

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Regulation der Expression von microRNAs beim hepatozellulären Karzinom durch
verschiedene Isoformen von p73

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Maria Kaser

2022

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Regulation der Expression von microRNAs beim hepatozellulären Karzinom durch
verschiedene Isoformen von p73

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Maria Kaser

2022

Dekan:	Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. univ. Sara Fill Malfertheiner
Tag der mündlichen Prüfung:	27.07.2022

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	15
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom.....	15
1.1.1 Epidemiologie	15
1.1.2 Ätiologie	16
1.1.3 Diagnostik und Einteilung der Stadien	21
1.2 Therapieoptionen des HCC	24
1.2.1 Lebertransplantation	24
1.2.2 Stadium BCLC 0 und A	25
1.2.3 Stadium BCLC B	26
1.2.4 Stadium BCLC C	26
1.3 Die p53-Familie.....	35
1.3.1 p53.....	36
1.3.2 p63.....	39
1.3.3 p73.....	40
1.3.4 Bildung verschiedener Isoformen der p53-Familie	42
1.4 microRNAs.....	45
1.4.1 Synthese von miRs.....	45
1.4.2 Regulation der Bildung und Funktion von miRs	47
1.4.3 Wirkweise von miRs.....	48
1.4.4 Physiologische und pathophysiologische Funktionen von miRs.....	49
1.5 Wechselwirkungen zwischen der p53-Familie und miRs	55
1.5.1 p53 und miRs	55
1.5.2 p63 und miRs	57
1.5.3 p73 und miRs	58
1.6 Zielsetzung.....	60

2	Material und Methoden	62
2.1	Materialien.....	62
2.1.1	Geräte	62
2.1.2	Laborbedarf.....	63
2.1.3	Kits.....	64
2.1.4	Antikörper	64
2.1.5	Primer.....	64
2.1.6	Reagenzien, Lösungen	65
2.1.7	Chemotherapeutika und <i>targeted therapies</i>	66
2.1.8	Puffer.....	66
2.1.9	Gele	68
2.2	Methoden	69
2.2.1	Zellkultur.....	69
2.2.2	Zellaussaat.....	69
2.2.3	Adenovirale Transduktion	70
2.2.4	Behandlung mit Chemotherapeutika und <i>targeted therapies</i>	70
2.2.5	Ernte und RNA-Extraktion für Kinetik-Versuche	71
2.2.6	Reverse Transkription von miRs in cDNA	71
2.2.7	Verfahren bei dose-response-Versuchen	71
2.2.8	qRT-PCR-Analysen der miR-Expression	72
2.2.9	Herstellung von Protein-Lysaten	72
2.2.10	Bestimmung des Proteingehaltes von Protein-Lysaten.....	73
2.2.11	Western Blot	73
2.2.12	MTS-Assay	74
2.2.13	Ergebnisdarstellung und statistische Auswertung	75
3	Ergebnisse.....	76
3.1	Wirkung von p73-Isoformen auf tumorsuppressive miRs	76

3.2	Einfluss verschiedener HCC-relevanter Therapeutika auf die Expression von miRs in Abhängigkeit von p73-Isoformen	80
3.3	Einfluss von Tivantinib auf die basale miR-Expression in Hep3B-Zellen	90
3.4	Dosisabhängige Effekte von Tivantinib auf die miR-Expression bei basaler p73-Expression in Hep3B-Zellen	92
3.5	Dosisabhängiger Einfluss von Tivantinib auf miR-Level bei adenoviraler TAp73-Überexpression.....	94
3.6	Einfluss von Tivantinib auf die Expression von Mitgliedern der p53-Familie und miRs in HepG2-Zellen im Zeitverlauf	98
3.7	Wirkung von Tivantinib auf die metabolische Aktivität von nativen HepG2- und adenoviral transduzierten Hep3B-Zellen.....	100
4	Diskussion	107
4.1	Rolle von miRs im HCC.....	107
4.2	TAp73-abhängige Induktion von miR-34a, miR-145 und miR-149.....	107
4.3	TAp73-unabhängige Expression von miR-192 und miR-194.....	108
4.4	Unbeeinflusste Expression oder negative Regulation der untersuchten miRs durch Δ Np73	109
4.5	Steigerung der TAp73-abhängigen Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch Tivantinib	110
4.6	Spezifische Effekte von Tivantinib auf die miR-Expression nativer Hep3B- und HepG2-Zellen.....	114
4.7	Ausgeprägte dosisabhängige, potenziell synergistische Effekte auf miR-34a, miR-145 und miR-149 durch Kombination aus Tivantinib und TAp73-Überexpression....	115
4.8	Ausgleich von p63-Induktion durch hohe Tivantinib-Dosierungen und regressivem Einfluss adenoviraler Vektoren	118
4.9	Tivantinib-abhängige Induktion von p53 in HepG2-Zellen	119
4.10	Hemmung der Stoffwechselaktivität von HCC-Zelllinien durch hohe Konzentrationen von Tivantinib unabhängig von TAp73.....	120
4.11	Schlussfolgerung	121
5	Ausblick.....	123

6	Zusammenfassung	125
7	Abbildungsverzeichnis	127
8	Tabellenverzeichnis	129
9	Literaturverzeichnis	130
10	Danksagung	158

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
Abb.	Abbildung
ADAR	adenosine deaminase acting on RNA
AFP	α -Fetoprotein
Ago2	protein argonaute 2
AK	Antikörper
AKT	Rac Protein-Kinase α
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	analysis of variance
ASPP	apoptosis-stimulating protein of p53
ATM	ataxia telangiectasia mutated
AXIN2	axis inhibition protein 2
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl	B-cell lymphoma
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BIM	Bcl-2 like protein 11
Bleo	Bleomycin
B-RAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma
BRCA	breast cancer gene
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBFB	core-binding factor subunit β
CBX4	chromobox homolog 4
CCNA2	Cyclin A2-Gen
CCND2	Cyclin D2-Gen
CCNE1	Cyclin E1-Gen
CCNE2	Cyclin E2-Gen
CCNG1	Cyclin G1-Gen

CD	Cluster of Differentiation
CDC7	cell division cycle 7-related protein kinase
CDH2	Cadherin 2
CDK	cyclin dependent kinase
CDKN/ CDN	cyclin dependent kinase inhibitor
CEUS	contrast enhanced ultrasound
CIS	Carcinoma in situ
CLIP	Cancer of the Liver Italian Program
CLL	chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
c-RAF	c-rapidly accelerated fibrosarcoma
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTNNB	β-Catenin
CUL5	Cullin 5
CUPI	Chinese University Prognostic Index
CUTL1	cut-like homeobox 1
C21ORF91	chromosome 21 open reading frame 91
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
Doxo	Doxorubicin
ds	double stranded
EASL	European Association for the Study of the Liver
ECL	enhanced chemiluminescence reagents
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EphB3	Ephrin-Typ-B-Rezeptor 3

ER α	estrogen receptor α
ERK	extracellular regulated kinase
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
E2F	E2 factor
FASLG	Fas-Ligand
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FLASH	caspase 8 associated protein 2
FLI1	friend leukemia integration 1 transcription factor
FOSL1	fos-like 1
FOXM1	forkhead box protein M1
Fra-1	fos-related antigen 1
g	Gramm
Gadd45	growth arrest and DNA damage 45
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLUT1/ GLUT4	Glukosetransporter 1/ Glukosetransporter 4
GPC3	Glypican 3
G-Phase	gap-Phase
GSK3 α	Glykogensynthase-Kinase 3 α
GW182	glycine-tryptophan protein of 182 kDa
h	Stunden
HBEGF	heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor
HBP1	HMG box-containing protein 1
HBV/ HB-Virus	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom/ Hepatozelluläre Karzinome
HCV/ HC-Virus	Hepatitis C-Virus
HDAC11	Histon-Deacetylase 11
HDV	Hepatitis D-Virus
HGF	hepatocyte growth factor
HIV/ HI-Virus	humanes Immundefizienz-Virus
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4 α
HPIP	hematopoietic PBX-interacting protein
HSP70	Hitzeschockprotein 70

iASPP	inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53
IFN	Interferon
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
IGFR	insulin-like growth factor receptor
INR	International Normalized Ratio
IRS-1	insulin receptor substrate 1
Itch	itchy E3 ubiquitin protein ligase
JAM-A	junctional adhesion molecule A
JIS	Japan Integrated Staging
JunB	JunB-Protoonkogen
KDM5B	lysine-specific demethylase 5B
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KLF	kruppel-like factor
l	Liter
LYVE1	lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1
μ	mikro
m	milli/ Meter
M	molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MDM2/ MDM4	mouse double minute 2/ mouse double minute 4
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MEK	mitogen-activated protein kinase
MELD	Model for Endstage Liver Disease
MEM	Minimal Essential Medium Eagle
MET/ c-Met	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
miR/ miRs	microRNA/ microRNAs
mirtron	splicing-derived miR
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOI	multiplicity of infection
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie

MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium
MWA	Mikrowellenablation
Myc/ c-Myc/ MYCN/ N-Myc	Myc proto-oncogene protein
MYO6	Myosin VI
n	nano
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NDST1	N-deacetylase and N-sulfotransferase 1
NFIB	nuclear factor 1B
NOB1	nin one binding protein 1
Notch-2	neurogenic locus notch homolog protein 2
NOXA	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
Oct-4	octamer-binding transcription factor 4
OD	Oligomerisierungsdomäne
PACT	protein kinase R-activating protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PD-1	programmed cell death protein 1
PDCD4	programmed cell death protein 4
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PEI	perkutane Ethanol-Injektion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α
PKC	Proteinkinase C
PLK1	polo-like kinase 1
PMS	N-Methylphenazoniummethylsulfat

PPM1F	protein phosphatase Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1F
PPP3CA	protein phosphatase 3 catalytic subunit α
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1
pre-miR	precursor miR
pri-miR	primary miR
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PU.1	hematopoietic transcription factor PU.1
PVDF	Polyvinylidene difluoride
p21	cyclin dependent kinase inhibitor 1
p53	tumor protein 53
p63	tumor protein 63
p68	RNA-Helikase p68
p72	RNA-dependent helicase p72
p73	tumor protein 73
p85 α	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit α
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
rAd	rekombinanter Adenovirus
RAF-Kinase	rapidly accelerated fibrosarcoma-Kinase
Rap	ras-associated protein
RB1	retinoblastoma protein 1
Rego	Regorafenib
REST	RE1-silencing transcription factor
RET	rearranged during transfection
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNU6B	small nuclear RNA U6B
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SAM	sterile alpha motif
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEMA3A	Semaphorin 3A
siRNA	small interfering RNA

SIRT	Sirtuin-Gen
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
SNAIL	zinc finger protein SNAI1
snRNA	small nuclear RNA
Sora	Sorafenib
SOX	SRY-related HMG-box gene
Sp1	specificity protein 1
STAT	signal transducers and activators of transcription
S2	biologische Schutzstufe 2
TA	entire transactivation domain containing
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	transarterielle Embolisation
TARE	transarterielle Radioembolisation
TCF7	T-cell specific transcription factor
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase-Gen
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
TFIIHA	Transkriptionsfaktor IIHA
TGF	transforming growth factor
TIE-2	tyrosine-protein kinase receptor tie-2
TIGAR	TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
Tiva	Tivantinib
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
TNTase	terminal nucleotidyl transferase
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
TRAIL-R	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor
TRBP	transactivation-response RNA-binding protein
TRIM23	tripartite motif containing 23
Trp53/ Trp63/ Trp73	transformation related protein 53/ 63/ 73
TYMS	Thymidylat-Synthase

USA	United States of America
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Wee1	Wee1-like protein kinase
WHO	World Health Organization
WIP	WAS/WASL-interacting protein family member
WNT	proto-oncogene wnt
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YES	Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1
YY-1	yin yang 1
ZBTB2	zinc finger and BTB domain containing 2
ZEB	zinc finger E-box binding homeobox 1
5-FU	5-Fluorouracil
ΔN	N-terminal truncated

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Primäre Lebertumore zählen als sechsthäufigste Tumorerkrankung zu den häufigsten malignen Tumoren [1]. Als dritthäufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle weltweit, nach pulmonalen und kolorektalen und vor gastralen Karzinomen, stellen sie ein relevantes Gesundheitsproblem dar [1]. Bei Männern gelten sie sogar als zweithäufigste maligne Todesursache [1]. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) macht dabei bis zu 90% der primären hepatischen Tumorleiden aus [2] und spielt damit als häufigster Primärtumor der Leber in der Gastroenterologie eine besondere Rolle. Diagnostiziert werden diese Lebermalignome meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr [3], bei Männern zwei- bis dreimal häufiger als bei Frauen [1,3,4]. Inzidenz und Mortalität zeigen eine negative Korrelation zum sozioökonomischen Status. Das erklärt, warum das HCC in Entwicklungsländern im Allgemeinen deutlich häufiger vorkommt [5]. In elf Ländern, vorwiegend in Ost- und Südostasien sowie Nord- und Westafrika, sind primäre Lebertumore die häufigste Tumorerkrankung bei Männern, in 23 Ländern sogar die häufigste krebsbedingte Todesursache [1]. Doch auch in den entwickelten Ländern steigen die Erkrankungszahlen, bedingt durch zunehmende metabolische Veränderungen bei höherem Lebensstandard [2]. Während in Asien und Afrika die meisten Fälle dieser Erkrankung bekannt sind, zeigt sich in Europa, Nord- und Südamerika eine geringere Prävalenz mit teils stärkeren geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Erkrankungshäufigkeit [4]. In den zentralen europäischen Ländern liegt die Relation der HCC-Manifestationen zwischen Männern und Frauen bei über vier zu eins [4,6]. Zudem haben Studien in den USA auch Unterschiede in den Erkrankungszahlen zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen nachgewiesen. Vor allem bei hispanischen Bewohnern [3,4,6], amerikanischen Ureinwohnern und Dunkelhäutigen treten primäre Lebermalignome häufiger auf [4,6]. In den kommenden Jahren und Jahrzehnten wird eine Zunahme der weltweiten Malignomdiagnosen erwartet [1]. Auch für das HCC ist ein relevanter Zuwachs insbesondere der metabolisch bedingten Erkrankungen prognostiziert [7]. Dadurch wird deutlich, dass das HCC auch in Europa ein bedeutsames Gesundheitsproblem darstellt.

1.1.2 Ätiologie

Für die Entstehung eines HCC sind verschiedene Risikofaktoren bekannt. Neben Infektionen, wie chronischer Hepatitis B oder C, spielen auch hereditäre Erkrankungen, beispielsweise Hämochromatose, α 1-Antitrypsin-Mangel [2,8] sowie Tyrosinämie oder die Glykogen-Speicherkrankheit Typ 1a bei der Entwicklung primärer Lebertumore eine Rolle [3]. Ebenso begünstigen Lifestyle-Komponenten, wie übermäßiger Alkoholkonsum oder Nikotinabusus, diese Neoplasie [3,9–11]. Die Gemeinsamkeit all dieser Faktoren besteht in der Entwicklung einer Leberzirrhose als mögliche Komplikation [8], die in 80 bis 90% der Fälle den Ausgangspunkt eines HCC darstellt [12]. Im Gegensatz zu den genannten Risikofaktoren gelten Koffein [2,12] und Aspirin als präventive Agenzien in der Hepatokarzinogenese [2].

1.1.2.1 Virale Ursachen

Als führende Ursache für die Entstehung des HCC wurden chronische Infektionen mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) identifiziert. Dieses Virus gehört zu den *Hepadnaviridae*, weist eine Virushülle und partiell doppelsträngige zirkuläre DNA auf und wird in zehn verschiedene Genotypen (A bis J) unterteilt. Eine HBV-Infektion führt zu einem 15- bis 20-fach erhöhten Risiko für die Ausbildung eines Lebertumors im Vergleich zu Gesunden; global beruhen etwa 50% der HCC auf einer solchen Infektion [3]. Das Lebenszeitrisiko für die Hepatokarzinogenese durch HBV wird mit zehn bis 25% angegeben [6]. Dabei spielt zum einen eine gesteigerte Telomerase-Aktivität mit konsekutiv erhöhter Lebensdauer der Zelle eine Rolle [13,14], zum anderen die Aktivierung von Onkogenen mit Auswirkungen auf die Regulation des Zellzyklus. Für diese Veränderungen ist die Integration des Virus in das Zellgenom mit Einfluss auf verschiedene Genloci, insbesondere CCNA2, CCNE1 [2,15] sowie TERT relevant [2,13–17].

In HBV-Endemie-Gebieten, wie beispielsweise Afrika oder Ostasien, besteht eine hohe HCC-Prävalenz. Hier entstehen primäre Leberkarzinome durchschnittlich zehn Jahre früher als bei Patienten in Europa und Nordamerika [12]. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die frühe Infektion, meist durch vertikale Transmission während der Schwangerschaft oder Geburt, zurückzuführen. Daraus resultiert in bis zu 90% der Fälle eine chronische Viruserkrankung. Bei niedriger HBV-Prävalenz in westlichen Ländern findet hingegen vorwiegend eine horizontale (parenterale oder sexuelle) Übertragung des Virus statt. In den meisten Fällen folgt eine akute nicht-chronische Infektion [12]. Die Wahrscheinlichkeit der Karzinogenese wird zudem durch das gleichzeitige Auftreten weiterer Risikofaktoren, wie männliches Geschlecht, Alter, ethnische Herkunft (afrikanische oder asiatische Wurzeln) und familiäre HCC-Vorbelastung begünstigt [6,12]. Lifestyle-Faktoren (Rauchen und

Alkoholkonsum) spielen ebenso wie das Vorbestehen einer Leberzirrhose sowie Virus-assoziierte Faktoren, zum Beispiel Replikationsrate, Genotyp, Dauer der Infektion, Koinfektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), dem Hepatitis C-Virus (HCV) [6,12] oder dem Hepatitis D-Virus (HDV) eine Rolle [12,18]. Für die Exposition gegenüber Aflatoxinen wurde zudem eine synergistische Wirkung auf die HCC-Entstehung bei bestehender Hepatitis B nachgewiesen [19]. Eine Infektion mit dem Genotyp C oder D des Virus spricht meist schlecht auf eine IFN-Therapie an und ist mit dem größten Risiko für die Ausbildung einer Leberzirrhose und eines -tumors vergesellschaftet [3]. Durch die Einführung der HBV-Impfung ist die HCC-Inzidenz zuletzt in einigen, vor allem asiatischen, Ländern deutlich rückläufig [1,6]. Neue medikamentöse Optionen in der antiviralen Therapie haben zudem in Studien eine Verringerung des Karzinogeneserisikos gezeigt [6].

Als weitere viral bedingte Ursache eines HCC gilt, mit einer Risikosteigerung um das bis zu 20-Fache, eine HCV-Infektion [6]. Da das HC-Virus, im Gegensatz zum HB-Virus, meist nicht bei der Geburt, sondern später erworben wird, treten HCV-bedingte Lebertumore meist erst in höherem Lebensalter auf [12]. Eine Übertragung dieses RNA-Virus aus der Gruppe der *Flaviviridae* findet vorwiegend durch kontaminiertes Applikationsbesteck bei Drogenabusus oder durch infizierte Blutprodukte statt. In Europa und den USA sind nur wenige chronische HCV-Infektionen bekannt, die geringsten Infektionsraten finden sich in Kanada. In Analogie zum HB-Virus zeigt sich jedoch eine vermehrte Belastung in afrikanischen und asiatischen Ländern [4]. Im Gegensatz zum HB-Virus kommt es beim HC-Virus allerdings in 70 bis 80% der Fälle zu einer chronischen Infektion. Weltweit ist das Virus für zehn bis 25% der HCC-Erkrankungen verantwortlich und damit global die zweithäufigste Ursache dieser Karzinome [3]. In den USA gilt die HCV-Infektion sogar als führender viraler Risikofaktor primärer Lebertumore. Auch in Japan wurde in Studien bei bis zu 80% und in Italien bei bis zu 66% der HCC-Patienten dieses Virus nachgewiesen. Hierbei kann ein Zusammenspiel unterschiedlicher Risikofaktoren eine begünstigende Wirkung auf die Entstehung einer Tumorerkrankung ausüben. So finden sich Karzinome deutlich häufiger bei männlichen Patienten, in höherem Alter, bei zusätzlichen Vorerkrankungen wie Diabetes, Adipositas und vorbestehender Leberzirrhose, bei Koinfektionen mit dem HB- oder HI-Virus oder durch Alkoholkonsum. Zudem spielen auch hier virale Faktoren eine Rolle [12]. Das HC-Virus wird in sechs Genotypen untergliedert [4], die als unterschiedlich starke Risikofaktoren für ein HCC gelten [6,12]. Die Verbreitung dieser Subgruppen unterscheidet sich länderspezifisch. In den USA findet sich in den meisten Fällen Genotyp 1a, in Europa Genotyp 1b und 2 bei älteren Personen, bei Drogenkonsumenten vor allem 1a und 3a [4]. Der Wirkmechanismus

dieses Virus in Hinblick auf die Entartung der Leberzellen ist hingegen nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass das HC-Virus nicht in das Wirtsgenom integriert und karzinogene Effekte wohl vorwiegend durch virale Proteine ausgelöst werden. Es können verschiedene Signalwege beeinflusst werden, darunter der MAPK-Signalweg, der Einfluss auf die Proliferation der Zellen nimmt, und der p53-Signalweg, der bei der Regulierung von Apoptose und Proliferation eine Rolle spielt. Zudem wird durch die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems TNF und IFN ausgeschüttet. Diese Zytokine vermitteln die Zerstörung bzw. den Zelltod viral befallener Zellen und nehmen auch Einfluss auf Regenerationsprozesse. Durch die damit verbundenen Umbaumechanismen im Gewebe kommt es zur Fibrosierung. Zusätzlich werden sowohl durch das Immunsystem als auch viral vermittelt freie Radikale freigesetzt, die Mutationen und DNA-Schäden begünstigen und zur Entartung der Hepatozyten führen können [3]. Ähnlich zur HBV-assoziierten HCC-Pathogenese ist auch bei HCV-Infektionen Einfluss auf den TERT-Promotor und damit auf die Telomerase-Aktivität beschrieben. Dies wird aber im Gegensatz zum HB-Virus nicht durch DNA-Integration, sondern durch mutagene Eigenschaften bedingt [14]. Durch die Einführung effektiver Therapien ist durch Reduktion der Viruslast unter die Nachweisgrenze ein geringeres Risiko für die Entstehung eines HCC [2,6,20,21] mit bis zu 71% weniger Karzinomfällen unter direkter antiviraler Therapie beschrieben [22]. Dennoch hat sich bei bereits bestehender Leberzirrhose vor vollständiger Eradikation des Virus ein erhöhtes Karzinogenese-Risiko trotz optimaler HCV-Therapie gezeigt [22,23].

