-Intervall auf 6 Monate angehoben werden (EASL Clinical Practice Guidelines 2018) (siehe Abbildung 2). Die Konzentrationsbestimmung des Alpha-Fetoproteins (AFP) wird ergänzend bei Verdacht auf ein HCC und für Therapie- und Verlaufskontrollen angewandt. Trotz der hohen Spezifität von 76-96% ist die alleinige serologische Messung des Tumormarkers aufgrund der geringen Sensitivität von nur 40-65% für eine sichere HCC-Diagnose nicht ausreichend (Debruyne und Delanghe 2008).

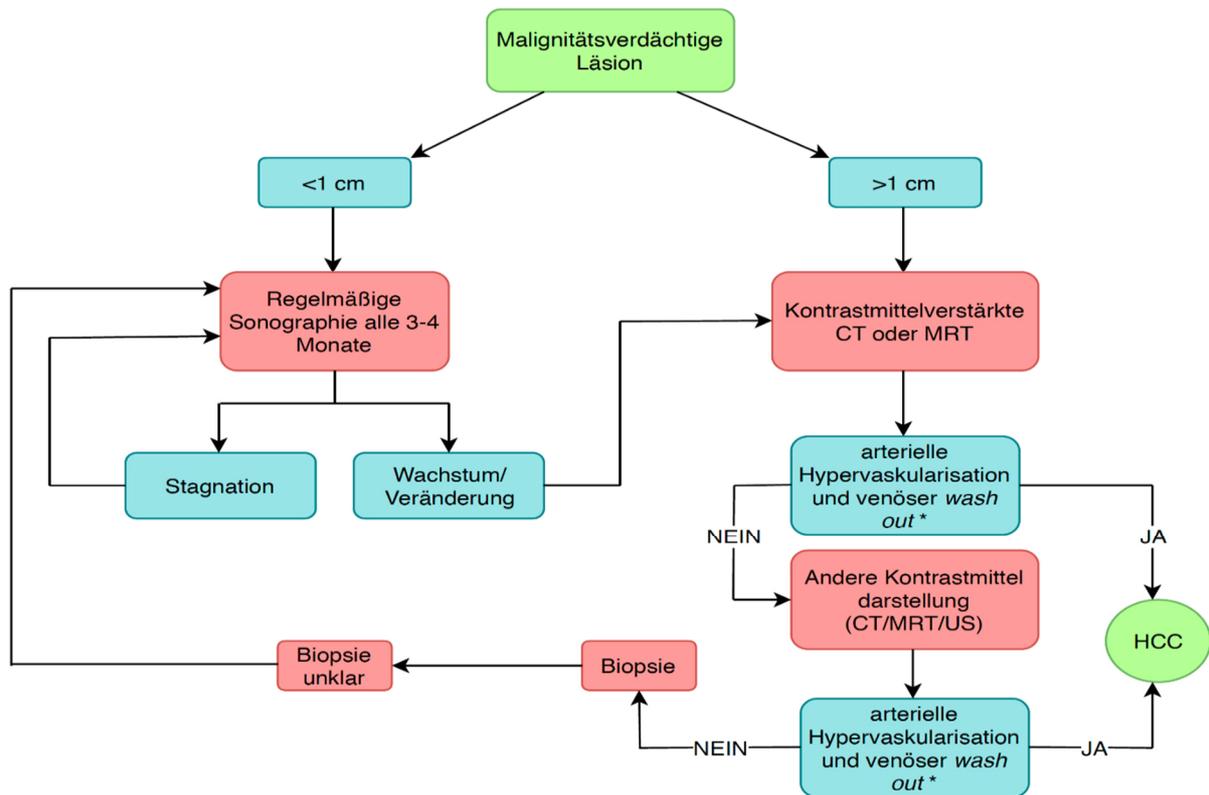


Abbildung 2: Diagnosealgorithmus bei HCC-Verdacht

* *typisches radiologisches Kontrastmittelverhalten des HCC: arterielle Hypervaskularisation mit Anreicherung des Kontrastmittels und spätvenösem „wash out“ (kontrastmittelverstärkte CT oder MRT, sowie kontrastmittelverstärkter Ultraschall)*

adaptiert nach EASL Clinical Practice Guidelines 2018

1.1.5 Therapie des HCC

Die Therapie eines HCC wird auf Basis der Tumorklassifikation und zusätzlichen prognostischen Werten, die Auskunft über die Leberfunktion enthalten (Child Pugh-Stadium, MELD (=Model Of End Stage Liver Disease)-Score), sowie des Allgemeinzustandes des Patienten (PS=Performance-Status, Klassifikation der Eastern Cooperative Oncology Group, daher auch ECOG-Status) gewählt (Pons et al. 2005; EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma 2012; EASL Clinical Practice Guidelines 2018).

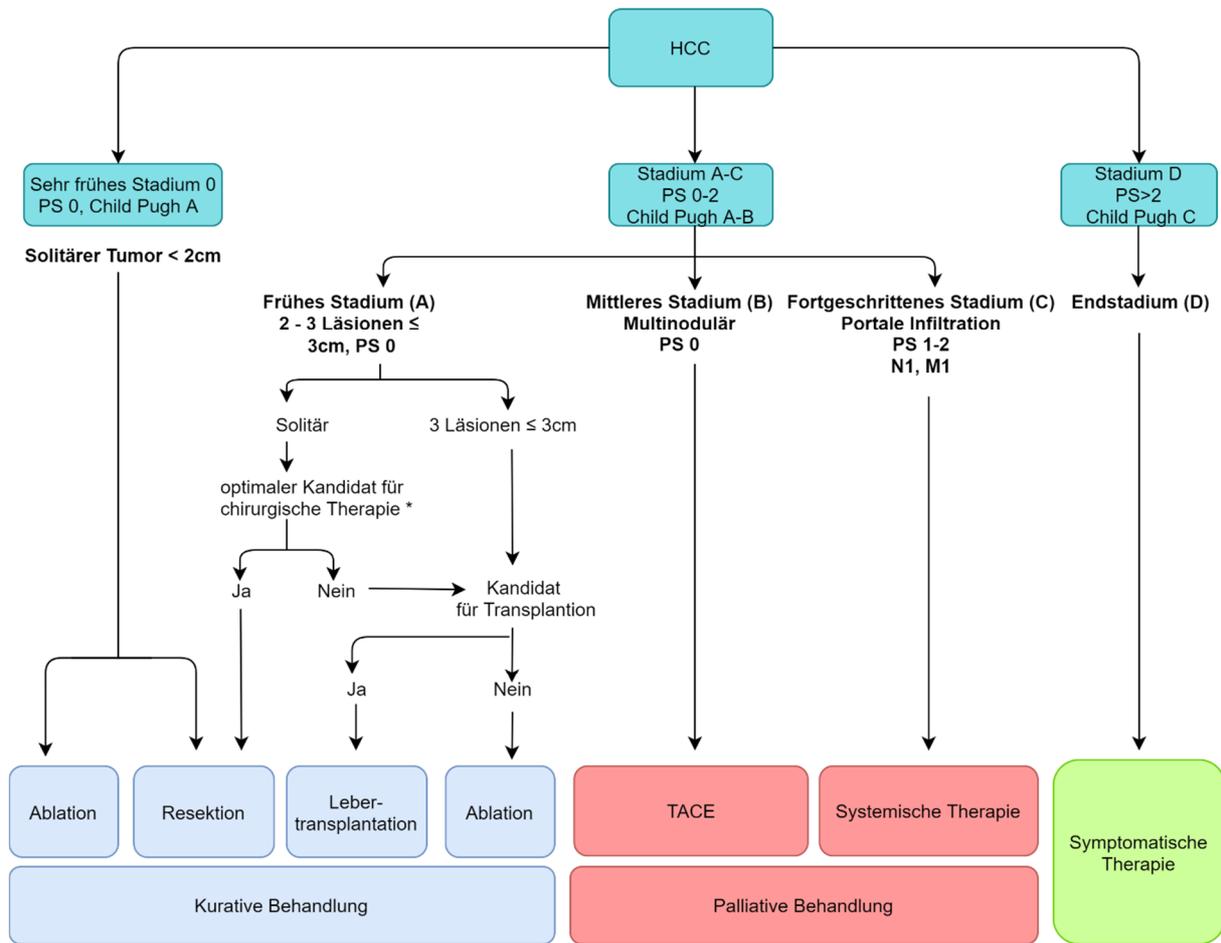
All diese Variablen gehen in die Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Kriterien ein, nach denen die Therapie des HCC definiert werden kann (siehe Abbildung 3).

Im frühen Stadium (BCLC 0) wird bei solitären Herden eine kurative Ablation oder Resektion angestrebt. Hierfür ist eine gute Leberfunktion (Child Pugh A) erforderlich, um ein Leberversagen postinterventionell oder postoperativ zu vermeiden.

Patienten im BCLC Stadium A kann bei Child Pugh A, MELD-Score < 10, normaler Bilirubin-Konzentration und Pfortaderdruck < 10 mmHg eine Resektion mit kurativem Ziel angeboten werden. Alle Patienten im BCLC Stadium A, die diese Kriterien nicht erfüllen, sollten bevorzugt eine kurative Ablation erhalten.

Bei multinodulärem Befall (BCLC Stadium B) sollte eine Transarterielle Chemoembolisation (TACE) erfolgen. Hierbei erfolgt eine gezielte Embolisation der Tumorarterien mit Chemotherapeutika und Lipiodol oder alternativ mit Drug-eluting Beads, die das Chemotherapeutikum durch eine ionische Bindung im Embolisat im Tumor halten (EASL Clinical Practice Guidelines 2018).

Im fortgeschrittenen Stadium BCLC Stadium C mit Gefäßinvasion und ggf. Vorliegen von Metastasen sollte bei Child Pugh Stadium A oder B eine Systemtherapie angeboten werden. Im Rahmen der systemischen Therapie des HCC ist neuer Therapiestandard eine Therapie mit dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab und dem VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-Inhibitor Bevacizumab (Finn et al. 2020). Atezolizumab, ein humanisierter monoklonaler IgG Antikörper, bindet an PD-1L (Programmed Cell Death Protein 1 Ligand). PD-1L bindet an PD-1 und induziert dadurch die Induktion von IL-10, einem immunsuppressiven Cytokin. Ist PD-1L durch Atezolizumab geblockt, kann diese Immunsuppression nicht stattfinden. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler IgG1 Antikörper, der VEGF bindet und dadurch die Angiogenese hemmt. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib und Lenvatinib sind ebenfalls in der Erstlinientherapie des HCC zugelassen, werden aber in aller Regel nur noch in der Zweitlinientherapie eingesetzt. Weitere Optionen für die Zweitlinientherapie sind die Kinase-Inhibitoren Regorafenib und Cabozantinib (Bruix et al. 2017; Kudo 2019). Bei Patienten im fortgeschrittenen HCC-Stadium mit erhöhtem AFP-Level (>400ng/ml) steht auch der monoklonale Antikörper Ramucirumab zur Verfügung (Zhu et al. 2019).



PS = Performance-Status; TACE = Transarterielle Chemoembolisation

Abbildung 3: Verknüpfung von Diagnosestadium und zugehöriger Therapieoption in der BCLC-Klassifikation

**als optimale Voraussetzungen für eine Resektion gelten u.a. folgende Kriterien: Child Pugh A, MELD-Score < 10, normale Bilirubin-Konzentration und Pfortaderdruck < 10mmHg*

adaptiert nach Bruix und Sherman (2011); EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma (2012); EASL Clinical Practice Guidelines (2018)

Die größer werdende Auswahl an Medikamenten führt zu einer Erweiterung des Behandlungsalgorithmus und macht die Kombination verschiedener Wirksubstanzen und Therapien möglich, sodass Patienten im palliativen BCLC-Stadium neue

Möglichkeiten und Chancen auf Heilung erhalten (EASL Clinical Practice Guidelines 2018).

Im Stadium D bei Vorliegen einer sehr eingeschränkten Leberfunktion und Child Pugh C sollte eine symptomatische Therapie erfolgen.

Alle Patienten, die sich innerhalb der Milan-Kriterien (solitärer Tumor < 5cm oder drei Läsionen bis zu 3cm) befinden, sollten für eine Lebertransplantation evaluiert werden (EASL Clinical Practice Guidelines 2018).

Anhand des MELD-Scores wird über die Dringlichkeit einer Lebertransplantation und Organzuteilung entschieden. Da im Falle des HCC der tatsächliche Dringlichkeitsgrad nicht adäquat über den lab-MELD erfasst wird, besteht die Möglichkeit Patienten mit HCC einen sogenannten match-MELD zuzuweisen, der sich alle 3 Monate erhöht. Neben der konventionellen Transplantationsmethode ist in den letzten Jahren auch die sogenannte „Living Donor Liver Transplantation“ (LDLT) als optionale Behandlung eingeführt worden.(Liu und Fan 2006).

1.2 Die p53-Familie

Zur Familie der p53-Proteine gehören neben p53 auch die Transkriptionsfaktoren p63 und p73. Die Mitglieder der p53-Familie sind an einer Vielzahl von essentiellen zellulären Prozessen, unter anderem der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptoseinduktion, beteiligt (siehe Abbildung 4).

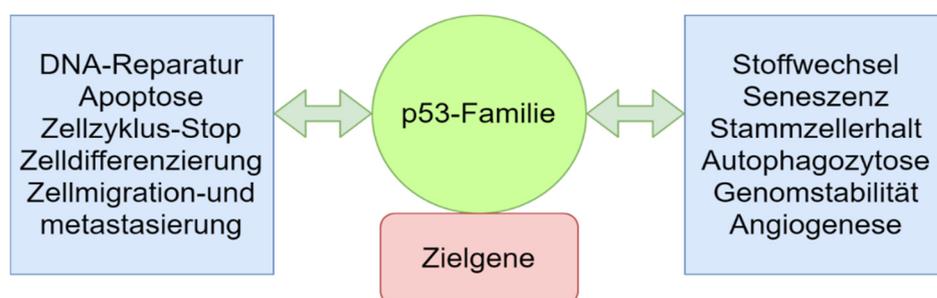


Abbildung 4: Beeinflussung zellulärer Prozesse durch die p53-Familie und ihrer Zielgene

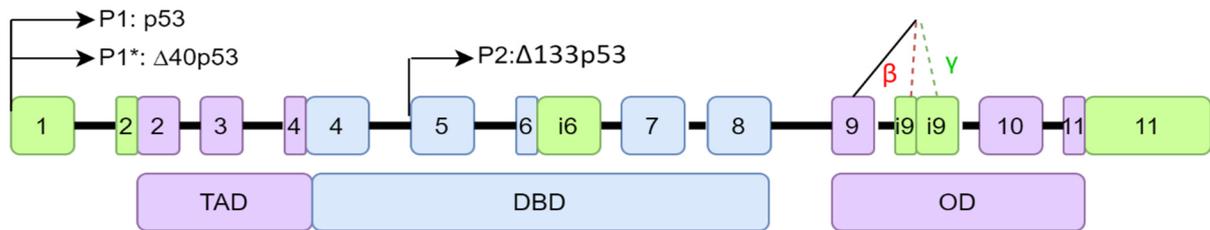
adaptiert nach Pflaum et al. (2014)

1.2.1 p53

Struktur und Isoformen

Die p53 Familie besteht aus dem Protein p53 und den strukturell zu p53 homologen Proteinen p63 und p73. Der Namensgeber der Proteinfamilie, p53 wurde 1979 erstmals beschrieben (Levine und Oren 2009). Erst 1997 wurden p63 und p73 beschrieben (Kaghad et al. 1997; Yang et al. 1998; Sethi et al. 2015).

Das p53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren und wird vom *TP53*-Gen codiert. Letzteres ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert (17p13.1) und enthält innerhalb seiner 11 Exons neben Gensequenzen für eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD; Bindungsstelle für Regulatoren wie MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog) und p300), eine DNA (Deoxyribonucleic Acid)-bindende Domäne (DBD; Bindung an eine regulatorische Einheit (RE) bei der Transkription), eine C-terminale Oligomerisierungsdomäne (OD; alternatives Spleißen und post-translationale Modifizierung), eine prolinreiche Genregion (PXXP) und drei verschiedene Promotorsequenzen, zwei vor dem ersten Exon, und eine zusätzlich nach Exon 4 (Murray-Zmijewski et al. 2006; Mavinahalli et al. 2010; Muller, Patricia A J und Vousden 2014). Neben der ursprünglichen Form des p53-Proteins, wurden noch elf weitere Isoformen beschrieben (p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 α , Δ 160p53 β , Δ 160p53 γ), die durch alternatives Spleißen (α , β , γ) und Aktivierung unterschiedlicher Promotorregionen (P1, P1* und P2) entstehen, und deren atypische Expression auch zur Entartung von Zellen beitragen kann (Surget et al. 2013). Alternatives Spleißen am Intron 9 und Aktivierung der P1-Region führt zur Bildung von p53, p53 α und p53 β , wovon die beiden letzteren keine OD-Domäne besitzen. Durch Transkription der P1*-Region und alternatives Spleißen an Intron 2 werden Δ 40p53-Isoformen gebildet. Die Aktivierung der zusätzlichen Promotorregion nach Exon 4 resultiert in der Entstehung von Δ 133p53- und Δ 160p53-Isoformen (siehe Abbildung 5) (Murray-Zmijewski et al. 2006; Surget et al. 2013).



TAD = Transaktivierungsdomäne; DBD = DNA-bindende Domäne; OD = Oligomerisierungsdomäne;
P = Promotor

Abbildung 5: Struktur des *p53*-Gens und seiner Isoformen

adaptiert nach Marcel et al. (2011) und Pflaum et al. (2014)

Funktion von p53

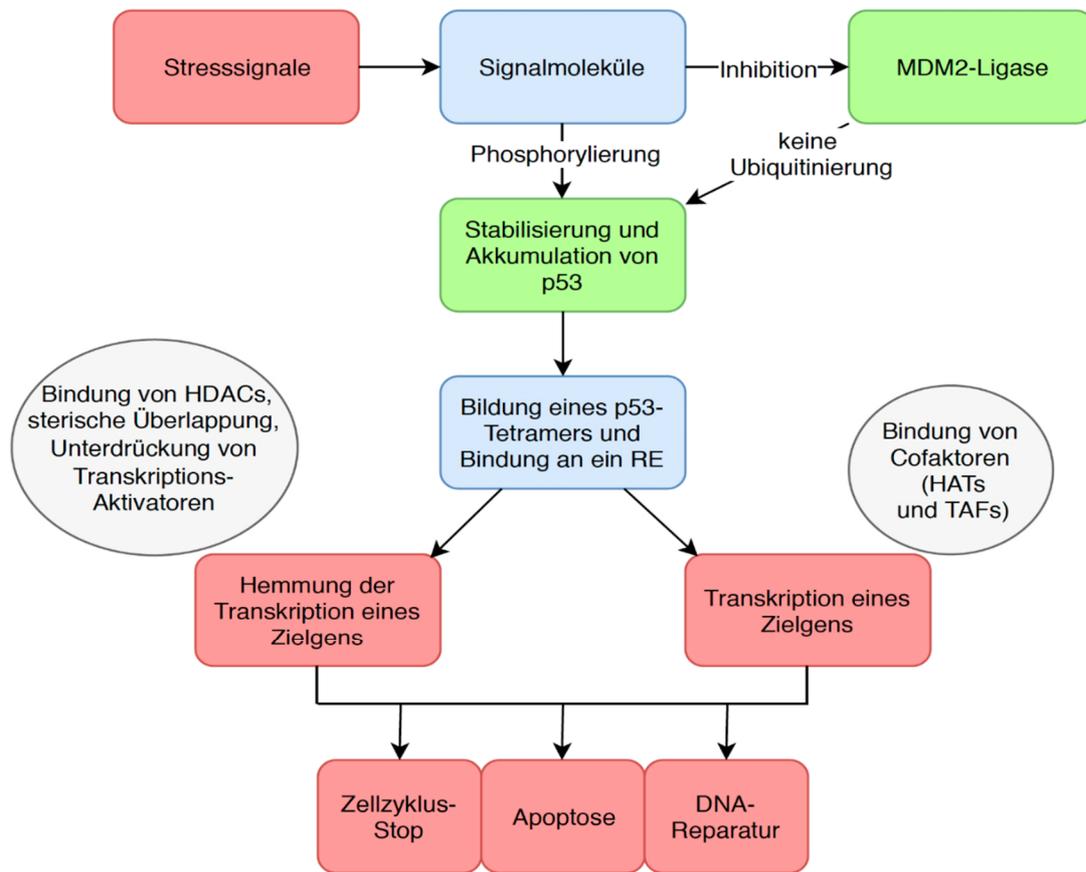
Als Tumorsuppressorprotein akkumuliert p53 als Sensor von verschiedenen zellulären Stresssignalen (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Hypoxie, Kanzerogene, Tabakrauch, oxidativer Stress, Onkogen-Aktivierung) in der Zelle, um im Rahmen verschiedener Zellkontroll-Mechanismen seiner Aufgabe als sogenannter „Wächter des Genoms“ gerecht zu werden (Vousden und Lu 2002; Strano et al. 2002; Müller et al. 2005; Levine und Oren 2009; Pflaum et al. 2014; Kunst, C. et al. 2016; Pitolli et al. 2019). In Folge von zellulärem Stress verstärkt oder reduziert p53 die Transkription zahlreicher Zielgene, deren Genprodukte in Signalwegen für die DNA-Reparatur, Apoptose (Puma (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis), Bax (Bcl-2-Associated X-Protein), TRAIL-R2 (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 2), CD95 (Cluster of Differentiation 95)) und Zellzykluskontrolle (p14-3-3 σ , p21, GADD45 α (Growth-Arrest and DNA-Damage Inducible Protein 45 α)) eine wichtige Funktion einnehmen (Müller et al. 1998; Riley et al. 2008; Schilling et al. 2009; Pflaum et al. 2014; Friedel und Loewer 2021).

Die physiologische intrazelluläre p53-Konzentration und auch die p53-Aktivität wird auf niedrigem Niveau gehalten (Momand et al. 1992; Barak et al. 1994; Kussie et al. 1996; Haupt et al. 1997; Rodriguez et al. 2000; Michael und Oren 2003; Moll und Petrenko 2003; Pflaum et al. 2014). Für die Aufrechterhaltung dieses für die Zellproliferation und das Zellüberleben wichtige Equilibrium ist vor allem ein negativer Feedback-Loop-Mechanismus zwischen p53 und der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 (Mouse Double

Minute 2 Homolog) entscheidend. Einerseits führt MDM2 zu einer Ubiquitinierung von p53 und leitet dessen proteasomale Degradation ein. Andererseits ist p53 ein positiver transkriptioneller Regulator von MDM2. Das heißt MDM2 wird verstärkt exprimiert bei gesteigerter p53-Expression. Somit regulieren sich die beiden Proteine gegenseitig auf transkriptioneller bzw. posttranslationaler Ebene (Donehower et al. 1992; Levine 1997; Sethi et al. 2015; Friedel und Loewer 2021).

Umgekehrt kommt es durch Stresssignale zur Hemmung dieser Feedback-Schleife und damit zur Akkumulation von p53 (Perry 2010; Pflaum et al. 2014; Friedel und Loewer 2021). Die Aktivierung des jeweiligen Zielgens erfolgt durch Bildung eines p53-Tetramers und Bindung verschiedener Co-Faktoren, wie z.B. Histonacetyltransferasen, Histondeacetyltransferasen oder TATA-Binding Associated Factors (TAFs), wobei durch gleichzeitige Bindung an eine sogenannte Regulatorische Einheit (RE), deren Gensequenz als 5'-RRRCWWGYYY-3' vorliegt (R=Purin, Y=Pyrimidin, W=Adenin oder Thymin, G=Guanin und C=Cytosin), die Chromatinstruktur entscheidend verändert wird, sodass die Transkription des Zielgens entweder induziert oder inhibiert wird (siehe Abbildung 6) (Riley et al. 2008).