1.1.2.2 Aflatoxin

Neben viralen Faktoren spielen auch Toxine bei der Entstehung eines HCC eine Rolle. Vor allem in Asien und den südlichen afrikanischen Ländern ist eine weit verbreitete Kontamination von Getreiden, Mais und Nüssen mit Aflatoxinen bekannt [4,12]. In ländlichen Gebieten, bei Männern und bei HBV-Infizierten wird dieses hepatische Karzinogen häufiger nachgewiesen [4]. Aflatoxin wird durch verschiedene Aspergilluspezies gebildet und kommt demnach bei fehlerhafter Lagerung in Nahrungsmitteln vor [12]. Es werden vier verschiedene Formen unterschieden, Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂, von denen B₁ als gefährlichste gilt. Das Gift kann nach Verzehr bei Patienten durch Abbauprodukte im Urin, gebunden an Albumin im Serum oder durch DNA-Mutationen in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden [4]. Dieser Einfluss auf das Erbgut spielt auch bei der Karzinogenese eine zentrale Rolle. Vor allem Veränderungen des tumorsuppressiven Transkriptionsfaktors p53 sind hier ausschlaggebend [12]. Aflatoxine führen zu Mutationen von p53 an der dritten Base von Codon 249, die sich bei 30 bis 60% exponierter HCC-

Patienten zeigen. Es kommt zu einem vierfach erhöhten Risiko für eine Zellentartung. Zusätzlich ist in den meisten Gebieten mit hoher Aflatoxin-Belastung auch eine hohe HBV-Prävalenz vorhanden. In Kombination mit einer chronischen HBV-Infektion kann das Toxin zu einer bis zu 60-fach höheren Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines HCC im Vergleich zu gesunden, nicht-exponierten Menschen führen, sodass von einer synergistischen Wirkung der beiden Risikofaktoren auszugehen ist [4].

1.1.2.3 Alkohol

Als weiterer, in Europa gravierender Risikofaktor für primäre Lebertumore gilt vermehrter und übermäßiger Alkoholkonsum mit der konsekutiven Entwicklung einer Leberzirrhose [3,4,12]. Bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren oder Vorschädigungen der Leber besteht auch bei nur geringer Alkoholingestion ein erhöhtes HCC-Risiko [24]. Wiederkehrende Inflammationsprozesse, Hepatozytennekrosen und Regenerationsabläufe in der Leber, die mit oxidativem Stress für das Gewebe verbunden sind, bedingen die Ausbildung einer hepatischen Zirrhose bei regelmäßigem Alkoholkonsum. Zudem beeinträchtigen freie Radikale die genomische Stabilität durch Inhibition der Interaktion von DNA, RNA, Proteinen und Lipiden und können so Mutationen und fehlerhafte Prozesse in den Zellen fördern [3]. Durch Ernährungsdefizite und Veränderungen in der Aktivität und Wirkung des Immunsystems wird die Karzinogenese unter Alkoholkonsum zusätzlich begünstigt [4]. In den meisten Fällen sind auch HCC bei viralen Hepatitiden durch eine bestehende Leberzirrhose mitbegründet. Dadurch wird auch der synergistische Effekt von Alkoholabusus und HBV- bzw. HCV-Erkrankungen deutlich [3,4,12]. Zudem ist ein Zusammenwirken von Alkohol und Adipositas wahrscheinlich. Ethanol als Risikofaktor ist in Abhängigkeit der Konzentration vor allem in Gesellschaften relevant, die ein sonst geringes HCC-Risiko und eine geringe Prävalenz viraler Hepatitiden aufweisen [4].

1.1.2.4 Metabolische Risikofaktoren

In westlichen Ländern spielen bei der Karzinogenese zudem Stoffwechselerkrankungen eine immer entscheidendere Rolle. Die Prävalenz von Diabetes und Adipositas ist hier verglichen mit der viralen Hepatitiden deutlich erhöht. Diese Erkrankungen begünstigen eine Steatose als Vorstufe einer Fibrose oder Zirrhose. Inwieweit diese beiden Krankheitsbilder als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC zu werten sind, ist nicht abschließend geklärt [4]. Mit einer weltweit geschätzten Prävalenz von bis zu 25% [22] gilt auch die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), deren Patienten sehr häufig auch unter Diabetes, Adipositas oder metabolischem Syndrom leiden, als Ursache chronischer

Lebererkrankungen und -zirrhose [3,12]. Bei 20 bis 30% der Patienten zeigt sich ein Progress zur nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) [6], der schwersten Form der NAFLD. Sie schreitet in Bezug auf Langzeitfolgen wie Fibrose schneller voran [25] und trägt ein noch höheres HCC-Risiko [2]. NASH zeichnet sich durch Steatose, Inflammation, degenerative Veränderungen und Fibrose in der Leber aus und ist ebenso wie NAFLD häufig mit Adipositas, Diabetes und Hypertriglyceridämie verbunden. In 15 bis 50% der Fälle ist eine Progression zur ausgeprägten Fibrose und in sieben bis 25% zur Zirrhose als möglicher Ausgangspunkt eines primären Lebertumors beschrieben [4] (Abb. 1). In westlichen Ländern füßen mittlerweile ca. 20% der HCC-Erkrankungen auf einer NASH [2]. Hierbei sind auch vermehrt Tumorerkrankungen ohne zugrunde liegende oder zuvor diagnostizierte Leberzirrhose nachgewiesen [26]. Für die Genese der NASH und folgend des HCC sind metabolische Veränderungen und oxidativer Stress durch vermehrte Einlagerung von Fettsäuren in die Hepatozyten relevant [26–28]. Die damit verbundene inflammatorische Reaktion [27,28] begünstigt das Auftreten von Zellschäden [26], die durch Modifikation der Expressionsmuster von Enzymen der DNA-Reparatur entgehen können [2,26]. Störungen in Mechanismen der Tumorsuppression sind zudem in der Pathogenese des HCC entscheidend [26]. Durch einen pathologischen Lipidmetabolismus können Fettsäuren und Lipide gebildet werden [28,29], die für die Karzinogenese als Onkometabolite zur Verfügung stehen [2]. Gleichzeitig kommt es zu einem veränderten Gehalt an Immunzellen [27,28,30–35] mit Einfluss auf immunologische und inflammatorische Signalwege durch Bildung von Zytokinen [27,28,31,32,34,35], die sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften im Gewebe begünstigen können [2]. Aufgrund der zunehmenden Prävalenz von Diabetes und Adipositas wird ein numerischer Progress der damit verbunden hepatischen Erkrankungen und auch der assoziierten Mortalität besonders in westlichen Ländern erwartet. Modellrechnungen zufolge sind im Jahr 2030 im europäischen Vergleich zu Italien, Spanien, Großbritannien und Frankreich die meisten Fälle von NASH und HCC in Deutschland vorhergesagt [7].

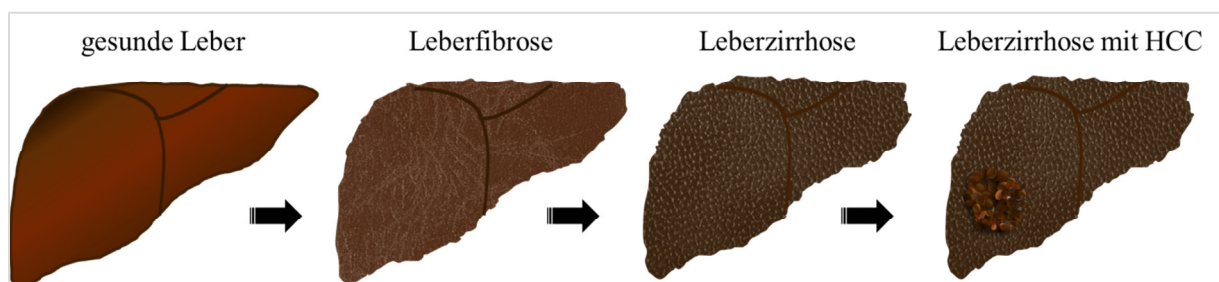


Abb. 1: Entstehung des HCC. Ausbildung einer reversiblen Leberfibrose und anschließend einer irreversiblen Leberzirrhose durch verschiedene ätiologische Faktoren als Ausgangspunkt einer HCC-Erkrankung.

1.1.3 Diagnostik und Einteilung der Stadien

Die frühe Diagnose eines Karzinoms verbessert im Allgemeinen die Heilungschancen des Patienten. Im Gegensatz zu Entwicklungsländern ist es heutzutage in vielen westlichen Ländern möglich, ein HCC in bis zu 60% der Fälle bereits in einem Frühstadium zu erkennen [36]. Zur Diagnostik werden dabei vorwiegend nicht-invasive Kriterien und Verfahren sowie histopathologische Eigenschaften des Tumors als Goldstandard herangezogen [24,37]. Eine zwingende Histologiegewinnung ist im Gegensatz zu anderen Malignomen im internationalen Konsens nicht erforderlich [22,24,37]. Als nicht-invasive Methoden werden Kontrastmittel-Sonografie (CEUS), MRT oder CT durchgeführt [24]. Im Vergleich zeigt die Verwendung des Gadoxetsäure-MRT eine höhere Sensitivität bei gleicher Spezifität gegenüber einem Multiphasen-CT [37]. Zur Diagnostik werden typische Eigenschaften von hepatischen Tumoren herangezogen. Hierbei zählt vor allem eine Hypervaskularisation in der arteriellen Phase in Kombination mit einem Kontrastmittel-*Washout* in der portalvenösen Phase zu den Malignitätskriterien [24,37]. Da ein HCC überwiegend durch arterielles Blut gespeist wird, kommt es während des CT-Scans in der arteriellen Phase zu einer Anreicherung an Kontrastmittel, sodass das Tumorgewebe gegenüber dem gesunden Lebergewebe hyperdens erscheint. Während der venösen Phase befindet sich in der Leber mehr mit Kontrastmittel angereichertes Blut als im Karzinom, es entsteht das so genannte „*Washout-Phänomen*“, der maligne Herd blasst ab [38]. Daneben gibt es weitere Kriterien, die die Diagnose stützen, aber nicht alleinig sichern können: Hyperintensität in T2-gewichteten oder Diffusions-gewichteten MRT-Sequenzen, Fettablagerungen oder Blutungen in der Läsion oder der Nachweis einer Kapsel [37]. Bei Herden mit einem Durchmesser unter einem cm kann keine sichere Diagnose gestellt werden. Deshalb wird eine Kontrolle des Befundes in Abständen von drei Monaten mittels CEUS oder MRT angeraten. Für Läsionen mit einer Größe über einem cm wird eine bildgebende Diagnostik mittels MRT empfohlen [24]. Sollten hierbei keine HCC-typischen Eigenschaften gefunden werden, wird eine CT- oder CEUS-Untersuchung notwendig. Wenn auch nach zwei bildgebenden Verfahren keine Sicherheit erlangt wird, Befunde nicht kongruent sind oder der Leberläsion keine Leberzirrhose zugrunde liegt, ist zur Diagnose eines HCC die Entnahme einer Biopsie notwendig [24,37] (Abb. 2). In einer palliativen Erkrankungssituation sollte hingegen zur definitiven Diagnostik immer eine bioptische Sicherung erfolgen [24]. Durch eine anschließende histopathologische Aufarbeitung und Nachweis immunhistologischer Marker ist eine Abgrenzung gegenüber Differenzialdiagnosen möglich. Die pathologische Untersuchung dient zudem der Unterscheidung von benignen Veränderungen,

Vorläuferläsionen oder verschiedenen Subtypen des HCC. Als Malignitätskriterien gelten insbesondere ausgedehnte histologische und zytologische Atypien sowie interstitielle und vaskuläre Invasion, die vor allem in Frühkarzinomen und bei guter Differenzierung schwer erkennbar sein können. Deshalb werden zur genauen Diagnosestellung Immunfärbungen auf GPC3, HSP70 und die Glutamin-Synthetase als diagnostische Kriterien verwendet [37]. Eine positive Färbung für mindestens zwei dieser Marker gilt als histologischer Beweis für ein HCC. Die Analyse der Genexpression von GPC3, LYVE1 und Survivin lässt zwischen hochgradigen Dysplasien und frühen Tumorstadien bei Herden mit weniger als zwei cm Durchmesser unterscheiden. Eine Färbung auf CD34 dient dem Nachweis einer Neovaskularisation. Eine weitere diagnostische Möglichkeit besteht in der Untersuchung des Markers Keratin 19, der mit einer schlechten Prognose des HCC assoziiert ist [36]. Zur weiteren Diagnostik und vor allem zum prä-operativen *Staging* vor Lebertransplantationen sind ein CT oder MRT des Abdomen sowie ein Thorax-CT nötig [36].

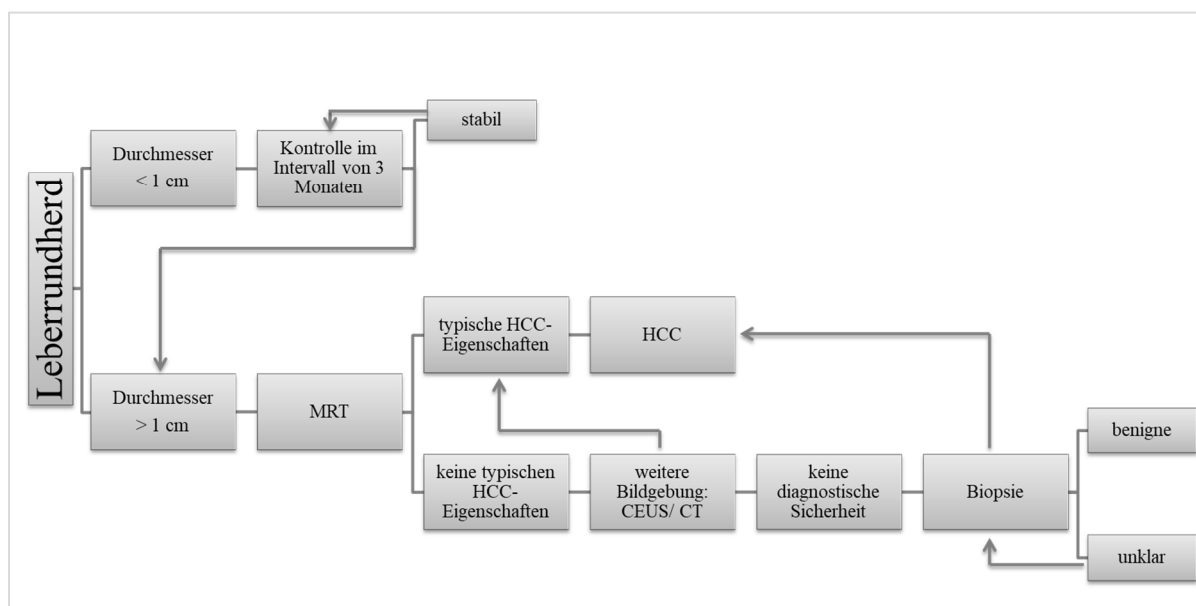


Abb. 2: Diagnostisches Vorgehen bei Leberläsionen. (modifiziert nach [24,37])

Zur möglichst genauen Vorhersage des *Outcomes*, zur Erleichterung und Objektivierung von Therapieentscheidungen, zur Vereinfachung des Informationsaustausches und zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Patienten und deren Therapieansprechen werden Karzinome in Stadien unterteilt [36,37,39]. Da beim HCC meist zwei lebensbedrohliche Zustände gleichzeitig auftreten – eine Leberzirrhose und der Tumor –, besteht die Notwendigkeit, Variablen in Bezug auf beide Erkrankungen zur Prognose zu vereinen. Hierbei spielen die Anzahl der Tumorherde und ihre Größe, die Gefäßinvasion, das Vorliegen extrahepatischer Tumormanifestationen oder Aszites, die Synthese- und Abbauleistung der Leber, eine

portalvenöse Hypertension und der Allgemeinzustand des Patienten bzw. die Ausbildung tumorassoziierter Symptome eine entscheidende Rolle [36,37]. Zur Abschätzung der noch erhaltenen Leberfunktion wird die Child-Turcotte-Pugh-Klassifikation verwendet. Diese orientiert sich an den Serumwerten Albumin und Bilirubin, der Blutgerinnung in Form der Prothrombin-Zeit und dem Vorliegen von Aszites oder einer Enzephalopathie [39]. Aufgrund einer Vielzahl verschiedener Klassifikationen, die für das HCC etabliert wurden, gibt es keine global einheitlichen und allgemeingültigen Maßstäbe zur Differenzierung unterschiedlicher Tumorstadien. Es sind viele *Staging*-Methoden bekannt, die verschiedene Variablen einbeziehen und für unterschiedliche Patientenkohorten und Krankheitsstadien entwickelt wurden. Hierzu zählen das Okuda-*Staging* für spät diagnostizierte Tumore, der *Cancer of the Liver Italian Program (CLIP)-Score*, die *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)*-Klassifikation, der *Chinese University Prognostic Index (CUPI)*, die Tumor-Nodus-Metastasen (TNM)-Klassifikation, das *Japan Integrated Staging (JIS)* und die *French-Classification* [39,40]. Die Europäische Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (EASL) sowie die deutsche S3-Leitlinie empfehlen für den europäischen Raum die BCLC-Klassifikation [24,37]. Diese verwendet prognostische Variablen wie Tumorstadium, Leberfunktion und Allgemeinzustand des Patienten sowie therapieabhängige Variablen zur Einteilung der Karzinome. Es werden fünf Stadien unterschieden (0, A, B, C, D), die Informationen zu Prognose und empfohlener Therapie vermitteln sollen [36,37] (Tabelle 1).

BCLC-Stadium	Bezeichnung	Tumoreigenschaften	ECOG-Stadium	Child-Pugh-Kategorie
0	sehr frühes Stadium	einzel < 2 cm, Carcinoma in situ (CIS)	0	A
A	frühes Stadium	einzel > 2 cm maximal 3 < 3 cm	0	A oder B
B	intermediäres Stadium	multinodulär	0	A oder B
C	fortgeschrittenes Stadium	portal invasiv, extrahepatisch metastasiert	1-2	A oder B
D	Endstadium	jede	3-4	C

Tabelle 1: Einteilung des HCC in *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)*-Stadien. (modifiziert nach [37] und [38]), *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)*

1.2 Therapieoptionen des HCC

1.2.1 Lebertransplantation

Als kurativ intendiertes Verfahren zur Behandlung eines HCC sollte bei Fehlen von extrahepatischer Metastasierung und makrovaskulärer Invasion eine Lebertransplantation geprüft werden [24,37,41]. Diese kann bei Leberzirrhose und nicht oder grenzwertig resektablen Leberherden im Rahmen der Milan-Kriterien angewandt werden [24]. Bei lokal begrenzter Erkrankung mit einer malignen Läsion von \geq zwei und \leq fünf cm Größe oder bis zu drei Raumforderungen von \geq einem und \leq drei cm Größe gelten die Milan-Kriterien als erfüllt [41]. Die Lebertransplantation stellt durch die gleichzeitige Behandlung des HCC und der zugrunde liegenden Zirrhose das Verfahren mit dem geringsten Rezidivrisiko und besten Gesamtüberleben dar [24]. Aufgrund limitierter Spenderzahlen und Verteilung der Organe auf Patienten mit tumorösen wie nicht-tumorösen Grunderkrankungen sind Transplantate nur begrenzt verfügbar [37]. Zur Allokation der Organe wird der *Model for Endstage Liver Disease* (MELD)-Score berechnet. Dieser setzt sich aus den Laborwerten für Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und INR zusammen und gibt das Mortalitätsrisiko innerhalb der nächsten drei Monate an [41]. Beim HCC kann bei Erfüllen der Milan-Kriterien auch der *matchMELD-Score* bei Vergabe einer *Standard-Exception* herangezogen werden. Dieser wird initial bei einer Punktzahl von 22 Punkten, entsprechend einer Drei-Monats-Mortalität von 15%, festgesetzt. Im dreimonatigen Abstand wird dieser *Score* erhöht, um die Steigerung der Drei-Monats-Mortalität um 10% abzubilden [41]. Im Sinne der deutschen S3-Leitlinie und der EASL ist durch neoadjuvante, lokal ablative Verfahren ein *Downstaging* von Tumoren möglich, die die Milan-Kriterien initial nicht erfüllen [24,37]. Die Richtlinien zur Organtransplantation sehen unter diesen Voraussetzungen aber keine Vergabe einer *Standard-Exception* und damit eines *matchMELD-Scores* vor [41]. Zur Überbrückung der Wartezeit auf ein Spenderorgan können lokale Maßnahmen ergriffen werden, um einen Progress der Grunderkrankung zu vermeiden oder zu verzögern [24,37]. Zu ihnen gehören Ablation, Resektion, transarterielle Chemoembolisation (TACE) oder Radioembolisation (TARE), bei Kontraindikationen für die genannten Verfahren auch eine stereotaktische Bestrahlung [24]. Das Ansprechen auf diese Interventionen gilt als Indikator für das Auftreten von Rezidiven nach einer Transplantation und damit auch als Marker für die Prognose [24,37].

1.2.2 Stadium BCLC 0 und A

Im BCLC-Stadium 0 sowie bei fehlender Transplantationsoption im Stadium A stehen lokale Therapieverfahren zur Verfügung [37]. Diese umfassen Resektion und Ablation, gegebenenfalls in Kombination mit einer TACE [24]. Eine offene oder laparoskopische Tumorresektion wird bei nicht-zirrhatischen Organen empfohlen [24,37], sofern eine R0-Resektion möglich ist [24]. Bei Vorliegen einer Leberzirrhose wird die Indikation zur operativen Maßnahme an Begleitfaktoren, beispielweise portale Hypertension und verbliebene Leberfunktion, geknüpft, da ein erhöhtes Risiko für eine postoperative Leberinsuffizienz besteht [24]. Auch Komorbiditäten und Tumorlokalisation gehen in die Therapieentscheidung ein [37]. In Einzelfällen kann auch in höheren Stadien der BCLC-Klassifikation eine Resektion diskutiert werden [24]. Als lokal ablativ Verfahren werden Radiofrequenzablation (RFA) und Mikrowellenablation (MWA) eingesetzt. Sie gelten dabei als äquivalente Therapieoptionen, bei Tumoren bis zu einer Größe von drei cm werden sie zudem auch gegenüber einer Resektion als gleichwertig betrachtet [24]. Im Rahmen der RFA wird durch Anlage von Wechselstrom Hitze erzeugt, die über Nadeln perkutan oder laparoskopisch am Zielgewebe verabreicht wird. Dadurch werden Nekrosen erzeugt, die zur Sicherstellung einer kompletten Ablation und Zerstörung aller Tumorzellen bis in das peritumorale Gewebe reichen [37]. Kontraindikationen für dieses Verfahren bestehen bei Nähe des zu behandelnden Leberherdes zu abdominellen Organen, dem Herzen oder den großen Gallenwegen [22]. Das *Outcome* ist dabei abhängig von Leberfunktion, AFP-Spiegel und dem Vorliegen portosystemischer Kollateralen. Das Risiko einer post-interventionellen lokalen Tumorprogression wird von der Größe des Herdes bestimmt, da die Hitzeentwicklung ausgehend von der Quelle zur Peripherie hin in Abhängigkeit der Perfusion abnimmt [37]. Die MWA als weiteres lokalablativ Verfahren weist Ähnlichkeiten in Nebenwirkungsprofil und Rezidivrate zur RFA auf. Bei diesem hyperthermischen Ablationsverfahren wird die Hitze durch elektromagnetische Energie erzeugt [37]. Die perkutane Ethanolinjektion (PEI), bei der durch lokale Applikation von Ethanol Nekrosen innerhalb der Tumorherde durch Denaturierung von Proteinen, Dehydratation von Zellen und Okklusion von Tumorgefäßen induziert wird, wird nicht mehr empfohlen [24]. Bei Tumormanifestationen, die eine Größe von drei cm überschreiten, kann vor Ablation eine Chemoembolisation durchgeführt werden, um einen synergistischen Effekt mit einem hyperthermen Verfahren zu erreichen [24]. Bei der TACE werden intraarteriell zytotoxische Substanzen infundiert und die Gefäße embolisiert. Dadurch wird zum einen lokal ein zellschädigender Effekt durch ein Therapeutikum erreicht, zum anderen wird durch den Gefäßverschluss eine Ischämie im Tumorgewebe induziert. Da

im Gegensatz zum gesunden Leberparenchym, das vorwiegend aus dem portalvenösen Gefäßsystem versorgt wird, eine arterielle Blutversorgung besteht, kann die Läsion so mit einer gewissen Selektivität behandelt werden. Bei der konventionellen TACE wird ein Gemisch aus Lipiodol und einem Chemotherapeutikum, beispielsweise Doxorubicin, Epirubicin, Cisplatin oder Miriplatin, verwendet und eine Okklusion der zuführenden Tumorgefäße durch ein Embolisationsmittel erzeugt. Daneben ist auch die Verwendung von *drug-eluting beads* möglich, bei denen das Partikel-gebundene Therapeutikum, meist Doxorubicin, konstant innerhalb einer Woche in das Tumorgewebe abgegeben wird [37].

1.2.3 Stadium BCLC B

Bei nicht-resektablen Tumoren wird die TACE als häufigstes lokales Verfahren durchgeführt [37], insbesondere im intermediären Tumorstadium und bei erhaltener Organfunktionalität ohne kurativen Ansatz [24]. Die Patientenauswahl ist abhängig von Tumorlast, zugrunde liegender Lebererkrankung und Allgemeinzustand. Bei einer Leberzirrhose der Child-Pugh-Kategorie B oder C oder Vorliegen einer makrovaskulären Invasion des HCC in das Portalvenensystem ist das Verfahren kontraindiziert [37]. Als gleichwertiges Verfahren gilt die TARE [24]. Hierbei werden interventionell Mikrosphären aus Glas oder Harz transarteriell in den Tumor eingebracht, die mit dem Isotop Yttrium-90 markiert sind. Durch radioaktiven Zerfall werden die malignen Zellen in einem Umkreis bis zu elf mm einem direkt zytotoxischen Effekt ausgesetzt. Als Nebenwirkungen sind bei diesem Verfahren vor allem Fatigue, abdominelle Schmerzen, Übelkeit und gastrointestinale Ulcera beschrieben [42]. Kontraindiziert sind diese Ablationstechniken bei Vorliegen einer Leberdekompensation, einer höhergradig eingeschränkten Nieren- oder Leberfunktion, einer makroskopischen Gefäßinvasion oder bei Fernmetastasierung des Tumors [37].

1.2.4 Stadium BCLC C

Zur Therapie des fortgeschrittenen HCC sind bei erhaltener Leberfunktion (Child-Pugh-Kategorie A, ggf. auch B) und Ausscheiden lokaler Behandlungsmaßnahmen Systemtherapeutika unterschiedlicher Wirkstoffklassen indiziert [24]. Diesen ist die systemische Gabe, verbunden mit dem möglichen Auftreten systemischer Nebenwirkungen, gemeinsam. Bei einer ausgeprägten Leberfunktionseinschränkung (Child-Pugh-Kategorie C) wird keine Systemtherapie empfohlen [24].

1.2.4.1 Kombinationstherapie aus Atezolizumab und Bevacizumab

Als *first-line*-Therapie hat die Kombinationstherapie aus Atezolizumab und Bevacizumab die langjährige primäre Empfehlung zu Sorafenib verdrängt [24]. Die Wirkung von Atezolizumab wird durch eine Hemmung von PD-L1 vermittelt. Im physiologischen Signalweg führt eine Bindung von PD-L1 an PD-1, einem Rezeptor auf T-Zellen [43], zu einer verminderten T-Zell-Funktionalität und -Proliferation, zur Inaktivierung und Apoptose von T-Zellen sowie zu einer Vermehrung regulatorischer T-Zellen [43,44]. Hierdurch kommt es zu einer Modulation der Immunantwort von immunsuppressivem Charakter [44]. Als monoklonaler Antikörper gegen PD-L1 bewirkt Atezolizumab durch Hemmung der Interaktion mit dem Rezeptor eine Reaktivierung der T-Zell-Funktion im Tumorgewebe. Dadurch wird die physiologische Immunität gegenüber Tumorzellen, die eine Expression von PD-L1 zeigen, gesteigert [43]. Demgegenüber agiert Bevacizumab als VEGF-Inhibitor. Diesem Wachstumsfaktor wird Einfluss auf die Entstehung und das Fortschreiten von Tumorerkrankungen zugesprochen [45]. VEGF übernimmt zum einen Funktionen in der Neoangiogenese, die für die Blut- und Substratversorgung auch im Tumor relevant ist, zum anderen wurden auch Effekte auf die Immunantwort in malignen Geweben durch Repression von T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Infiltration sowie Zunahme immunsuppressiver Zellen nachgewiesen [44,46,47] (Abb. 3). Im HCC wurde ein stärkerer Effekt auf das progressionsfreie Überleben durch eine Kombinationstherapie aus Bevacizumab und Atezolizumab nachgewiesen, als durch eine PD-L1-Antikörper-Monotherapie [45]. Zudem wurde in einer nicht-verblindeten Studie die Verbindung beider Substanzen als *first-line*-Therapie beim unbehandelten HCC gegenüber Sorafenib erprobt. Dabei ergab sich nach zwölf Monaten eine Verbesserung des Gesamtüberlebens auf 67,2% gegenüber 54,6% unter Sorafenib-Behandlung. Das mediane progressionsfreie Überleben wurde durch die Kombinationstherapie von 4,3 Monaten auf 6,8 Monate gesteigert [48]. Allerdings gibt es Hinweise auf ein schlechteres Ansprechen immunmodulatorischer Therapien bei HCC-Genese auf Basis metabolischer Erkrankungen, wie beispielsweise NAFLD [49]. Als Nebenwirkungen der Antikörper-Medikation zeigten sich in der Studie unter anderem Hypertonie, Thrombozytopenie, Proteinurie, Pruritus, Diarrhoe und Fatigue-Symptomatik. Als schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkung traten vor allem Blutungskomplikationen, wie Ösophagusvarizenblutungen auf [48]. Immuntherapien sind zudem mit einem erhöhten Risiko autoimmun-vermittelter unerwünschter Arzneimittelwirkungen vergesellschaftet [50].

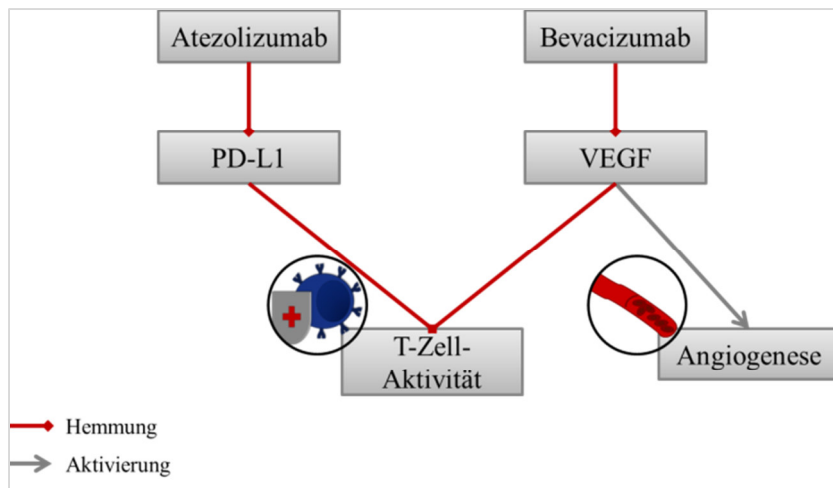


Abb. 3: Wirkweise von Atezolizumab und Bevacizumab.

1.2.4.2 Sorafenib

Bei Kontraindikationen gegen Immuntherapeutika stehen die oralen Multikinase-Inhibitoren Sorafenib und Lenvatinib als *first-line*-Therapie im fortgeschrittenen Stadium und bei ausreichender Leberfunktion für die systemische Applikation zur Verfügung [24,37]. Die Wirkung von Sorafenib beruht auf der Hemmung verschiedener Kinasen, vorwiegend Raf-1, BRAF, VEGFR 1-3 und PDGFR- β , die in unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen wurde [51–53]. Besonders Raf-1 und VEGF scheinen als Zielstrukturen interessant, da sie bei der Pathogenese des HCC relevant sind [53]. VEGF und PDGF wirken als Wachstumsfaktoren für die Neoangiogenese. VEGF führt zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, während die Stabilisierung der Gefäße durch PDGF beeinflusst wird. Entsprechend wird durch die Hemmung dieser Signalwege ein antiangiogener Effekt auf Tumorzellen verübt [51]. Zudem sind *in vitro* und *in vivo* eine dosisabhängige Abnahme der Tumorzellproliferation durch Hemmung des RAF/MEK/ERK-Signalweges sowie die Induktion von Zelltod beschrieben [51,54] (Abb. 4). Letzteres wird auch durch eine Verminderung von Mcl-1 vermittelt. Dieses Molekül aus der Bcl-2-Familie mit anti-apoptotischen Funktionen gilt gemeinhin als Faktor der Apoptoseresistenz im HCC. Durch die Verringerung der Mcl-1-Expression wirkt Sorafenib im HCC Zelltod-induzierend [54], ein Effekt, der beispielsweise bei Nierenzellkarzinomen nicht nachgewiesen wurde [52]. Zusätzlich wurde in verschiedenen Tumorzelllinien die Ausbildung von Nekrosen durch die Verschlechterung von Blutversorgung und Angiogenese gezeigt [51,52]. In einer randomisierten, doppelt verblindeten Phase-III-Studie ergab eine Behandlung mit Sorafenib im Vergleich zur Placebo-Gabe eine gesteigerte Überlebenszeit von 10,7 gegenüber 7,9 Monaten [53]. Als prognostisch relevant für diesen Endpunkt erwiesen sich der

Allgemeinzustand des Patienten, das Vorliegen einer makroskopischen Gefäßinvasion, die Tumorlast, das Ausmaß der zugrunde liegenden Leberzirrhose und verschiedene Blutwerte, wie AFP, Bilirubin oder Albumin. Daneben wurde das Zeitintervall bis zur bildgebend messbaren Progression der Erkrankung durch die *targeted therapy* im Vergleich zur Kontrolle von 2,8 auf 5,5 Monate verlängert [53]. In einer retrospektiven Analyse wurde bei lokoregionärer Erkrankung ohne Fernmetastasierung ein besseres Therapieansprechen verzeichnet. Zudem wurde eine HCV-abhängige Genese des HCC ebenso wie ein niedriger Neutrophilen-Leukozyten-Index, ein Marker des Inflammationsstatus, als Prädiktionsfaktor für die Wirkung einer Sorafenib-Behandlung identifiziert [55]. Als adjuvante Therapie nach Resektion oder lokaler Ablation hingegen zeigte Sorafenib keine signifikanten Vorteile hinsichtlich des Überlebens oder des Rezidivierens der Erkrankung gegenüber der Placebo-Kontrolle [56]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählten in verschiedenen Studien das Hand-Fuß-Syndrom, Diarrhoe, Gewichtsverlust und Alopezie, zudem traten Hypertonie und abdominelle Schmerzen auf [53,56].

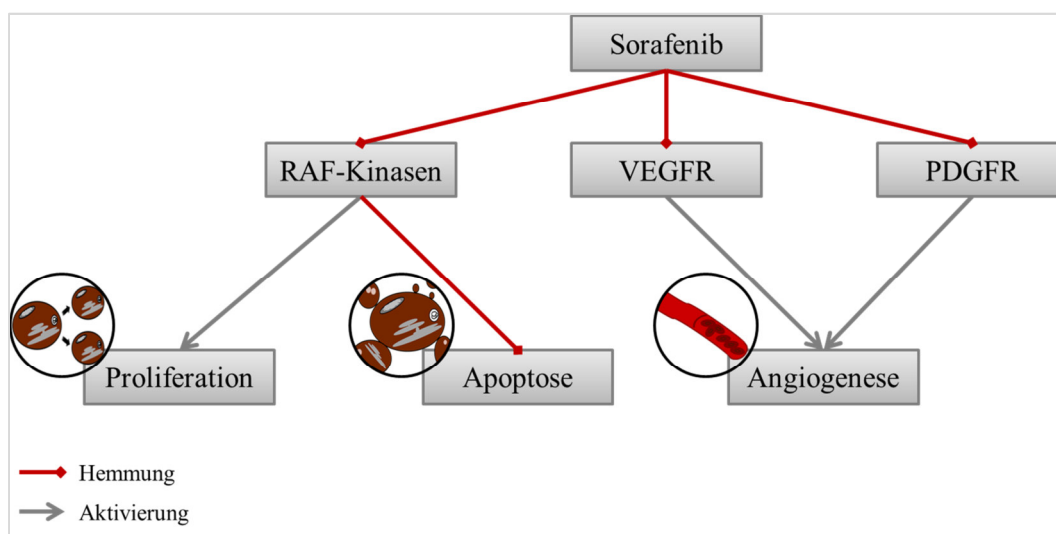


Abb. 4: Wirkweise von Sorafenib.

1.2.4.3 Lenvatinib

Als antiangiogener oraler Multityrosinkinasehemmer wirkt Lenvatinib auf VEGFR 1-3, FGFR 1-4, PDGFR- α , RET und KIT [37,57]. In einer randomisierten Phase-III-Studie war diese *targeted therapy* im Vergleich zu einer Behandlung mit Sorafenib nicht unterlegen. Im Gesamtüberleben, unter Lenvatinib 13,6, unter Sorafenib 12,3 Monate, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede [57]. Bei Betrachtung des Intervalls bis zum Nachweis einer Krankheitsprogression überwog hingegen der Vorteil des neuen Medikaments mit 8,9 gegenüber 3,7 Monaten unter Sorafenib-Behandlung, verbunden mit einer längeren Erhaltung

der Lebensqualität. Als Nebenwirkungen traten unter anderem Hypertonie, Appetitminderung, Hypothyreose, Diarrhoe und Gewichtsverlust auf [57]. In Zukunft ist möglicherweise auch ein Einsatz als Kombinationstherapeutikum sinnvoll. Erste Studienergebnisse deuten auf relevante Effekte durch Kombination mit dem Immuntherapeutikum Pembrolizumab hin [58].

1.2.4.4 *Second-line-Therapeutika*

Als *second-line*-Therapien stehen Regorafenib, Cabozantinib sowie Ramucirumab zur Verfügung [24]. Regorafenib zeigt in der molekularen Struktur große Homologien zu Sorafenib, weist aber dennoch ein anderes Wirkspektrum auf [59]. Unter diesem Therapeutikum wurde bei Patienten mit guter Leberfunktion, die eine initiale Sorafenib-Therapie tolerierten, ein Überlebensvorteil gegenüber Placebo-Gabe erzielt [37]. Der Wirkstoff gehört zu den oralen Multikinaseinhibitoren aus der Klasse der *targeted therapies*, der auch bei metastasierten Kolonkarzinomen und fortgeschrittenen gastrointestinalen Stromatumoren eingesetzt wird [60,61]. Die Wirkweise beruht auf einer Hemmung verschiedener Rezeptortyrosinkinasen, beispielsweise VEGFR 1-3, FGFR 1, TIE-2, PDGFR- β , BRAF, KIT oder RET [62,63]. In Analogie zu Sorafenib kommt es so zur Hemmung unterschiedlicher Signalwege, die unter anderem obligat für die Neoangiogenese neoplastischer Gewebe sind. Durch die Inhibition von FGFR wird ein wichtiger Faktor der Tumorphilierung und -migration beeinflusst [62], zudem sind Effekte des Wirkstoffes auf Metastasierung, Apoptose und die Infiltration von Makrophagen in Tumorgewebe beschrieben [60,62,63]. Die Induktion von Zelltod wird der Hemmung von p-STAT3 und anderen essenziellen Proteinen im Zellzyklus, wie beispielsweise Cyclin-1 oder Mcl-1, zugeschrieben. Aufgrund hoher Expressionsraten von p-STAT3 bei fortgeschrittenem Tumorstadium und gering differenzierten Tumoren wurde STAT3 auch als diagnostisch und therapeutisch-prognostisch relevant identifiziert [60] (Abb. 5). In der RESORCE-Studie, die als randomisierte Doppelblindstudie zur Untersuchung eines potenziellen Nutzens von Regorafenib als *second-line*-Therapie nach Sorafenib-Gabe durchgeführt wurde, wurde ein Anstieg des medianen Gesamtüberlebens von 7,8 auf 10,6 Monate gegenüber einer Behandlung mit Placebo erzielt [61,64]. Dieses Ergebnis war unabhängig von der zuvor verabreichten Dosis an Sorafenib [64]. Zudem wurde eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls von 1,5 auf 3,2 Monate beobachtet [61]. Die Nebenwirkungen von Regorafenib ähnelten dabei denen von Sorafenib, unter anderem kam es zum Auftreten von Fatigue, Hypertension, palmar-plantarer Erythrodyästhesie und Diarrhoe [37,61].

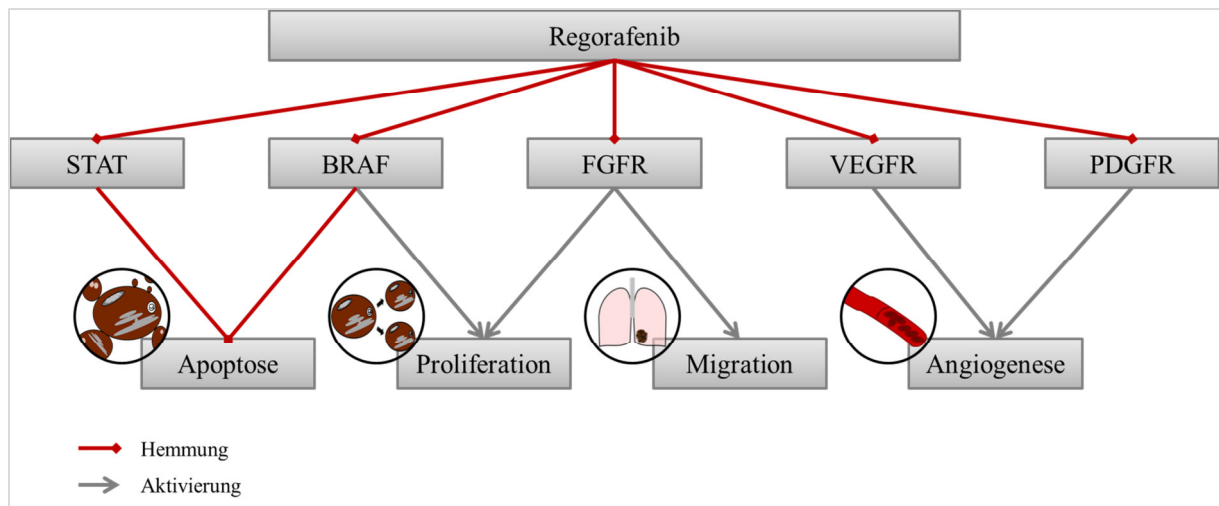


Abb. 5: Wirkungen von Regorafenib.

Cabozantinib inhibiert MET, VEGFR-2 und RET und wurde initial zur Therapie von Schilddrüsenkarzinomen und Nierentumoren eingesetzt [37]. Im HCC wurde ein gesteigertes medianes Gesamtüberleben von 10,2 gegenüber 8,0 Monaten bei Placebo-Gabe durch Cabozantinib als *second-line*-Therapie beobachtet, ebenso eine Verbesserung des medianen progressionsfreien Überlebens. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen ergaben sich vor allem gastrointestinale Symptome, Hypertonie, Fatigue und palmar-plantare Erythrodyssästhesie [65]. Als weiterer Wirkstoff im VEGF-Signalweg wurde Ramucirumab als monoklonaler Antikörper in der Zweitlinientherapie erprobt. Während sich in der Standardpopulation keine signifikanten Unterschiede gezeigt hatten [66], kam es bei Patienten mit erhöhten AFP-Spiegeln zu einer Steigerung des medianen Gesamtüberlebens gegenüber Placebo [67]. Voraussetzung für den Einsatz als *second-line*-Therapie ist daher ein AFP-Serumspiegel über 400 ng/ml [24].

1.2.4.5 Weitere Therapieoptionen

Patienten mit gut erhaltener Leberfunktion (Child-Pugh-Stadium A) können außerhalb der europäischen Arzneimittelzulassungen nach Ausschöpfen anderer Therapieoptionen oder bei Unverträglichkeiten auch Immuntherapien zugeführt werden. Hierfür werden Nivolumab oder Pembrolizumab in der Monotherapie verwendet [24]. Diese wirken als Checkpoint-Inhibitoren auf das Immunsystem und fördern durch Hemmung von PD-1 die T-Zell-vermittelte Tumorbekämpfung [24,68]. Für beide wurde ein ausreichendes Sicherheitsprofil nachgewiesen [68,69]. Als Kombinationstherapie ist die Verwendung von Nivolumab mit Ipilimumab, einem CTLA-4-Antikörper möglich [24].