Auch bei der Entstehung des HCC ist diese p53-MDM2-Regulation von großer Bedeutung. In HCC-Zellen wurde ein Ungleichgewicht zwischen p53 und MDM2 beobachtet, durch das die Tumorentstehung begünstigt wird (Meng et al. 2014). An diesem Ungleichgewicht ist wahrscheinlich auch das Tumorsuppressorprotein p14ARF (p14 Alternate Reading Frame) beteiligt, das in Folge von Stresssignalen als Inhibitor von MDM2 agiert und so zur verstärkten Expression von p53 führt (Weber et al. 1999; Pflaum et al. 2014).



HAT = Histonacetyltransferase ; TAF = TATA-bindingprotein-associated factors;
 HDAC = Histondeacetyltransferase; RE = Regulatorische Einheit

Abbildung 6: Transkriptionsabhängiger Antwortmechanismus von p53 auf Stresssignale

adaptiert nach Riley et al. (2008)

p53 spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und Apoptose, sondern auch bei Migrations- und Metastasierungsprozessen. Es kann zum Beispiel die MDM2-vermittelte Verminderung der Slug (=Zinkfingerprotein SNAI2)-Konzentration fördern, wodurch mehr E-Cadherin produziert wird und Zell-Zell-Kontakte verstärkt werden. Dieser Wirkmechanismus kann die sogenannte EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) und damit Zellmigration bzw. Metastasierung verhindern (Muller et al. 2011).

p53 steuert auch transkriptionsunabhängige Signalkaskaden. Es kann z.B. mit Bcl (B-Cell-Lymphoma)-2 oder auch Bcl-X_L Komplexe bilden, die diese negativen Apoptoseregulatoren inhibieren und somit eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran einleiten. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c und

zur Bildung eines sogenannten Apoptosoms. Diese Apoptoseplattform leitet dann den programmierten Zelltod ein (Mihara et al. 2003; Chipuk et al. 2004; Leu et al. 2004; Tomita et al. 2006; Krammer PH et al. 2007; Pflaum et al. 2014).

In den vergangenen Jahren wurden weitere Funktionen von p53 identifiziert, darunter eine Beteiligung bei der Regulation des Metabolismus, der Autophagie, der Immunantwort, der maternalen Reproduktion, der Zelldifferenzierung und Zellmigration (Menendez et al. 2009; Vousden und Prives 2009; Pflaum et al. 2014; Shi et al. 2020; Boutelle und Attardi 2021; Lahalle et al. 2021).

1.2.2 p63 und p73

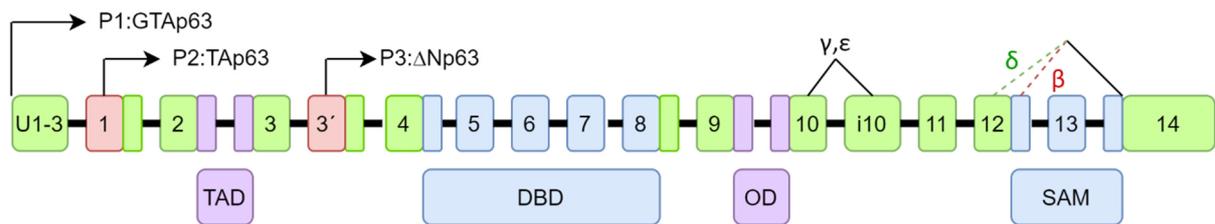
Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit aller Mitglieder der p53-Familie weisen auch p63 und p73 die typischen Domänen TAD, DBD und OD auf, die aber nur zum Teil mit denen von p53 übereinstimmen. Die höchste Sequenzhomologie findet man bei der DBD (63% zwischen p73 und p53 und 60% zwischen p63 und p53), während die OD (jeweils 38% von p63 und p73 zu p53) und TAD (30% zwischen p73 und p53 und 22% zwischen p63 und p53) weniger identische Bereiche aufweisen (Dötsch et al. 2010; Pflaum et al. 2014). Zusätzlich besitzen p63 und p73 eine C-terminale Protein-Protein-interagierende Domäne, die auch als Sterile Alpha Motif (SAM) bezeichnet wird, sowie eine transkriptioninhibierende Domäne (TID) (Dötsch et al. 2010; Allocati et al. 2012). p63 und p73 sind in der Lage, Zielgene von p53 zu regulieren und sind somit an der Regulierung von Apoptose und Zellzyklus beteiligt, können jedoch auch von p53 unabhängige Funktionen ausüben, die im Folgenden näher beschrieben werden (Levrero et al. 2000; Pflaum et al. 2014 González et al. 2017; Melino 2020) .

p63

Struktur von p63

Das humane *p63*-Gen (Lokalisation: 3q27, Chromosom 3) besteht aus rund 270.000 bp, innerhalb derer sich 15 Exons befinden. Das Gen enthält drei verschiedene Promotorsequenzen (P1, P2 und P3), die zu den Isoformen TAp63 (P1), TAp63 (P2)

und N-terminal trunkiertem Δ Np63 (P3) mit den jeweils durch alternatives Spleißen entstehenden Sub-Isoformen α , β , γ , δ und ϵ führen (siehe Abbildung 7) (Candi et al. 2007; Dötsch et al. 2010; Beyer et al. 2011; Amelio et al. 2012). Δ Np63-Isoformen sind in der Lage, sowohl die Transkription der TAp63-regulierten Gene zu hemmen und so die Funktion der TAp63-Isoformen zu steuern als auch eigene Zielgene direkt zu regulieren (Ghioni et al. 2002; Candi et al. 2007; Pflaum et al. 2014).



TAD = Transaktivierungsdomäne; DBD = DNA-bindende Domäne; OD = Oligomerisierungsdomäne;
P = Promotor; SAM = Sterile Alpha Motif

Abbildung 7: Struktur des p63-Gens

adaptiert nach Murray-Zmijewski et al. (2006) und Pflaum et al. (2014)

Funktion von p63

p63 ist ähnlich wie p53 an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt (Fisher et al. 2020; Osterburg et al. 2021). p63 reguliert wie p53 p21 und p57/Kip2 positiv und führt so zu einem Arrest des Zellzyklus in der G₁-Phase. Zudem kontrolliert p63 die Expression zahlreicher Gene und micro-RNAs (RNA=Ribonucleic Acid; miRs), die bei der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen (zum Beispiel DICER1, miR-130b und miR-205). Reguliert wird p63 durch E3-Ligasen wie PIRH2 (p53-Induced RING-H2) und ITCH (Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase) und die RNA-bindenden Proteine RNPC1 (RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 1)), HuR (Human Antigen R) und PCB1 (Polychlorinated Biphenyl 1) (Pflaum et al. 2014).

Neben der Regulation von Zellzyklus und Apoptose sind auch spezielle unabhängige Funktionen von p63 beschrieben: Unter normalen Bedingungen kommt das Protein in verschiedenen Basalzelltypen (Haut, Zervix, Zunge, Ösophagus, Brustdrüse, Prostata und Urothel) vor und zeigt sich vor allem als wichtiges Protein in epithelial-

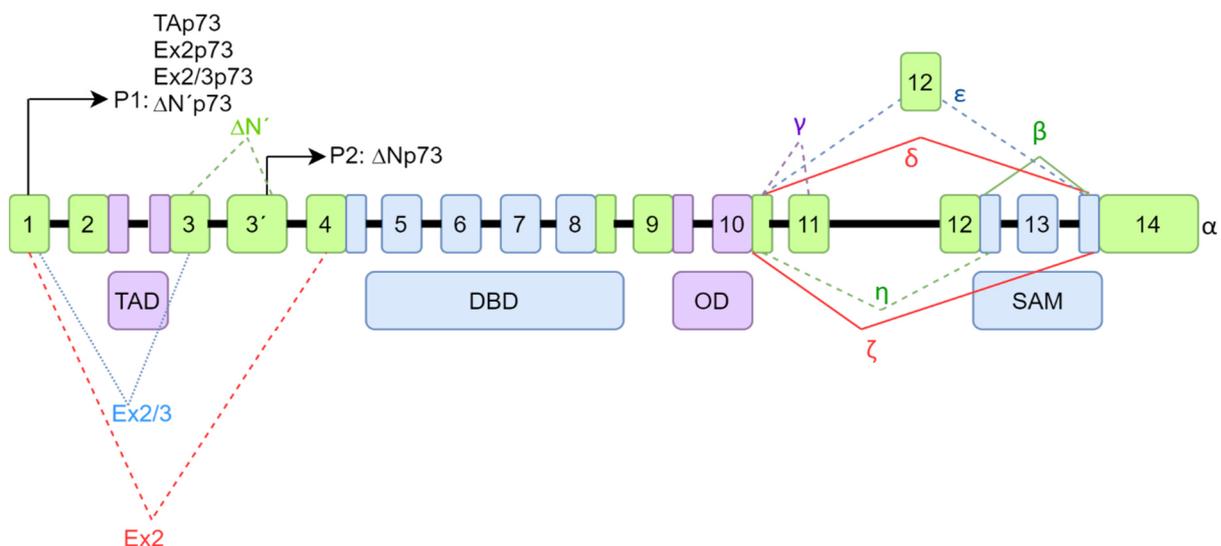
mesenchymalen Wechselwirkungen in der Proliferation und Differenzierung ektodermaler Stammzellen während der Embryogenese. Ergebnisse aus p63-knockout-Mäusen, deren Überlebensdauer sehr kurz war, zeigten, dass fehlendes p63 neben Fehlentwicklungen – betreffend Epidermis, verschiedene Drüsengewebe (unter anderem Brust-, Speichel - und Tränendrüse) und Zähne – auch zu Störungen der Wundheilung und Fehlbildung von Extremitäten führt (Mills et al. 1999; Yang et al. 1999; Rufini et al. 2006). Auch beim Menschen kommt es durch Mutationen im p63-Gen zu ähnlichen phänotypischen Entwicklungsstörungen, die in sechs autosomal-dominant vererbten Syndromen (EEC (Ectrodactyly-Ectodermal-Dysplasia-Cleft)-Syndrom, ADULT (Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth)-Syndrom, AEC (Ankyloblepharon-Ektodermal-Dysplasia-Cleft)-Syndrom, SHFM (Split Hand/Foot Malformation)-Syndrom, LMS (Limb-Mammary)-Syndrom und RH (Ramsay-Hunt)-Syndrom), aber auch in nicht-syndromalen Ausprägungen (zum Beispiel SHFM4 (Split Hand/Foot Malformation 4) und NSCL (Nonsyndromic Cleft Lip)) beschrieben sind (Brunner et al. 2002; Rinne et al. 2007; Tadini et al. 2013).

TAp63 wird in Oozyten produziert und spielt eine entscheidende Rolle während der Meiose durch Induktion des Zelltods von Oozyten nach DNA-Schädigung (Suh et al. 2006). Zudem wird TAp63 zusammen mit p53 und Δ Np73 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Neuronen zugeschrieben (Jacobs et al. 2005; Dötsch et al. 2010). Dass Δ Np63 in odontogenen Zellen von Mausembryonen, aber auch, zusammen mit p73, in normalen und neoplastischen Zellen des Ameloblastoms nachgewiesen werden konnte, deutet darauf hin, dass diese Isoform bei der Zahnentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Kumamoto et al. 2005; Matalova et al. 2008). Anhand von Untersuchungen in knockout-Mäusen zeigte sich, dass neben p63 auch PAX9 (Paired Box Gene 9), MSX1 (Msh Homeobox 1), PITX2 (Pituitary Homeobox 2), GLI2/3 (GLI Family Zinc Finger 2/3), LEF1 (Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1), DLX1/2 (Distal-Less Homeobox 1), Activin β und TGF α (Transforming Growth Factor α) zum Fehlen eines oder mehrerer Zähne (Hypodontie) führen, da bei Fehlen des jeweiligen Proteins die Zahnentwicklung schon im Knospenstadium gestoppt war (Matalova et al. 2008). Zudem scheint p63 auch an der Entstehung des Adenomatoiden Odontogenen Tumors (AOT) beteiligt zu sein (Sempere et al. 2006).

p73

Struktur von p73

Das auf Chromosom 4 und 1p36.3 lokalisierte *p73*-Gen enthält in 80.000 bp ebenfalls 15 Exons, zudem noch zwei Promotorabschnitte (P1 und P2), die zu fünf verschiedenen p73-Isoformen führen (P1: TAp73, Ex2p73, Ex2/3p73, $\Delta N'$ p73; P2: ΔN p73). Wie in Abbildung 8 zu sehen, können durch alternatives Spleißen am C-terminalen Ende sieben Isoformen (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η) gebildet werden, wobei insgesamt 14 Isoformen von p73 beschrieben sind (Murray-Zmijewski et al. 2006; Pflaum et al. 2014; Melino 2020).



TAD = Transaktivierungsdomäne; DBD = DNA-bindende Domäne; OD = Oligomerisierungsdomäne;
P = Promotor; SAM = Sterile Alpha Motif

Abbildung 8: Struktur des *p73*-Gens

adaptiert nach Pflaum et al. (2014)

Funktion von p73

Um den Erhalt der Zellintegrität zu sichern, sorgt p73 durch Interaktion mit p21 und p57/Kip2, sowie mit CDC25 B (Cell Division Cycle 25; M-phase Inducer Phosphatase

2) und C (M-phase Inducer Phosphatase 3), Cyclin B1 und B2 und FLASH (FLICE-Associated Huge Protein) für einen Abbruch der Zellteilung in der G₁-, G₂/M- bzw. S-Phase (Pflaum et al. 2014). Außerdem wird p73 auch die Beteiligung an der Kontrolle von Mitosevorgängen zugeschrieben. In TAp73–negativen Oozyten wurde eine verminderte Funktionstüchtigkeit von BUB1 (Budding Uninhibited by Benzimidazole 1) festgestellt, wodurch die Anheftung von BUBR1 (Budding Uninhibited by Benzimidazole-related 1) an das Kinetochor während der Kernteilung gestört war (Niikura et al. 2007; Tomasini et al. 2009).

Obgleich das p73-Gen in weniger als 1% der Malignome mutiert ist, spielt die Überexpression von p73 für die maligne Transformation eine wichtige Rolle. Experimente mit knockout-Mäusen ergaben, dass das Fehlen von p73 ein erhöhtes Risiko für eine Tumorentstehung darstellt (Flores et al. 2005; Tomasini et al. 2008; Pflaum et al. 2014; Melino 2020).

Eine spezielle Funktion übernimmt p73 in der Entwicklung und Differenzierung neuronaler Zellen sowie in der Infektabwehr. p73-knockout-Mäuse zeigen neben einer Fehlentwicklung des Hippocampus und der Entwicklung eines Hydrocephalus eine erhöhte Infektionsanfälligkeit aufgrund eines beeinträchtigten Immunsystems (Dötsch et al. 2010). Verantwortlich für diese Dysfunktionen und Dysgenesen ist das Fehlen der NGF (Nerve Growth Factor)-induzierten Isoform Δ Np73, die zusammen mit p53 und TAp63 einen Regelkreis bildet, der den kontrollierten Zelltod von Neuronen steuert (Pozniak et al. 2000; Jacobs et al. 2005; Dötsch et al. 2010).

Da das Fehlen von p73 bei weiblichen und männlichen p73-knockout-Mäusen zu Infertilität führt, hat sich gezeigt, dass p73, insbesondere TAp73, an der Keimzellentwicklung beteiligt ist (Tomasini et al. 2008).

1.2.3 Interaktion zwischen p53, p63 und p73

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Homologie aller Mitglieder der p53-Familie geht man davon aus, dass p53 nicht singulär an der Wahrung der Zellintegrität beteiligt ist, sondern vielmehr ein Wechselwirken zwischen p53, p63 und p73 innerhalb eines Netzwerkes stattfindet (Müller et al. 2006).

Tatsächlich zeigen Experimente mit p63-p73-knockout-Mäusen, dass p53 in Abwesenheit von p63 und p73 die Transkription seiner Zielgene BAX, NOXA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1) und PERP (p53 Apoptosis Effector Related to PMP-22) nicht induziert und deuten damit darauf hin, dass p53 für die Ausübung seiner Funktion auf seine „Familienmitglieder“ angewiesen ist (Murray-Zmijewski et al. 2006).

Ein komplexes Netzwerk ergibt sich nicht nur aus der Steuerung gemeinsamer Zielgene aller Mitglieder der p53-Familie, sondern zusätzlich auch aus der gegenseitigen Beeinflussung von p53, p63 und p73 und ihrer Isoformen. So können zum Beispiel p53 und TAp73 an den P2-Promoter des p73-Gens binden und so die Expression von $\Delta Np73$ induzieren (Murray-Zmijewski et al. 2006). Laut Müller et al. sind die Isoformen mit funktioneller TA-Domäne für die Transkription der gemeinsamen Zielgene verantwortlich, während die N-terminal trunkierten ΔN -Isoformen die Transkription der nicht trunkierten Formen von p53, p63 und p73 blockieren und diese so in ihrer Funktion z. B. als Apoptosemediatoren antagonisieren (Müller et al. 2006).

Wie in 1.2.2 bereits erwähnt, sind auch während der neuronalen Zellentwicklung Wechselwirkungen zwischen p53, TAp63 und $\Delta Np73$ bekannt (Dötsch et al. 2010).

1.3 Das Alpha-Fetoprotein (AFP)

1.3.1 Struktur und Regulation

Das *AFP*-Gen (4q13.3) besteht aus ca. 20.000 bp; es ist in 14 Introns und 15 Exons aufgeteilt, von denen das erste und das letzte nicht transkribiert werden (Lazarevich 2000). Das humane *AFP*-Gen ist dem der Maus und Ratte in struktureller Hinsicht homolog. Die Gene unterscheiden sich nur in der Sequenz zweier Nukleotide, was jedoch auf die Aminosäuresequenz des AFPs und seine Funktion keine Auswirkung hat, sowie in der Länge zweier Exons (Exon 3 und 15) (Sakai et al. 1985; Lazarevich 2000). Am 5'-Ende des Maus-*AFP*-Gens befinden sich innerhalb eines ca. 7 kbp langen *cis*-regulatorischen Fragments ein ca. 250bp langer Promotor und drei gewebsspezifische Enhancer-Regionen (-2,5kbp; -5kbp; -6,5kbp), sowie eine Repressor-Domäne (ca. -850kbp) (Spear 1994; Lee et al. 1999; Lazarevich 2000).

Regulatoren, die auf Promotorbasis die Transkription des Maus-*AFP*-Gens beeinflussen, sind HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) 1 und 3, C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein), Nkx2.8, FTF (Fetoprotein Transcription Factor) und NF1 (Neurofibromin 1) (Schohy et al. 2000; Gabant et al. 2002; Peterson et al. 2011). Auch die Zinkfingerproteine Zbtb20 und Zhx2 sowie miR-122 konnten mit der Regulation des *AFP*-Gens in Verbindung gebracht werden (Kojima et al. 2011; Galle et al. 2019).

Für das humane *AFP*-Gen wurde ein ähnliches regulatorisches Muster beschrieben. Wie in Abbildung 9 dargestellt, befinden sich vor einem ca. 200bp langen Promotor zwei Silencer-Regionen bei -402 bis -169bp (S1) und -1822 bis -951bp (S2), wobei der distale Silencer zu dominieren scheint (Lazarevich 2000).

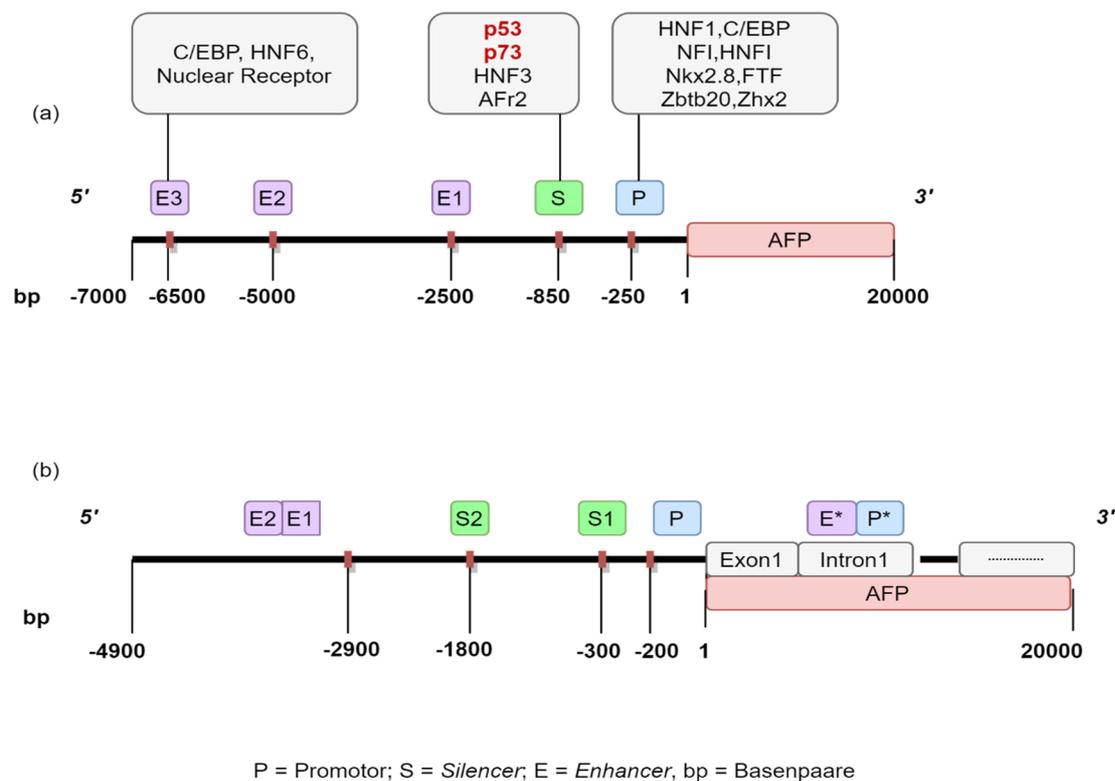


Abbildung 9:Strukturdarstellung des murinen (a) und humanen (b) *AFP*-Gens

(a) Struktur und trans-regulatorische Bindungsstellen des Maus-*AFP*-Gens

adaptiert nach Peterson et al (2011);

(b) Schematisierte Struktur und regulatorische Elemente im humanen *AFP*-Gen

adaptiert nach Lazarevich (2000); Schohy et al. (2000); Ninomiya et al. (2002); Nakabayashi et al. (1991)

Des Weiteren sind in der *upstream*-Sequenz zusätzlich zwei Enhancer-Sequenzen bei -4 bis -3.7kbp und -3.7 bis -3.3kbp vorhanden (Ninomiya et al. 2002). In Intron 1 wurde neben einem alternativen Promotor auch eine CAAC-reiche Enhancer-Region identifiziert, an der die beiden Zinkfingerproteine BKLF (Basic Krüppel-Like-Factor; positive Regulierung) und YY1 (negative Regulierung) binden und so an der Regulation der AFP-Expression beteiligt sind (Schohy et al. 2000).

p53 ist ein Inhibitor der *AFP*-Transkription. p53 bindet direkt an die Repressordomäne des *AFP*-Gens (Lee et al. 1999; Ogden et al. 2001). Sowohl P300-induzierte als auch stressbedingte Expression von p53 resultieren in verminderten AFP-Spiegeln, während Mutationen in der DNA-bindenden Domäne von p53 oder der *AFP*-Repressor-Domäne zum Verlust dieses Inhibitionsprozesses führen (Lee et al. 1999). p73 ist ebenfalls ein Repressor der *AFP*-Expression – genau wie p53. Beide Proteine bewirken eine Reduzierung an Lysin-acetylierten und eine Vermehrung an Lysin-dimethylierten H3-Histonen, wobei durch die daraus resultierende Chromatinkondensation an der *AFP*-Promotorsequenz (Repressor-Domäne) die Zugänglichkeit der DNA eingeschränkt und somit die Transkription verhindert wird (siehe Abbildung 10) (Cui et al. 2005).