1.2.4.6 *Tivantinib*

Tivantinib stellt eine weitere Substanz aus der Klasse der *targeted therapies* dar, die ursprünglich als c-Met-Inhibitor klassifiziert wurde [70]. c-Met ist eine Rezeptortyrosinkinase mit hoher Affinität zum hepatozellulären Wachstumsfaktor HGF, die für die physiologische Entwicklung entscheidend ist. Für verschiedene Tumorzellen ist eine Dysregulation der c-Met-Expression beschrieben, die Einfluss auf Proliferation, Migration, Invasion und Angiogenese entarteter Zellen und Gewebe nimmt und so eine Rolle bei Metastasierung und Therapieresistenz spielt [70]. In HCC-Zelllinien wurde kein Einfluss von Tivantinib auf die Expression von c-Met nachgewiesen [71]. Dennoch wurden anti-proliferative und apoptotische Effekte auf verschiedene Tumorzelllinien, beispielsweise von HCC, cholangiozellulärem Karzinom, Kolonkarzinom oder Mammakarzinom, beobachtet [70,72]. Die Wirkweise wird durch unterschiedliche Mechanismen beschrieben, ist aber nicht abschließend geklärt. Für die Induktion von Zelltod werden die gesteigerte Aktivität verschiedener Caspasen, eine vermehrte Bildung pro-apoptotischer Proteine wie Bax sowie ein vermindertes Level anti-apoptotischer Moleküle, beispielsweise Bcl-2, Bcl-x1 und Mcl-1, verantwortlich gemacht [71,72]. Da Bcl-x1 und Mcl-1 bei gesteigerter Expression von c-Met vermehrt gebildet werden und möglicherweise direkte Zielstrukturen von Tivantinib darstellen, wird Apoptose hier in indirekter Abhängigkeit vom c-Met-Level ausgelöst [72]. Zudem verhindert eine Behandlung mit Tivantinib die Ausbildung von Mikrotubuli. Dies wird einer Inhibition der Tubulin-Polymerisation zugeschrieben. Die damit verbundene Hemmung der physiologischen Zellaktivität stellt einen Einflussfaktor auf die Tumorsuppression und Apoptose dar [71]. Die *targeted therapy* bewirkt des Weiteren im Zellzyklus einen vermehrten G2/M-Arrest durch Veränderung des Cyclin-B1-Gehaltes [71,72]. Als Substanz aus der Gruppe der Bisindolylmaleimide, die als Proteinkinase C (PKC)-Inhibitoren bekannt sind [73,74], ist auch über diesen Weg ein Einfluss auf Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose möglich [75].

Tivantinib wurde bereits im experimentellen Ansatz bei HCC-Patienten getestet. In einer Phase-II-Studie zeigte die *targeted therapy* als *second-line*-Therapie bei Tumoren mit hoher c-Met-Expression signifikante Vorteile. Das mediane Gesamtüberleben stieg von 3,8 Monaten in der Placebo-Gruppe auf 7,2 Monate bei Wirkstoffbehandlung. Auch das mediane Intervall bis zum Nachweis einer Krankheitsprogression wurde von 1,4 auf 2,7 Monate verlängert, das mediane progressionsfreie Überleben von 1,4 auf 2,2 Monate [76]. Dagegen wurde bei Patienten mit Tumoren ohne erhöhte c-Met-Expression keine Verbesserung des Verlaufes erreicht. Es zeigte sich vielmehr, dass das mediane Gesamtüberleben in der Placebo-Gruppe

bei niedrigem Met-Status 9 Monate, bei hohem 3,8 Monate betrug. Der Met-Gehalt im Tumorgewebe stellt somit einen negativen prognostischen Faktor bei vorbehandelten HCC-Patienten dar [76]. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Phase-II-Studie wurde im Anschluss eine Phase-III-Studie durchgeführt. Auch hier wurde Tivantinib als *second-line*-Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC und hoher Met-Expression eingesetzt. Aufgrund schwerer Nebenwirkungen zu Beginn der Studie wurde die Dosierung von Tivantinib im Verlauf verringert und somit nicht in gleicher Höhe wie in der Phase-II-Studie eingesetzt [77]. Im Gegensatz zur vorhergehenden Untersuchung wurde kein Überlebensvorteil durch Tivantinib im Vergleich zur Placebo-Kontrolle nachgewiesen. Patienten unter Wirkstoffbehandlung zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 9,1 Monaten, in der Kontrolle von 8,4 Monaten. Auch bei Betrachtung des medianen progressionsfreien Überlebens sowie der medianen progressionsfreien Zeit wurde kein signifikanter Vorteil durch Tivantinib erzielt [77]. Die Art der auftretenden Nebenwirkungen unterschied sich in den verschiedenen Studien kaum, es kam unter anderem zu Neutropenie, Anämie, Aszites, Fatigue, Diarrhoe und abdominellen Schmerzen [76,77].

1.2.4.7 Chemotherapeutika im HCC

Eine systemische Applikation von Chemotherapeutika, wie sie bei vielen Tumorerkrankungen Standard ist, wird von den Fachgesellschaften beim HCC nicht empfohlen. Aufgrund einer hohen intrinsischen Chemoresistenz wurden durch Doxorubicin und andere Therapeutika keine Überlebensvorteile erzielt [37]. Da bei der überwiegenden Zahl an HCC-Patienten neben dem Tumor auch eine Leberzirrhose vorliegt, kann die Metabolisierung der Therapeutika gestört und damit die Toxizität der Medikamente erhöht sein. Zudem stellt die Leberzirrhose einen immunsuppressiven Faktor dar, der schwerwiegende Komplikationen bei Infektionen und Nebenwirkungen der Behandlung begünstigt [37].

Obwohl die systemische Therapie mit Doxorubicin, die aufgrund geringer Ansprechraten keine relevanten Überlebensvorteile gezeigt hat [37], verlassen wurde, wird dieses Chemotherapeutikum noch immer im Rahmen lokaler Verfahren, wie der TACE, eingesetzt [24,37]. Der Wirkstoff gehört zur Klasse der Anthrazyklin-Antibiotika und ist bereits seit 1969 bekannt. Die Wirkweise besteht in der Interkalation zwischen Basenpaaren der DNA, sodass DNA-Synthese und Transkription verhindert werden. Durch den Einfluss auf DNA-Replikation und Proteinbiosynthese wird die Zellteilung in sich schnell teilenden Geweben, wie beispielsweise Karzinomen, unterbunden. Neben einer Hemmung der Topoisomerase II, die diese Funktionen ebenfalls beeinträchtigt, kommt es aufgrund der molekularen Eigenschaften der Substanz zur Bildung freier Radikale, die zu einer Schädigung von

Zellstrukturen und DNA führen [78] (Abb. 6). Die systemische Applikation von Doxorubicin ist mit verschiedenen Nebenwirkungen, wie Kardiotoxizität, peripherer Neurotoxizität, Myelosuppression, Erbrechen, abdominalen Schmerzen oder Onycholyse verbunden [78]. Im Rahmen von TACE-Behandlungen mit Doxorubicin-haltigen Mikrosphären sind lokale Begleiterscheinungen beschrieben. Zu diesen gehören Lebernekrose, Leberinsuffizienz und Abszessbildung. Zudem wurden unter anderem Aszites und hepatische Enzephalopathie, Angina und Herzinsuffizienz sowie Anämie und Sepsis beobachtet [79]. Bei der Verwendung sogenannter *drug-eluting beads* wurden Schmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen und ebenfalls die Ausbildung von Leberabszessen nachgewiesen [80].

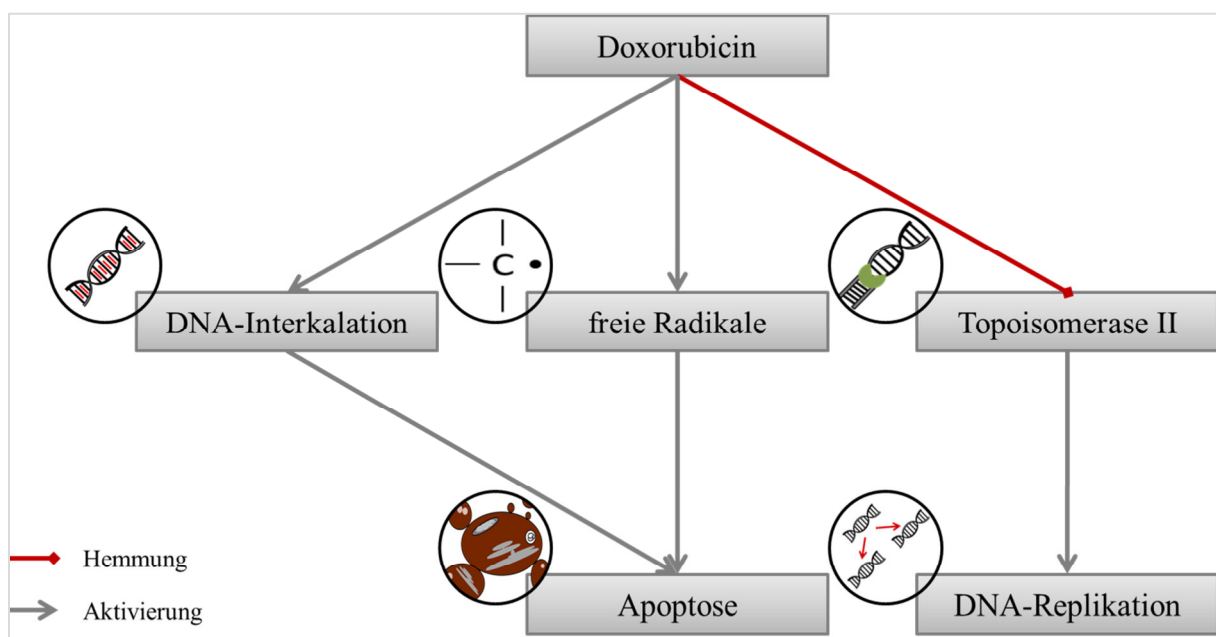


Abb. 6: Wirkungen von Doxorubicin.

Bleomycin gehört ebenfalls zur Klasse der Chemotherapeutika. Dieser Wirkstoff wird bei verschiedenen Karzinomerkrankungen eingesetzt, findet im HCC aber keine leitliniengemäße Verwendung. Dennoch wurde eine tumorsuppressive Wirkung auf HCC-Zellen festgestellt [81–84], auch in der Elektrochemotherapie im Tiermodell [85]. Bleomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum, das durch Interkalation in die DNA sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche Einfluss auf die Chromosomen-Morphologie nehmen kann und so zu Zellzyklusarrest und Apoptose, insbesondere in G1- sowie G2/M-Phase des Zellzyklus, führt [86]. Zudem wird es zu den Topoisomerase II-Inhibitoren gezählt [87] (Abb. 7). Zu den wichtigsten Nebenwirkungen dieses Wirkstoffes gehört die Entstehung einer interstitiellen Pneumonitis mit konsekutiver Lungenfibrose [86].

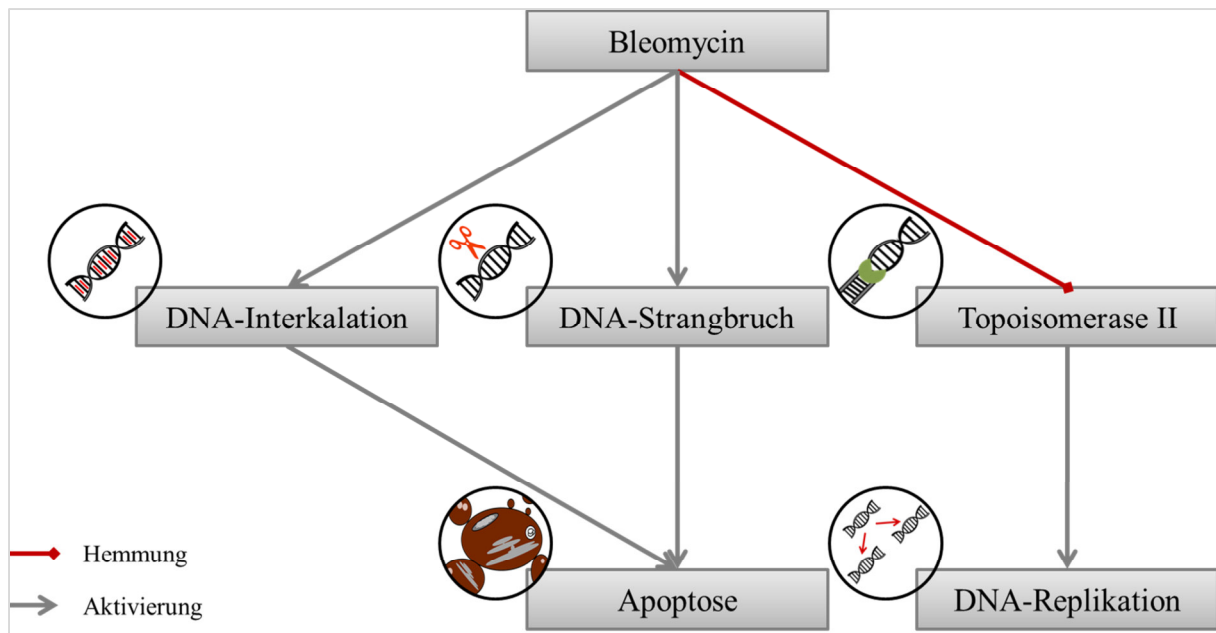


Abb. 7: Wirkungen von Bleomycin.

1.3 Die p53-Familie

Für das Verständnis der Entstehung und die Therapie von Tumoren wie dem HCC spielt die pathogenetische Einordnung der Erkrankung sowie die Unterscheidung von funktionalen und dysfunktionalen Signalwegen eine entscheidende Rolle. Bedeutsam ist hierbei vor allem die p53-Familie, deren Einfluss in der Tumorgenese seit Langem bekannt ist. Sie setzt sich aus einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren zusammen, zu denen neben p53 auch p63 und p73 gehören. Der Aufbau dieser Proteine weist hohe Übereinstimmungen auf. Die Struktur besteht im Allgemeinen aus einer Transaktivierungsdomäne (TAD), einer Oligomerisierungsdomäne (OD) sowie einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) [88]. Letztere beinhaltet ein Zinkion zur DNA-Bindung [89] und zeigt zwischen den Mitgliedern der p53-Familie die größte Ähnlichkeit. Sie beträgt zwischen p53 und p73 63%, zwischen p53 und p63 60% [88,90]. Die ausgeprägte Homologie erklärt auch die Regulation übereinstimmender Zielstrukturen, die zu funktionellen Parallelen der p53-Familienmitglieder beiträgt [90]. Die TAD weist Bindestellen für Proteine und Kofaktoren auf, die für die Regulation der Transkriptionsfaktoren notwendig sind. Im Falle von p53 können hier beispielsweise MDM2 oder MDM4 zu einer verminderten Transkription des Gens beitragen, auch TFIIID oder TFIIHA können hier binden [91,92]. Die Übereinstimmung der TAD beträgt zwischen p53 und p63 22%, zwischen p53 und p73 30% [90]. Die OD vermittelt die Oligomerisierung der Transkriptionsfaktoren. Dabei entstehen im Allgemeinen bevorzugt Homo- statt Heteromere. p53 bildet beispielsweise in seiner aktiven Form ein Homotetramer aus [92,93]. Am C-terminalen Ende von p63 und p73 kann, im Gegensatz zu p53, zusätzlich auch eine

sterile alpha motif (SAM)-Domäne enthalten sein [94], die für direkte Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. In der Nomenklatur wird die entsprechende Form als α gekennzeichnet [90]. Sie kann Einfluss auf Apoptose, Adhäsion und Transkription [95] sowie auf die Oligomerisierung der Proteine zur Bildung der aktiven Form nehmen [96] (Abb. 8).

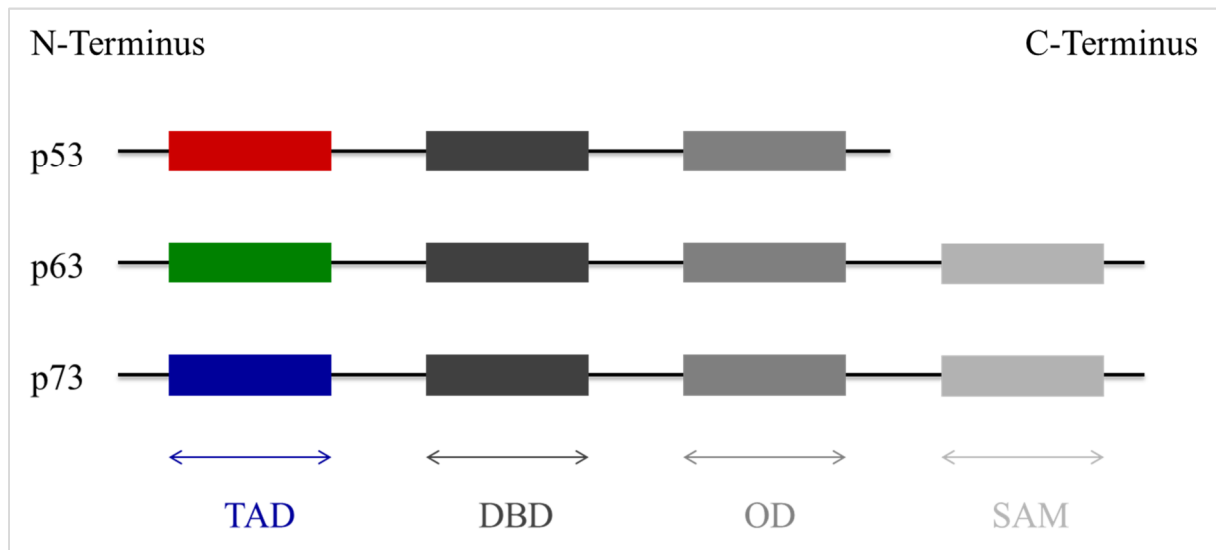


Abb. 8: Vereinfachte Gen-Struktur von p53, p63 und p73. (modifiziert nach [91]) Ausgeprägte Homologie im Aufbau der p53-Familienmitglieder bestehend aus N-terminaler Transaktivierungsdomäne (TAD) als Bindestelle für Kofaktoren, DNA-Bindungsdomäne (DBD) für Bindung an Zielstrukturen sowie C-terminaler Oligomerisierungsdomäne (OD) zur Bildung der funktionellen Form der Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich *sterile alpha motif* (SAM)-Domäne bei p63 und p73 für direkte Protein-Protein-Interaktion möglich. Größte Übereinstimmung in der DNA-Sequenz zwischen p53, p63 und p73 in der DBD [88,90,92,94].

1.3.1 p53

p53 wurde erstmals 1979 [97] von verschiedenen Forschungsgruppen nahezu gleichzeitig in Europa und den USA beschrieben [98]. Damals wurden diesem Protein onkogene Eigenschaften zugeordnet [97,99]. Im Laufe der p53-Forschung wurden immer mehr mutierte Gensequenzen in Tumorzellen nachgewiesen, sodass ein tumorsuppressiver Effekt der Wildtyp-Form nahe lag [98]. Durch den Nachweis eines besseren Ansprechens auf zytostatische Therapien und Radiatio bei Vorliegen von nicht-mutiertem *TP53* wurde diese Schlussfolgerung und die klinischen Relevanz dieses Moleküls bestätigt [89]. Heute ist p53 als entscheidender Tumorsuppressor in einer Vielzahl von Organismen bekannt und Gegenstand zahlreicher Studien. Aktivierungsfaktoren für p53 sind neben DNA-Schäden auch Substratmangel und Hypoxie [100] sowie Hyperproliferation und Telomer-Instabilität [101]. Als exogene Faktoren sind vor allem Strahlung, Onkogene, oxidativer Stress oder Medikamente, wie Chemotherapeutika oder Proteinkinase-Inhibitoren, relevant. Diese

bedingen eine Steigerung der Aktivität, eine Akkumulation und einen verminderten Abbau des Proteins [91,102]. So wird die Halbwertszeit von p53, die normalerweise nur etwa 20 Minuten beträgt, exponentiell verlängert [91,103]. Dabei kommt es auch zu Modifikationen, die zu einer Veränderung der Proteinstruktur führen und so Einfluss auf DNA-Bindung und Funktionalität nehmen. Hierzu zählen Acetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen oder Glykosylierungen [102,104,105]. Die Wirkung des Transkriptionsfaktors besteht vorwiegend in der Induktion von Zellzyklusarrest in der G1- oder G2-Phase, von Seneszenz, Apoptose über den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg sowie dem Erkennen und der Reparatur geschädigter Gen-Abschnitte (Abb. 9). Dies trägt dazu bei, dass genetische Veränderungen im Rahmen schädigender Einflüsse nicht an Tochterzellen weitergegeben werden und so die genomische Integrität der Zellen gewahrt bleibt [88,91,102,104]. Neben den genannten klassischen Effekten der Tumorsuppression sind heute viele weitere Mechanismen bekannt, die der Regulation durch p53 unterliegen. Im Rahmen der Induktion von Autophagie beispielsweise, einer Art Selbstverdauung der Zelle, wird ebenso ein Beitrag zur genomischen Stabilität geleistet. Durch lysosomalen Abbau von Zellorganellen oder Makromolekülen werden einerseits beschädigte oder nicht mehr funktionsfähige Zellbestandteile vernichtet, andererseits Substrate für die Biosynthese generiert. Eine Dysregulation kann Tumorbildung begünstigen [106]. Im Zellmetabolismus kann p53 die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die DNA-Schäden bedingen können, durch Einfluss auf das TIGAR-Gen reduzieren, den Pentose-Phosphat-Weg induzieren und die Glykolyse hemmen [107]. Letzteres wird durch die verminderte Expression von Glukosetransportmolekülen wie GLUT1 und GLUT4 erreicht [100,108]. Cholesterinbiosynthese sowie Fettsäure-Synthese und Lipidoxidation werden ebenso wie der Harnstoffzyklus gehemmt [109]. Die Oxidation freier Fettsäuren kann gesteigert werden, sodass Substrate nicht mehr für Tumorzellen zur Verfügung stehen [100]. Auch im Rahmen immunologischer Reaktionen, bei Zellkommunikation und Zelldifferenzierung [110], beispielsweise von Adipozyten [111] oder Neuronen [112], Migration [109,110] und Hemmung der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) [108], Ferroptose [100,108,111,113] sowie bei Angiogenese und embryonaler Implantation wurde eine Beteiligung von p53 beobachtet [107,110]. Die Vermittlung dieser Funktionen basiert auf DNA-Ebene auf Bindung an *response elements*. Einige Zielstrukturen, wie beispielsweise p21, enthalten mehrere dieser Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität, die zu verschiedenen Reaktionen führen können. p21 vermittelt so bei Bindungen mit niedriger Affinität Apoptose, bei hoher Zellzyklusarrest [110] durch Aktivierung von Cyclinen und

Cyclin-abhängigen Kinasen. Daneben sind auch direkte Protein-Protein-Interaktionen beschrieben [89]. Die p53-vermittelten Reaktionen unterscheiden sich dabei auch abhängig von der Art des schädigenden Faktors [114].

Da viele dieser Aspekte eine entscheidende Rolle zur Vermeidung von Zellentartung und Tumorbildung spielen, gilt p53 als „Wächter des Genoms“ und damit wichtigster Tumorsuppressor im menschlichen Körper [91]. Gleichzeitig unterliegt p53 selbst einer strengen Regulation, um die Homöostase und die Entscheidung über Leben oder Tod der Zelle zu kontrollieren. Als relevantester Repressor gilt MDM2 [114], das im Heterodimer mit MDM4 [111] den proteasomalen Abbau [109,114] des Transkriptionsfaktors vermittelt. MDM2 hemmt so die p53-Funktion und unterbindet die Induktion von Zelltod [115]. Im Rahmen der Aktivierung und Stabilisierung von p53 unter zellulären Stresssituationen aktiviert p53 verschiedene Zielgene, darunter wiederum auch MDM2. So entsteht ein Feedback-Mechanismus, der eine Überaktivität des Transkriptionsfaktors vermeidet [114]. Daneben sind weitere Regulationsfaktoren, wie ASPP1 und ASPP2, bekannt [104].

Bei Tumorerkrankungen wurden in mehr als 50% der Fälle Mutationen von *TP53* [90,110,116] auf Chromosom 17 nachgewiesen. Sie gelten als häufigste Tumormutation, meist assoziiert mit schlechter Prognose und schwerem Krankheitsverlauf [88,91]. Mittlerweile sind mehr als 1500 verschiedene Mutationen bekannt [106]. Typisch sind hierbei vor allem Mutationen im Bereich der DBD zwischen Codon 125 und 300 [117], die vorwiegend *missense*-Mutationen darstellen [110,116–118]. Veränderungen in diesem Gen- bzw. Proteinbereich sind für etwa 90% der karzinogenen Mutationen von p53 verantwortlich [92] und haben Auswirkung auf Zielgenbindung, Interaktionen oder Regulationsmechanismen [110]. Außerhalb der DBD finden sich dagegen häufiger *nonsense*- oder *frameshift*-Mutationen [117]. Als Folge der p53-Mutation ist eine Hemmung der noch verbliebenen p53-Wildtyp-Funktion des anderen Allels über zwei Mechanismen möglich: Einerseits bindet und inaktiviert verändertes p53 im Heterodimer physiologisches p53-Protein, andererseits folgt auf eine p53-Mutation meist ein Verlust des verbliebenen Wildtyp-Allels auf DNA-Ebene [116]. Die Folgen der genetischen Veränderungen können ebenso wie die physiologischen Funktionen des Transkriptionsfaktors vielfältig sein. Interaktionen von p53-Mutanten mit dem Mikrobiom des Darmes und bakteriellen Stoffwechselprodukten können die Wirkung der Gen-Variation zusätzlich beeinflussen [119]. Durch Veränderung der Architektur und Expression extrazellulärer Matrixproteine der Basalmembran als Folge der p53-Mutation wird die Invasion von Tumorzellen begünstigt, unterschiedliche Interaktionen beeinflussen Proliferation, Angiogenese und Migration [101]. Im Zellmetabolismus werden durch

Steigerung von Glykolyse und Cholesterinbiosynthese Voraussetzungen für schnelle Energiegewinnung sowie die Bildung neuer Zellmembranen geschaffen, die relevant für die Überproliferation der Zellen sind [106]. Durch Bindung an p63 und p73 mit folgender Inaktivierung ist durch p53-Mutationen auch eine Funktionseinschränkung dieser Transkriptionsfaktoren mit pro-karzinogenen Effekten möglich [116]. Je nach Ausprägung der genetischen Variation ist eine gesteigerte oder verminderte Apoptoserate beschrieben. In den meisten Fällen kommt es jedoch in Karzinomzellen, wie beispielsweise dem HCC, zu einer verminderten Zelltod-Rate und geringeren Expression pro-apoptotischer Proteine [120] sowie der für Apoptose erforderlichen Rezeptoren [121].

Auch Karzinome ohne Mutationen des p53-Proteins zeigen häufig Veränderungen in dessen Expression, beispielsweise durch vermehrte Bildung von p53-Regulatoren, wie MDM2 oder MDM4 [115]. In Analogie zu den natürlichen Eigenschaften treten bei kompletter Defizienz des p53-Gens erhöhte Raten an Zellentartung und Defekte bei der Apoptose- und Zellzyklusregulation auf [88,91,93,103].

Als Zielstrukturen von p53 wurden hunderte von Genen identifiziert, die unter der Expression von p53 einer gesteigerten oder verminderten Bildung unterliegen [117]. Neben Zellzyklus-Checkpoints, wie Cyclinen, MDM2, TGF- α und EGFR, gehören hierzu auch Bestandteile der DNA-Reparatur, wie PCNA oder Gadd45, und der Apoptose, beispielsweise Bcl-xL, Bax [88,102,104] und IGFBP3 [89]. Antiproliferative Effekte wurden unter anderem auch über die Regulation von NR4A3 mit konsekutiver Induktion pro-apoptotischer Genexpression nachgewiesen [122]. Dadurch wird deutlich, dass p53 Bestandteil eines komplexen Regulationssystems von Genen ist, das zur Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen und zur Vermeidung karzinogener Wirkungen einem sensiblen Zusammenspiel mit seinen Kofaktoren bedarf.

1.3.2 p63

Im Gegensatz zur Rolle von p53 in der Tumorsuppression wurden für p63 und p73 vorwiegend Eigenschaften in der physiologischen Entwicklung von Organismen nachgewiesen [123–126]. p63, kodiert auf Chromosom 3 [115,127], bildet bei Betrachtung der Evolution das wohl älteste Mitglied der p53-Familie [90]. Das Protein wurde als entscheidender Faktor für Zellproliferation und Synthese epithelialer Gewebe [91,94,128], insbesondere für Bildung und Differenzierung von Keratinozyten durch Einfluss auf CBX4 sowie für die embryonale Entwicklungsphase [129] identifiziert und überwiegend in Epithelien nachgewiesen [127]. Dementsprechend verursacht eine p63-Defizienz vor allem epitheliale Schädigungen, beispielsweise Wundheilungsstörungen, das Fehlen von

Drüsengewebe, Haarfollikeln und Zähnen. Diese Anomalien nehmen häufig frühzeitig postnatal einen letalen Verlauf [91,93]. Auch die Aufrechterhaltung der Integrität weiblicher Keimzellen [96] sowie eine Expression in Nervenzellen [130] ist für p63 nachgewiesen.

Zudem werden diesem Protein teils auch Funktionen im Rahmen von Karzinomerkrankungen zugeschrieben [96]. p63-Mutationen, die durch Funktionsverlust zur Entwicklung von Karzinomen führen, sind selten. Da p63 aber zum Teil auch analoge Eigenschaften zu p53 besitzt, kann eine Veränderung der p63-Expression durchaus Einfluss auf die Tumorentstehung nehmen [91,115]. Auch durch dieses Protein ist neben der Induktion von Zellzyklusarrest die Auslösung von Apoptose durch den extrinsischen und intrinsischen Signalweg [91,93,115], von Seneszenz sowie die Hemmung der Metastasierung im Rahmen von Tumorerkrankungen möglich [96] (Abb. 9). Als Zielstrukturen dienen dabei unter anderem p21, Bax, CD95, TRAIL-R oder TNF-R [91,93,115]. Durch die Bindung an *response elements* von p53 kann p63 somit auch dessen Zielgene regulieren. Durch eigene DNA-Bindungssequenzen werden p53-unabhängige Zielgene beeinflusst [115,131]. Neben den tumorsuppressiven Eigenschaften wurde in einigen Tumorentitäten auch eine Überexpression von p63 nachgewiesen. Diese zeigt sich beispielsweise bei Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, Brust-, Zervix- und Prostatakarzinomen sowie beim malignen Melanom [96].

1.3.3 p73

Das auf Chromosom 1 kodierte p73-Protein [91], das 1997 erstmals beschrieben wurde [132], dient unter physiologischen Bedingungen vorwiegend der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und Fertilität, der Vermittlung von Apoptose und Chemosensitivität sowie der Zilienbildung und neuronalen Differenzierung [91,94,112,115,126,128,133], vor allem in den frühen Entwicklungsphasen [134] (Abb. 9). Zudem wurde Einfluss auf den Metabolismus und die zelluläre Energiegewinnung, vorwiegend durch die Regulation der mitochondrialen Proteinexpression beschrieben. Auch für die Zellalterung in Abhängigkeit des Gehaltes an Sauerstoffradikalen ist p73 relevant [133]. Eine Defizienz dieses Transkriptionsfaktors führt bei Mäusen zur Entwicklung schwerer gastrointestinaler Blutungen, chronischer Infektkonstellationen und Fehlbildungen im Bereich des Gehirns [135,136], vorwiegend am Hippocampus im Gyrus dentatus [133]. Außerdem zeigt sich ein gehäuftes Auftreten von Infertilität sowie eine erhöhte Tumorratenrate [96]. p73 weist sowohl im Aufbau als auch funktionell eine ausgeprägte Homologie zu p53 auf [132,137]. Aufgrund hoher Übereinstimmung, vor allem in der DBD, wurden für p73 größtenteils identische Zielgene zu p53, unter anderem Bax, MDM2 oder Cyclin G, beschrieben [93,132,135]. Daher ist auch

durch p73 Zellzyklusarrest in der G1-Phase und Zelltod auslösbar, vermittelt durch Interferenzen mit p21, Cyclin B1, Cyclin B2 oder FLASH [91,94]. Im Gegensatz zu p53 kommt es bei DNA-Schädigungen allerdings nicht zur ausgeprägten Akkumulation des Proteins [132].

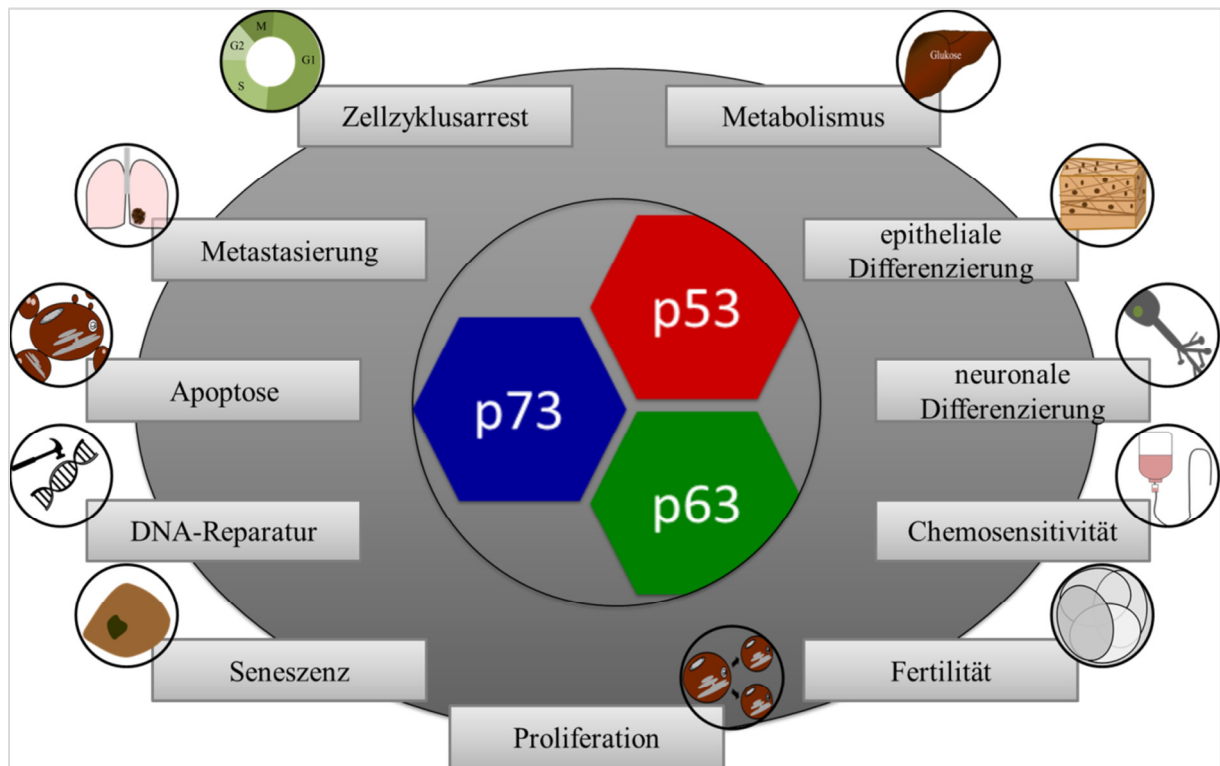


Abb. 9: Funktionen der p53-Familie. Vermittlung vielfältiger Funktionen durch die Mitglieder der p53-Familie, unter anderem bei Tumorsuppression (Zellzyklusarrest, Apoptose, DNA-Reparatur, Seneszenz), physiologischer Zellentwicklung (Differenzierung und Proliferation) und Metabolismus, aber auch bei Metastasierung.

Die tumorsuppressiven Eigenschaften legen nahe, dass Mutationen von p73 Einfluss auf die Entstehung unterschiedlicher Krebserkrankungen nehmen können, allerdings sind Inaktivierungen selten [115]. Ätiologisch relevant scheint entsprechend weniger der Funktionsverlust des Proteins, als vielmehr die in verschiedenen Karzinomentitäten veränderte Expressionsrate [137]. Beispielsweise zeigten sich in HCC, kolorektalen und Lungenkarzinomen erhöhte p73-Level [91]. Andererseits wurden auch Deletionen nachgewiesen, die sich gehäuft in einigen Tumorentitäten finden. Zu diesen gehören unter anderem Kolon-, Pankreas-, Lungen-, Zervix- und Mammakarzinome, außerdem Gliome sowie akute und chronische Leukämieformen [96].

1.3.4 Bildung verschiedener Isoformen der p53-Familie

Neben den bereits beschriebenen agonistischen Funktionen wurden für p63 und p73 auch antagonistische Eigenschaften zu p53 nachgewiesen. Dieser scheinbare Gegensatz ist durch verschiedene Isoformen der Proteine, die durch unterschiedliche Promotoren und alternatives Splicing aus den Genen *TP63* und *TP73* entstehen, zu erklären [115]. Dabei werden TA-Formen mit einer N-terminalen TAD von den dominant negativen, N-terminal trunkierten (Δ N-) Formen ohne diese Domäne unterschieden. Erstere zeichnen sich vorwiegend durch tumorsuppressive, also anti-proliferative und pro-apoptotische Eigenschaften aus, während die Δ N-Formen den TA-Formen gegenüber häufig antagonistische oder inhibitorische Funktionen zeigen [138]. Δ N-Isoformen können dabei zu einer Unterdrückung der Bildung TA-abhängiger Zielproteine führen und so einen dominant-negativen Effekt ausüben, andererseits aber auch selbst als Transkriptionsfaktoren wirken und eigene Zielstrukturen beeinflussen [91,96]. Ein Beispiel für das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren zeigt sich bei der Regulation von Apoptose. Sowohl für p53 als auch für TAp63- und TAp73-Isoformen wurde eine Aktivierung von Rezeptoren beschrieben, die für die Induktion von Apoptose über den extrinsischen Signalweg erforderlich sind, beispielsweise CD95 [83,84,139–143]. Die Regulation erfolgt dabei auch über *p53 response elements* im CD95-Gen [143]. Dahingegen ist durch Δ Np63 eine Hemmung dieses Rezeptors im HCC beschrieben [144]. Eine komplette Trennung der pro- und anti-apoptotischen Eigenschaften dieser verschiedenen Formen der Transkriptionsfaktoren ist allerdings nicht immer eindeutig möglich [91].

Initial wurden für p63 sechs verschiedene Isoformen beschrieben [127], drei TA- sowie drei Δ N-Formen bei drei Promotoren. TAp63 α , TAp63 β und TAp63 γ entstehen bei identischem 5'-Promotor durch alternatives Splicing am 3'-Ende, Δ Np63 α , Δ Np63 β und Δ Np63 γ durch einen abweichenden Promotor [91,93]. Mittlerweile wurden zusätzlich δ - und ϵ -Isoformen sowie eine $\Delta\Delta$ N-Form, der 26 Aminosäuren im Vergleich zur Δ N-Isoform fehlen, nachgewiesen. Die Expression dieser Isoformen bzw. ihre Kombination ist spezifisch für bestimmte Zellarten oder Entartungsmuster [145]. TAp63 findet sich dabei vor allem in Herz, Hoden, Thymus und (Klein-)Hirn [129]. In neonatalen sympathischen Nervenzellen wurde vorwiegend eine Expression von TAp63 α und TAp63 γ nachgewiesen [130]. Δ Np63 zeigt sich vor allem in Niere, Milz, Thymus und Epithelien [129]. Insbesondere für die physiologische Epithelentwicklung ist überwiegend Δ Np63 relevant [131,146], bei zunehmender Ausdifferenzierung von Keratinozyten hingegen nimmt der zelluläre Δ Np63-Gehalt ab [146]. Neben dem unterschiedlichen Vorkommen der Isoformen im Gewebe sind auch divergente

Funktionen der Proteine beschrieben. Während durch TAp63 α und TAp63 γ in Neuronen eine Induktion von Apoptose nachgewiesen wurde, zeigt Δ Np63 α anti-apoptotische Eigenschaften [130]. TAp63 α vermittelt Chemosensitivität [131,141], Δ Np63 α werden gegenteilige Effekte zugeschrieben [131,144]. Dies wird durch unterschiedliche Regulationsmechanismen und verschiedene Zielgene erklärt. Der dominant-negative Effekt der Δ Np63-Isoformen gegenüber TAp63 ergibt sich dabei zum einen durch Hemmung von Bindestellen der TA-Formen, zum anderen durch direkte Protein-Protein-Interaktionen [131]. Als Zielstrukturen dienen TAp63 zur Induktion von Apoptose bei DNA-Schäden die Gene NOXA und PUMA in Oozyten [129], in Neuronen wird Zelltod Bax-abhängig durch TAp63 α und TAp63 γ ausgelöst [130]. Zellzyklusarrest wird anhand einer vermehrten Expression von p21 mit Hemmung Cyclin-abhängiger Kinasen vermittelt [129]. Dahingegen hemmt Δ Np63 durch negative Regulation pro-apoptotischer Faktoren Zelltod sowohl im extrinsischen, als auch im intrinsischen Weg [144]. Δ Np63-Isoformen begünstigen zudem Zellproliferation und -adhäsion und zeigen in Karzinomzellen häufig Überexpression [95]. Einfluss auf den Zellmetabolismus wird durch Expressionssteigerung von GLUT1 verübt [129].

Für p73 sind sieben unterschiedliche Splice-Varianten, benannt von α bis η , sowie zwei Promotoren bekannt. Diese sind für die Bildung der TA- und Δ N-Form notwendig [94] (Abb. 10). Die Δ Np73-Isoformen, ausgehend von einem Promotor im Intron 3 [90], weisen überwiegend dominant-negative Eigenschaften gegenüber TAp73 und p53 auf. Da größtenteils onkogene Effekte vermittelt werden, wie beispielsweise Hemmung von Apoptose [140,147], überrascht die Überexpression von Δ Np73 in Karzinomen von Kolon, Lunge oder Ovar nicht [96]. In der physiologischen Entwicklung von Zellen zeigt sich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Isoformen. Δ Np73 β bildet die überwiegend nachweisbare Form in sympathischen neuronalen Zellen in der Zellkultur und hemmt deren Apoptose [148]. Im Gegensatz dazu ist für die Ausbildung von Dendriten und Axon TAp73 relevant [112,133]. Bei Verlust von TAp73 α , das die SAM-Domäne beinhaltet, zeigt sich zudem eine Bildungsstörung des Hippocampus [112,133,134,149]. Die Regulation des Metabolismus sowie der terminalen Differenzierung von Nervenzellen obliegt ebenfalls TAp73 [112]. Es ist zudem für die Ausbildung der Mitose- und Meiose-Spindeln relevant. Daher führt ein Verlust von TAp73 zu Infertilität [90]. Die Ziliogenese der respiratorischen und neuronalen Gewebe ist bei Verlust von TAp73 α hingegen nicht beeinträchtigt, am ehesten bedingt durch überlappende Funktionen von TAp73 α und TAp73 β , die zu einem Ausgleich bei Expressionsveränderungen einzelner Isoformen führen können [149]. In Analogie zu p63 ist auch für TAp73 eine gesteigerte Sensitivität von Zellen gegenüber Chemotherapeutika

beschrieben, wohingegen $\Delta Np73$ ein vermindertes Ansprechen vermittelt. Letzteres wird daher auch als negativer prognostischer Faktor gewertet [140].

Auch für das p53-Protein selbst sind mittlerweile zwölf verschiedene Isoformen bekannt [91], die sich durch unterschiedliche Affinität zu ihren jeweiligen Zielstrukturen auszeichnen [115]. Zu diesen zählen p53, p53 β , p53 γ , $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 40p53\beta$, $\Delta 40p53\gamma$, $\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$, $\Delta 160p53\alpha$, $\Delta 160p53\beta$ und $\Delta 160p53\gamma$, gebildet durch drei verschiedene Promotoren im *TP53*-Gen [91].

Bezüglich der Regulation dieser unterschiedlichen Proteine wurden Wechselwirkungen und gegenseitige Beeinflussung der Expression und Aktivität gezeigt. Die Expression von p53 und TAp73 beispielsweise führt zu einer Induktion von $\Delta Np73$, während die Expression von $\Delta Np73$ zu einer Hemmung der Transkription des *TP53*- und *TP73*-Gens führt. Diese gegenseitige Regulation begünstigt die Homöostase der unterschiedlichen Isoformen und ihrer Funktionen [150,151]. Durch Autoregulation wird bei starker Expression von $\Delta Np73$ zudem eine Selbsthemmung der Biosynthese dieses Proteins ausgelöst [150]. Durch p53 wurde eine Reduktion von $\Delta Np63$ [152] sowie von TAp63 γ [153] beobachtet. Letzteres wirkt zudem über eine positive Rückkopplung auf $\Delta Np63$ [153,154]. Auch eine Regulation von TAp73 β durch $\Delta Np63\alpha$ ist möglich. Eine Überexpression des dominant-negativen Proteins führt dabei zu einer Aktivitätseinschränkung von TAp73 β [155]. Ebenso ist durch $\Delta Np63\alpha$ eine Suppression von TAp63 γ und p53 möglich [127].

Zur Persistenz physiologisch arbeitender Zellen ist vor allem die Dominanz tumorsuppressiver gegenüber onkogenen Funktionen entscheidend. Die Aktivität der antitumorösen Komponenten der p53-Familie, die zur Induktion von Apoptose bei DNA-Schäden nötig ist, bleibt hierbei durch die kurze Halbwertszeit der $\Delta Np73$ -Formen und eine im Verhältnis 10- bis 100-fach höhere Expression der TAp73-Formen erhalten [150,151]. Im Rahmen von Karzinomen hingegen sind Dysregulationen in der Homöostase der meist onkogenen ΔN -Formen und tumorsuppressiv wirkenden TA-Formen möglich und für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen [115].