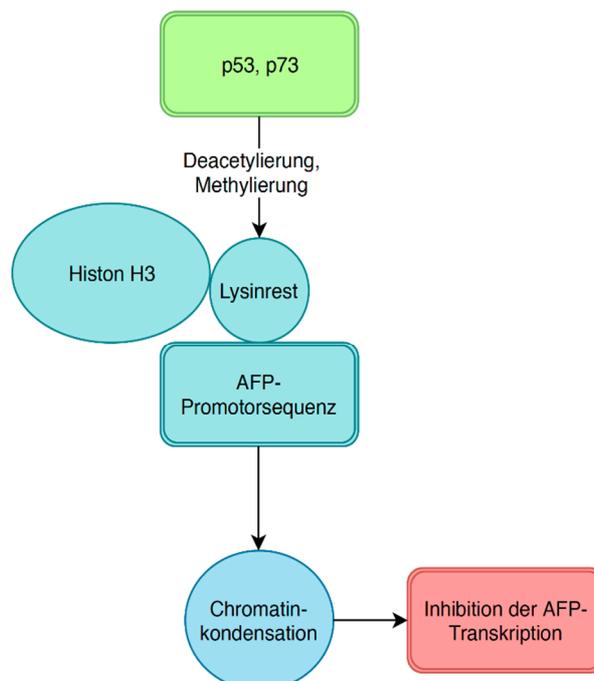


Abbildung 10: Repression der *AFP*-Expression durch p53 und p73

Bei der Transkription des *AFP*-Gens können unterschiedlich lange mRNA-Formen gebildet werden, wobei im fetalen Serum vorwiegend die 2,1kbp lange mRNA auftritt (resultierend in einem 68-70kDa schweren Protein, abhängig von der Glykosilierung), bei Erwachsenen aber hauptsächlich kürzere Varianten nachgewiesen wurden (Lazarevich 2000).

Im humanen Glykoprotein liegt der Kohlenhydratanteil bei 3-5% und die aus 590 Aminosäuren bestehende Polypeptidkette bildet in ihrer dreidimensionalen Struktur drei über Disulfidbrücken charakterisierte Domänen (Morinaga et al. 1983).

Wie Mizejewski zeigte, ist vor allem die dritte carboxyterminale Domäne von AFP an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt. In diesem Abschnitt der AFP-Polypeptidkette sind Aminosäuresequenzen vorhanden, die zugehörige Scavenger-Rezeptoren (SR) binden können. Dazu sind CD36, CD163, Stabilin, SSC5D (Soluble Scavenger Receptor Cysteine-rich domain-containing Protein SSC5D), SRB1 (Scavenger Receptor B1) und SREC (Scavenger Receptor Expressed By Endothelial Cells), sowie der SR-assozierte Mannose-Rezeptor, LDL-Rezeptor, der Asialoglykoprotein-Rezeptor und der RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products)-Rezeptor zu zählen. Zusätzlich wurden Scavenger-Rezeptor-Sequenzen im Bereich des Growth Inhibitory Peptid (GIP)-Segments identifiziert, welches aus 34 Aminosäuren der dritten Proteindomäne des AFP (Aminosäuresequenz 447-480 des AFP) besteht (Eisele 2000; Mizejewski 2007).

1.3.2 Funktion von AFP

AFP entstammt einer Genfamilie, zu der außer dem Serumprotein noch Albumin, Alpha-Albumin und Vitamin D-bindendes Protein zählen (Sakai et al. 1985; Scohy et al. 2000; Gabant et al. 2002). Bei Erwachsenen unterliegt *AFP* einem postnatalen Expressionsstopp und ist somit physiologisch nur in geringer Konzentration vorhanden, während es im humanen embryonalen Leber- und Dottersackgewebe stark exprimiert wird (Ingram et al. 1981; Harper und Dugaiczky 1983; Galle et al. 2019). Ausnahmen bilden hierbei bestimmte Erkrankungen, wozu neben dem HCC und Keimzelltumoren noch die Tyrosinämie und das Teleangiektasie-Ataxie-Syndrom gehören, bei denen die Konzentration an AFP erhöht ist (Harper und Dugaiczky 1983; Wilkinson D.S. 2008; Abdel-Aziz et al. 2016; Pedrazzoli et al. 2021).

Die Tatsache, dass AFP in Leberzellen und im Dottersack während der Embryogenese produziert wird, legt nahe, dass es für die fetale Entwicklung von entscheidender Bedeutung ist. Bei weiblichen Mäusen führte der knockout von *AFP* zu Störungen des Hypophysen/Hypothalamus-Systems und damit zur Infertilität (MacLusky und Naftolin 1981; Gabant et al. 2002).

Die strukturelle Homologie von 39% mit Albumin und die Fähigkeit zahlreiche andere Bindungen mit Steroiden, Fettsäuren, Bilirubin, Kupfer, Nickel und pharmakologischen Substanzen eingehen zu können, deutet darauf hin, dass AFP ein wichtiger Faktor für biologische Transportprozesse ist (Morinaga et al. 1983; Gillespie und Uversky 2000; Gabant et al. 2002; uniprot AFP, 2018).

Zusätzlich geben erhöhte AFP-Werte auch Hinweis auf andere chronische Lebererkrankungen (Di Bisceglie, Adrian M et al. 2005; Looijenga, Leendert H J 2009; Nogales et al. 2012; Rich und Singal 2014). Auf Grund der geringen Spezifität wird in neueren europäischen und amerikanischen Studien, im Gegensatz zu Studien aus Japan und Asien, die serologische Bestimmung des AFP-Spiegels nicht mehr zum Screening des HCC empfohlen (EASL Clinical Practice Guidelines 2018; Lersritwimanmaen und Nimanong 2018). Im Zusammenhang mit der Hepatokarzinogenese wird auch eine Beeinflussung des Immunsystems bei HCC-Patienten beschrieben, wobei sich die erhöhte AFP-Konzentration auf die Funktion der dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen und folglich auf die zelluläre Immunantwort durch B- und T-Lymphozyten negativ auswirkt (Alisa et al. 2005; Setiyono et al. 2011; Wang et al. 2018). Neuere Studien belegen, dass AFP tumorfördernde Eigenschaften besitzt. AFP kann zu einer Deregulation der Immunantwort führen, indem es inhibitorisch auf Antigen-präsentierende Zellen (APC) wirkt und damit das adaptive Immunsystem herunterreguliert (Alisa et al. 2005; Setiyono et al. 2011; Wang et al. 2018). Die Tatsache, dass der AFP-Spiegel im HCC häufig erhöht ist, ist ein möglicher Angriffspunkt in der Immuntherapie. Ziel ist dabei eine Immunantwort gegen AFP zu induzieren, um so eine Immunantwort gegen AFP-positive Tumore einzuleiten. Es wurde bereits gezeigt, dass CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen bestimmte Epitope des AFP-Antigens erkennen und anschließend die Produktion von TNF (Tumor Necrosis Factor) und IFN (Interferon)- γ zur Bekämpfung von HCC-Zellen steigern können. Versuche zur Immunisierung gegen AFP in murinen Tumormodellen verliefen positiv (Butterfield et al. 2001; Hiroishi et al. 2010; Wang et al. 2018).

Nicht zuletzt lässt die Expression von *AFP* während der G₁- und S-Phase im Zellzyklus einen engen Zusammenhang mit den p53-Proteinen in Bezug auf die Regulation von Zellteilungsprozessen vermuten (Gabant et al. 2002; Cui et al. 2005). AFP reguliert auch die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren. Dabei kann AFP seine Struktur in eine wachstumshemmende Variante, das tAFP („transformed AFP“), ändern, die auch das 34-Aminosäuren lange GIP (Growth Inhibitory Peptid) enthält. GIP ist in unterschiedliche zelluläre Prozesse involviert, wobei es die Entstehung eines Malignoms und dessen Metastasierung verhindert, indem es das Zellwachstum und die Tumorzell-Adhäsion an Matrix-Proteine inhibiert (Muehleemann et al. 2005; Mizejewski 2007, 2011).

1.4 AFP als Bestandteil einer p53-Familien-Zielgensignatur mit prognostischer Relevanz für Patienten mit HCC

Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, die Funktion der p53-Familie in der Hepatokarzinogenese, im Therapieansprechen und in der Prognose des HCC zu verstehen.

In Vorarbeiten haben wir mittels Microarray-Technik Zielgenexpressionsprofile der p53-Familie in Hep3B-Zellen erstellt. Dazu wurden Hep3B-Zellen mit adenoviralen Konstrukten der p53 Familienmitglieder transduziert. Diese Gen-Promotor-Konstrukte kodierten für die einzelnen p53-Familienmitglieder (Abbildung 11). p53/p63/p73-vermittelte Veränderungen der Genexpression wurden mittels Microarrays analysiert. Die prognostische Relevanz der hierbei aus den *in vitro* Daten gewonnen Zielgensignaturen wurde mittels eines integrativen Ansatzes unter Einbezug eines externen humanen *in vivo* Expressionsdatensatzes von 139 HCC-Patienten nachgewiesen. Neben Zielgensignaturen der einzelnen p53-Familienmitglieder im HCC wurden gemeinsame 78- und 28-Zielgensignaturen der p53-Familie im HCC identifiziert. Besonders hervorzuheben ist, dass AFP ein Bestandteil sowohl der prognostisch relevanten gemeinsamen 78- wie auch der 28-Zielgensignatur ist.

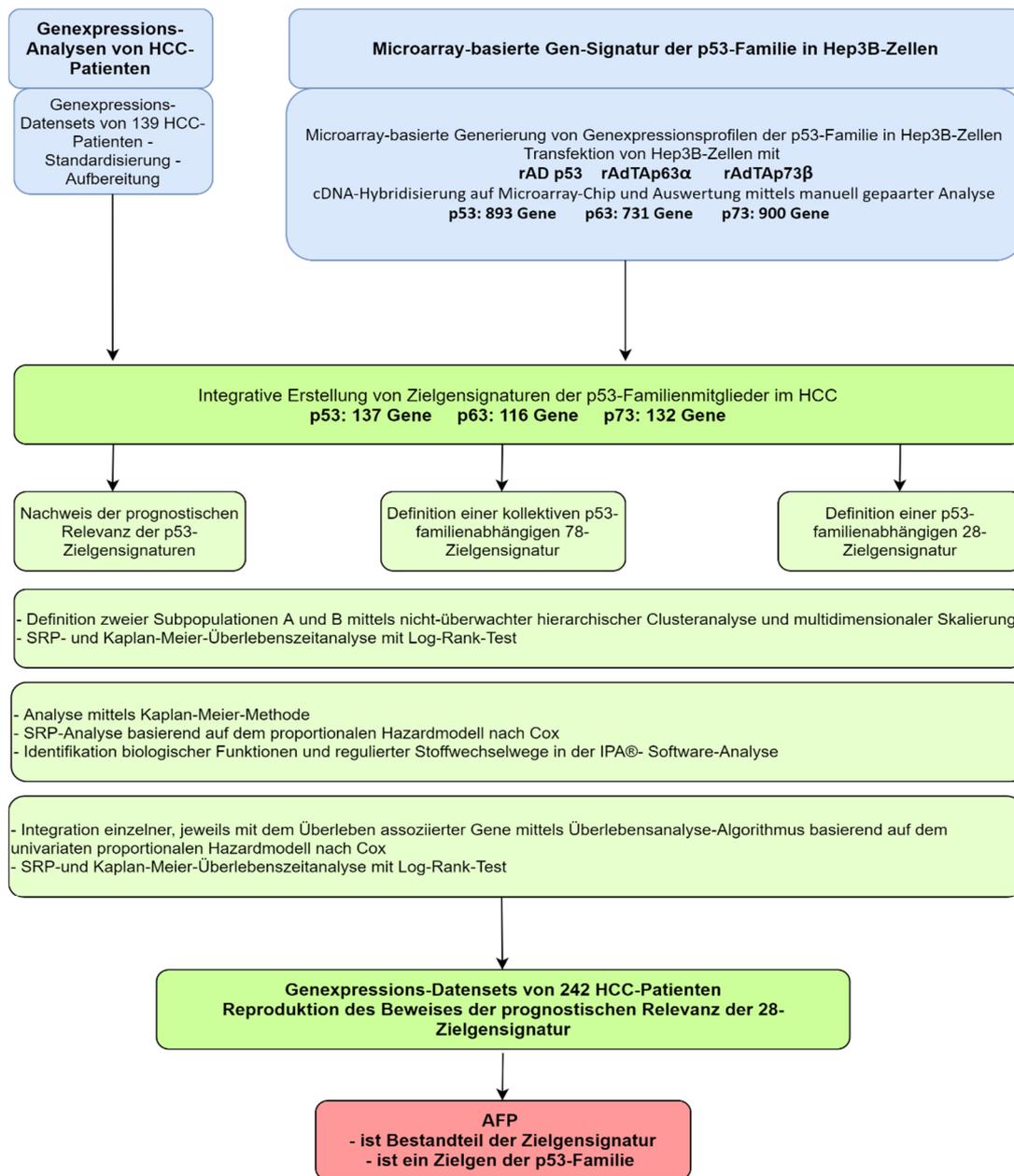


Abbildung 11: Schematische Darstellung der erarbeiteten Zielgenexpressionsprofile mittels Microarray-Technik

AFP ist ein potenzielles Zielgen der p53-Familie mit prognostischer Relevanz im HCC

adaptiert nach Kerkeni, SS (2013) und Pelc, A. (2015)

1.5 Zielsetzung

Die Entwicklung neuer und effektiverer HCC-Therapieansätze liegt in einer stringenten Definition verschiedener HCC-Subtypen und der Entwicklung hochspezifischer und individualisierter therapeutischer Ansätze. Ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen pathogenetischer Prozesse im HCC ist dabei unerlässlich (Jindal et al. 2019). Wie von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, haben alle p53-Familienmitglieder aufgrund ihrer Beteiligung an Signalwegen, die DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest und Zelltod steuern, einen entscheidenden Einfluss auf die Therapiesensitivität und Prognose des HCC (Gressner et al. 2005; Müller et al. 2005; Müller et al. 2006; Mundt et al. 2010; Schuster et al. 2010; Seitz et al. 2010). Wir haben über einen integrativen und komparativen Ansatz aus Whole-Genome-Array-Analysen und HCC-Patientendatensets eine 28 Gene umfassende prognostisch relevante HCC-Zielgensignatur der p53-Familie identifiziert (Pelc A. 2015). Für 7 dieser 28 Gene, unter denen sich *AFP* befindet, konnte im Rahmen einer weiteren Arbeit die Regulation auf qPCR-Ebene bestätigt werden (Kerkeni, SS. 2013).

Es wurde bisher gezeigt, dass p53 und p73 Repressoren der *AFP*-Expression sind (Lee et al. 1999; Cui et al. 2005). Nicht untersucht ist bisher, inwieweit andere p53-Familienmitglieder in die Regulation der *AFP*-Expression involviert sind. Daher wurde in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die p53 Familienmitglieder p63 und $\Delta Np73$ und deren Rolle in der Regulation des *AFP*-Gens untersucht. Aus dem Verständnis der Regulationsmechanismen von *AFP* ergeben sich potentielle innovative Ansätze zur Entwicklung von neuen Therapieoptionen für Patienten mit HCC.

Folgende Fragestellungen sollten deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden:

1. Welche Effekte haben die p53-Familienmitglieder p53, p63 und p73 auf die Transkription und die Synthese von *AFP*?
2. Wie reguliert die dominant-negative Isoform $\Delta Np73$ die *AFP*-Transkription im Vergleich zu ihrer TA-Isoform?
3. Können durch Verifizierung bekannter und Identifizierung neuer potentieller Bindungsstellen im *AFP*-Gen Rückschlüsse auf Regulationsmechanismen durch die p53-Familie gezogen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Biofuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CO ₂ Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Elektrophorese	Hoefer Inc., Holliston
Probengefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Tubes	Corning Inc., New York, USA
Laminar-Flow-Werkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
LightCycler® 480 Real-time PCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH + Co. KG, Staufen
Mikroskop CK 2	Olympus GmbH, Hamburg
Mikroskop Typ 71071	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar
Multiwellplatte PCR	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NanoPhotometer	Implen GmbH, München
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg und Gilson, Inc., Middelton, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Schlauchpumpensystem	Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim
Schüttler	Biometra GmbH, Göttingen
Sterile Pipettenspitzen	Corning Inc., New York, USA

Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Thermo Scientific Centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermo Scientific Megafuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Western Blot-System	Hoefer Inc., Holliston, USA
Zellschaber	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Zellkultur Multiwell Platten 6 Well	Corning Inc., New York, USA
Zellkulturflasche	Corning Inc., New York, USA

2.1.2 Software

Ensembl	https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000081051;r=4:73431138-73456174 (Abgefragt am: 18.02.2021)
Excel	Microsoft Corporation
Diagrams.net (Draw.io)	https://app.diagrams.net/ (Abgefragt am 26.01.2021)
Imagej 1	Java
Image Lab™ Software 6.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Jaspar	http://jaspar2016.genereg.net/ (Abgefragt am: 18.02.2021)
LightCycler® 480 Software 1.5.0 SP4	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SoftMax® Pro ELISA, Software 4.3	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Transfac	http://www.gene-regulation.com/ (Abgefragt am 18.02.2021)

2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien

Millipore-H ₂ O	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamidmix (30%)	National Diagnostics, Atlanta, USA
0,8 % Bis-Acrylamid	National Diagnostics, Atlanta, USA
Ammoniumpersulfat (10%)	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
Butanol (H ₂ O-gesättigt)	Merck KGaA, Darmstadt
Blockierlösung (PBS mit Tween, Milchpulver 5%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ECL-Mix (Luminol und p-Cumarinsäure)	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
Gentamycin	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
H ₂ O ₂	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
Lipofectamine® (LTX und PLUS™-Reagent)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe SIGMA®-ALDRICH, St. Louis, USA
Laemmli-Puffer	SIGMA®-ALDRICH, St. Louis, USA
MEM Eagle Kulturmedium	SIGMA®-ALDRICH Missouri, USA
Opti-MEM® Kulturmedium	Gibco® Life Technologies, Carlsbad, USA
PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Merck KGaA, Darmstadt; SIGMA®-ALDRICH Missouri, USA
QuantiTect®Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RLT-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Minikit	QIAGEN GmbH, Hilden
RIPA-Puffer	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
SYBR®-Green	QIAGEN GmbH, Hilden

SDS (10%)	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
SDS-Puffer	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
TBST-Puffer (TBS und Tween 20)	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA
TEMED	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-Puffer (1,5M; 1M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete, Phosphostop	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Antikörper

anti-AFP monoclonal (mouse)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
anti-p53 monoclonal (mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; sc-126
anti-p63 polyclonal (rabbit)	abcam® plc., Cambridge, UK; ab179874
anti-p73 polyclonal (rabbit)	abcam® plc., Cambridge, UK; ab40648
anti-mouse IgG peroxidase polyclonal	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA; A9044
anti-rabbit IgG peroxidase polyclonal	SIGMA®-ALDRICH, Missouri, USA; A0545-1ML
β-Aktin pox	SIGMA®ALDRICH, Missouri, USA; A3854

Primer (QuantiTect® Primer Assays, QIAGEN GmbH, Hilden)

GAPDH (QT00079247), AFP (QT00085183), GFP (QT01079589)

2.1.4 Zelllinien

Hep3B-Hepatokarzinomzelllinie

Hep3B Zellen (Aden et al. 1979) wurden bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. Die Zellen sind p53-negativ (Cui et al. 2005), exprimieren jedoch p63, p73 und ΔNp73 (Petitjean et al. 2005). Kawai et al. zeigten, dass es sich bei Hep3B

um eine von fünf AFP-produzierenden Leberkarzinomzelllinien handelt (Kawai et al. 2001).

2.1.5 Plasmide

Zur Expression von p53 Familienmitgliedern wurden folgende Plasmide verwendet:

pcDNA TAp53

pcDNA TAp63

pcDNA TAp73

pcDNA Δ Np73

sowie ein pcDNA-Kontrollvektor mit Grün Fluoreszierendem Protein (GFP).

2.2 Methoden

2.2.1 Hep3B-Zellkultur

Die Hep3B-Zellen wurden bei 37°C und 5%iger CO₂-Konzentration in MEM (Minimum Essential Medium) Zellkulturmedium mit 10% FCS (Fötale Kälberserum) in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert.

Hierbei wurden die Zellen nach Verwerfen des Mediums einmal mit 10ml PBS (Phosphate-Buffered Saline) gewaschen. Anschließend wurden 5ml Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden zugeführt und unmittelbar danach wieder abgenommen (5ml 10-fach Konzentrat Trypsin-EDTA wurde zuvor mit 45ml PBS verdünnt). Daraufhin wurden die Zellen in MEM-Medium (10% FCS) resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

Zur Verwendung in den folgenden Versuchsansätzen wurde die Zellzahl bestimmt (rund 0,7x10⁶/ml) und die Zellen dann auf 6-Well Platten ausgesät.

2.2.2 Plasmid-Transfektion

Zur Expression einzelner Mitglieder der p53-Familie in Hep3B-Zellen wurden die auf 6-Well-Platten ausgesäten Zellen mit den jeweiligen Plasmiden, die das gewünschte Gen enthalten, transfiziert. Als Kontrolle wurde ein Referenzvektor, der ein *GFP*-Gen enthält, verwendet. Im Hinblick darauf, dass die verschiedenen Isoformen der p53-Familienmitglieder sich gegenseitig beeinflussen könnten, wurden die Zellen einzeln mit p53-, p63-, p73-, und Δ Np73-Plasmiden (pcDNA TAp53, pcDNA TAp63, pcDNA TAp73, und pcDNA Δ Np73) und dem Kontrollplasmid (pcDNA GFP) transfiziert.

Für die Transfektion wurde Lipofectamine (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet, das aus den zwei Reagenzien LTX und PLUS™-Reagent besteht. Die Transfektion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt:

432 μ l LTX und 10,8ml Opti-MEM-Zellkulturmedium wurden vorgelegt. Für den DNA-Komplex-Ansatz wurden 45 μ l PLUS™-Reagent und 45 μ l DNA-Probe in 2,1ml Opti-MEM verdünnt. Dann wurden 1,8ml des LTX-Ansatzes zum DNA-Komplex gegeben und für fünf Minuten inkubiert. Nach fünf Minuten wurden 200 μ l der LTX-DNA-Suspension zu den Zellen gegeben. Die Zellernte erfolgte in der Folge nach 24, 48 und 72 Stunden (einmalig auch nach 96 Stunden).

2.2.3 Zellernte und Protein-Isolation

Die transfizierten Hep3B-Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden für weitere Versuche geerntet. Der Medium-Überstand wurde gesammelt und die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgelöst. Durch Spülen mit ca. 1ml PBS wurden nun die restlichen Zellen gesammelt und zum Medium-Überstand gegeben. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 U/min und 21°C für fünf Minuten und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 900 μ l PBS gelöst, von dem in der Folge 600 μ l für Protein-Analysen sowie 300 μ l für RNA-Analysen verwendet wurden. Die Zellpellets wurden im Anschluss für die Zellyse und die Protein-Isolation in 80–100 μ l RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay)-Puffer (mit Zusatz von Phosphostop und Complete) aufgenommen und 60 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 60 Minuten bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die

isolierten Proteine für die späteren Western-Blots befanden, wurde in neue Proben-Reaktionsgefäße gegeben und diese bei -20°C gelagert.

Analog wurden die Pellets für die spätere RNA-Isolation in 300–330µl RLT-Puffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 RNA-Isolation und cDNA-Herstellung für qPCR

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben

cDNA-Synthese

Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Aus den zuvor bestimmten RNA-Konzentrationen wurde das Probenvolumen berechnet, das 1µg RNA entsprach und für die cDNA-Synthese benötigt wurde. Danach folgte die Degradation der genomischen DNA, gefolgt von der eigentlichen reversen Transkription. Die Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR (Real-time-quantitative-Polymerase-chain-reaction, qPCR)

In der qPCR werden Nukleinsäuren amplifiziert und zusätzlich quantitativ durch Fluoreszenz (meist mit SYBR-green) analysiert, wobei sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge an PCR-Produkten verhält (Law et al. 2014). Bei den Primern handelt es sich um validierte QuantiTect® Primer (Qiagen, siehe 2.1.3). Dabei wurden die qPCR-Messungen mit dem Referenzgen (Housekeeping-Gen) *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase) verglichen und an dessen Expressionsmuster angepasst (Normierung).

Zuerst wurden die vorgefertigten Doppel-Primer (QuantiTect® Primer Assays, QIAGEN GmbH) in 1,1ml TE-Puffer (Tris und EDTA) gelöst und anschließend ein

Primer-Mix nach Anleitung des Herstellers verwendet: In vorbeschriftete Reaktionsgefäße wurden 110µl Primer, 550µl SYBR®-Green und 330µl RNase-freies Wasser gegeben. Es wurden auf 384-Well-Platten pro Well 9µl des Primer-Mixes und 1µl der cDNA-Probe eingesetzt (alle Proben in Doppelbestimmung) und anschließend im LightCycler®-Gerät mit entsprechender Software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ausgewertet. Die resultierenden Rohdaten wurden anschließend in Microsoft Excel importiert und gemittelt (Doppel- und Tripletbestimmung). Die Daten wurden mit Hilfe der „delta-delta-Ct-Methode“ ($\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode) ausgewertet, wobei die konstitutive Expression des housekeeping-Gens (hier GAPDH) als Referenz verwendet und so eine Normalisierung der Expressionsunterschiede erreicht wurde (Pfaffl 2004).

Cp (= englisch: Crossing point) oder Ct (= Cycle threshold) steht für den Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal eine bestimmte Schwelle erreicht, beziehungsweise ein konstantes Fluoreszenzniveau gemessen wird (Pfaffl 2004; Rao et al. 2013).

2.2.6 Western Blot

BCA-Protein-Assay

Zunächst wurde die Proteinkonzentration mittels BCA (Bicinchoninic Acid)-Test analysiert. Hierzu wurde zuerst eine Standardreihe angesetzt, die sich aus BSA-Stammlösung (2000µg/ml) und RIPA-Puffer zusammensetzte und bis zu 200µg/ml verdünnt wurde. 10µl der Standardverdünnung bzw. 10µl der jeweiligen Proteinlysate mit der entsprechenden Proteinmenge und 200µl Working Reagent, das aus Bicinchoninic Acid und Kupfer-II-Sulfat bestand, wurden eingesetzt; wobei als Negativkontrolle 10µl RIPA dienen. Alle Proteinproben wurden doppelt bestimmt. Anschließend wurde die Platte 30 Sekunden lang vorsichtig geschüttelt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung im ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-Photometer bei 560nm und die Auswertung mit der zugehörigen Softmax-Software.

Western Blot

Hierbei werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in der Gel-Elektrophorese (hier: SDS-PAGE, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt und dann auf eine Membran übertragen. Hierzu wurde ein 12%-iges SDS-Polacrylamidgel genutzt. Die Proteinproben wurden in Laemmli-Puffer fünf Minuten bei 95°C aufgekocht. Durch die Erhitzung kam es zur Denaturierung der Proteine. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen und bei 25mA pro Gel für 60 Minuten aufgetrennt (Mahmood und Yang 2012).

Nach der Elektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Membran. Die Dauer des Transfers betrug 50 Minuten bei 80mA pro Gel. Im Anschluss wurde die Membran, um nicht-spezifische Protein-Bindungsstellen zu blockieren, für 60 Minuten in eine Blockierlösung (PBS) mit 0,05% Tween und Milchpulver) gelegt und danach der jeweilige Erst-Antikörper über Nacht im Kühlraum inkubiert (anti-p63 (mouse; 1:500), anti-p73 (rabbit; 1:600), anti-p53 (mouse; 1:500), anti-AFP (mouse; 1:100)). Die Membran wurde dann dreimal je 5 Minuten mit TBST (Tris-buffered Saline with Tween20)-Puffer gewaschen, anschließend folgte die Zugabe und 60-minütige Inkubation des Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörpers, der, dem Erst-Antikörper entsprechend, von der Maus (α -mouse-pox) oder vom Kaninchen (α -rabbit-pox) stammte und in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt wurde. Danach wurde der Blot mit ECL (Enhanced Chemiluminescence) entwickelt und mit der ImageJ-Software quantifiziert.

2.2.7 Bindungsstellenanalyse des humanen *AFP*-Gens

Um bereits beschriebene Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen am humanen *AFP*-Gen für p53-Proteine zu bestätigen (Lazarevich 2000), aber auch um mögliche weitere putative Bindungsstellen zu identifizieren, wurde mit Hilfe von *Transfac*® und *Jaspar* eine Bindungsstellenanalyse für die Mitglieder der p53-Familie im humanen *AFP*-Gen durchgeführt.

Es wurde ein MATCH-Algorithmus auf 21 in der *Transfac*-Matrix gespeicherten, positionsgewichteten Matrizen der p53-Familie angewandt, um putative Bindungsstellen dieser Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Die

positionsgewichteten Matrizen dienten als Grundlage für die Identifikation der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Die *Cut-Offs* der Matrizenübereinstimmung wurden an die jeweilige Länge der zu analysierenden Sequenzen adaptiert. Weiterhin wurde zur Validierung der Bindungsstellen eine zusätzliche Analyse mit *Jaspar* 5.0_Alpha durchgeführt. Auch diese wurde an die Länge der zu analysierenden Sequenz angepasst. Für die vorliegenden Analysen wurde festgelegt, dass eine Bindungsstelle wahrscheinlich ist, wenn gilt: Sequenzhomologie > 0,9 bzw. > 70%.

Mit Hilfe bestimmter sogenannter Weight Matrices (Position-Specific-Score-Matrix; PSSM; = Matrix) können potentielle Bindungsstellen (Transcription Factor Binding Sites; TFBS) in beliebigen Sequenzen gefunden werden, was auch als `phylogenetic footprinting` bezeichnet wird (Matys et al. 2003; Sandelin et al. 2004; Andersen et al. 2008; Mathelier et al. 2016). Hierzu wurde in einer weiteren Datenbank, *Ensembl*, das humane *AFP*-Gen (ENSG00000081051) und das Transkript mit der ID: ENST00000395792.6 ausgewählt und die jeweiligen Upstream-, Intron- und Exonsequenzen in der Datenbank mit vorgegebenen Matrix-Sequenzen von p53, p63 und p73 abgeglichen und ausgewertet.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die delta-delta-Ct-Werte der qPCR wurden im SAS-System anhand des MANOVA (Multivariate Analysis of Variance)- und ANOVA (Analysis of Variance)-Verfahrens statistisch ausgewertet. Zudem wurden die Daten im Welch-Test hinsichtlich ihrer Signifikanz untersucht, wobei der p-Wert (p) für einen zweiseitigen Hypothesentest berechnet wurde und die Versuchsanzahl n zwischen 6 und 9 betrug.

3 Ergebnisse

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden in Genomanalysen (Whole genome array) Expressionsprofile von Zielgenen der p53-Familienmitglieder im HCC erstellt (Abbildung 11). Hieraus resultierend, wurde eine - den drei p53 Familienmitgliedern gemeinsame - 28 Gene umfassende HCC-Gen-Signatur von prognostischer Relevanz definiert (Kerkeni SS. 2013; Pelc A. 2015). Mit dem für den klinisch relevanten Tumormarker AFP kodierenden Zielgen *AFP* soll im Rahmen dieser Arbeit eines dieser Gene und seine Regulation durch die p53-Familie weiter charakterisiert werden.

3.1 Der Einfluss der p53-Familie auf die Expression von *AFP*

Hep3B ist eine HCC-Zelllinie, die defizient für p53 ist. Darüber hinaus weisen diese Zellen eine charakteristische *AFP*-Expression auf (ATCC; <https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/All/HB-8064.aspx#characteristics>). Daher wurden in Hep3B-Zellen die einzelnen p53-Familienmitglieder mittels einer Transfektion von entsprechenden Plasmiden exprimiert. Anschließend wurde die relative *AFP*-Expression im zeitlichen Verlauf bestimmt.

3.1.1 Der Einfluss von p53 auf die *AFP*-Transkription in Hep3B-Zellen

p53 ist ein Repressor des *AFP*-Gens

Ziel war es, die molekularen Mechanismen der Regulation der *AFP*-Expression durch p53 zu analysieren. Hierzu wurde die Zelllinie Hep3B, die eine Deletion für p53 aufweist, verwendet. Die p53 Expression wurde durch Transfektion mit einem Expressionsvektor (pcDNA TAp53) wieder hergestellt. Die RNA aus Hep3B-Zellen, die mit p53 oder GFP transfiziert waren, wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mittels einer qPCR die *AFP*-Expression untersucht. Wie in Abbildung 12 dargestellt, nahm im zeitlichen Verlauf die *AFP*-Expression signifikant

ab. Nach 48 Stunden reduzierte sich die Transkription von *AFP* um 13% und nach 72 Stunden um 49% ($p=0,004$). Somit konnte gezeigt werden, dass p53 ein negativer transkriptioneller Regulator von *AFP* ist. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten anderer Gruppen, die ebenfalls eine Regulation von *AFP* durch p53 zeigen (Lee et al. 1999; Cui et al. 2005).

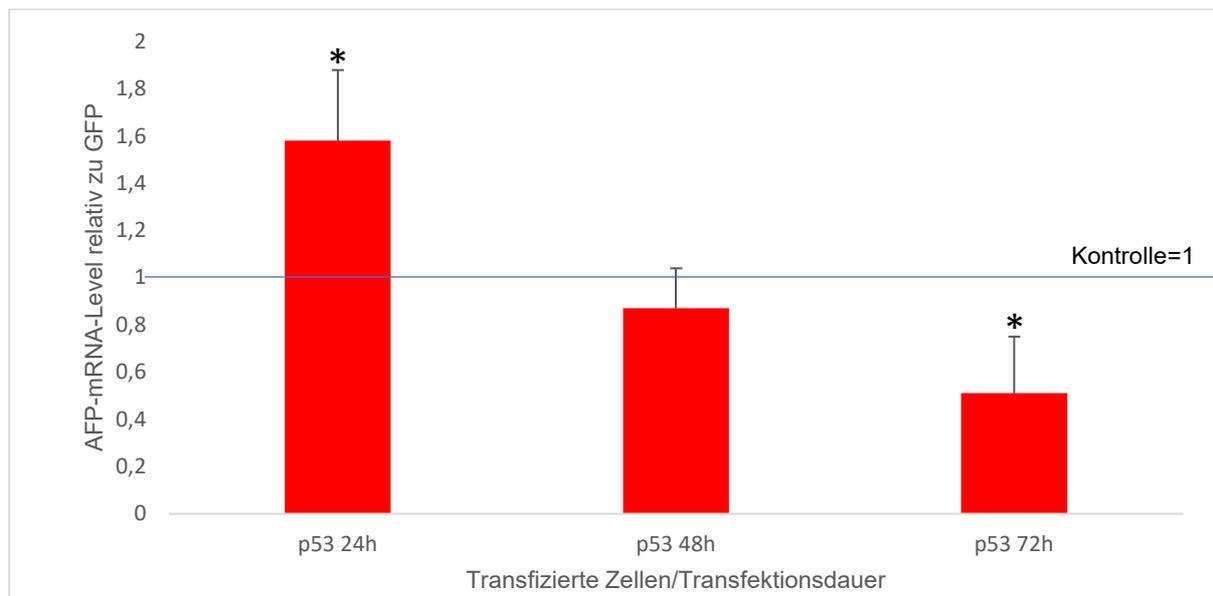


Abbildung 12: AFP-Expression in p53-transfizierten Hep3B-Zellen

Hep3B-Zellen wurden mit pcDNA-p53 Plasmiden oder GFP-Kontrollplasmiden transfiziert und zu drei unterschiedlichen Messzeitpunkten (24h, 48h, 72h) geerntet. Anschließend wurde RNA aus den Zellen isoliert, quantifiziert und in cDNA umgeschrieben. Die Transkriptmenge wurde mittels qPCR bestimmt und auf die Kontrolle (GFP-Transfektion) normiert, statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Die y-Achse zeigt die AFP-mRNA-Spiegel relativ zu dem der Kontrollzellen mit GFP, die x-Achse gibt die Transfektionsgruppe, hier p53, und die Transfektionsdauer wieder. Die Balken stellen die mRNA-Level relativ zu GFP in p53-transfizierten Zellen dar. Die jeweilige Standardabweichung ist durch einen Fehlerbalken gekennzeichnet.

*Die AFP-Expression in p53-transfizierten Zellen war anfänglich erhöht, zeigte dann im zeitlichen Verlauf eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den GFP-Kontroll-Zellen. *Signifikanz ($p \leq 0,05$) im Welch-Test bei $n = 6$ gegeben, dementsprechend gilt hier für p53 24h $p = 0,005$; für p53 48h $p = 0,11$ (nicht signifikant); für p53 72 h $p = 0,004$.*

3.1.2 Der Einfluss von p63 auf die *AFP*-Synthese in Hep3B-Zellen

TAp63 reprimiert das *AFP*-Gen

Der Einfluss von p63 auf AFP ist bisher noch nicht untersucht worden. Um den Effekt einer Expression von p63 auf die *AFP*-Transkription in Hep3B-Zellen zu untersuchen, wurde RNA von p63-transfizierten Zellen isoliert, in cDNA umgewandelt und in einer qPCR analysiert.

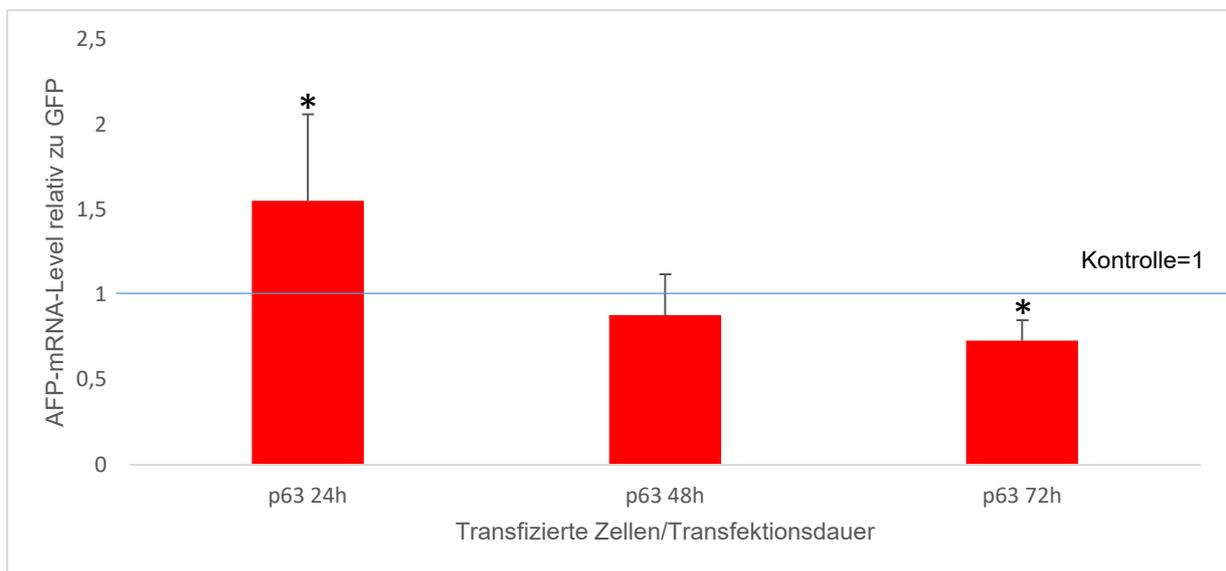


Abbildung 13: *AFP*-Expression in p63-transfizierten Hep3B-Zellen

Die Expression von p63 und deren Effekt auf die *AFP*-mRNA Level wurde in Hep3B-Zellen zu drei unterschiedlichen Messzeitpunkten (24h, 48h, 72h) getestet. Dazu wurde die in cDNA umgeschriebene RNA in der qPCR analysiert und die statistische Auswertung grafisch dargestellt. Die y-Achse zeigt die mRNA-Level relativ zu GFP-Kontrollzellen, die x-Achse die Transfektion mit p63-Plasmiden und den Zeitpunkt der Analyse. Die roten Balken stellen die *AFP*-mRNA-Level relativ zu GFP in p63-transfizierten Zellen dar. Die Standardabweichung ist angegeben.

Die Ergebnisse zeigten eine Abnahme der *AFP*-mRNA-Menge in p63-transfizierten Zellen über 72h. *Signifikanz ($p \leq 0,05$) im Welch-Test bei $n = 7$ gegeben, dabei gilt für p63 24h $p = 0,02$; für p63 48h $p = 0,25$ (nicht signifikant); für p63 72h $p = 0,0004$.

Nach der Transfektion mit *TAp63* wurde in Hep3B-Zellen in den folgenden 72 Stunden eine stetige Reduktion der AFP mRNA-Menge nachgewiesen. Nach 48 Stunden war die Expression des *AFP*-Gens um 12% und nach 72 Stunden um 27% ($p=0.0004$) im Vergleich zur GFP-Kontrolle gesunken (Abbildung 13). Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass p63 ein negativer transkriptioneller Regulator von *AFP* ist.

3.1.3 Effekte der TAp73- und Δ Np73-Expression auf die *AFP*-Transkription in Hep3B-Zellen

TAp73 wirkt als negativer Regulator der *AFP*-Transkription

Genau wie zu p63 ist sehr wenig bekannt über den Einfluss von p73 und seiner dominant negativen Isoformen auf die *AFP*-Expression.

Um den Einfluss einer p73-Expression auf die *AFP*-Transkription in Hep3B-Zellen zu analysieren, wurde auch hier RNA isoliert, in cDNA umgewandelt und die *AFP*-Transkription mittels qPCR analysiert. Nach 48 Stunden ist die *AFP*-Expression um 71% ($p=2,21 \times 10^{-9}$) und nach 72 Stunden um 86% ($p=2,4 \times 10^{-11}$) gesunken (Abbildung 14). Der Einfluss von p73 auf die *AFP*-Expression war damit im Vergleich zu den anderen p53-Familienmitgliedern am deutlichsten erkennbar.

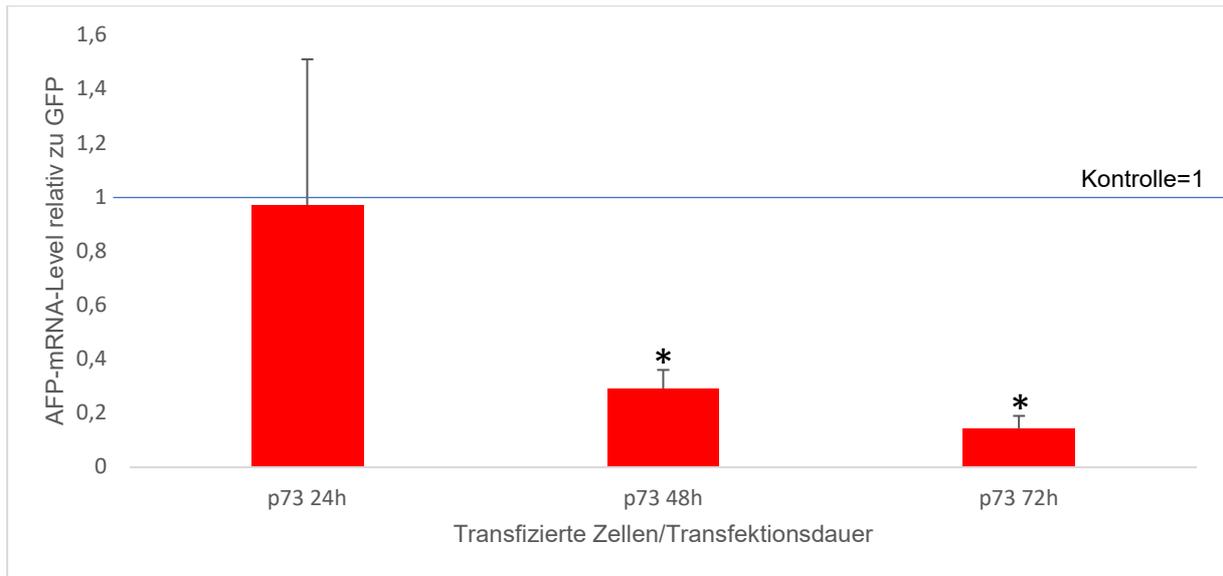


Abbildung 14: AFP-Expression in p73-transfizierten Hep3B-Zellen

Hep3B-Zellen wurden mit p73-Plasmiden transfiziert und die aus den Zellen gewonnene RNA in cDNA umgewandelt. Die anschließende Analyse der AFP-mRNA-Mengen in der qPCR wurde statistisch ausgewertet und in ein Balkendiagramm übertragen, in dem die y-Achse die AFP-mRNA-Level relativ zu GFP zeigt, die x-Achse die Transfektionsgruppe (p73-Plasmide) und die Zeitpunkte der Analyse. Die roten Balken zeigen die AFP-mRNA-Mengen in p73-transfizierten Zellen im Vergleich zu der GFP-Kontrolle (Kontrolle=1). Die jeweilige Standardabweichung ist dargestellt.

Die Abnahme der AFP-mRNA-Menge ist signifikant, im zeitlichen Verlauf verstärkt sie sich. *Signifikanz ($p \leq 0,05$) im Welch-Test bei $n = 9$ gegeben, dabei gilt für p73 24h $p = 0,86$ (nicht signifikant); für p73 48h $p = 2,21 \times 10^{-9}$; für p73 72h $p = 2,4 \times 10^{-11}$.

Δ Np73-Expression erhöht die AFP-Expression.

Die Δ N-Formen agieren auf Grund der fehlenden TAD als funktionelle Gegenspieler der aktiven p53-Familienmitglieder (Kartasheva et al. 2002; Nakagawa et al. 2002; Stiewe et al. 2002). Daher ist es von besonderem Interesse die Rolle von Δ Np73 in Bezug auf die AFP Transaktivierung zu analysieren. Dazu wurden Hep3B-Zellen mit Δ Np73 transfiziert und die AFP-Transkription in Bezug auf die Kontrollzellen ausgewertet. Im Gegensatz zu den TA-Formen der p53-Familie zeigte sich keine Abnahme, nach 24 und 48 Stunden hingegen eine Zunahme der AFP-

Transkriptmengen (Abbildung 15). Dies ist bemerkenswert, da es noch einmal die Funktion von $\Delta Np73$ als Gegenspieler der TA-Formen unterstreicht.