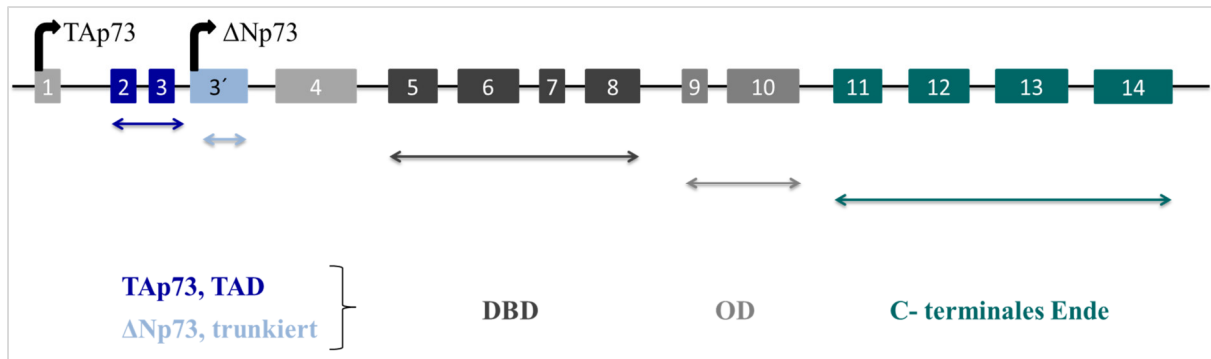


Abb. 10: Aufbau des TP73-Gens. Ausbildung unterschiedlicher Isoformen durch alternatives Splicing und verschiedene Promotoren (modifiziert nach [91]). TA-Formen bestehend aus Transaktivierungsdomäne (TAD), DNA-Bindungsdomäne (DBD) und Oligomerisierungsdomäne (OD), ΔN-Formen ohne TAD.

1.4 microRNAs

Neben dem Einfluss der p53-Familie auf Tumorgenese und -suppression fiel in den letzten Jahren das Augenmerk in der Untersuchung von Zellsignalwegen vermehrt auf kleine Moleküle, die sogenannten microRNAs (miRs). Diese bezeichnen kurze, nicht-codierende RNA-Moleküle mit einer Größe von ca. 22 Nukleotiden, die der Genregulation auf translationaler Ebene dienen [156]. Seit der Erstbeschreibung der miR lin-4 im Jahr 1993 [157] wurden viele weitere, bis dato 800 verschiedene miRs beim Menschen entdeckt, die an der Regulation etwa der Hälfte der Protein-kodierenden Gene beteiligt sind [158].

1.4.1 Synthese von miRs

Die Bildung der miRs findet im Zellkern statt. Zuerst transkribiert die RNA-Polymerase II (in manchen Fällen auch die RNA-Polymerase III [159]) DNA aus Introns Protein-kodierender Gene oder aus anderen, unabhängigen DNA-Abschnitten, in doppelsträngige *primary microRNA* (pri-miR). Diese wird im Anschluss am 5'-Ende mit einer Kappe und am 3'-Ende mit einem Poly-A-Schwanz versehen, bevor ein erster Prozessierungsschritt im Nukleus erfolgt. Hierbei wird die pri-miR durch das RNase-III-Enzym Drosha in die etwa 70 Nukleotide messende *precursor microRNA* (pre-miR) prozessiert, die eine Schlaufenstruktur aufweist (Abb. 11a)). Auch die Bildung mehrerer verschiedener pre-miRs aus einer pri-miR ist möglich. Drosha kollaboriert dabei in einem Mikroprozessor mit DGCR8, das als Bindungsprotein für dsRNA notwendig ist, und weiteren Kofaktoren, beispielsweise den Helikasen p68 und p72. Anschließend wird die pre-miR über Exportin-5 anhand eines zwei Nukleotide messenden 3'-Überhangs erkannt und energieabhängig über Kernporen ins Zytoplasma transportiert. Dort wird sie über das RNase-III-Enzym Dicer in die reife, noch immer doppelsträngige miR mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden prozessiert.

Zur Erhöhung der Bindungsspezifität werden dabei die Kofaktoren PACT und TRBP, das auch die genaue Spaltungsstelle beeinflusst, benötigt. Die doppelsträngige miR besteht aus einem Leitstrang, der im Allgemeinen als miR bezeichnet wird, und einem komplementären Strang, der die Kennung miR* trägt. Nach Trennung der beiden Stränge kommt es zur Bildung des *RNA-induced silencing complex* (RISC), der meist aus dem Leitstrang, Ago2, GW182, Dicer, TRBP und PACT besteht [157,158,160–164] (Abb. 11b)).

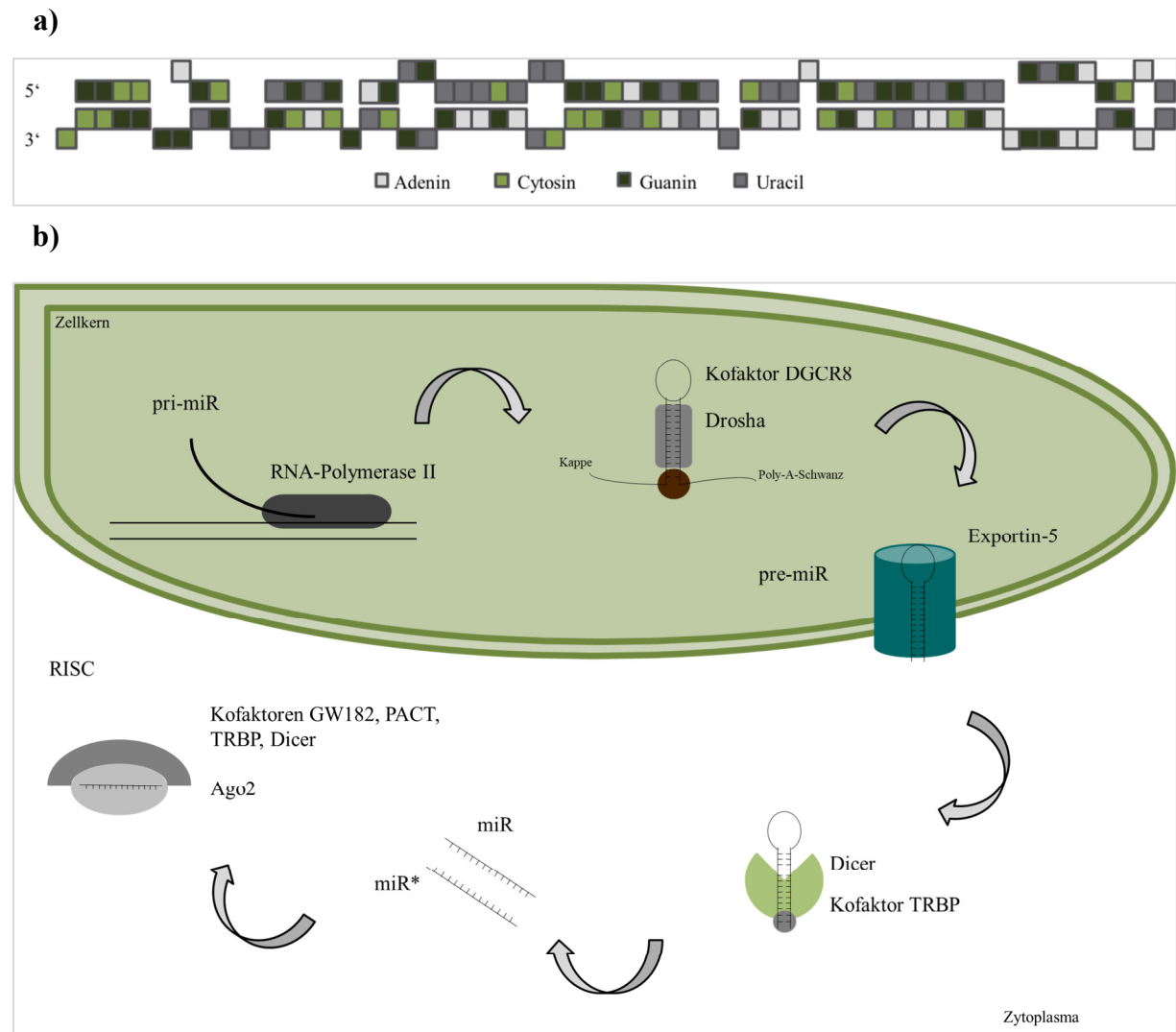


Abb. 11: Aufbau und Bildung von miRs. a) Struktur der pre-miR-34a (nach www.mirbase.org), b) klassischer Bildungsweg der miRs (modifiziert nach [163]).

Neben diesem klassischen Bildungsweg der miRs ist auch ein alternativer Syntheseprozess bekannt. Die pri-miR wird dabei ohne Modifikation durch das Enzym Drosha und dessen Kofaktoren durch Splicing in eine pre-miR überführt. Hierbei werden Introns, auch genannt mirtrons, aus pri-miR oder mRNA freigesetzt, die dann die Funktion der pre-miR übernehmen [157,163–165].

Wie bei vielen anderen RNA- und Proteinmolekülen ist auch bei miRs die Bildung verschiedener Isoformen, genannt Isomirs, möglich, die unterschiedliche Wirksamkeit und Zielstrukturen aufweisen. Bei Veränderungen am 5'-Ende der RNA, beispielsweise durch unterschiedliche Prozessierung, verändert sich die Bindungsstelle zur Ziel-mRNA. Daher nehmen 5'-Isomirs Einfluss auf die Expression unterschiedlicher Gene. Daneben sind – zum Beispiel durch Resektion von Basen am 3'-Ende (*trimming*) oder durch Kopplung weiterer Adenosin- oder Uracil-Basen (*tailing*) durch TNTasen – auch Veränderungen am 3'-Ende der miR mit Bildung verschiedener Isoformen möglich. Da es sich hierbei nicht um den mRNA-bindenden Teil des Moleküls handelt, gibt es typischerweise keine direkten Auswirkungen auf die Auswahl der Zielstrukturen. Allerdings bewirken diese Modifikationen Abweichungen der Halbwertszeit sowie der Wirkeffektivität. Interne Isomirs entstehen durch eine Desaminierung von Adenosin zu Inosin durch das Enzym ADAR [163]. Dabei kommt es durch enzymatische Katalyse zu einer Veränderung der Basenpaarung und der sterischen Eigenschaften. Konsekutiv variiert dadurch die Aktivität von Drosha und Dicer [158]. Diese Art von miR-Isoform ist eher selten und weist meist keine Relevanz für die Funktion der miR auf [163].

1.4.2 Regulation der Bildung und Funktion von miRs

Die Regulation der miR-Synthese erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen. Hierbei spielen Feedback-Schleifen eine entscheidende Rolle, die durch gegenseitige Beeinflussung verschiedener Faktoren die Aufrechterhaltung der Homöostase unterstützen. Im Zellkern wird vor allem Drosha beeinflusst. Der Kofaktor DGCR8 trägt dabei einerseits zu einer Stabilisierung des Enzyms bei, andererseits führt dieses zu Spaltung und Abbau von DGCR8-mRNA. Häm-Proteine dagegen begünstigen durch Bindung und Induktion von Dimeren die Funktionsfähigkeit und damit die Prozessierung von pri-miRs [158]. Daneben bedingen auch Strukturen, die keine Bestandteile des beschriebenen Syntheseweges sind, Veränderungen der miR-Expression. p53 führt durch Steigerung der Aktivität von Drosha zu einer vermehrten Bildung verschiedener miRs, unter anderem miR-34a, miR-145, miR-192 und miR-194 [164]. BRCA1, der vielleicht bekannteste Tumorsuppressor im Mammakarzinom, trägt durch direkte Bindung an pri-miRs zu einem gesteigerten Gehalt an let-7a-1, miR-34a und miR-145 bei [164]. ADAR1, das durch Bindung von DGCR8 dessen Interaktion mit Drosha verhindert, führt zu einer Einschränkung der Prozessierung von miRs. Mutationen des Transportproteins Exportin-5 wiederum bewirken eine Akkumulation der pre-miRs im Nucleus mit konsekutivem Abbau und Verminderung der Expression reifer miRs [164].

Im Zytoplasma erfolgt die Regulation des Enzyms Dicer durch Interaktion mit dessen Kofaktoren. Bei verminderter Expression von TRBP wird die Stabilität des Moleküls

eingeschränkt, sodass es zu Fehlern bei der Prozessierung der miR-Vorstufen kommt. Dagegen führt eine Phosphorylierung von Serin-Resten von TRBP durch den MAPK/ERK-Signalweg zu einer Stabilisierung dieses Kofaktors [158]. Des Weiteren führt mutiertes p53, wie es in vielen Karzinomentitäten vorkommt, zusammen mit TAp63 zu einer Hemmung des Enzyms Dicer. Daneben ist auch Ago2 an der Regulation der miR-Synthese unter Einfluss verschiedener Faktoren beteiligt. Durch hypoxische Zustände, beispielsweise in Tumorzellen, wird eine vermehrte Hydroxylierung des Proteins erreicht, die für die Bildung des RISC entscheidend ist. Funktionsfähigkeit und Aktivität reifer miRs werden so begünstigt. Auch die Stabilität der miRs wird durch Ago-Proteine gesteigert [164]. Eine hohe Komplementarität der miR zu ihrer Ziel-mRNA bewirkt zudem einen beschleunigten Abbau der miR. Diese Übereinstimmung begünstigt Modifikationen im Sinne des *tailing* und *trimming*, die die Halbwertszeit der miR verändern und zur Degradation beitragen. Die dafür nötige ausgeprägte kongruente Basenpaarung zwischen mRNA und miR ist zwar selten und die Funktion dieses Mechanismus nicht abschließend geklärt, eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Homöostase in der Genregulation ist jedoch wahrscheinlich [163].

Auch die Regulation der miR-Funktion ist vielfältig und wird zum Teil über Faktoren vermittelt, die bei der Expression anderer Gene und Signalwege eine Rolle spielen. Zu diesen gehören beispielsweise p53, Myc, MEF2, PU.1 und REST. RNA-Bindeproteine beeinflussen die Interaktion zwischen miR und Zielstruktur. Durch kompetitive Eigenschaften wird die Bindung an die Ziel-mRNA und damit die Funktionalität moduliert. Daneben üben epigenetische Veränderungen, wie Modifikationen der Methylierungsmuster, oder Variationen an Histonen, ausgelöst durch Histon-Deacetylasen, Einfluss auf die Aktivität von miRs aus. Derartige Abweichungen können Expression und Funktion der miRs enorm beeinträchtigen und auch begünstigend auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Karzinomerkrankungen wirken [164].

1.4.3 Wirkweise von miRs

Der Wirkmechanismus von miRs ähnelt dem von *small interfering RNAs* (siRNAs) und fußt auf zwei Säulen. Dabei ist die Basenpaarung zwischen den Nukleotiden zwei bis acht am 5'-Ende der miR gegenüber ihrer Zielstruktur entscheidend [165]. Bei vollständiger Komplementarität der miR-Sequenz mit der Sequenz der Ziel-mRNA kommt es zu deren Abbau über den RISC. Dieser Prozess wird von Ago2 unter Mitwirkung von GW182-Proteinen als Kofaktoren katalysiert [158,166,167]. Auf diese Weise werden die Translation und damit die Bildung des Genprodukts komplett unterbunden. Sofern die Sequenz der miR und der Ziel-mRNA nicht vollkommen übereinstimmen und somit keine

absolute Basenpaarung beider RNA-Moleküle möglich ist, wird die Übersetzung der Ziel-mRNA in ihr Proteindendant lediglich vermindert, aber nicht vollständig aufgehoben. Dies kann entweder durch Hemmung der Translationsinitiation [168] oder durch Unterbrechung des Kontaktes zwischen Ribosomen und mRNA nach Bindung der miR geschehen [169]. Der genaue Mechanismus der Translationshemmung wurde in verschiedenen Modellen beschrieben. Durch Konkurrenz zwischen dem RISC und dem Kofaktor eIF4E, der zur Initiation der Translation nötig ist, wird eine Form der kompetitiven Hemmung vermutet. So wird die Bindung zwischen Translationsfaktor und mRNA und somit die Übersetzung in ein Protein verhindert. Andere Formen der Translationshemmung werden einer Vermittlung durch den RISC zugeschrieben. Demnach soll dieser durch Deadenylierung des mRNA-Endes die physiologisch auftretende zirkuläre Formation der mRNA im Ribosom stören, sodass eine Translation nicht möglich ist. Auch eine Hemmung der Kopplung der 40S- und 60S-Untereinheit des Ribosoms durch den RISC wird angenommen [165]. Aufgrund der Vielzahl an Theorien und der divergenten Datenlage bezüglich der Wirkung der miRs steht eine abschließende Klärung des Mechanismus aber noch aus.

1.4.4 Physiologische und pathophysiologische Funktionen von miRs

Nicht-codierende RNA-Moleküle, zu denen auch miRs zählen, wurden lange Zeit als sogenannte „*junk RNA*“ ohne relevante Funktionen für Zellen und Organismen betrachtet. Heute hingegen ist eine Vielzahl von Signalwegen bekannt, in denen vor allem miRs eine entscheidende Rolle spielen, sowohl im Bereich der physiologischen Entwicklung als auch in der Karzinogenese [170]. Hierzu zählen beispielsweise Wirkungen auf Differenzierung und Entwicklung von Zellen, Apoptose und Zellwachstum [95]. Zudem wurden Interaktionen mit großem Einfluss auf Tumorgenese und Metastasierung bzw. auf das Ansprechen von Krebserkrankungen auf verschiedene Therapien festgestellt. Im Rahmen dessen wurden unterschiedliche Zielgene von miRs ermittelt und einzelnen miRs bestimmte Funktionen zugeordnet, zum Teil als Tumorsuppressoren, zum Teil als Onkogene (Tabelle 2). In diesem Zusammenhang besteht Hoffnung auf den Einsatz von miRs als Marker für Krebserkrankungen und als Zielstrukturen für Therapieansätze [170]. Auch für einzelne Karzinome, wie beispielsweise das HCC, wurden in einer Vielzahl von Studien verschiedene miRs, deren Zielgene sowie ihr Einfluss auf Entstehung, Aufrechterhaltung und Therapieansprechen untersucht. Auch hier wurden sowohl onkogene als auch tumorsuppressiv wirkende Moleküle identifiziert [170,171] (Tabelle 3 und 4).

miR-34a

Tumorentität	Zielgen	Funktion	Referenz
Cholangiozelluläres Karzinom	SMAD4	Hemmung von EMT	[172]
Glioblastom	Notch-2, YY-1, PDGFRA	Hemmung von Proliferation	[173]
Kolonkarzinom	CDK4/6, CCNE2, SNAIL, AXIN2, MET, E2F3	Induktion von Zellzyklusarrest, Regulation von EMT, Hemmung von Proliferation, Migration und Invasion	[173]
Lungenkarzinom	CCNE2, MET	Induktion von Zellzyklusarrest, Hemmung von Migration und Invasion	[173]
Mammakarzinom	Fra-1	Hemmung von Migration und Invasion	[173]
Neuroblastom	N-MYC	Induktion von Zellzyklusarrest	[173]
Prostatakarzinom	CDK6	Induktion von Zellzyklusarrest	[173]

miR-145

Tumorentität	Zielgen	Funktion	Referenz
Kolonkarzinom	FLI1, IRS-1, c-Myc, STAT1, PPP3CA, CBF, YES	Hemmung von Proliferation, Induktion von Zelltod	[174–176]
Lungenkarzinom	Akt	Hemmung von Proliferation	[175]
Magenkarzinom	MYO6	Hemmung von Migration, Metastasierung und EMT	[177]
Mammakarzinom	JAM-A, Rhotekin, Mucin-1, c-Myc	Hemmung von Proliferation, Invasion und Metastasierung	[176,178–180]
Urothelkarzinom	PPP3CA, CBF, YES, STAT1	Induktion von Zelltod	[175]

miR-149-5p

Tumorentität	Zielgen	Funktion	Referenz
AML	FASLG	Hemmung von Apoptose	[181]
Glioblastom	AKT1	Hemmung von Proliferation	[181]
Kolonkarzinom	EphB3	Hemmung von Migration und Invasion	[181]
Kolorektales Karzinom	FOXM1	Hemmung von Migration und Invasion, Steigerung der Chemosensitivität gegenüber 5-FU	[181]
nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	FOXM1	Hemmung von EMT	[181]
Magenkarzinom	ZBTB2	Hemmung von Proliferation und Zellzyklus	[181]
Mammakarzinom	Rap1a, Rap1b, NDST1	Hemmung von Migration und Invasion, Steigerung der Chemosensitivität	[181]
Neuroblastom	Rap1	Hemmung von Proliferation	[181]
Nierenzellkarzinom	FOXM1	Hemmung von Proliferation, Migration und Invasion	[182]
Schilddrüsenkarzinom	FOSL1	Hemmung von Proliferation	[181]

miR-149-3p

Tumorentität	Zielgen	Funktion	Referenz
Melanom	GSK3 α	Induktion von Apoptoresistenz	[181]
Nierenzellkarzinom	FOXM1	Hemmung von Proliferation, Migration und Invasion	[182]
T-ALL	JunB	Steigerung der Proliferation, Verminderung von Apoptose	[181]
Zervixkarzinom	PLK1	Induktion von Apoptose	[183]

miR-192

Tumorentität	Zielgen	Funktion	Referenz
Kolorektales Karzinom	DHFR	Hemmung von Proliferation, Zellzykluskontrolle, Steigerung der Sensitivität gegenüber Methotrexat	[184]
Lungenkarzinom	RB1	Induktion von Apoptose, Hemmung von Proliferation	[185]
Magenkarzinom	ALCAM	Steigerung von Proliferation und Migration	[186]
Multiples Myelom	IGF-1, IGF-1R, MDM2	Hemmung von Proliferation und Migration	[187]
Nierenzellkarzinom	ZEB2, MDM2, TYMS	Hemmung von Migration und Invasion	[188]
Osteosarkom	TCF7	Hemmung von Proliferation, Migration und Invasion, Induktion von Apoptose	[189]
Ösophageales Plattenepithelkarzinom	BIM	Hemmung von Apoptose	[190]
Prostatakarzinom	NOB1	Induktion von Zellzyklusarrest, Hemmung von Proliferation und Migration	[191]

miR-194

Tumorentität	Zielgen	Funktion	Referenz
Blasenkarzinom	RAP2B, E2F3	Hemmung von Proliferation, Migration und Invasion	[192,193]
Glioblastom	IGF-1R	Induktion von Apoptose, Hemmung von Proliferation	[194]
Magenkarzinom	KDM5B	Hemmung von Proliferation, Migration und Invasion	[195]
Multiples Myelom	MDM2	Hemmung von Proliferation und Migration	[187]
Nierenzellkarzinom	ZEB2, MDM2, TYMS	Hemmung von Migration und Invasion	[188]
Osteosarkom	CDH2	Hemmung von Proliferation und Migration, Induktion von Apoptose	[196]
Laryngeales Plattenepithelkarzinom	Wee1	Hemmung von Proliferation, Migration und Invasion	[197]
Ösophageales Plattenepithelkarzinom	KDM5B	Hemmung von Proliferation und Invasion, Induktion von Apoptose	[198]

Tabelle 2: Wirkungen ausgewählter miRs in verschiedenen Karzinomentitäten.