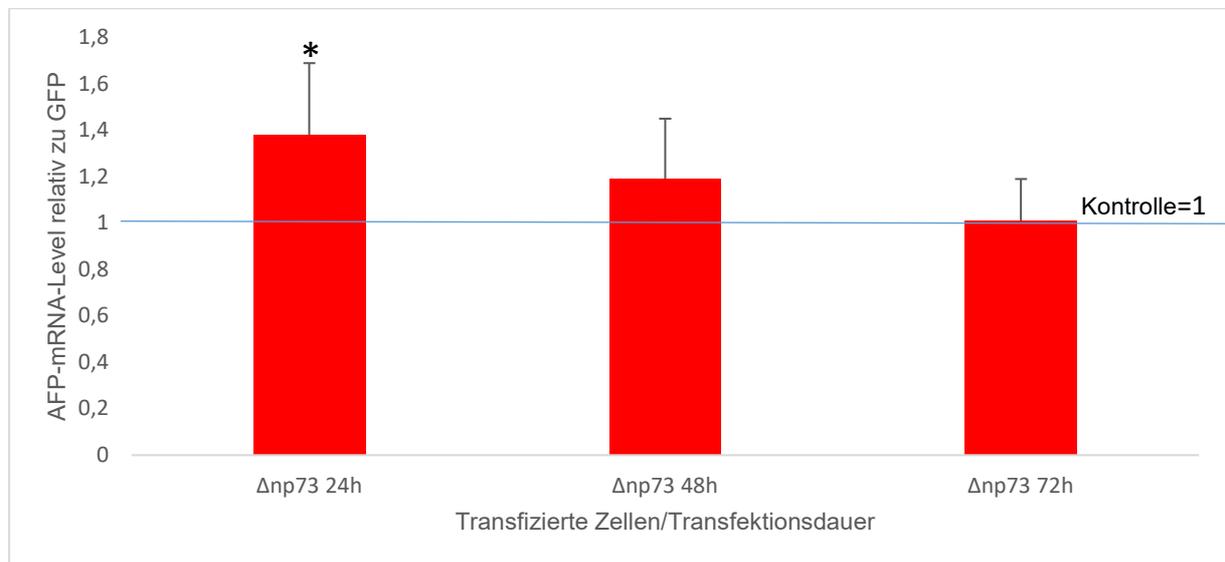


Abbildung 15: AFP-Expression in $\Delta Np73$ -transfizierten Hep3B-Zellen

Hep3B-Zellen wurden mit $\Delta Np73$ -Plasmiden transfiziert und die Menge an isolierter AFP-mRNA bzw. cDNA zu drei Messzeitpunkten in einer qPCR bestimmt. Die anschließende statistische Auswertung wurde in Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Auch hier stellt die y-Achse die AFP-mRNA-Menge in den transfizierten Zellen relativ zum Kontrollgen GFP dar, die x-Achse zeigt die Transfektionsgruppe (GFP oder $\Delta Np73$) und die Transfektionsdauer. Die roten Balken stellen die AFP-Menge in $\Delta Np73$ -transfizierten Zellen relativ zu GFP dar.

*Die Regulation von AFP wurde über den Zeitverlauf durch $\Delta Np73$ aktiviert (24, 48h) *Signifikanz ($p \leq 0,05$) im Welch-Test bei $n = 6$ gegeben, dementsprechend gilt für $\Delta Np73$ 24h $p = 0,03$; für $\Delta Np73$ 48h $p = 0,06$ (nicht signifikant); für $\Delta Np73$ 72h $p = 0,87$ (nicht signifikant).*

Zusammenfassend zeigte sich somit eine negative Regulation der AFP-Transkription in p53-, p63- und p73-transfizierten Zellen. Diese war in p73-transfizierten Zellen am stärksten ausgeprägt. Interessanterweise fiel die AFP-mRNA-Menge in $\Delta Np73$ -überexprimierenden Zellen nicht ab, sondern stieg sogar an. Somit hatte $\Delta Np73$ einen aktivierenden Effekt auf die AFP-Transkription. Die statistische Auswertung aller

qPCR-Daten im MANOVA-Verfahren wurde mit n=6 überprüft und ergab zudem, dass sich alle RNA-Gruppen im zeitlichen Verlauf signifikant voneinander unterschieden, und des Weiteren, dass die zeitliche Abnahme der *AFP*-Expression nach Transfektion der verschiedenen TA Isoformen der p53- Familienmitglieder signifikant war.

3.1.4 Effekte der p53-Expression auf den AFP-Proteinspiegel

p53 reduziert die AFP-Proteinspiegel

Entscheidend für eine Aussage über die Rolle der p53-Familienmitglieder in der Regulation von *AFP* ist jedoch die Auswirkung auf den AFP-Proteinspiegel. Um die Beeinflussung der AFP-Synthese durch p53 zu analysieren, wurden Hep3B-Zellen transfiziert, lysiert und im Western Blot untersucht. Dabei wurde eine negative Regulation der AFP-Spiegel durch p53 anhand der abnehmenden Menge an AFP auf Protein-Ebene ersichtlich. (Abbildung 16). Dies zeigte auch die densitometrische Auswertung (Abbildung 17), die eine Abnahme des relativen Wertes für AFP nach 24 Stunden um 59%, nach 48 Stunden um 27% und nach 72 Stunden um 7% im Vergleich zur GFP-Kontrolle aufwies. Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass die Herunterregulation durch p53 von den Zellen nach 72 Stunden fast vollständig kompensiert wurde. Dies lag nicht an einer Abnahme der p53-Expression über die Zeit, sondern ist wahrscheinlich ein AFP-spezifischer Regulationsmechanismus.

Somit konnte eine Verringerung der AFP-Synthese vor allem nach 24 Stunden und 48 Stunden in p53-transfizierten Zellen festgestellt werden und es wurde auch bestätigt, dass p53 ein negativer Regulator von AFP ist (Lee et al. 1999; Cui et al. 2005).

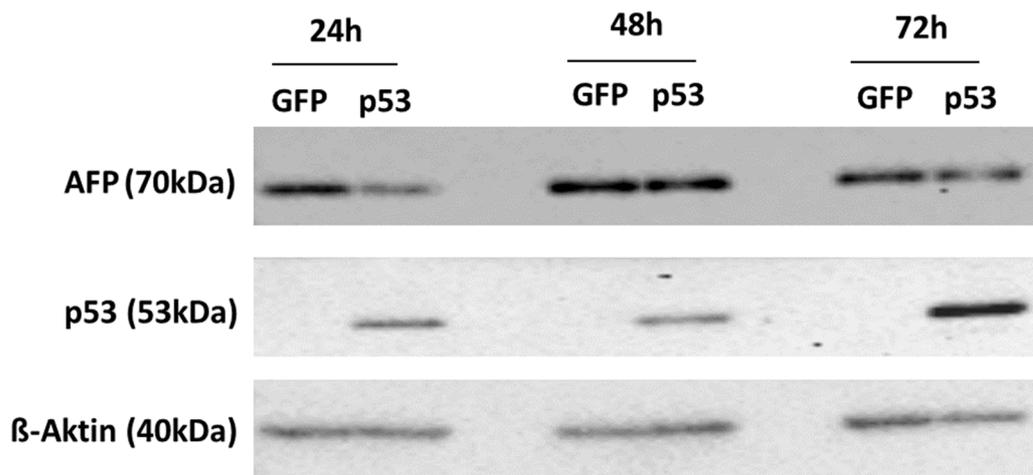


Abbildung 16: Einfluss von p53 auf die AFP-Synthese

Hep3B-Zellen wurden mit p53 transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h) geerntet. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und die Proteinmengen mit dem BCA-Test ermittelt. Nach Auftrennung der Proteine in der Gel-Elektrophorese und Übertragung auf eine Membran wurde diese mit Erst-Antikörpern (anti-p53, anti-AFP) und einem Zweit-Antikörper (anti-mouse IgG Meerrettichperoxidase) inkubiert und die Signale mittels ECL sichtbar gemacht. Zur Normierung der Proteinmengen wurde die Membran abschließend mit β-Aktin Antikörpern inkubiert. Die p53-Menge wurde als Nachweis der Transfektion zusätzlich bestimmt. Die Bandenintensität wurde mit der Image J-Software ausgewertet und in einem Diagramm grafisch dargestellt (siehe Abbildung 17).

Eine deutliche Abschwächung der AFP-Bande und damit eine verminderte AFP-Synthese war zu erkennen.

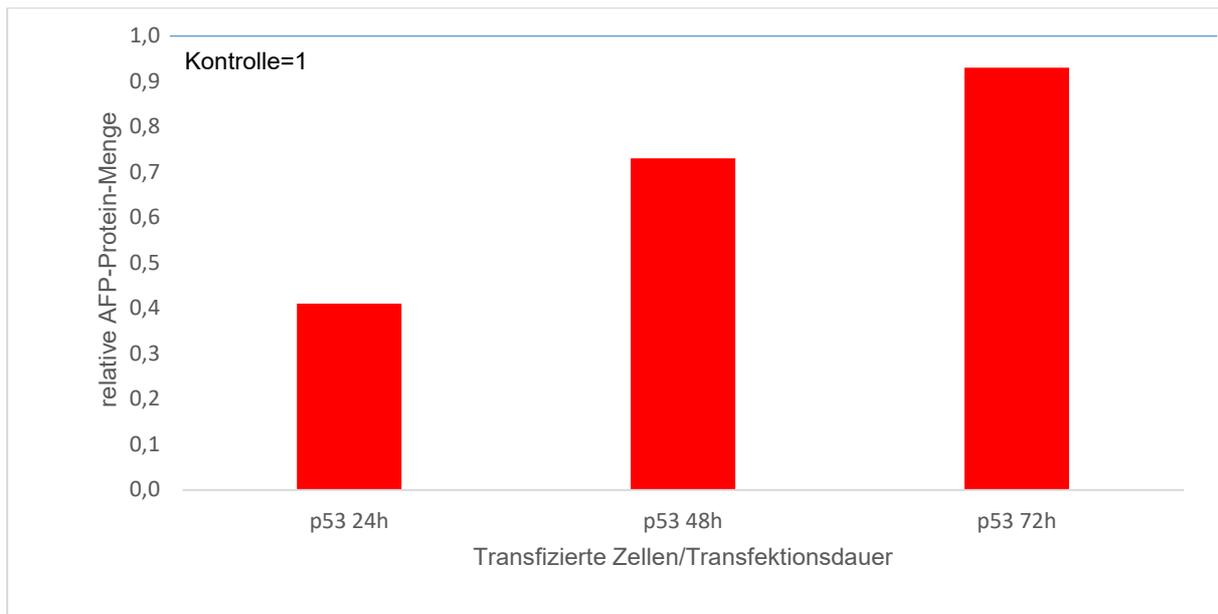


Abbildung 17: Densitometrische Analyse der AFP-Proteinbanden in p53-transfizierten Zellen

Die in der Image J-Software analysierten Banden ergaben relative Werte, aus denen der Quotient aus dem AFP-Wert in p53-transfizierten Zellen bzw. Kontrollzellen und dem zugehörigen β -Aktin-Wert gebildet wurde. Anschließend wurden die Werte normiert, Mittelwerte bzw. Standardabweichungen berechnet und grafisch dargestellt. So kann die relative AFP-Menge in den transfizierten Zellen und den Kontrollzellen ausgewertet werden und ist auf der y-Achse im Diagramm zu sehen. Die x-Achse gibt die Art der Transfektion bzw. die Transfektionsdauer wieder. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken markiert.

Die Ergebnisse zeigen eine geringe Abnahme der AFP-Synthese nach 24h und 48h, die nach 72h wieder ansteigt. Eine Signifikanz ($p \leq 0,05$) konnte im Welch-Test bei $n = 4$ allerdings nicht nachgewiesen werden (p53 24h $p = 0,46$; p53 48h $p = 0,85$; p53 72h $p = 0,52$).

3.1.5 Effekte der p63-Expression auf die AFP-Proteinspiegel

p63 vermindert die AFP-Proteinsynthese

p63 wurde im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern bisher nicht als Regulator der AFP-Synthese untersucht. Daher ist es von besonderer Bedeutung die Rolle von p63 genauer zu charakterisieren. Auf Transkriptionsebene konnte von mir gezeigt werden, dass die p63-Expression zu einer Suppression von *AFP* führt (Abbildung 13). Um die Wirkung der p63-Transfektion auf den AFP-Proteinspiegel zu untersuchen wurden Western Blot Analysen angefertigt.

Dabei zeigten die Versuchsreihen mit p63-transfizierten Zellen mit zunehmender Inkubationszeit eine verringerte AFP-Synthese (Abbildung 18). In der Densitometrie zeigte sich ein im Vergleich zur GFP-Probe geringerer AFP-Spiegel zu allen drei Messzeitpunkten. Dabei war nach 24 Stunden eine Abnahme um 41% ($p = 0,009$), nach 48 Stunden um 36% ($0,05$) und nach 72 Stunden ein um 67% ($p = 0,01$) geringerer AFP-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (Abbildung 19).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine p63-Expression zu einer deutlichen Inhibition des AFP-Proteinspiegels führt. Dies bekräftigt die Daten aus den Analysen zur AFP-mRNA-Synthese nach p63-Expression, die eine Inhibition zeigten (Abbildung 13).

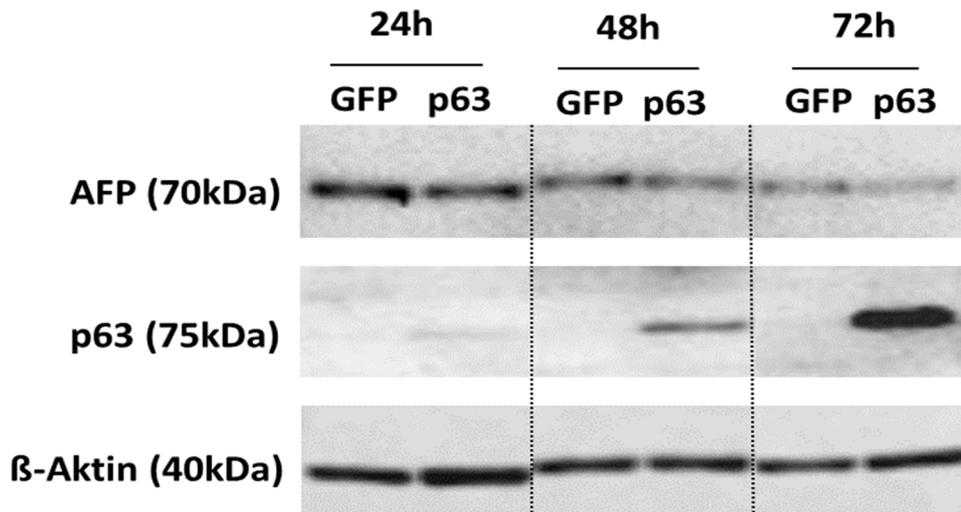


Abbildung 18: Einfluss von p63 auf die AFP-Synthese

Hep3B-Zellen wurden mit p63 transfiziert und die Proteinmengen im Western Blot bestimmt. Dazu wurden nach der Zellernte zu den drei Messzeitpunkten (24h, 48h, 72h) Proteinlysate hergestellt und deren Protein-Konzentration mittels BCA-Tests bestimmt. Die Proteine wurden mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Membran und Inkubation mit den jeweiligen Erst-Antikörpern (anti-p63, anti-AFP) und Zweit-Antikörpern (anti-rabbit IgG Meerrettichperoxidase) in der Image Lab-Software sichtbar gemacht. Zur Normierung wurde β -Aktin verwendet, zum Transfektionsnachweis wurde zusätzlich die Menge an p63 bestimmt. Die Auswertung der AFP-Banden in der Image J-Software wurde in ein Balkendiagramm übertragen (siehe Abbildung 19).

Für p63-transfizierte Zellen war eine Abschwächung der AFP-Bande im Vergleich zur GFP-Bande zu allen drei Messzeitpunkten ersichtlich.

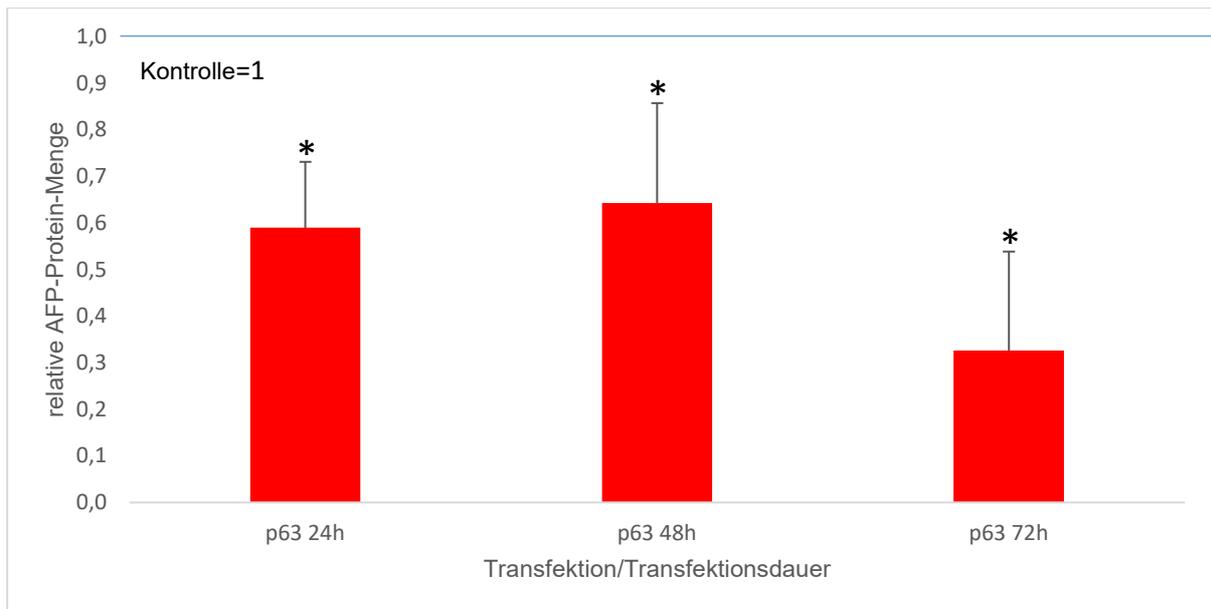


Abbildung 19: Densitometrische Auswertung der Proteinbanden in p63-transfizierten Hep3B-Zellen

Die Proteinbanden wurden mit Hilfe der Image J-Software analysiert und ergaben dabei relative Werte für die Bandenintensität. Dann wurde der Quotient mit den β -Aktin-Werten gebildet, die relativen AFP-Mengen normiert und auf der y-Achse dargestellt. Die x-Achse steht für die Transfektion bzw. die Transfektionsdauer. Fehlerbalken sind schwarz eingezeichnet.

*Die Ergebnisse zeigen geringere AFP-Level im Vergleich zur GFP-Probe zu allen drei Messzeitpunkten. *Signifikanz ($p \leq 0,05$) im Welch-Test bei $n = 4$ gegeben, hier gilt für p63 24h $p = 0,009$; für p53 48h $p = 0,05$; für p63 72h $p = 0,01$.*

3.1.6 Effekte der TAp73- und Δ Np73-Expression auf die AFP-Proteinspiegel

Der Tumorsuppressor p73 reguliert die AFP-Proteinmenge negativ, wohingegen das Proto-Onkogen Δ Np73 einen gegenläufigen Effekt auf AFP zeigt

Die Expression von TAp73 zeigte den deutlichsten Einfluss auf die *AFP*-Transkription. Hier war eine signifikante Inhibition der mRNA-Synthese detektierbar (vgl. 3.1.3). Bemerkenswerterweise zeigte Δ Np73 einen aktivierenden Einfluss auf die *AFP*-Transkription. Dies unterstreicht noch einmal die gegenläufigen Funktionen von p73 und Δ Np73.

Die Effekte von p73 und Δ Np73 auf die AFP-Proteinspiegel wurden in Western Blots untersucht.

Im zeitlichen Verlauf wurde in p73-transfizierten Zellen eine Abschwächung der AFP-Proteinbanden im Vergleich zur GFP-Kontrolle beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte die N-terminal trunkierte Isoform des p73-Proteins jedoch keine reprimierende Wirkung auf die AFP-Proteinspiegel, sondern führte zu einer Erhöhung der AFP-Proteinspiegel (siehe Abbildung 20).

Analog hierzu ergab die densitometrische Analyse der Proteinbanden nach 24 Stunden für p73 eine relative Abnahme von AFP um 44%, nach 48 Stunden um 62% ($p = 0,02$) und nach 72 Stunden um 80% ($p = 0,002$) im Vergleich zur GFP-Probe (Abbildung 21). Im Gegensatz dazu zeigte Δ Np73 keinen Einfluss oder aber eine Steigerung in Bezug auf den AFP-Spiegel. Dies ist besonders hervorzuheben, da es noch einmal die antagonistische Beziehung von p73 und Δ Np73 hinsichtlich der Regulation des *AFP*-Gens verdeutlicht (Abbildung 20 und 21).

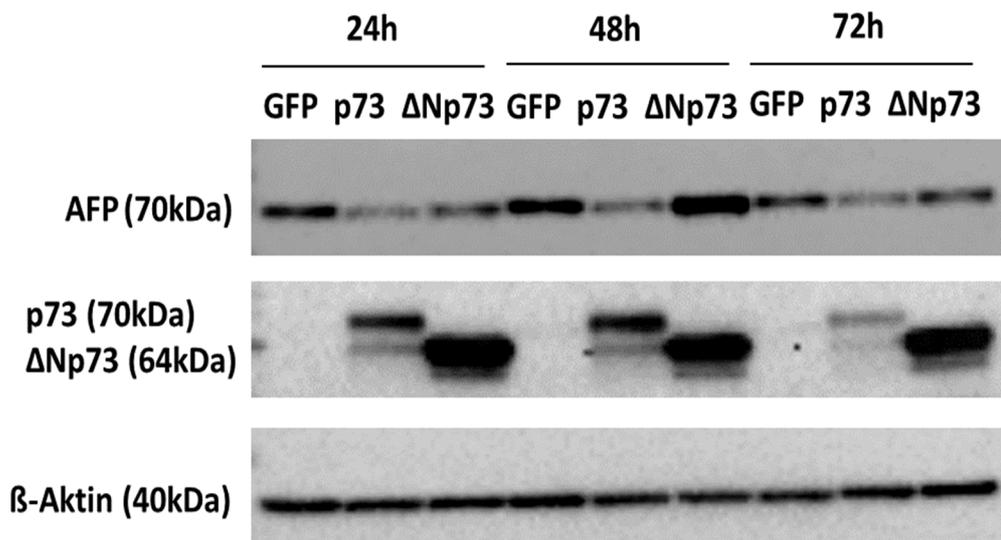


Abbildung 20: Einfluss von p73-Isoformen auf die AFP-Synthese

Hep3B-Zellen wurden mit p73 und Δ Np73 transfiziert und die Proteinmengen im Western Blot bestimmt. Nach der Zellernte zu den drei Messzeitpunkten (24h, 48h, 72h) wurden Proteinlysate hergestellt und deren Protein-Konzentration mittels BCA-Tests bestimmt. Die Proteine wurden in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden sie auf eine Membran übertragen und mit den Erst-Antikörpern (anti-p73, anti-AFP) und einem Zweit-Antikörper (anti-rabbit IgG Meerrettichperoxidase) inkubiert. Die Darstellung der Banden erfolgte mittels der Image Lab-Software. Zur Normierung wurde β -Aktin verwendet, die Transfektion wurde durch Bestimmung der Überexpression von p73 und Δ Np73 überprüft. Die Auswertung der AFP-Bandenintensität wurde mit Hilfe der Image J-Software vorgenommen und die Ergebnisse grafisch dargestellt.

In p73-transfizierten Zellen war eine deutliche Abnahme der AFP-Bandenintensität nach 24, 48 und 72 h zu sehen, Δ Np73 führte zu einer Verstärkung der AFP-Bande zu allen drei Messzeitpunkten.

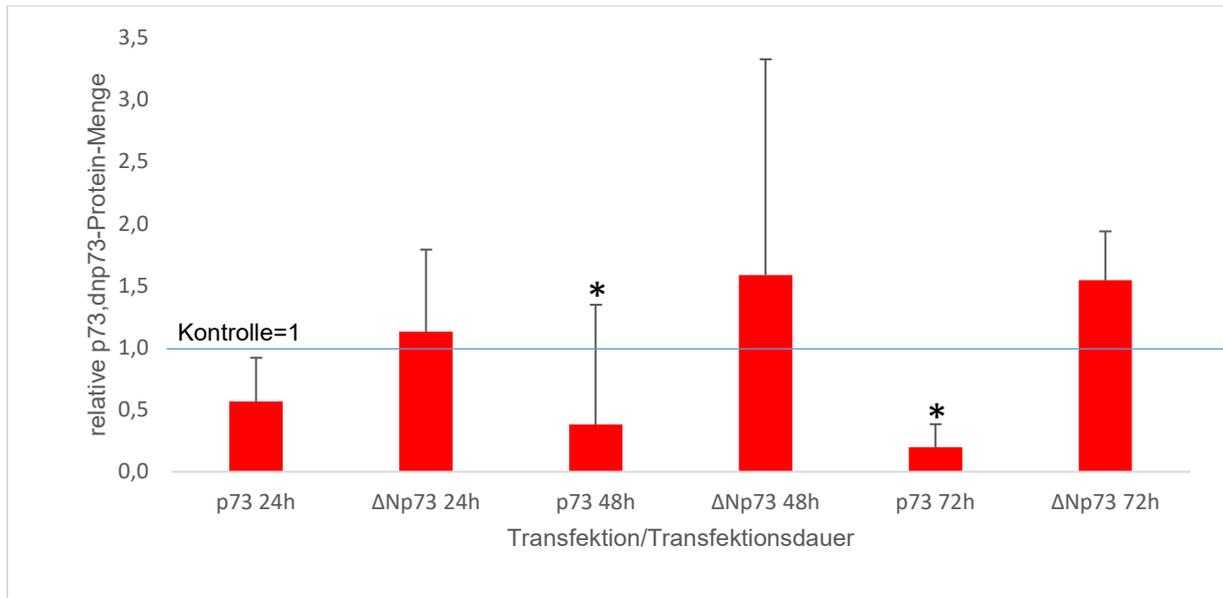


Abbildung 21: Densitometrie der Proteinbanden in p73/ΔNp73-transfizierten Hep3B-Zellen

Die Auswertung der Banden wurde in der Image J-Software vorgenommen, dabei erhielt man für die Banden jeder Transfektionsreihe relative Werte. Analog zu den anderen Proteinen, wurde der Quotient aus AFP-Werten und β -Aktin-Werten gebildet, der wiederum die relative AFP-Menge darstellt. Die normierten Werte wurden in ein Balkendiagramm überführt, wobei die y-Achse den relativen AFP-Spiegel, die x-Achse die Transfektion bzw. Transfektionsdauer angibt. Die Standardabweichung ist als schwarzer Fehlerbalken im Diagramm eingezeichnet.

Die relativen Mengenunterschiede zeigen für p73-transfizierte Zellen negative, für Δ Np73-transfizierte Zellen positive Werte im Vergleich zur GFP-Probe über den zeitlichen Verlauf, d.h. p73 führte zu einer Abnahme, die delta-Form zu einer Zunahme der AFP-Synthese. *Signifikanz ($p \leq 0,05$) im Welch-Test bei $n = 4$ gegeben, dabei gilt für p73 24h $p = 0,21$ (nicht signifikant); für p73 48h $p = 0,02$; für p73 72h $p = 0,002$; für Δ Np73 24h $p = 0,74$ (nicht signifikant); für Δ Np73 48h $p = 0,79$ (nicht signifikant); für Δ Np73 72h $p = 0,43$ (nicht signifikant)

3.2 *In silico* Analyse der Bindungsstellen von p53, p63 und p73 im *AFP*-Gen

Das humane *AFP*-Gen besitzt eine ca. 200bp umfassende Promotorregion. Im Promotor wurden zwei Silencer-Regionen bei -402 bis -169bp (S1) und -1822 bis -951bp (S2) beschrieben (Lazarevich 2000). Cui und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass in den Silencer-Regionen Bindungsstellen der p53-Familie lokalisiert sind und p53 und TAp73 als negative Regulatoren an diese Regionen binden können (Cui et al. 2005).

Position im <i>AFP</i> -Gen	Potentiell bindender Transkriptionsfaktor
-1873 bis -1781 bp	p53, p63, p73*
-295 bis -215 bp	p53, p63, p73*
Intron 1, 203bp	p53
Intron 2, 1962 bp	p53, p73
Intron 3, 3086 bp	p53
Intron 4, 5054 bp	p63, p53

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der identifizierten Bindungsstellen von p53, p63 und p73 Proteinen als Transkriptionsfaktoren am *AFP*-Gen

*Zur Identifikation potentieller Bindungsstellen wurden bekannte Matrixsequenzen von p53, p63 und p73 mit Abschnitten des AFP-Gens in Softwareprogrammen abgeglichen. Dabei wurden zwei bisher vermutete Bindungsstellen der p53-Proteine in der upstream-Sequenz des AFP-Gens bestätigt, weitere wurden in den Intronabschnitten 1-4 detektiert. Neue Bindungsstellen sind mit rot markiert; * = bereits beschriebene Bindungsstellen in den Silencer-Regionen (Lazarevich 2000; Cui et al. 2005).*

Um die Regulation des *AFP*-Gens besser zu verstehen und die Rolle von p63 und der dominant-negativen Isoformen von p73 in der Regulation der *AFP*-Expression zu

analysieren, wurde eine *in silico* Bindungsstellenanalyse durchgeführt. Für die Analyse wurden in den Datenbanken *Jaspar* und *Transfac* die Position-Specific-Score Matrices der p53-Proteine mit ausgewählten Sequenzen (*upstream*-Sequenz bis -7000bp und Intronabschnitte 1-4) des humanen *AFP*-Gens abgeglichen, um so potentielle (neue) Bindungsstellen dieser Transkriptionsfaktoren am *AFP*-Gen zu ermitteln (siehe Kapitel 2.2.7). Hierbei konnten wir die bereits bekannten Bindungsstellen für die p53-Familie (Lazarevich 2000; Cui et al. 2005) in den Silencer-Regionen bestätigen. In Ergänzung zu diesen Bindungsstellen konnten wir im Intron 1 eine neue putative Bindungsstelle für p53, im Intron 2 eine neue kombinierte Bindungsstelle für p53 und p73, im Intron 3 eine neue Bindestelle für p53, sowie im Intron 4 eine neue kombinierte Bindungsstelle für p63 und p53 nachweisen (Tabelle 1, Abbildung 22).

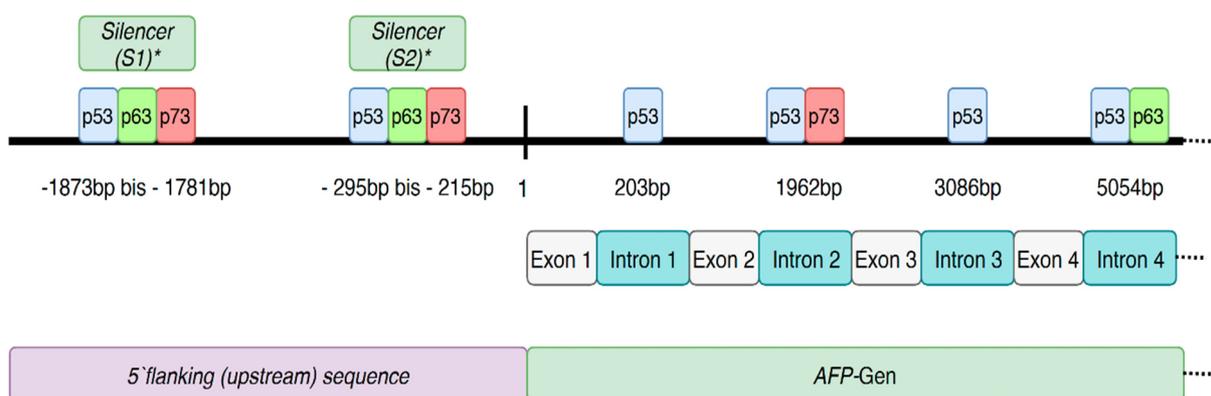


Abbildung 22: Grafische Darstellung der identifizierten potentiellen Bindungsstellen der p53-Proteine am humanen *AFP*-Gen

Zur Überprüfung bzw. Registrierung dieser Bindungsstellen (TFBS) wurden bekannte Matrixsequenzen von p53, p63 und p73 (PSSM) mit der *upstream*-Gensequenz, sowie den Intronabschnitten 1-4 des *AFP*-Gens verglichen, was als *phylogenetic footprinting* bezeichnet wird. Neue putative Bindungsstellen für p53 Familienmitglieder wurden in den Introns 1-4 erstmals identifiziert.

* Silencerregionen (-402 bis -169bp (S1) und -1822 bis-951bp (S2)), die von Lazarevich 2000 beschrieben wurden (siehe Kapitel 1.3.1). In diesen Regionen befinden sich putative Bindungsstellen der p53-Familie (Cui et al. 2005).

Potentielle Bindungsstellen von p53, p63 und p73 am *AFP*-Gen konnten in mehreren Abschnitten gezeigt werden. Dies bekräftigt, dass p53 und p73 an der Regulation der *AFP*-Transkription maßgeblich beteiligt sind (Lazarevich 2000; Cui et al. 2005) und unterstreicht die hier zum ersten Mal präsentierten Ergebnisse, dass p63 ebenfalls ein negativer Regulator der *AFP*-Genregulierung ist.

Somit konnten *in silico* neue Bindungsstellen der p53-Familie in den Introns 1-4 beschrieben werden. Neu sind insbesondere die Bindungsstellen für p63. Dies unterstreicht unsere Befunde, dass p63 ein neuer Suppressor von *AFP* ist.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Dissertation zeigen, dass die alle Mitglieder der p53-Familie eine wichtige Rolle in der Regulation des *AFP*-Gens spielen.

4 Diskussion

Das HCC stellt weltweit die dritthäufigste Todesursache in Folge einer Tumorerkrankung dar (EASL Clinical Practice Guidelines 2018). Zur Identifikation neuer therapeutischer Targets ist das molekularbiologische Verständnis der Hepato-Karzinogenese von essentieller Bedeutung. Hochdurchsatz-Analysen zeigen, dass im HCC genetische Veränderungen entstehen, die vor allem Tumorentwicklung, -progression und Therapieansprechen betreffen (Kunst et al., 2016). Diese Erkenntnisse können langfristig zur Entwicklung neuer therapeutischer Zielstrukturen und Biomarker und damit zur besseren Patientenversorgung beitragen.

In fast 50% aller HCCs ist der p53-Signalweg beeinträchtigt, u.a. durch Mutationen innerhalb des *TP53* Gens (Zalcenstein et al. 2003; Hussain et al. 2007; Schilling et al. 2010). Es ist bekannt, dass p53 die *AFP*-Expression negativ reguliert (Lee et al., 1999). Mutationen im *TP53*-Gen wirken sich dann insofern auf die *AFP*-Produktion aus, dass es zu erhöhten *AFP* Spiegeln kommen kann. Die fehlende Repression von *AFP* im HCC, die durch mutiertes p53 verursacht werden kann, und die daraus resultierenden höheren Level an *AFP* erlauben dessen klinische Anwendung als Tumormarker (Liu et al. 2021). Da aber nur in ca. 50% aller HCC-Fälle eine Mutation von *TP53* vorliegt, könnten theoretisch noch andere Mechanismen bzw. Regulatoren für die fehlende Repression von *AFP* im HCC verantwortlich sein.

Da die Mitglieder der p53-Familie ein komplexes Netzwerk bilden und sich auch gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und in welcher Weise p53 und speziell p63 und p73 an der Regulation der *AFP*-Expression beteiligt sind.

Die Repression von *AFP* durch p53 ist bereits beschrieben (Lee et al. 1999; Cui et al. 2005). Übereinstimmend mit der Literatur konnten auch wir diesen Effekt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigen. (Abbildungen 12,16,17).

Auch p73 wurde als Repressor der *AFP*-Transkription beschrieben (wenn auch mit weniger deutlich ausgeprägten Effekten) (Cui et al. 2005). Im Gegensatz hierzu zeigen unsere Daten eine starke und signifikante Reduktion der *AFP*-Transkription nach Expression der TA-Isoform von p73 in Hep3B Zellen. Die repressive Wirkung von p73

war in der qPCR bereits nach 24 Stunden zu erkennen und zeigte eine kontinuierliche Zunahme (Abbildung 14). Auch auf Proteinebene wurde dieser Effekt beobachtet, wobei hier nach 72 Stunden die stärkste repressive Wirkung zu erkennen war (Abbildungen 20,21).

Zusätzlich zur TAp73-Isoform wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Effekte der Δ Np73-Isoform analysiert. Bemerkenswerterweise führte die Überexpression der Δ Np73-Isoform - im Gegensatz zur TAp73-Isoform - zu einer Verstärkung der *AFP*-Expression. Damit zeigen wir erstmals die antagonistischen Effekte der beiden p73-Isoformen in Bezug auf die Regulation von *AFP*.

Wie bereits beschrieben, können Δ N-Formen aufgrund der fehlenden TAD nicht als Transfaktoren wirksam sein. Δ N-Formen können jedoch über Protein-Protein-Wechselwirkungen die Funktion der jeweiligen Wildtyp-Formen negativ regulieren (Müller et al. 2006; Dötsch et al. 2010; Mundt et al. 2010). Möglicherweise kann also die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Δ Np73 und TAp73 zur Inhibition der TA-Isoform und infolgedessen zu einer verstärkten *AFP*-Synthese führen. Darüber hinaus wäre es möglich, dass Δ Np73 trotz fehlender TAD transkriptionsmodulierende Eigenschaften besitzt, und so die Transkription der TA-Isoform reguliert. Der physiologische Repressionsmechanismus (siehe Abbildung 10) könnte folglich so beeinträchtigt sein, dass eine Deacetylierung der H3-Histone durch das inhibierte p73 nicht mehr möglich ist, in Folge die Chromatinverdichtung ausbleibt und eine Transkription von *AFP* möglich wird. Ein schneller Abbau der Isoform und die Aufhebung der repressiven Wirkung von Δ Np73 auf p73 könnten den Abfall der *AFP*-Synthese nach 48 Stunden erklären (Abbildung 15). Der inhibitorische Effekt auf transkriptioneller Ebene war nach 24 Stunden am stärksten ausgeprägt und wurde dann wieder schwächer. Eine Erklärung hierfür wäre eine vorübergehende Transkription von *AFP*, die nach 24 Stunden nachlässt und auf das Anfangsniveau zurückgeht. Hieraus könnte man theoretisch eine kurze, effektive Interaktion zwischen p73 und Δ Np73 ableiten, wobei die densitometrische Auswertung eine Verstärkung der *AFP*-Synthese zu allen drei Messzeitpunkten wiedergibt (Abbildungen 20,21).

Während die repressive Wirkung von p53 und p73 auf die *AFP*-Transkription in der Literatur bereits beschrieben ist (Lee et al. 1999; Cui et al. 2005), gibt es bisher keine Studie über mögliche Effekte von p63. Cui et al. untersuchten in ihrer Studie zwar die Wirkung von p63 auf die *AFP*-Transkription, beobachteten jedoch keine inhibitorischen

Effekte (Cui et al. 2005). Unsere Daten zeigen nun erstmals deutlich, dass auch p63 als Repressor der *AFP*-Transkription fungiert.

Im Gegensatz zu Cui et al., die ein p63 mit Myc-Tag verwendeten, erfolgte die Expression von p63 in der vorliegenden Arbeit ohne Modifikation, weshalb wir von einer korrekten Faltung und Funktionalität ausgehen können, die durch den Myc-Tag unter Umständen nicht gegeben ist.

Zusammenfassend ergänzen die Daten der vorliegenden Arbeit das Verständnis des komplexen Netzwerks der p53-Familie in Bezug auf die Regulation des *AFP*-Gens mit folgenden wichtigen Aspekten:

1. TAp73 und Δ Np73 haben antagonistische Effekte auf *AFP*: während TAp73 als effektiver Repressor wirkt, führt Δ Np73 zu einer Stabilisierung der *AFP*-mRNA-Level und Akkumulation des *AFP*-Proteins.
2. TAp63 wirkt wie p53 und TAp73 als Repressor des *AFP*-Gens.
3. Die Identifikation neuer klassischer intronischer Bindungsstellen der p53 Familie im *AFP* Gen belegt die Bedeutung der transkriptionellen Regulation von *AFP* durch die p53 Familie als Transkriptionsfaktoren.

Da die Interaktion zwischen den TA- und Δ N-Formen einen entscheidenden Einfluss auf den Ablauf des sowohl intrinsischen als auch extrinsischen Apoptose-Signalweges hat (Müller et al. 2006; Mundt et al. 2010), kann eine Dysbalance der Proteine eine Tumorentstehung nach sich ziehen und somit für die Therapie ein besonders wichtiger Ansatzpunkt sein. Auch für weitere Untersuchungen sollte das Augenmerk auf die unterschiedlichen Isoformen der p53-Proteine gerichtet sein. Ihnen könnte eine wichtige Rolle in Bezug auf die reaktivierte *AFP*-Synthese, als Ausdruck des gestörten Repressionsmechanismus im HCC zukommen. Die vermehrte Expression der Δ N-Formen der p53 Familie stellt in vielen Tumoren ein Charakteristikum und einen Marker für eine ungünstige Prognose dar, wie zum Beispiel die Überexpression von Δ Np63 in Kopf-und-Hals-Tumoren (Weber et al. 2002; Sniezek et al. 2004; Rocco et al. 2006; DeYoung et al. 2006; Pietsch et al. 2008) oder die Expression von Δ Np73 im HCC.

Um den Regulationsmechanismus am *AFP*-Gen und dessen Beeinflussung durch die p53-Familie im Detail zu charakterisieren, war es wichtig, potentielle Bindungsstellen für die einzelnen p53-Familienmitglieder am *AFP*-Gen zu identifizieren.

Das *AFP*-Gen, dessen Expression nach der Geburt rapide abnimmt, unterliegt einem postnatalen Repressionsmechanismus, der nicht durch eine Inaktivierung von

positiven Regulationselementen oder Transfaktoren, sondern durch eine Aktivierung von negativen Regulatorsequenzen verursacht wird, die ihrerseits die Aktivität der Enhancer-Elemente und des Promotors reduzieren (Nakabayashi et al. 1991). Die Aktivierung dieser Sequenzen erfolgt dabei durch p53. Somit lässt sich auch die hohe oder wieder nachweisbare Menge an AFP als Tumormarker im HCC erklären, da in diesem Karzinom mutierte Formen von p53 bzw. der komplette Verlust der p53-Expression eine bedeutende Rolle spielen (Nakabayashi et al. 1991; Muller et al. 2011), wobei in beiden Fällen vermutlich die repressive Wirkung des Tumorsuppressorproteins auf die *AFP*-Transkription verloren gehen kann.

Obwohl sich die Gensequenzen für das *AFP*-Gen in Maus, Ratte, Gorilla und Mensch hinsichtlich ihrer regulatorischen Struktur sehr ähneln, gibt es bis dato sehr wenige Studien über Transkriptionsfaktoren, die an die regulatorischen Einheiten des humanen *AFP*-Gens binden. Lediglich für HNF1, nkx2.8, ATBF1, YY1 und BKLf wurden Bindungsstellen am humanen Gen detektiert, vermutlich sind aber ähnliche Transfaktoren für die Regulation beim Mensch wie bei der Maus verantwortlich (Lazarevich 2000; Scohy et al. 2000; Ninomiya et al. 2002; Peterson et al. 2011). Für p53 und TAp73 wurde eine identische regulatorische DNA-Sequenz, das SBE/p53RE bei -887 bis -827bp, im Maus-*AFP*-Gen gefunden (Cui et al. 2005), was durch ihre Strukturhomologie erklärt werden kann. Da wir erstmals p63 als negativen Regulator des *AFP*-Gens identifizieren konnten, war unsere Hypothese, dass p63 durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu p53 und TAp73, vor allen Dingen in Bezug auf die DBD und TAD, ähnliche, oder sogar identische repressive Sequenzen des *AFP*-Gens regulieren könnte. Dass sich regulatorische Elemente beim Maus-*AFP*-Gen nicht nur auf die *upstream*-Sequenz beschränken, sondern auch auf Nukleotidbereiche im Gen selbst ausweiten, wurde schon von Camper und Tilghman vermutet (Camper und Tilghman 1989). Die Daten der durchgeführten Bindungsstellenanalyse legen nahe, dass dies auch für das humane *AFP*-Gen zutrifft.

So konnten wir innerhalb der bereits beschriebenen Silencer-Regionen des humanen *AFP*-Gens (Ninomiya et al. 2002), zwei potentielle Bindungsstellen für p53, und auch für TAp63 und TAp73, bei ca. -1873 bis -1781bp und -295 bis -215bp identifizieren. Zusätzlich wurden weitere Bindungsstellen für p53, TAp63 und TAp73 in den Intronregionen des *AFP* Gens erstmals identifiziert (Tabelle 1, Abbildung 22). In weiterführenden Experimenten sollen diese potentiellen Bindungsstellen nun weiter charakterisiert werden. Die Resultate der Bindungsstellenanalyse unterstreichen damit

nochmals die Ergebnisse der Expressionsanalysen, dass neben p53 und p73 auch p63 an Silencer-Regionen des humanen *AFP*-Gens bindet, und so eine repressive Wirkung auf die *AFP*-Transkription ausüben kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit die Funktion von p53, und TAp73 als inhibierende Transfaktoren der *AFP*-Expression bestätigt. Darüber hinaus wurde TAp63 als neuer Repressor der *AFP*-Expression identifiziert. Dies führt zu der Frage, weswegen sowohl TAp63 als auch TAp73, die in Hep3B-Zellen nachweisbar sind (Cui et al. 2005), nicht die fehlerhafte bzw. fehlende Funktion von p53 als Tumorsuppressor kompensieren. Um diesen Befund zu erklären sind mehrere Hypothesen denkbar: (1) Eventuell wird die Aufhebung der Repression von *AFP* im HCC nicht oder nur im geringen Maße von p63 und p73 *in vivo* übernommen, da die Repressorwirkung zu schwach und/oder die Inhibition durch mutiertes p53 zu stark ist.