Tumorsuppressive miRs im HCC

miR	Zielstruktur	Wirkung	Referenz
miR-18a	ER α	Reduktion HCC-Bildung bei HBV-positiven Frauen	[171]
miR-23a	XIAP	Induktion von Apoptose	[171]
miR-26a	ER α , CCND2, CCNE2	Verminderung der Zell-Lebensfähigkeit	[171]
miR-29c	WIP1	Induktion von Apoptose, Hemmung von Proliferation, Zellzyklusarrest	[199]
miR-34a	MET, HNF4A, CCND1, Bcl-2	Hemmung von Proliferation, Metastasierung und Invasion, Induktion von Apoptose, Steigerung der Chemosensitivität gegenüber Sorafenib	[171,200]
miR-122	CCNG1, CUTL1, WNT1, MYC, KLF6	Hemmung von Invasion, Proliferation und Metastasierung, Zellzyklusarrest	[170,171]
miR-122*	MDM2	Induktion von Apoptose, Hemmung von Proliferation	[171]
miR-124	STAT3, PIK3CA	Zellzyklusarrest, Hemmung von Proliferation	[170]
miR-125-5p; miR-125b	SIRT7	Zellzyklusarrest, Hemmung von Proliferation	[171]
miR-127	MMP13	Hemmung von Migration und Invasion	[201]
miR-145-5p	MDM2, HDAC11	Induktion von Apoptose, Hemmung von Proliferation und Metastasierung, Reduktion der Resistenz gegenüber Sorafenib	[171,202]
miR-148a	HPIP	Hemmung von Proliferation, Migration, Invasion	[203]
miR-149-5p	PPM1F, AKT1	Hemmung von Proliferation und Metastasierung	[181]
miR-194	N-Cadherin, RAC1, HBEGF, IGF-1R, PRC1, TRIM23, C21ORF91, CDH2	Hemmung von Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung, Regulation von EMT, Steigerung der Chemosensitivität gegenüber Sorafenib	[170] [204– 206]
miR-200a	CDK6	Zellzyklusarrest, Hemmung von Proliferation	[207]
miR-200b/a miR-194-1/215 miR-194-2/192	ZEB1, ZEB2	Regulation von EMT	[171]
miR-214	EZH2, CTNNB1	Zellzyklusarrest, Hemmung von Proliferation und Invasion	[170]
miR-379	IGF-1R	Steigerung der Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU in HepG2- und Huh-7-Zellen	[208]
miR-1188	Bcl-2, Sp1	Hemmung von Proliferation, Invasion und Migration, Induktion von Apoptose	[209]
miR-1246	NFIB	Induktion von Apoptose, Hemmung von Proliferation, Induktion durch p53	[210]

Tabelle 3: Tumorsuppressive miRs und ihre Zielgene und Funktionen im HCC.

Onkogene miRs im HCC

miR	Zielstruktur	Wirkung	Referenz
miR-21	HBP1, PTEN, PDCD4, TP53, SOX4	Zellzyklusprogression, Lipogenese, hepatische Lipidakkumulation	[170,211]
miR-24	TP53	Begünstigung von Metastasierung, Migration und Invasion	[212]
miR-34a	MET, HNF4A, CCND1	bei β -Catenin-Mutation Begünstigung HCC-Entstehung und -Progress	[171]
miR-155	Oct-4, TP53INP1	Hemmung der tumorsuppressiven Eigenschaften von TP53INP1, Homöostase des Immunsystems, Regulation der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen	[170]
miR-192-5p	SEMA3A	Begünstigung von Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung	[213]
miR-221	CDKN2B, CDKN2C, PTEN, TIMP3, MDM2	Steigerung von Proliferation	[171]
miR-452	SOX7	Veränderung von Stammzellen und Tumor-Stammzellen	[170]
miR-519d	PTEN, AKT3, CDN2A, TIMP2, CDKN1A/p21	Begünstigung von Proliferation und Invasion, Hemmung von Apoptose	[171,214]
miR-1228	TP53	Begünstigung von Proliferation, Invasion und Metastasierung	[171]

Tabelle 4: Onkogene miRs und ihre Zielgene und Funktionen im HCC.

1.5 Wechselwirkungen zwischen der p53-Familie und miRs

1.5.1 p53 und miRs

Da miRs sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften aufweisen können [215], liegen Interferenzen mit den Transkriptionsfaktoren der p53-Familie nahe. miRs stellen direkte Zielstrukturen der verschiedenen Proteine der p53-Familie dar, können sie aber umgekehrt auch selbst beeinflussen. Dadurch wird klar, dass miRs durch die inhibitorische Wirkung auf die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung oder Verhinderung von Karzinomen spielen können [171,209,210,212,214–216]. Relevant sind dabei auch die unterschiedlichen Funktionen der miRs in Abhängigkeit des Gewebes, in dem sie gebildet werden. Je nach Entität der Zellen sind tumorsuppressive oder onkogene Wirkungen möglich. Die tumorsuppressiven Effekte der p53-Familie werden somit nicht nur durch direkte Bindung ihrer Zielgene vermittelt, sondern auch durch die Expressionsveränderung von miRs und durch deren Translationsinhibitorische Wirkung [215]. Beispielsweise wird durch die Bindung von p53 an den Promotor von miR-34a oder miR-34b/c die Expression von Mitgliedern der tumorsuppressiv wirkenden miR-34-Familie induziert. Konsekutiv kommt es dann zu einer Hemmung von miR-34-Zielgenen, die zur Steigerung der Zellproliferation sowie zur Regulation von Apoptose, Seneszenz und Zellzyklusarrest beitragen [215,217,218]. Als Zielstrukturen dienen dabei beispielsweise Cyclin E2, CDK4, CDK6, E2F, MYCN und Bcl-2 [217–219]. Gleichzeitig erklärt sich dadurch auch die verminderte Expression dieser miRs bei reduzierten p53-Leveln in einigen Tumorentitäten, die mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht wird [217,218,220]. So wurde beispielsweise bei CLL-Erkrankungen eine verringerte Expression von miR-34a bei Vorliegen von p53-Mutationen oder -Deletionen gezeigt [219].

Auch für miR-145, kodiert auf Chromosom 5q32-33 [175], wurde eine direkte Regulation durch p53 beobachtet. Die Bindung von p53 an den Promotor führt zu einer gesteigerten Expression dieser ebenfalls tumorsuppressiven miR. Diese wiederum dient der negativen Regulation des Proteins c-Myc, das als proliferationssteigerndes Onkogen wirkt [217,218]. Als weitere Zielgene wurden in Urothelkarzinomen PPP3CA, CBFβ, STAT1 und YES [175], im Kolonkarzinom IRS-1, Cyclin D1, FLI1 und e1F4E identifiziert [174,175]. In Letzterem wurde auch ein Einfluss auf den PI3K-, WNT- und MAPK-Signalweg nachgewiesen [221]. In Mammakarzinomzellen zeigte sich zudem eine p53-abhängige Wirkung von miR-145 auf Mucin-1, Rhotekin und JAM-A mit konsekutiver Hemmung von Proliferation und Invasion, vermehrter Apoptose sowie reduzierter Zellmotilität [176,178–180]. In Analogie zu miR-34a

findet sich auch bei miR-145 in Karzinomen zum Teil eine verminderte Expression [175,222,223], die mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein kann [221].

Daneben sind weitere miRs bekannt, die einer Aktivierung durch p53 unterliegen, beispielsweise miR-192, miR-194, miR-215 [109,215,217], miR-107, miR-605 [215,217] sowie miR-128 [224]. Dabei wirken miR-215 und miR-192 auf Regulatoren der DNA-Synthese und des Zellzyklus, unter anderem auf CDC7 oder CUL5, und sind so beispielsweise an der Induktion von Zellzyklusarrest beteiligt [217]. miR-128 dagegen trägt durch Hemmung von Prohibitin zur Apoptose bei [224].

Auch eine direkte Hemmung der miR-Expression durch die Wirkung von p53 ist möglich. Diese wurde für miR-17-92, miR-224 und miR-502 beschrieben. Durch Bindung an die DNA-Promotoren schränkt der Tumorsuppressor die Bildung dieser miRs ein und vermittelt damit wiederum tumorsuppressive Funktionen, wie Apoptose und Wachstumsstillstand. Auch Mutationen des p53-Proteins beeinflussen die Regulation der miRs. Indem mutiertes p53 an miR-Promotoren bindet, wird die Expression tumorsuppressiver miRs unterbunden und die onkogene miRs gesteigert [218].

miRs sind aber auch an der Regulation von p53 beteiligt. Durch die inhibitorische Wirkung von miRs auf mRNA von Genen, die an der Steuerung der p53-Funktionen beteiligt sind, wird die Aktivität des Tumorsuppressors beeinflusst. miR-34a, die auch einer direkten Regulation durch p53 unterliegt, trägt durch Inhibition von SIRT1 zu einer indirekten Wirkungssteigerung bei. Da SIRT1 als Inhibitor von p53 agiert, wird durch dessen verminderte Expression die Aktivität von p53 erhöht. Als ähnliches Beispiel dient die miR-29-Familie, die durch Translationshemmung von p85 α , ebenfalls ein negativer Regulator von p53, die Aktivität des Transkriptionsfaktors positiv beeinflusst [217]. miR-25, miR-32, miR-143, miR-145, miR-192, miR-194 und miR-215 tragen unter anderem durch Inhibition von MDM2 zu einer gesteigerten Wirkung von p53 bei. Ähnliches gilt für miR-10a, miR-34a und miR-887 durch die Inhibition von MDM4 [218]. miR-143, miR-145, miR-192, miR-194, miR-215 und miR-605 sind dabei an einem Netzwerk reziproker Regulation mit dem p53-Protein beteiligt. Durch die beschriebene Hemmung von MDM2 als p53-Inhibitor wird die Aktivität des Tumorsuppressors gesteigert. Da die Expression dieser miRs durch p53 selbst vermittelt wird, ergibt sich hier eine Wechselwirkung im Sinne einer positiven Regulationsschleife [215,218]. Dies zeigt auch, dass durch Inhibition bestimmter miRs Aktivitätseinbußen des „Genomwächters“ in Karzinomzellen vermittelt werden [215].

Im Umkehrschluss ist auch eine Hemmung von p53 durch onkogene miRs möglich. miR-380-5p und miR-504 führen durch Inhibition von p53 zu einer gesteigerten Proliferation

und Tumorbildung [215,218]. miR-125b hemmt durch Verminderung der p53-Expression die Auslösung von Zelltod und übt so onkogene Funktionen aus [217,218]. Ähnliches wurde auch für miR-25, miR-30d, miR-33, miR-98, miR-150, miR-214 und viele weitere nachgewiesen [218] (Abb. 12).

Wie bereits beschrieben nehmen die Transkriptionsfaktoren auch Einfluss auf die Regulation der miR-Synthese. Demnach fördert p53 die Prozessierung der pri-miR durch Interferenzen mit Drosha, während mutiertes p53 durch Wechselwirkung mit Dicer [215] sowie mit Drosha, p68 und pri-miRs zu einer verminderten Bildung von reifen miRs führt. Durch Interferenzen mit Ago2 wird zudem die Bildung des RISC beeinflusst [218].

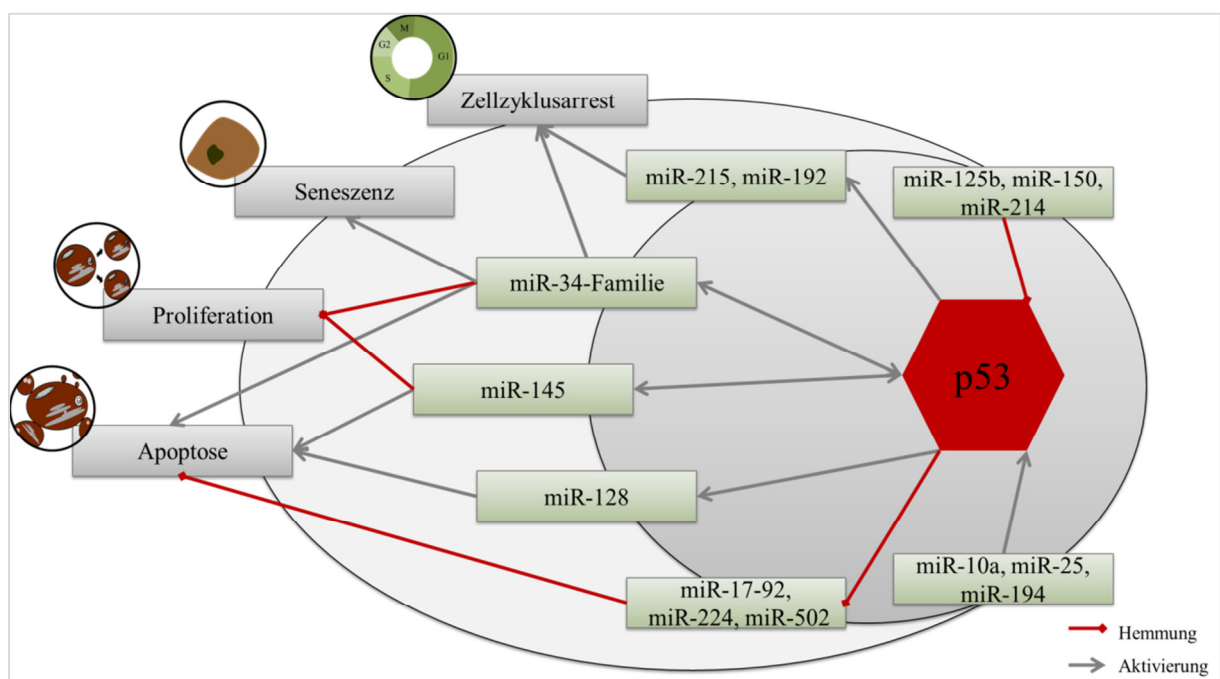


Abb. 12: Zusammenspiel von p53 und miRs.

1.5.2 p63 und miRs

Ähnlich zu p53 sind auch für p63 direkte Regulationsmechanismen für miRs bekannt. Durch Bindung an den Promotor von miR-200/b/a/429 werden die Mitglieder der miR-200-Familie reguliert. Auch die Expression der miR-34-Familie, von miR-138 und miR-181 wird beeinflusst. Dies kann zu Auswirkungen auf Zellproliferation, Invasion, Metastasierung und Apoptose führen. Daneben ist eine Regulation durch p63 für miR-130b, miR-155, miR-205 sowie miR-429 beschrieben [95,96]. Im Falle von miR-155 wird so eine Hemmung von Tumorwachstum und Metastasierung vermittelt [225]. $\Delta Np63\alpha$ inhibiert zudem miRs, die für die Regulation der Seneszenz eine Rolle spielen, beispielsweise miR-130b, miR-138, miR-181a, miR-181b sowie miR-193a [96].

Neben der Einflussnahme von p63 auf die Expression der miRs ist auch eine umgekehrte Regulation möglich [95]. miR-21, miR-30b/c und miR-302 inhibieren als Zielstruktur TAp63 und tragen so zur Entwicklung von Karzinomen bei [95,96,96,226]. miR-130a, miR-138, miR-181a und miR-181b hemmen ebenfalls p63 und SIRT1 und beeinflussen so die Zellalterung von Keratinozyten [225]. Des Weiteren steigert miR-92 durch negative Regulation von p63 die Zellproliferation, auch miR-125b beeinflusst die Expression von p63 negativ [96]. Zellzyklusarrest und Proliferationshemmung durch miR-92 und miR-203 werden durch die Hemmung von Δ Np63 vermittelt [95].

In Analogie zu p53 wird auch durch p63 die Synthese der miRs gesteuert, indem p63 Dicer [215,218] und Δ Np63 die Bildung des Kofaktors DGCR8 beeinflusst [225].

1.5.3 p73 und miRs

Auch für p73 wurden bereits Interaktionen mit miRs beschrieben. In Konkordanz zu den bekannten tumorsuppressiven Funktionen dieses Proteins wirkt es vor allem als direkter Aktivator verschiedener, ebenfalls tumorsuppressiver miRs, beispielsweise miR-34a, miR-145, der miR-200-Familie, miR-205, miR-1246 und miR-3158 [227]. miR-34a stellt dabei ein direktes Zielgen von TAp73 α und TAp73 β dar [228,229]; miR-3158 wird ebenfalls direkt durch TAp73 β und TAp73 γ , nicht aber durch TAp73 α , aktiviert. Gemeinsam ist diesen miRs auch, dass sie durch ihre untergeordneten Zielstrukturen an der Regulation der EMT beteiligt sind [228]. Die Expression von miR-200b-3p [230] wird durch direkte Interferenz mit dem miR-200b/a/429-Promotor vermittelt [231]. miR-145 wird sowohl von TA- als auch von Δ N-Formen des p73-Proteins beeinflusst. Aufgrund der sterischen Nähe der Promotoren ist hier auch eine Aktivierung von miR-143 durch diesen Transkriptionsfaktor nicht auszuschließen [232]. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei miR-205 eine gegenläufige Regulation durch TAp73 und Δ Np73. Ersteres führt zu einer Induktion der miR, Letzteres zu einer Hemmung. Da miR-205 für die Aufrechterhaltung von Chemosensitivität in Karzinomzellen relevant ist, vermittelt Δ Np73 durch die inhibitorischen Effekte eine Steigerung der Resistenz gegenüber medikamentöser Tumorthherapie [233]. Ähnliche Effekte wurden auch für miR-885-5p nachgewiesen, die durch TAp73 aktiviert und durch Δ Np73 gehemmt wird [234]. An der Regulation von miR-1246 zeigt sich, dass konkordante Effekte durch die Proteine der p53-Familie möglich sind. Diese miR wird sowohl von p73, als auch von p63 und p53 induziert [235].

Umgekehrt ist auch eine Expressionsveränderung des Transkriptionsfaktors durch miRs möglich. Dabei wurden bis dato häufiger hemmende als aktivierende Eigenschaften beschrieben. miR-323 [236], miR-361-3p [237], miR-647 [238], miR-663b [239] und

miR-1180-5p inhibieren in verschiedenen Zellarten oder Tumorzellen die Expression von p73 [240], während miR-106b durch Suppression von Itch zu einem erhöhten Gehalt durch Stabilisierung von p73 in Leukämie-Zellen führt [241] (Abb. 13).

Zudem sind auch Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und miRs bekannt, die zur Homöostase der Mitglieder der p53-Familie untereinander beitragen. Ein Beispiel hierfür stellt die Regulation der miR-193a dar. Diese wird unter Einfluss von TAp73 gebildet, wirkt selbst als Inhibitor von TAp73 und wird durch $\Delta Np63\alpha$ gehemmt. Durch die dadurch entstehende Feedback-Regulation kann $\Delta Np63\alpha$ zu einer Steigerung der TAp73-Spiegel beitragen [128,242].

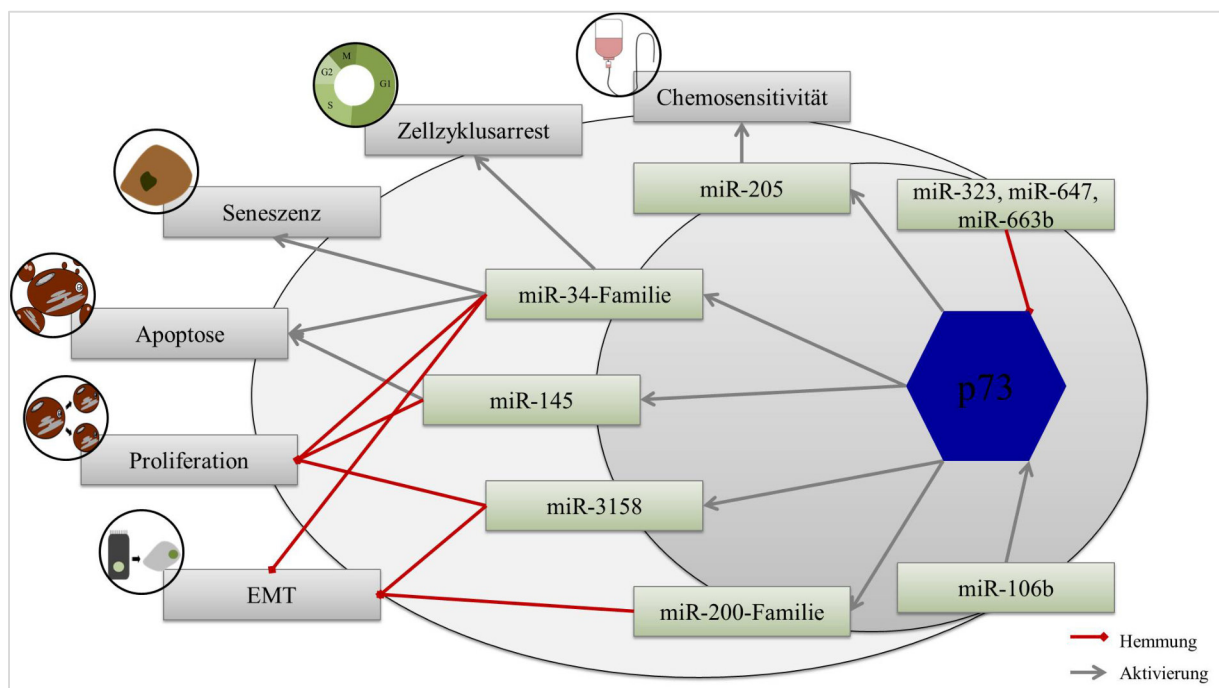


Abb. 13: Zusammenspiel von p73 und miRs.