(2) Wie Stindt zeigte, besitzt mutiertes p53 die Fähigkeit p63 und p73 zu binden und dadurch ihre transkriptionsmodulierenden Eigenschaften zu hemmen (Stindt et al. 2015). Dadurch kann die Funktion von p63 und p73 im HCC also durch Komplexbildung mit p53-Mutanten inhibiert werden. Die hemmende Wirkung von p53-Mutanten auf p63 und p73 wird durch weitere Proteine, wie z.B. TOPBP1, Pin1 und SMAD2 beeinflusst (Stindt et al. 2015; Hall und Muller 2019). Andere Proteine wie ANKRD11 oder ATF3 verhindern die Komplexbildung zwischen mutiertem p53 und p63 bzw. p73 (Hall und Muller 2019). Hiermit bieten sich zusätzliche Angriffspunkte und Signalwege, deren Analysen in Zukunft einen Fortschritt in Bezug auf die Entwicklung neuer Therapien bringen könnte, so z.B. die Verabreichung bestimmter Substanzen, die eine Komplexbildung zwischen mutiertem p53 und den TA Isoformen verhindern oder die Reparatur mutierter p53-Proteine initiieren sollen (Hall und Muller 2019). (3) Unter Stressbedingungen kann p53 die Transkription von p73 aktivieren (Pietsch et al. 2008). Im HCC könnte es so durch fehlendes oder dysfunktionales p53 zu keiner oder einer geringeren Expression von p73 kommen, wodurch dieses die Repressorfunktion von p53 nicht ausreichend kompensieren kann. (4) Wie bereits beschrieben, hemmen trunkierte Isoformen ihre Wildtyp-Formen (Müller et al. 2006; Dötsch et al. 2010; Mundt et al. 2010), weswegen für die verstärkte *AFP*-Synthese in Hep3B-Zellen auch eine Inhibition von p63 und p73 durch deren Δ N-Formen verantwortlich sein kann. Jede dieser Hypothesen berücksichtigt, dass das erhöhte Serum-*AFP*-Level nicht in allen HCC-Fällen nachzuweisen ist. Yu et al. fanden nur in

10-20 % der HCC-Fälle ein erhöhtes AFP-Level im frühen Stadium, während in anderen Studien ein erhöhter AFP-Spiegel bei 70% der HCC-Patienten angegeben wird (Yu 2016; Wang 2018). Übereinstimmend damit deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass das Fehlen von TAp63 und TAp73 zu einer mangelnden *AFP*-Repression führen und damit die Tumorgenese begünstigen würde.

Von besonderer Bedeutung ist, dass neben p53, p63 und p73 auch die Δ N-Formen, nicht zuletzt durch ihre Interaktion mit den Wildtyp-Formen, eine entscheidende Rolle bei der *AFP* Regulation spielen. Gerade im Hinblick auf die neuere Rolle des AFP als tumorförderndes Protein werden durch diese Ergebnisse neue Grundlagen für eine eventuelle Therapie des HCC gelegt. Von besonderer klinischer Relevanz ist im nächsten Schritt das genaue Verständnis über die (Kreuz-)Regulationen von TA- und Δ N-Formen im Rahmen des p53-Netzwerks. Langfristig könnte man dann gezielt in diese Regulation eingreifen, um z.B. aktive TA-Formen der Tumorsuppressorproteine p53, p63, und p73 zu induzieren bzw. wiederherzustellen und somit der Tumorgenese, u.a. durch *AFP*-Repression, entgegenzuwirken.

5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte aller p53 Familien -Proteine auf die *AFP*-Transkription und Synthese mit Hilfe von qPCR und Western Blot und *in silico* Bindungsstellenanalysen des *AFP*-Gens untersucht. Hierbei wurde eine negative Regulation der *AFP*-Transkription durch p53, TAp63 und TAp73 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu vermindert Δ Np73 die *AFP*-Transkription nicht, beziehungsweise verstärkt sie sogar. Diese Erkenntnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der postnatalen *AFP*-Repression bzw. zum Verständnis, wie deren Aufhebung im HCC zustande kommt.

AFP ist ein wichtiger Bestandteil der Leberkrebsforschung, da es als tumorassoziiertes Antigen Apoptose in Leberkrebszellen hemmt und deren Proliferation fördert. Des Weiteren wird die Immunantwort im Leberkarzinom maßgeblich von AFP beeinflusst, indem AFP dendritische Zellen und NK-Zellen in ihrer Funktion hemmt bzw. deren Apoptose induziert, und dadurch eine Immunevasion ermöglicht (Yamamoto et al.

2011; Vujanovic et al. 2015; Vujanovic et al. 2017). So stellt AFP einen neuen wichtigen Angriffspunkt für die Immuntherapie des HCC dar, mit dem Ziel, neue Behandlungsoptionen zu eröffnen.

6 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit eine der häufigsten Tumorerkrankungen. Im Hinblick darauf, dass kurative Therapien wie die Lebertransplantation, die Resektion und lokal ablativ Verfahren nur im Anfangsstadium des HCC und nur für eine bestimmte Gruppe von Patienten möglich sind, ist es wichtig, neue Therapieansätze zu entwickeln, welche die Heilungschance und die Überlebensrate für Patienten mit HCC verbessern. Der Fokus der vorliegenden Arbeit richtet sich auf das Alpha-Fetoprotein (AFP), das im gesunden Lebergewebe eines Erwachsenen nur in geringen Mengen exprimiert wird, dessen Expression aber im tumorösen Gewebe stark verstärkt wird. Neben der daraus abgeleiteten Funktion als Tumormarker für das HCC, wirkt AFP auch als tumorförderndes Antigen. So kann sich eine gesteigerte AFP-Menge auf die Funktion antigenpräsentierender Zellen und natürlicher Killerzellen negativ auswirken. Diese Schwächung der Immunantwort kann dann zur verstärkten Onkogenese und verstärktem Tumorwachstum führen. Ein wichtiger Repressor von AFP ist das p53-Protein, das aber in über der Hälfte aller Tumore mutiert oder deletiert ist. Dadurch ist eine p53-vermittelte Repression der *AFP*-Expression nicht mehr möglich und AFP kann in malignen Zellen hochreguliert werden. Wenig untersucht hingegen sind die p53-Familienmitglieder TAp63, TAp73 und ihre dominant negativen Isoformen in Bezug auf die Regulation der *AFP*-Expression.

Die genauen Zusammenhänge zwischen der p53-Familie und der *AFP*-Expression wurden daher in dieser Arbeit auf molekularer Ebene untersucht. Dazu wurden Hep3B-Zellen mit Plasmiden, die Gene der p53-Familie (p53, TAp63, TAp73, und Δ Np73) enthielten, transfiziert und analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit p53, TAp63 und TAp73 zu einer Abnahme der AFP-Menge führte. Δ Np73 zeigte keinen suppressiven Effekt auf die AFP Proteinmenge; im Gegenteil Δ Np73 führte zu einer Induktion von AFP. Dies unterstreicht die onkogenen Eigenschaften der Δ N-Formen der p53 Familie in der Regulation von *AFP* im HCC.

Darüber hinaus ergab eine Bindungsstellenanalyse, dass in der Promotorregion und innerhalb der Intronabschnitte des *AFP*-Gens Bindungsstellen für p53, TAp63 und TAp73 vorliegen.

Damit konnte durch diese Dissertation erstmals gezeigt werden, dass

- (1) p63 ein hier erstmals beschriebener Repressor des *AFP*-Gens ist und somit die Funktion von p53 und TAp73 in der *AFP*-Regulation unterstützt
- (2) Δ Np73 aktivierende Eigenschaften in Bezug auf die *AFP*-Transkription besitzt und sich somit antagonistisch zu p73 verhält,
- (3) Δ Np73 aktivierend auf die *AFP* Expression wirkt, was wiederum die Onkogenität der trunkierten Isoformen der p53 Familie im HCC unterstreicht
- (4) in Intron 1-4 des *AFP*-Gens Bindungsstellen für p53 Familienmitglieder lokalisiert sind
- (5) sowohl der *AFP*-Promotor als auch Intron 1-4 des *AFP*-Gens Bindungsstellen für TAp63 aufweisen.

Gerade im Hinblick auf *AFP* als onkogenes Protein werden durch diese Ergebnisse Grundlagen für die Entwicklung möglicher neuer Therapieoptionen für das HCC gelegt.

Literaturverzeichnis

Abdel-Aziz, Mohamed M.; Elshal, Mohamed F.; Abass, Aymn T.; El-Kafrawy, Sherif; Ezzat, Sameera; Abdel-Wahab, Mohamed (2016): Comparison of AFP-L3 and p53 Antigen Concentration with Alpha-Fetoprotein as Serum Markers for Hepatocellular Carcinoma. In: *Clinical laboratory* 62 (6), S. 1121–1129. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.151102.

Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B. B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. In: *Nature* 282 (5739), S. 615–616.

Alisa, Akeel; Ives, Annette; Pathan, Ansar A.; Navarrete, Cristina V.; Williams, Roger; Bertolotti, Antonio; Behboudi, Shahriar (2005): Analysis of CD4+ T-Cell responses to a novel alpha-fetoprotein-derived epitope in hepatocellular carcinoma patients. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (18), S. 6686–6694. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0382.

Allocati, N.; Di Ilio, C.; Laurenzi, V. de (2012): p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. In: *Exp Cell Res* 318 (11), S. 1285–1290. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.01.023.

Amelio, Ivano; Grespi, Francesca; Annicchiarico-Petruzzelli, Margherita; Melino, Gerry (2012): p63 the guardian of human reproduction. In: *Cell Cycle* 11 (24), S. 4545–4551. DOI: 10.4161/cc.22819.

Andersen, Malin C.; Engstrom, Par G.; Lithwick, Stuart; Arenillas, David; Eriksson, Per; Lenhard, Boris et al. (2008): In silico detection of sequence variations modifying transcriptional regulation. In: *PLoS computational biology* 4 (1), e5. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0040005.

Barak, Y.; Gottlieb, E.; Juven-Gershon, T.; Oren, M. (1994): Regulation of mdm2 expression by p53. Alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. In: *Genes Dev* 8 (15), S. 1739–1749.

Beyer, Ulrike; Moll-Rocek, Julian; Moll, Ute M.; Dobbelstein, Matthias (2011): Endogenous retrovirus drives hitherto unknown proapoptotic p63 isoforms in the

male germ line of humans and great apes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (9), S. 3624–3629. DOI: 10.1073/pnas.1016201108.

Boutelle, Anthony M.; Attardi, Laura D. (2021): p53 and Tumor Suppression. It Takes a Network. In: *Trends in cell biology*. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.12.011.

Bruix, Jordi; Qin, Shukui; Merle, Philippe; Granito, Alessandro; Huang, Yi-Hsiang; Bodoky, György et al. (2017): Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE). A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. In: *Lancet (London, England)* 389 (10064), S. 56–66. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32453-9.

Brunner, H. G.; Hamel, B C J; van Bokhoven, H. (2002): The p63 gene in EEC and other syndromes. In: *J Med Genet* 39 (6), S. 377–381.

Butterfield, L. H.; Meng, W. S.; Koh, A.; Vollmer, C. M.; Ribas, A.; Dissette, V. B. et al. (2001): T cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (8), S. 5300–5308. DOI: 10.4049/jimmunol.166.8.5300.

Camper, S. A.; Tilghman, S. M. (1989): Postnatal repression of the alpha-fetoprotein gene is enhancer independent. In: *Genes Dev* 3 (4), S. 537–546.

Candi, Eleonora; Dinsdale, David; Rufini, Alessandro; Salomoni, Paolo; Knight, Richard A.; Mueller, Martina et al. (2007): TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (3), S. 274–285. DOI: 10.4161/cc.6.3.3797.

Chipuk, Jerry E.; Kuwana, Tomomi; Bouchier-Hayes, Lisa; Droin, Nathalie M.; Newmeyer, Donald D.; Schuler, Martin; Green, Douglas R. (2004): Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5660), S. 1010–1014. DOI: 10.1126/science.1092734.

Cui, Rutao; Nguyen, Thi T.; Taube, Joseph H.; Stratton, Sabrina A.; Feuerman, Miriam H.; Barton, Michelle Craig (2005): Family members p53 and p73 act together in chromatin modification and direct repression of alpha-fetoprotein transcription. In: *J Biol Chem* 280 (47), S. 39152–39160. DOI: 10.1074/jbc.M504655200.

- Debruyne, Evi N.; Delanghe, Joris R. (2008): Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. In: *Clin Chim Acta* 395 (1-2), S. 19–26. DOI: 10.1016/j.cca.2008.05.010.
- DeYoung, Maurice Phillip; Johannessen, Cory M.; Leong, Chee-Onn; Faquin, William; Rocco, James W.; Ellisen, Leif W. (2006): Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. In: *Cancer Res* 66 (19), S. 9362–9368. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1619.
- Di Bisceglie, Adrian M; Sterling, Richard K.; Chung, Raymond T.; Everhart, James E.; Dienstag, Jules L.; Bonkovsky, Herbert L. et al. (2005): Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. In: *J Hepatol* 43 (3), S. 434–441.
- Donehower, L. A.; Harvey, M.; Slagle, B. L.; McArthur, M. J.; Montgomery, C. A., JR; Butel, J. S.; Bradley, A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. In: *Nature* 356 (6366), S. 215–221. DOI: 10.1038/356215a0.
- Dötsch, V.; Bernassola, F.; Coutandin, D.; Candi, E.; Melino, G. (2010): p63 and p73, the ancestors of p53. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (9), a004887. DOI: 10.1101/cshperspect.a004887.
- EASL Clinical Practice Guidelines. Management of hepatocellular carcinoma (2018). In: *Journal of hepatology* 69 (1), S. 182–236.
- EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma (2012). In: *J Hepatol* 56 (4), S. 908–943.
- Finn, Richard S.; Qin, Shukui; Ikeda, Masafumi; Galle, Peter R.; Ducreux, Michel; Kim, Tae-You et al. (2020): Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 382 (20), S. 1894–1905. DOI: 10.1056/NEJMoa1915745.
- Fisher, Matthew L.; Balinth, Seamus; Mills, Alea A. (2020): p63-related signaling at a glance. In: *Journal of cell science* 133 (17). DOI: 10.1242/jcs.228015.
- Flores, Elsa R.; Sengupta, Shomit; Miller, John B.; Newman, Jamie J.; Bronson, Roderick; Crowley, Denise et al. (2005): Tumor predisposition in mice mutant for p63

and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. In: *Cancer Cell* 7 (4), S. 363–373. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.02.019.

Friedel, Laura; Loewer, Alexander (2021): The guardian's choice. How p53 enables context-specific decision-making in individual cells. In: *The FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15767.

Gabant, Philippe; Forrester, Lesley; Nichols, Jennifer; van Reeth, Thierry; Mees, Christelle de; Pajack, Bernard et al. (2002): Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (20), S. 12865–12870. DOI: 10.1073/pnas.202215399.

Galle, Peter R.; Foerster, Friedrich; Kudo, Masatoshi; Chan, Stephen L.; Llovet, Josep M.; Qin, Shukui et al. (2019): Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 39 (12), S. 2214–2229. DOI: 10.1111/liv.14223.

Ghioni, Pamela; Bolognese, Fabrizio; Duijf, Pascal H G; van Bokhoven, Hans; Mantovani, Roberto; Guerrini, Luisa (2002): Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. In: *Mol Cell Biol* 22 (24), S. 8659–8668.

Gillespie, J. R.; Uversky, V. N. (2000): Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview. In: *Biochim Biophys Acta* 1480 (1-2), S. 41–56.

González, Raúl; La Rosa, Ángel J. de; Rufini, Alessandro; Rodríguez-Hernández, María A.; Navarro-Villarán, Elena; Marchal, Trinidad et al. (2017): Role of p63 and p73 isoforms on the cell death in patients with hepatocellular carcinoma submitted to orthotopic liver transplantation. In: *PloS one* 12 (3), e0174326. DOI: 10.1371/journal.pone.0174326.

Gressner, Olav; Schilling, Tobias; Lorenz, Katja; Schulze Schleithoff, Elisa; Koch, Andreas; Schulze-Bergkamen, Henning et al. (2005): TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. In: *EMBO J* 24 (13), S. 2458–2471. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600708.

Hall, Callum; Muller, Patricia A. J. (2019): The Diverse Functions of Mutant 53, Its Family Members and Isoforms in Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 20 (24). DOI: 10.3390/ijms20246188.

Harper, M. E.; Dugaiczyk, A. (1983): Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. In: *Am J Hum Genet* 35 (4), S. 565–572.

Haupt, Y.; Maya, R.; Kazaz, A.; Oren, M. (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. In: *Nature* 387 (6630), S. 296–299. DOI: 10.1038/387296a0.

Hiroishi, Kazumasa; Eguchi, Junichi; Baba, Toshiyuki; Shimazaki, Tomoe; Ishii, Shigeaki; Hiraide, Ayako et al. (2010): Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. In: *Journal of gastroenterology* 45 (4), S. 451–458. DOI: 10.1007/s00535-009-0155-2.

Hussain, S. P.; Schwank, J.; Staib, F.; Wang, X. W.; Harris, C. C. (2007): TP53 mutations and hepatocellular carcinoma. Insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. In: *Oncogene* 26 (15), S. 2166–2176. DOI: 10.1038/sj.onc.1210279.

Ingram, R. S.; Scott, R. W.; Tilghman, S. M. (1981): alpha-Fetoprotein and albumin genes are in tandem in the mouse genome. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (8), S. 4694–4698.

Jacobs, W. Bradley; Govoni, Gregory; Ho, Daniel; Atwal, Jasvinder K.; Barnabe-Heider, Fanie; Keyes, William M. et al. (2005): p63 is an essential proapoptotic protein during neural development. In: *Neuron* 48 (5), S. 743–756. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.10.027.

Jindal, Aastha; Thadi, Anusha; Shailubhai, Kunwar (2019): Hepatocellular Carcinoma. Etiology and Current and Future Drugs. In: *Journal of clinical and experimental hepatology* 9 (2), S. 221–232. DOI: 10.1016/j.jceh.2019.01.004.

Kaghad, M.; Bonnet, H.; Yang, A.; Creancier, L.; Biscan, J. C.; Valent, A. et al. (1997): Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. In: *Cell* 90 (4), S. 809–819. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80540-1.

Kartasheva, Natalia N.; Contente, Ana; Lenz-Stöppler, Claudia; Roth, Judith; Dobbelstein, Matthias (2002): p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. In: *Oncogene* 21 (31), S. 4715–4727. DOI: 10.1038/sj.onc.1205584.

- Kawai, H. F.; Kaneko, S.; Honda, M.; Shirota, Y.; Kobayashi, K. (2001): alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. In: *Hepatology* 33 (3), S. 676–691. DOI: 10.1053/jhep.2001.22500.
- Kerkeni SS. Prognose relevante Zielgene der p53-Familie beim Hepatozellulärem Karzinom [med. Dissertation]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität; 2013
- Krammer PH, Kaminski M, Kiessling M, Gülow K: No life without death. In: *Adv. Cancer Res.* 2007. DOI: 10.1016/S0065-230X(06)97005-5.
- Kudo, Masatoshi (2019): Cabozantinib for advanced hepatocellular carcinoma. In: *Hepatobiliary surgery and nutrition* 8 (2), S. 153–156. DOI: 10.21037/hbsn.2018.11.22.
- Kumamoto, Hiroyuki; Ohki, Kousuke; Ooya, Kiyoshi (2005): Expression of p63 and p73 in ameloblastomas. In: *J Oral Pathol Med* 34 (4), S. 220–226. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2005.00284.x.
- Kunst, C., Haderer, M., Heckel, S., Schlosser, S., Müller, M. (2016): The p53 family in hepatocellular carcinoma. In: *Translational Cancer Research* (5 (6)), S. 632–638. DOI: 10.21037/tcr.2016.11.79.
- Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. (1996): Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. In: *Science* 274 (5289), S. 948–953.
- Lahalle, Aïrelle; Lacroix, Matthieu; Blasio, Carlo de; Cissé, Madi Y.; Linares, Laetitia K.; Le Cam, Laurent (2021): The p53 Pathway and Metabolism. The Tree That Hides the Forest. In: *Cancers* 13 (1). DOI: 10.3390/cancers13010133.
- Law, Jodi Woan-Fei; Ab Mutalib, Nurul-Syakima; Chan, Kok-Gan; Lee, Learn-Han (2014): Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. In: *Front Microbiol* 5, S. 770. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00770.
- Lazarevich, N. L. (2000): Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 65 (1), S. 117–133.

Lee, K. C.; Crowe, A. J.; Barton, M. C. (1999): p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. In: *Molecular and cellular biology* 19 (2), S. 1279–1288. DOI: 10.1128/mcb.19.2.1279.

Lersritwimanmaen, Patharapan; Nimanong, Supot (2018): Hepatocellular Carcinoma Surveillance. Benefit of Serum Alfa-fetoprotein in Real-world Practice. In: *Euroasian journal of hepato-gastroenterology* 8 (1), S. 83–87. DOI: 10.5005/jp-journals-10018-1268.

Leu, J. I-Ju; Dumont, Patrick; Hafey, Michael; Murphy, Maureen E.; George, Donna L. (2004): Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. In: *Nature cell biology* 6 (5), S. 443–450. DOI: 10.1038/ncb1123.

Levine, A. J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. In: *Cell* 88 (3), S. 323–331. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81871-1.

Levine, Arnold J.; Oren, Moshe (2009 Oct): The first 30 years of p53. Growing ever more complex.

Levrero, M.; Laurenzi, V. de; Costanzo, A.; Gong, J.; Wang, J. Y.; Melino, G. (2000): The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. In: *J Cell Sci* 113 (Pt 10), S. 1661–1670.

Liu, Chi Leung; Fan, Sheung Tat (2006): Adult-to-adult live-donor liver transplantation: the current status. In: *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 13 (2), S. 110–116. DOI: 10.1007/s00534-005-1016-x.

Liu, Dongming; Luo, Yi; Chen, Lu; Chen, Liwei; Zuo, Duo; Li, Yueguo et al. (2021): Diagnostic value of 5 serum biomarkers for hepatocellular carcinoma with different epidemiological backgrounds. A large-scale, retrospective study. In: *Cancer biology & medicine* 18 (1), S. 256–270. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0207.

Looijenga, Leendert H J (2009): Human testicular (non)seminomatous germ cell tumours: the clinical implications of recent pathobiological insights. In: *J Pathol* 218 (2), S. 146–162. DOI: 10.1002/path.2522.

MacLusky, N. J.; Naftolin, F. (1981): Sexual differentiation of the central nervous system. In: *Science* 211 (4488), S. 1294–1302.

Marcel, V.; Dichtel-Danjou, M-L; Sagne, C.; Hafsi, H.; Ma, D.; Ortiz-Cuaran, S. et al. (2011): Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal

and cellular models. In: *Cell Death Differ* 18 (12), S. 1815–1824. DOI: 10.1038/cdd.2011.120.

Matalova, E.; Fleischmannova, J.; Sharpe, P. T.; Tucker, A. S. (2008): Tooth agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry. In: *J Dent Res* 87 (7), S. 617–623.

Mathelier, Anthony; Fornes, Oriol; Arenillas, David J.; Chen, Chih-Yu; Denay, Gregoire; Lee, Jessica et al. (2016): JASPAR 2016. A major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. In: *Nucleic Acids Res* 44 (D1), D110-5. DOI: 10.1093/nar/gkv1176.

Matys, V.; Fricke, E.; Geffers, R.; Gossling, E.; Haubrock, M.; Hehl, R. et al. (2003): TRANSFAC. Transcriptional regulation, from patterns to profiles. In: *Nucleic Acids Res* 31 (1), S. 374–378.

Mavinahalli, Jagadeesh N.; Madhumalar, Arumugam; Beuerman, Roger W.; Lane, David P.; Verma, Chandra (2010): Differences in the transactivation domains of p53 family members: a computational study. In: *BMC Genomics* 11 Suppl 1, S5. DOI: 10.1186/1471-2164-11-S1-S5.

Melino, G. (2020): Molecular Mechanisms and Function of the p53 Protein Family Member - p73. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 85 (10), S. 1202–1209. DOI: 10.1134/S0006297920100089.

Menendez, Daniel; Inga, Alberto; Resnick, Michael A. (2009): The expanding universe of p53 targets. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (10), S. 724–737. DOI: 10.1038/nrc2730.

Meng, Xuan; Franklin, Derek A.; Dong, Jiahong; Zhang, Yanping (2014): MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. In: *Cancer Res* 74 (24), S. 7161–7167. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1446.

Michael, Dan; Oren, Moshe (2003): The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. In: *Seminars in cancer biology* 13 (1), S. 49–58.

Mihara, Motohiro; Erster, Susan; Zaika, Alexander; Petrenko, Oleksi; Chittenden, Thomas; Pancoska, Petr; Moll, Ute M. (2003): p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. In: *Molecular cell* 11 (3), S. 577–590. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00050-9.

Mills, A. A.; Zheng, B.; Wang, X. J.; Vogel, H.; Roop, D. R.; Bradley, A. (1999): p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. In: *Nature* 398 (6729), S. 708–713. DOI: 10.1038/19531.

Mizejewski, Gerald J. (2007): The alpha-fetoprotein-derived growth inhibitory peptide 8-mer fragment. Review of a novel anticancer agent. In: *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 22 (1), S. 73–98. DOI: 10.1089/cbr.2006.343.

Mizejewski, Gerald J. (2011): Mechanism of Cancer Growth Suppression of Alpha-Fetoprotein Derived Growth Inhibitory Peptides (GIP). Comparison of GIP-34 versus GIP-8 (AFPep). Updates and Prospects. In: *Cancers* 3 (2), S. 2709–2733. DOI: 10.3390/cancers3022709.

Moll, Ute M.; Petrenko, Oleksi (2003): The MDM2-p53 interaction. In: *Molecular cancer research : MCR* 1 (14), S. 1001–1008.

Momand, J.; Zambetti, G. P.; Olson, D. C.; George, D.; Levine, A. J. (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. In: *Cell* 69 (7), S. 1237–1245.

Morinaga, T.; Sakai, M.; Wegmann, T. G.; Tamaoki, T. (1983): Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (15), S. 4604–4608.

Muehleemann, M.; Miller, K. D.; Dauphinee, M.; Mizejewski, G. J. (2005): Review of Growth Inhibitory Peptide as a biotherapeutic agent for tumor growth, adhesion, and metastasis. In: *Cancer metastasis reviews* 24 (3), S. 441–467. DOI: 10.1007/s10555-005-5135-2.

Muller, Patricia A. J.; Vousden, Karen H.; Norman, Jim C. (2011): p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. In: *J Cell Biol* 192 (2), S. 209–218. DOI: 10.1083/jcb.201009059.

Müller, M.; Schilling, T.; Sayan, A. E.; Kairat, A.; Lorenz, K.; Schulze-Bergkamen, H. et al. (2005): TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. In: *Cell death and differentiation* 12 (12), S. 1564–1577. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401774.

Müller, M.; Wilder, S.; Bannasch, D.; Israeli, D.; Lehlbach, K.; Li-Weber, M. et al. (1998): p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by

anticancer drugs. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (11), S. 2033–2045. DOI: 10.1084/jem.188.11.2033.

Müller, Martina; Schleithoff, Elisa Schulze; Stremmel, Wolfgang; Melino, Gerry; Krammer, Peter H.; Schilling, Tobias (2006): One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. In: *Drug Resist Updat* 9 (6), S. 288–306. DOI: 10.1016/j.drug.2007.01.001.

Muller, Patricia A J; Vousden, Karen H. (2014): Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. In: *Cancer Cell* 25 (3), S. 304–317. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.021.

Mundt, Heiko M.; Stremmel, Wolfgang; Melino, Gerry; Krammer, Peter H.; Schilling, Tobias; Müller, Martina (2010): Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. In: *Biochemical and biophysical research communications* 396 (2), S. 335–341. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.093.

Murray-Zmijewski, F.; Lane, D. P.; Bourdon, J-C (2006): p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. In: *Cell Death Differ* 13 (6), S. 962–972. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401914.

Nakabayashi, H.; Hashimoto, T.; Miyao, Y.; Tjong, K. K.; Chan, J.; Tamaoki, T. (1991): A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha-fetoprotein expression in human hepatoma. In: *Mol Cell Biol* 11 (12), S. 5885–5893.

Nakagawa, Takahito; Takahashi, Masato; Ozaki, Toshinori; Watanabe Ki, Ken-ichi; Todo, Satoru; Mizuguchi, Hiroyuki et al. (2002): Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. In: *Molecular and cellular biology* 22 (8), S. 2575–2585. DOI: 10.1128/mcb.22.8.2575-2585.2002.

Niikura, Yohei; Dixit, Amruta; Scott, Ray; Perkins, Guy; Kitagawa, Katsumi (2007): BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. In: *J Cell Biol* 178 (2), S. 283–296. DOI: 10.1083/jcb.200702134.

Ninomiya, Toshiaki; Mihara, Koichiro; Fushimi, Kazuo; Hayashi, Yoshitake; Hashimoto-Tamaoki, Tomoko; Tamaoki, Taiki (2002): Regulation of the alpha-fetoprotein gene by the isoforms of ATF1 transcription factor in human hepatoma. In: *Hepatology* 35 (1), S. 82–87. DOI: 10.1053/jhep.2002.30420.

- Nogales, Francisco F.; Preda, Ovidiu; Nicolae, Alina (2012): Yolk sac tumours revisited. A review of their many faces and names. In: *Histopathology* 60 (7), S. 1023–1033. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03889.x.
- Ogden, S. K.; Lee, K. C.; Wernke-Dollries, K.; Stratton, S. A.; Aronow, B.; Barton, M. C. (2001): p53 targets chromatin structure alteration to repress alpha-fetoprotein gene expression. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (45), S. 42057–42062. DOI: 10.1074/jbc.C100381200.
- Osterburg, Christian; Osterburg, Susanne; Zhou, Huiqing; Missero, Caterina; Dötsch, Volker (2021): Isoform-Specific Roles of Mutant p63 in Human Diseases. In: *Cancers* 13 (3). DOI: 10.3390/cancers13030536.
- Pedrazzoli, Paolo; Rosti, Giovanni; Soresini, Eleonora; Ciani, Silvia; Secondino, Simona (2021): Serum tumour markers in germ cell tumours. From diagnosis to cure. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 159, S. 103224. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103224.
- Pelc A. Charakterisierung von Zielgenexpressionsprofilen der p53-Familie und ihrer prognostischen Relevanz beim hepatozellulären Karzinom (HCC) [Med. Dissertation]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität; 2015
- Perry, Mary Ellen (2010): The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (1), a000968. DOI: 10.1101/cshperspect.a000968.
- Peterson, Martha L.; Ma, Chunhong; Spear, Brett T. (2011): Zhx2 and Zbtb20. Novel regulators of postnatal alpha-fetoprotein repression and their potential role in gene reactivation during liver cancer. In: *Seminars in cancer biology* 21 (1), S. 21–27. DOI: 10.1016/j.semcancer.2011.01.001.
- Petitjean, Audrey; Cavard, Catherine; Shi, Hong; Tribollet, Violaine; Hainaut, Pierre; Caron de Fromentel, Claude (2005): The expression of TA and DeltaNp63 are regulated by different mechanisms in liver cells. In: *Oncogene* 24 (3), S. 512–519. DOI: 10.1038/sj.onc.1208215.
- Pfaffl, M. W. (2004): Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. In: *Biospektrum* 10 (1), S. 92–95.

- Pflaum, Johanna; Schlosser, Sophie; Muller, Martina (2014): p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. In: *Front Oncol* 4, S. 285. DOI: 10.3389/fonc.2014.00285.
- Pietsch, E. C.; Sykes, S. M.; McMahon, S. B.; Murphy, M. E. (2008): The p53 family and programmed cell death. In: *Oncogene* 27 (50), S. 6507–6521. DOI: 10.1038/onc.2008.315.
- Pitolli, Consuelo; Wang, Ying; Candi, Eleonora; Shi, Yufang; Melino, Gerry; Amelio, Ivano (2019): p53-Mediated Tumor Suppression. DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. In: *Cancers* 11 (12). DOI: 10.3390/cancers11121983.
- Pons, Fernando; Varela, Maria; Llovet, Josep M. (2005): Staging systems in hepatocellular carcinoma. In: *HPB (Oxford)* 7 (1), S. 35–41. DOI: 10.1080/13651820410024058.
- Pozniak, C. D.; Radinovic, S.; Yang, A.; McKeon, F.; Kaplan, D. R.; Miller, F. D. (2000): An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. In: *Science* 289 (5477), S. 304–306.
- Rich, Nicole; Singal, Amit G. (2014): Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. In: *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28 (5), S. 843–853. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.07.018.
- Riley, Todd; Sontag, Eduardo; Chen, Patricia; Levine, Arnold (2008): Transcriptional control of human p53-regulated genes. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (5), S. 402–412. DOI: 10.1038/nrm2395.
- Rinne, Tuula; Brunner, Hans G.; van Bokhoven, Hans (2007): p63-associated disorders. In: *Cell Cycle* 6 (3), S. 262–268.
- Rocco, James W.; Leong, Chee-Onn; Kuperwasser, Nicolas; DeYoung, Maurice Phillip; Ellisen, Leif W. (2006): p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. In: *Cancer Cell* 9 (1), S. 45–56. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.12.013.
- Rodriguez, M. S.; Desterro, J. M.; Lain, S.; Lane, D. P.; Hay, R. T. (2000): Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. In: *Mol Cell Biol* 20 (22), S. 8458–8467.

Rufini, Alessandro; Weil, Miguel; McKeon, Frank; Barlattani, Alberto; Melino, Gerry; Candi, Eleonora (2006): p63 protein is essential for the embryonic development of vibrissae and teeth. In: *Biochem Biophys Res Commun* 340 (3), S. 737–741. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.065.

Sakai, M.; Morinaga, T.; Urano, Y.; Watanabe, K.; Wegmann, T. G.; Tamaoki, T. (1985): The human alpha-fetoprotein gene. Sequence organization and the 5' flanking region. In: *J Biol Chem* 260 (8), S. 5055–5060.

Sandelin, Albin; Alkema, Wynand; Engstrom, Par; Wasserman, Wyeth W.; Lenhard, Boris (2004): JASPAR. An open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. In: *Nucleic Acids Res* 32 (Database issue), D91-4. DOI: 10.1093/nar/gkh012.

Schilling, Tobias; Kairat, Astrid; Melino, Gerry; Krammer, Peter H.; Stremmel, Wolfgang; Oren, Moshe; Müller, Martina (2010): Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. In: *Biochemical and biophysical research communications* 394 (3), S. 817–823. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.082.

Schilling, Tobias; Schleithoff, Elisa Schulze; Kairat, Astrid; Melino, Gerry; Stremmel, Wolfgang; Oren, Moshe et al. (2009): Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. In: *Biochemical and biophysical research communications* 387 (2), S. 399–404. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.07.063.

Schuster, André; Schilling, Tobias; Laurenzi, Vincenzo de; Koch, Andreas F.; Seitz, Sarah; Staib, Frank et al. (2010): $\Delta Np73\beta$ is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (13), S. 2629–2639. DOI: 10.4161/cc.9.13.12110.

Schohy, S.; Gabant, P.; Szpirer, C.; Szpirer, J. (2000): Identification of an enhancer and an alternative promoter in the first intron of the alpha-fetoprotein gene. In: *Nucleic Acids Res* 28 (19), S. 3743–3751.

Seitz, Sarah J.; Schleithoff, Elisa Schulze; Koch, Andreas; Schuster, André; Teufel, Andreas; Staib, Frank et al. (2010): Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. In: *International journal of cancer* 126 (9), S. 2049–2066. DOI: 10.1002/ijc.24861.

Sempere et al. (2006): Follicular adenomatoid odontogenic tumor: immunohistochemical study. In: *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11 (4), E305-8.

Sethi, Isha; Romano, Rose-Anne; Gluck, Christian; Smalley, Kirsten; Vojtesek, Borivoj; Buck, Michael J.; Sinha, Satrajit (2015): A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. In: *BMC genomics* 16, S. 584. DOI: 10.1186/s12864-015-1793-9.

Setiyono, Agus; Budiayati, Akterono D.; Purwantomo, Sigit; Anggelia, Madonna R.; Fanany, Ismail; Wibowo, Gunawan A. et al. (2011): Immunoregulatory effects of AFP domains on monocyte-derived dendritic cell function. In: *BMC immunology* 12, S. 4. DOI: 10.1186/1471-2172-12-4.

Shi, Yong; Norberg, Erik; Vakifahmetoglu-Norberg, Helin (2020): Mutant p53 as a Regulator and Target of Autophagy. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 607149. DOI: 10.3389/fonc.2020.607149.

Snizek, Joseph C.; Matheny, Keith E.; Westfall, Mathew D.; Pietenpol, Jennifer A. (2004): Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. In: *The Laryngoscope* 114 (12), S. 2063–2072. DOI: 10.1097/01.mlg.0000149437.35855.4b.

Spear, B. T. (1994): Mouse alpha-fetoprotein gene 5' regulatory elements are required for postnatal regulation by raf and Rif. In: *Mol Cell Biol* 14 (10), S. 6497–6505.

Stiewe, Thorsten; Theseling, Carmen C.; Pützer, Brigitte M. (2002): Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding. Implications for tumorigenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (16), S. 14177–14185. DOI: 10.1074/jbc.M200480200.

Stindt, M. H.; Muller, P. A. J.; Ludwig, R. L.; Kehrlöesser, S.; Dotsch, V.; Vousden, K. H. (2015): Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. In: *Oncogene* 34 (33), S. 4300–4310. DOI: 10.1038/onc.2014.359.

Strano, Sabrina; Fontemaggi, Giulia; Costanzo, Antonio; Rizzo, Maria Giulia; Monti, Olimpia; Baccarini, Alessia et al. (2002): Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. In: *J Biol Chem* 277 (21), S. 18817–18826. DOI: 10.1074/jbc.M201405200.

Suh, Eun-Kyung; Yang, Annie; Kettenbach, Arminja; Bamberger, Casimir; Michaelis, Ala H.; Zhu, Zhou et al. (2006): p63 protects the female germ line during meiotic arrest. In: *Nature* 444 (7119), S. 624–628. DOI: 10.1038/nature05337.

Surget, Sylvanie; Khoury, Marie P.; Bourdon, Jean-Christophe (2013): Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. In: *Oncotargets Ther* 7, S. 57–68. DOI: 10.2147/OTT.S53876.

Tadini, G.; Santagada, F.; Brena, M.; Pezzani, L.; Nannini, P. (2013): Ectodermal dysplasias: the p63 tail. In: *G Ital Dermatol Venereol* 148 (1), S. 53–58.

Tomasini, Richard; Tsuchihara, Katsuya; Tsuda, Chiharu; Lau, Suzanne K.; Wilhelm, Margareta; Ruffini, Alessandro et al. (2009): TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (3), S. 797–802. DOI: 10.1073/pnas.0812096106.

Tomasini, Richard; Tsuchihara, Katsuya; Wilhelm, Margareta; Fujitani, Masashi; Ruffini, Alessandro; Cheung, Carol C. et al. (2008): TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. In: *Genes Dev* 22 (19), S. 2677–2691. DOI: 10.1101/gad.1695308.

Tomita, York; Marchenko, Natasha; Erster, Susan; Nemajerova, Alice; Dehner, Alexander; Klein, Christian et al. (2006): WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (13), S. 8600–8606. DOI: 10.1074/jbc.M507611200.

Vousden, Karen H.; Lu, Xin (2002): Live or let die: the cell's response to p53. In: *Nat Rev Cancer* 2 (8), S. 594–604. DOI: 10.1038/nrc864.

Vousden, Karen H.; Prives, Carol (2009): Blinded by the Light. The Growing Complexity of p53. In: *Cell* 137 (3), S. 413–431. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.

Vujanovic, Lazar; Stahl, Elizabeth; Pardee, Angela; Watkins, Simon; Gibson, Gregory; Butterfield, Lisa H. (2015): Tumor-derived alpha fetoprotein directly impacts human natural killer cell activity and viability. In: *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 3 (2), P289. DOI: 10.1186/2051-1426-3-S2-P289.

Vujanovic, Lazar; Stahl, Elizabeth C.; Pardee, Angela D.; Geller, David A.; Tsung, Allan; Watkins, Simon C. et al. (2017): Tumor-Derived α -Fetoprotein Directly Drives

- Human Natural Killer-Cell Activation and Subsequent Cell Death. In: *Cancer immunology research* 5 (6), S. 493–502. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0216.
- Wang, Xiaoping; Wang, Qiaoxia (2018): Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. In: *Canadian journal of gastroenterology & hepatology* 2018, S. 9049252. DOI: 10.1155/2018/9049252.
- Weber, Anette; Bellmann, Ulf; Bootz, Friedrich; Wittekind, Christian; Tannapfel, Andrea (2002): Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *Int J Cancer* 99 (1), S. 22–28.
- Weber, J. D.; Taylor, L. J.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J.; Bar-Sagi, D. (1999): Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. In: *Nat Cell Biol* 1 (1), S. 20–26. DOI: 10.1038/8991.
- Wild, C.; Weiderpass, E.; Stewart, B. W. (2020): World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention. Online verfügbar unter <http://publications.iarc.fr/586>.
- Wilkinson D.S., Barton M.C. (2008): Tumor Suppressors p53 and TGF β Converge to Regulate the Alpha-Fetoprotein Oncodevelopmental Tumor Marker. In: *Jakowlew S.B. (eds) Transforming Growth Factor- β in Cancer Therapy, Springer, II*, S. 309–320.
- Yamamoto, M.; Tatsumi, T.; Miyagi, T.; Tsunematsu, H.; Aketa, H.; Hosui, A. et al. (2011): α -Fetoprotein impairs activation of natural killer cells by inhibiting the function of dendritic cells. In: *Clinical and experimental immunology* 165 (2), S. 211–219. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04421.x.
- Yang, A.; Kaghad, M.; Wang, Y.; Gillett, E.; Fleming, M. D.; Dötsch, V. et al. (1998): p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. In: *Molecular cell* 2 (3), S. 305–316. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80275-0.
- Yang, A.; Schweitzer, R.; Sun, D.; Kaghad, M.; Walker, N.; Bronson, R. T. et al. (1999): p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. In: *Nature* 398 (6729), S. 714–718. DOI: 10.1038/19539.
- Yang, Ju Dong; Hainaut, Pierre; Gores, Gregory J.; Amadou, Amina; Plymoth, Amelie; Roberts, Lewis R. (2019a): A global view of hepatocellular carcinoma.

Trends, risk, prevention and management. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 16 (10), S. 589–604. DOI: 10.1038/s41575-019-0186-y.

Yu, Su Jong (2016): A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world. 2010-2016. In: *Clinical and molecular hepatology* 22 (1), S. 7–17. DOI: 10.3350/cmh.2016.22.1.7.

Zalcenstein, Amir; Stambolsky, Perry; Weisz, Lilach; Müller, Martina; Wallach, David; Goncharov, Tanya M. et al. (2003): Mutant p53 gain of function. Repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. In: *Oncogene* 22 (36), S. 5667–5676. DOI: 10.1038/sj.onc.1206724.

Zhu, Andrew X.; Kang, Yoon-Koo; Yen, Chia-Jui; Finn, Richard S.; Galle, Peter R.; Llovet, Josep M. et al. (2019): Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2). A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 20 (2), S. 282–296. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30937-9.

<http://www.uniprot.org/uniprot/P02771>, Aufgerufen am 20.01.2018

http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/transfac/current/TRANSFAC_User_Manual.pdf, S. 9, Aufgerufen am 15.01.2018

http://www.cisreg.ca/RAVEN/RAVEN_web/includes/RAVEN_tutorial.pdf, S.2 und 6, Aufgerufen am 15.01.2018

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000081051;r=4:73431138-73456174, Aufgerufen am 27.08.2016 und 10.01.2018

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_86062703?lang=de®ion=DE, Aufgerufen am 10.01.2018

The World Cancer Observatory 2020:

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>, Aufgerufen am 26.01.2021

Zentrum für Krebsregisterdaten:

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leberkrebs/leberkrebs_nod_e.html, Aufgerufen am 26.01.2021

Lebenslauf

Name: Elisabeth Franziska Ostheim
Geboren am: 05. März 1991 in Landshut
Wohnsitz: Morgenbacher Str. 7
82401 Rottenbuch

Beruflicher und schulisch-akademischer Werdegang:

07/2010	Allgemeine Hochschulreife Gymnasium Vilshofen
10/2010 – 04/2011	Studium B.Sc. Chemie an der Universität Regensburg
04/2011 – 07/2016	Studium Zahnmedizin an der Universität Regensburg
07/2016	Approbation als Zahnärztin
11/2016 – 11/2018	Assistenz Zahnärztin in Oberammergau
12/2018 – 03/2021	Zahnärztin in Weiterbildung zur Fach Zahnärztin für Oralchirurgie in Kempten
Seit 04/2021	Weiterbildungsassistentin für Oralchirurgie in Freising

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Danksagung

Ohne die fortwährende Unterstützung zahlreicher Personen wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich in der ganzen Phase meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zu besonderem Dank bin ich Frau Professor Dr. med. Martina Müller-Schilling verpflichtet, die mir an ihrem Lehrstuhl die Möglichkeit einer praxisnahen Promotion zu einem hochspannenden Thema gegeben hat. Ihre intensive Betreuung und wissenschaftlichen Anregungen waren mir dabei immer äußerst hilfreich, und haben mich von Anfang an in meinem Vorhaben bestärkt. Durch ihre bereits umfangreich vorhandene Forschungs- und Publikationsarbeit konnte ich sehr schnell auf dem von ihr überlassenen Promotionsthema aufbauen. Ohne diese Chance hätte ich mich nicht derart fachlich und menschlich weiterentwickeln können. Ich habe die konstruktiven Gespräche und den persönlichen Kontakt mit Frau Professor Dr. Müller-Schilling stets sehr geschätzt und bedanke mich für ihre umfassende Unterstützung über die gesamte Dauer hinweg. Herrn Professor Dr. Tobias Schilling danke ich für die aufwendige statistische Auswertung der qPCR-Rohdaten in der Dissertation, welche eine immense Erleichterung für die gesamte Anfertigung derjenigen war.

Ohne die engagierte Betreuung durch Frau Dr. Sophie Schlosser, Herrn PD Dr. Karsten Gülow und Frau PD Dr. Claudia Kunst wäre gerade die rasche Finalisierung der Arbeit in den letzten Monaten nicht möglich gewesen. Ich danke ihnen für ihre Zeit, die Inhalte meiner Dissertation sowohl persönlich als auch fernmündlich zu erörtern, für ihre Geduld und ihre wertvollen Anmerkungen, die meine Arbeit letztendlich vervollständigt haben.

Die Forschungstätigkeiten an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg haben mich für meinen weiteren beruflichen wie auch interdisziplinär-fachlichen Werdegang stark geprägt und mir viele neue, bereichernde Eindrücke in diesem Bereich gewährt. Gerade die Verknüpfung von experimentellen und theoretischen Forschungsgrundlagen machte das Thema für mich so interessant. In diesem Sinne vielen Dank an Frau Elisabeth Aschenbrenner,

Frau Kirstin Pollinger und Frau Martina Meisinger, die mir bei der Durchführung der Versuche im Labor hervorragende fachliche Unterstützung gaben und mich sofort in ihr kollegiales Team aufnahmen. Die Zusammenarbeit mit meinen Kommilitonen und Kommilitoninnen brachte so manche bahnbrechende Idee hervor, die für die Erstellung der Dissertation entscheidend war. So wurde mir die praktische Arbeit meiner Promotion in einem sehr angenehmen, freundschaftlich geprägten Umfeld ermöglicht.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nimmt meine Familie ein, besonders meine Eltern, Geschwister und mein Mann. Gerade weil in der Endphase der Dissertation im März 2020 mein geliebter Vater plötzlich aus unserer Mitte gerissen wurde, war der familiäre Rück- und Zusammenhalt ungemein wichtig für mich. Meine Eltern haben mich während des Studiums und der Promotion auf jede erdenkliche Art und Weise unterstützt, was ich ihnen niemals vergessen werde. Die liebevolle Fürsorge und motivierenden Worte meines Mannes Tobias haben mich dauernd darin bestärkt, diesen sehr lohnenswerten akademischen Weg einzuschlagen. Ohne meine Familie wäre ich heute nicht da, wo ich bin, und dafür gilt ihr mein besonderer Dank.