1.6 Zielsetzung

Als häufiges und gesundheitsökonomisch relevantes Tumorgeschehen ist das HCC [1] gerade wegen der eingeschränkten wirksamen therapeutischen Optionen und der zum Teil unklaren Wirkmechanismen bestehender Therapien Gegenstand zahlreicher klinischer und Grundlagenorientierter Studien. In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf Interaktionen der p53-Familie, miRs sowie verschiedener Therapiesubstanzen im HCC gelegt. Dabei wurden miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 untersucht, die über verschiedene Effektormechanismen bei primären Lebertumoren als tumorsuppressiv beschrieben wurden [171,181,200,204–206]. Ziel war, ihre Expression in Abhängigkeit der Expression von p73-Isoformen genauer zu beleuchten. Die bekannten antagonistischen Eigenschaften von TAp73 und $\Delta Np73$ [96] sollten dabei auf Ebene der miRs weiter analysiert werden. Die Wahl der miRs wurde auch aufgrund vorheriger Arbeiten unserer Gruppe getroffen, da sich für sie bereits teilweise p53- und p73-abhängige Expressionsmuster gezeigt hatten [243]. Zum Ausschluss einer Interferenz mit der Wirkung von p53 wurden überwiegend p53-defiziente Hep3B-Zellen für die Zellkultur verwendet. Aufgrund der häufig bei Malignomen vorhandenen p53-Mutationen mit Verlust der physiologischen Funktion dieses Transkriptionsfaktors [110,116] wurde so auch die Nähe zur klinischen Situation gewahrt. Zur weiteren Evaluation eines klinischen Bezuges sowie einer möglichen therapeutischen Relevanz dieser miRs stellte sich auch die Frage nach einer Wirkstoff-Abhängigkeit der Expressionsraten. Zur Eruiierung möglicher molekularer Wirkmechanismen von Tumortheraeutika sollte daher der Einfluss der *targeted therapies* Sorafenib und Regorafenib untersucht werden, die leitliniengemäß Einsatz als *first-line*- und *second-line*-Therapien im HCC finden [24,37]. Erweitert wurde das Wirkstoffspektrum um Tivantinib. Diese Substanz hatte in einer Phase-II-Studie vielversprechende Vorteile bezüglich der Überlebensraten gegenüber Placebo als *second-line*-Therapie gezeigt [76]. Die Ergebnisse der Phase-III-Studie, die die Wirksamkeit von Tivantinib im HCC im klinischen Setting nicht bestätigten [77], wurden erst nach Abschluss der Labortätigkeit zu dieser Arbeit veröffentlicht. Auf molekularer Ebene besteht die Wirkung von Tivantinib in einer Hemmung der Rezeptortyrosinkinase c-Met [70], für die Einfluss auf Tumorprogression und Zellzykluskontrolle beschrieben wurde [244]. Aufgrund der chemischen Zugehörigkeit in die Gruppe der Bisindolylmaleimide können zudem Effekte auf PKC relevant sein [73,74]. Auch für PKC-Inhibitoren sind potenzielle Regulationsmechanismen für Proliferation, Differenzierung und Apoptose durch Veränderung der miR-Expression beschrieben [245]. Da im Rahmen der regulierten Signalwege Interaktionen mit verschiedenen miRs [246] auch im

HCC nachgewiesen wurden [247–249], konnten relevante Effekte auch auf die Expression der hier untersuchten miRs vermutet werden. Ergänzt werden sollten die Analysen zur Wirkstoffabhängigkeit einer miR-Expression um die Chemotherapeutika Doxorubicin und Bleomycin. Beiden ist eine Induktion von DNA-Schäden [78,86,87] mit konsekutiver Aktivierung der p53-Familie [102], insbesondere der TA-Isoformen [140], gemeinsam. Zudem findet Doxorubicin im HCC Anwendung als Lokalthapeutikum im Rahmen der TACE [24,37]. Effekte auf tumorsuppressive miRs in Abhängigkeit von p73-Isoformen ließen sich also auch hier vermuten. Um einen Zusammenhang potenzieller Substanzeffekte mit der miR-Expression unter Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, sollte eine Differenzierung durch verschiedene Versuchsansätze mit und ohne Überexpression von TAp73 und Δ Np73 erfolgen. Neben den Veränderungen der Expression von miRs und p53-Familienmitgliedern, die mittels qRT-PCR und Western Blot identifiziert werden sollten, wurden auch Ansätze mit MTS-Assays geplant. Hierbei sollte die Veränderung der Konzentration von Redox-Äquivalenten als Endpunkt einer möglichen p73-abhängigen Expressionsveränderung von miRs im Zentrum stehen und Hinweise auf eine potenzielle therapeutische Relevanz im Sinne einer veränderten Stoffwechselaktivität resultierend aus Zelltod oder Zellzyklusarrest liefern (Abb. 14).

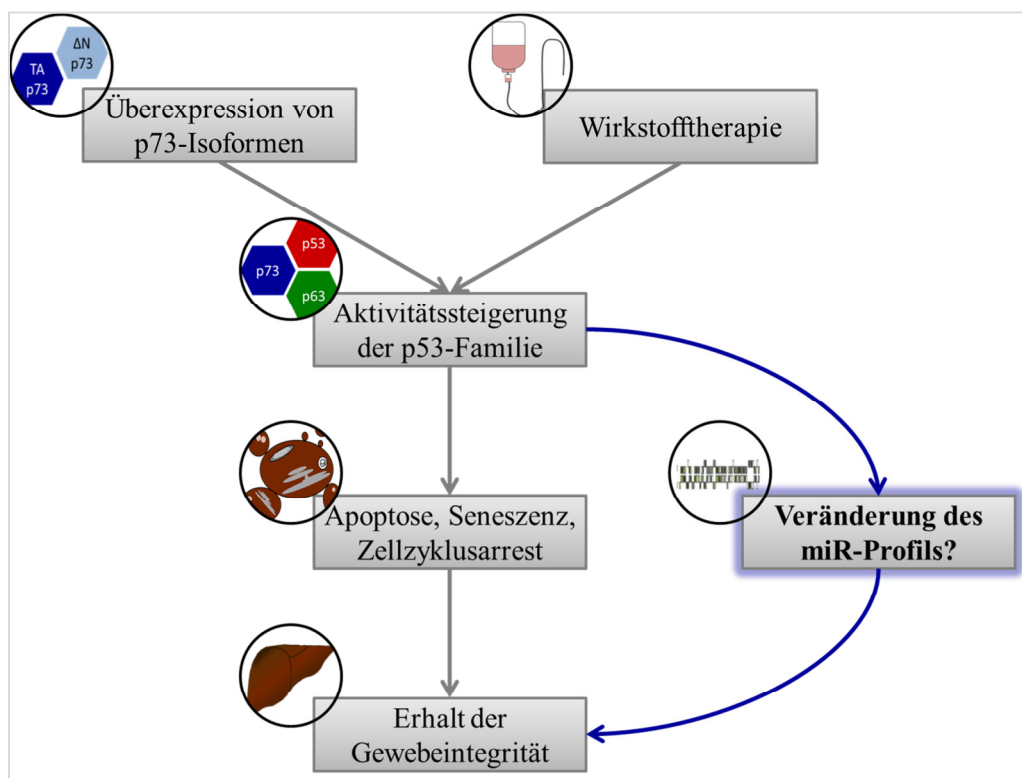


Abb. 14: Untersuchung der Effekte einer Expression von p73-Isoformen und der Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen auf das miR-Profil in HCC-Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Sterilbank Hera safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Forma Scientific CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Mikroskop Olympus CK 2	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg
ZOE Fluorescent Cell Imager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TC 20 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Eppendorf Centrifuge 5417 R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg
NanoPhotometer	IMPLEN GmbH, München
T3 ThermoCycler	Biometra GmbH, Göttingen
LightCycler® 480	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
EMax® Plus Microplate Reader	Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, Kalifornien
Consort EV 261 Electrophoresis Power Supply	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TE77XP Semi-Dry Transfer Unit	Hoefer Inc., Holliston, Massachusetts
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Laborwaage L2200P-*D2	Sartorius GmbH, Göttingen
REAX 2000 Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Gefrierschrank Liebherr mediline	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß

2.1.2 Laborbedarf

Bedarfsgegenstand	Bezugsfirma/ Hersteller
Eppendorf Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
175 cm ² Cell Culture Flask	Corning Inc., Corning, New York
6 Well Cell Culture Cluster with Lid, costar®	Corning Inc., Corning, New York
Minimal Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gentamicin-ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm
Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QIAshredder	QIAGEN GmbH, Hilde
96 Well Cell Culture Plate, costar®	Corning Inc., Corning, New York
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
PVDF Transfer Membrane, 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Eppendorf Research plus Pipetten, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Multipette M4	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon 15 ml/ 50 ml	Corning Inc., Corning, New York
PCR Soft Tubes, 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
DNA-, DNase-, RNase-frei	
Eppendorf Tubes, 1,5 ml, 2,0 ml, 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Vakuumfiltration 500 „rapid“-Filtermax	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Kits

Kit	Bezugsfirma
miRNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien

2.1.4 Antikörper

ID	Antikörper	Bezugsfirma
sc-126	p53-Mouse-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas
ab179874	p63-Rabbit-Antikörper	abcam plc, Cambridge, UK
ab40658	p73-Rabbit-Antikörper	abcam plc, Cambridge, UK
A0545	Anti-Rabbit-Peroxidase-gekoppelter Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
A9044	Anti-Mouse-Peroxidase-gekoppelter Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
A3854	β-Aktin-Peroxidase-gekoppelter Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.5 Primer

ID	Bezeichnung		Bezugsfirma
001093	RNU6B	RNU6B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
000426	hsa-miR-34a	miR-34a	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
002278	hsa-miR-145	miR-145	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
002255	hsa-miR-149	miR-149	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
000491	hsa-miR-192	miR-192	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
000493	hsa-miR-194	miR-194	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

2.1.6 Reagenzien, Lösungen

Reagenz	Bezugsfirma
Millipore-Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
Nuclease-Free Water	QIAGEN GmbH, Hilden
Chloroform, EMSURE	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, ROTIPURAN®, ≥99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol, ROTIPURAN®, ≥99,9%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-Propanol, AnalaR NORMAPUR	VWR International, Ismaning
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Copper(II)-sulfate solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
c0mplete Tablets mini, EDTA-free, Protease-Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
PhosSTOP, Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat, ≥98%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Merck KGaA, Darmstadt
1-Butanol, ROTIPURAN®, ≥99,5%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Stock, 20% SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS, PUFFERAN®, ≥99,9%, Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Re-Blot plus strong solution (10x)	Merck KGaA, Darmstadt
Bovine Albumin Fraction V	AppliChem GmbH, Darmstadt
PERDROGEN 30% H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenol blue sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luminol sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ESMURE® Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethyl sulphoxide (DMSO) Hybri-Max®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CALBIOCHEM® ε-Amino-n-caproic Acid	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.7 Chemotherapeutika und *targeted therapies*

Wirkstoff	Bezugsfirma
Doxorubicin	Hölzel Diagnostika GmbH, Köln
Bleomycin	Hölzel Diagnostika GmbH, Köln
Regorafenib	Hölzel Diagnostika GmbH, Köln
Sorafenib	Hölzel Diagnostika GmbH, Köln
Tivantinib	Hölzel Diagnostika GmbH, Köln

Wirkstoff	Masse (Wirkstoff)	Volumen (DMSO)	Endkonzentration
Doxorubicin	1 mg	0,0345 ml	50 mM
Bleomycin	1 mg	0,0661 ml	10 mM
Regorafenib	1 mg	0,2071 ml	10 mM
Sorafenib	1 mg	0,0430 ml	50 mM
Tivantinib	1 mg	0,0541 ml	50 mM

2.1.8 Puffer

RIPA-Puffer

Reagenz	Menge
RIPA-Puffer	10 ml
c0mplete Tablets mini, EDTA-free, Protease-Inhibitor	1 Tablette
PhosSTOP, Phosphatase-Inhibitor	1 Tablette

Anodenpuffer A

Reagenz	Menge
Tris-Puffer	18,2 g
Methanol	100 ml

Zugabe von H₂O auf ein Endvolumen von 500 ml

pH= 10,4

Anodenpuffer B

Reagenz	Menge
Tris-Puffer	1,5 g
Methanol	100 ml
Zugabe von H ₂ O auf ein Endvolumen von 500 ml	
pH= 10,4	

Kathodenpuffer

Reagenz	Menge
Tris-Puffer	1,5 g
ε-Aminocaprinsäure	2,6 g
Methanol	100 ml
Zugabe von H ₂ O auf ein Endvolumen von 500 ml	
pH= 9,4	

2x Lämmli-Puffer

Reagenz	Menge
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	2 ml
0,2 M EDTA	0,2 ml
H ₂ O	2 ml
Glycerin	3,1 ml
Bromphenolblau	30 mg

ECL-Lösung

Reagenz	Menge
250 mM Luminol in DMSO	2 ml
aus 100 mg Luminol in 2 ml DMSO	
90 mM p-Coumarin-Säure in DMSO	890 µl
aus 14,76 mg in 1 ml DMSO	
1 M Tris-HCl, pH 8,5	20 ml
Auffüllen auf 200 ml mit H ₂ O	

10 x PBS

Reagenz	Menge
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	28,85 g
Auffüllen auf 1 l H ₂ O	

ELISA-Waschpuffer

Mischung aus PBS und 0,05% Tween 20

2.1.9 Gele

Trenngel 12%

Reagenz	Menge
H ₂ O	3,3 ml
Acrylamid-Mix 30%	4,0 ml
1,5 M Tris-Puffer	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
Ammoniumpersulfat 10%	100 µl
Temed	4 µl

Sammelgel

Reagenz	Menge
H ₂ O	2,7 ml
Acrylamid-Mix	670 µl
Tris-Puffer, pH 6,8	500 µl
1 M SDS	40 µl
APS 10%	40 µl
Temed	4 µl

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert.

Hep3B-Zellen, eine p53-defiziente HCC-Zelllinie, wurden in Minimal Essential Medium Eagle (MEM) unter Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Zellen wurden je nach Dichte des Zellwachstums zwei Mal wöchentlich unter sterilen Bedingungen gesplittet. Hierzu wurde zuerst das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und anschließend zur Reinigung von FCS-Resten 10 ml sterile Phosphate-Buffered Saline (PBS) zu den adhären Zellen gegeben. Nach Absaugen von PBS wurden 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung in PBS zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche hinzugefügt. Nach dreiminütiger Inkubation wurde die Enzymlösung entfernt und die Zellflasche für weitere fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert. Anschließend wurde den Zellen zur Inaktivierung des Trypsins FCS-versetztes MEM zugeführt, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht und auf neue, sterile Zellkulturflaschen der Größe 175 cm² mit 20 ml vorgelegtem Medium verteilt.

Die Kultivierung von HepG2-Zellen wurde in gleicher Weise durchgeführt, als Medium wurde hier RPMI mit 10% FCS verwendet.

2.2.2 Zellaussaat

Für die verschiedenen Versuche wurden HCC-Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well in Six-Wellplatten oder von 10.000 Zellen pro Well in 96-Wellplatten ausgesät. Zu diesem Zweck wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und nach Entfernen des Puffers 5 ml Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von drei Minuten wurde das Enzym abgesaugt und die Kulturflasche für weitere fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5% gelagert. Anschließend wurden 10 ml Medium zugegeben. Je nach Dichte der Zellen und benötigter Zellmenge wurden mehrere Zellkulturflaschen auf diese Weise behandelt und die Zellsuspension in einer Flasche vereinigt. Aus dieser wurde 1 ml entnommen und die Zellzahl mittels Cell Counter in Counting Slides mit 10 µl Zellsuspension bestimmt. Danach wurde eine Zellsuspension mit der nötigen Menge Medium und der entsprechenden Zellzahl nach Bedarf hergestellt. Hier wurde bei der Berechnung auch ein Überschuss von ca. 10% aufgrund etwaiger Pipettierverluste einkalkuliert. Im Anschluss daran wurden die einzelnen

Wells der Six-Wellplatten mit 100.000 Zellen in je 2 ml Medium befüllt, in 96-Wellplatten mit 10.000 Zellen in je 100 µl Medium.

2.2.3 Adenovirale Transduktion

Für Versuche, bei denen eine Transduktion mit Adenoviren nötig war, wurden die Zellen zwölf bis 24 Stunden nach Aussaat mit Viren behandelt. Hierzu wurde unter S2-Bedingungen eine Suspension der nötigen Menge Adenovirus-Lösung in Medium hergestellt. Das Medium aus den Platten der zuvor ausgesäten Zellen wurde abgenommen und die Zellen anschließend mit 1 ml Virensuspension in Six-Wellplatten oder 10 µl in 96-Wellplatten behandelt. rAd-GFP und rAd-ΔNp73 wurde je mit MOI 10 eingesetzt. Bei Transduktion mit rAd-TAp73 wurde je nach Virusstock MOI 10 oder MOI 20 verwendet, um eine vergleichbare Transduktionseffizienz zu gewährleisten. Zur Dekontamination der benutzten Gegenstände und der Sterilbank wurde eine UV-Bestrahlung für mindestens 30 Minuten durchgeführt und alle Abfälle im Anschluss autoklaviert. Die behandelten Zellen wurden separat im Brutschrank unter den üblichen Bedingungen gelagert. Nach vier Stunden wurde das mit Viren versetzte Medium von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium unter Zugabe von Gentamicin im Verhältnis 1:1.000 mit einer Endkonzentration von 0,05 mg/ml ersetzt. Auch nach diesem Schritt wurden Abfallmaterialien einer UV-Bestrahlung von mindestens 30 Minuten zugeführt und nachfolgend autoklaviert. Die separate Zelllagerung wurde anschließend aufgehoben.

Alle verwendeten Adenoviren führen neben der Information für das entsprechende gewünschte Gen der p53-Familie auch das Gen für GFP in den Zellkern ein. Bei erfolgreicher Transduktion kann GFP, das dann von den Zellen gebildet wird, im Fluoreszenzmikroskop in Form von grüner Fluoreszenz nachgewiesen werden. Zur Abschätzung der Transduktionseffizienz wurden die Zellen am Folgetag der viralen Behandlung auf diese Weise untersucht.

2.2.4 Behandlung mit Chemotherapeutika und *targeted therapies*

Am Folgetag der Virustransduktion bzw. bei Versuchen ohne Transduktion am Folgetag der Aussaat wurden die Zellen mit Chemotherapeutika und *targeted therapies* behandelt. Dazu wurde jeweils eine Lösung der Wirksubstanz in der nötigen Konzentration in Medium hergestellt. Als Chemotherapeutika wurden Doxorubicin in einer Konzentration von 0,04 µM und Bleomycin in einer Konzentration von 2 µM verwendet. Dies entspricht in der Literatur beschriebenen therapeutisch relevanten Serumkonzentrationen der Wirkstoffe [82]. Um für die *targeted therapies* ebenfalls den Bereich der Plasmakonzentrationen von Patienten unter

Therapie zu erreichen, wurde Regorafenib in einer Konzentration von 5,1 μM , Sorafenib in einer Konzentration von 4,5 μM und Tivantinib in einer Konzentration von 5,4 μM eingesetzt [70,250–252]. Als Kontrolle diente DMSO, das Lösungsmittel der Wirksubstanzen. Hierbei wurde die Menge an die höchste Volumenzugabe der Therapeutika angepasst, dies entsprach dem Volumen des Wirkstoffes Regorafenib. Das vorhandene Medium wurde aus den Wells abgesaugt und durch das Medikamenten-versetzte ersetzt. Auch hier wurde Gentamicin in einem Verhältnis von 1:1.000 zugesetzt.

2.2.5 Ernte und RNA-Extraktion für Kinetik-Versuche

Für Kinetik-Versuche, in denen in Abhängigkeit der Zeit der Effekt der Chemotherapeutika und *targeted therapies* oder der alleinigen adenoviralen Transduktion auf die Expression verschiedener miRs untersucht werden sollte, wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung mit den verschiedenen Medikamenten oder nach Viruszugabe geerntet. Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen mit einem CellScraper vom Boden des Wells gelöst, mittels PBS-Puffer in einer Menge von 500 μl in Suspension gebracht und zum entsprechenden Reaktionsgefäß hinzugegeben. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße bei 2.000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet in weiteren 500 μl PBS gelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 2.000 x g für fünf Minuten wurde erneut der Überstand abgenommen und aus den Zellen anschließend mittels miRNeasy mini Kit von QIAGEN die RNA inklusive der miR nach Protokoll isoliert. Im Anschluss an die RNA-Extraktion wurde die Menge der isolierten RNA photometrisch bestimmt.

2.2.6 Reverse Transkription von miRs in cDNA

Zur weiteren Analyse wurden die miRs mittels TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit revers in cDNA transkribiert. Hierfür wurden Primer für miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192, miR-194 und für den *Housekeeper* RNU6B verwendet. Dies geschah nach Protokoll, die Reaktion wurde mittels ThermoCycler durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert, während die übrigen Proben aus der RNA-Extraktion, die nicht revers transkribiert wurden, unverzüglich bei -80 °C gelagert wurden.

2.2.7 Verfahren bei dose-response-Versuchen

Für dose-response-Versuche, bei denen in Abhängigkeit der Wirkstoffdosis die Expression verschiedener miRs gemessen werden sollte, wurden die Zellen nach Aussaat und Transduktion mit Tivantinib in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Hierbei wurden

die Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5,4 μM sowie 10 μM verwendet. Als Kontrolle diente DMSO, dessen Volumenzugabe dem höchsten Volumen eines Wirkstoffes entsprach. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 Stunden nach medikamentöser Behandlung, da sich dieser Zeitpunkt in den Kinetik-Versuchen als optimal herausgestellt hatte. Ernte, RNA-Extraktion inklusive miR-Extraktion und reverse Transkription wurden in Analogie zu den vorherigen Versuchen durchgeführt.

2.2.8 qRT-PCR-Analysen der miR-Expression

Zur Auswertung der Expression der verschiedenen miRs wurden qRT-PCR-Analysen in 384-Wellplatten im LightCycler von Roche durchgeführt. Als Basis wurde der Brilliant III Ultra-Fast Mastermix verwendet. Die Reaktion wurde nach TaqMan-Protokoll in Triplikaten aus einem Reaktionsgefäß pro Probe angesetzt. Im LightCycler wurden 55 Amplifikationszyklen von je einer Minute eingestellt. Die anschließende Auswertung der Ct-Werte erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Als Normierungsreferenz des RNA-Gehaltes wurde dabei zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit mit den Vorarbeiten von Bender [243] die snRNA RNU6B als *Housekeeper* verwendet.

2.2.9 Herstellung von Protein-Lysaten

Für Protein-Nachweise mittels Western Blot wurden aus den in Six-Wellplatten ausgesäten Zellen nach der Ernte teilweise Protein-Lysate hergestellt. Hierzu wurde das Medium aus den Zellschalen in Reaktionsgefäße überführt, die Zellen mit Hilfe von CellScrapern vom Boden der Wellplatte gelöst, mit 1.000 μl PBS-Puffer zum Medium gegeben und anschließend bei 2.000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 900 μl PBS-Puffer gewaschen und resuspendiert. Anschließend wurden für Versuche, bei denen aus einer Probe sowohl RNA- als auch Protein-Lysate hergestellt werden sollten, 300 μl der Zellsuspension zur RNA-Extraktion und 600 μl zur Protein-Gewinnung in je ein Reaktionsgefäß überführt. Die Gefäße wurden anschließend bei 2.000 x g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Für Protein-Lysate wurden 70 μl RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor hinzugegeben, das Zellpellet darin aufgelöst und im Anschluss eine Stunde auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße bei 4 °C für eine weitere Stunde bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand aus Puffer und gelöstem Protein wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Bestimmung des Proteingehaltes von Protein-Lysaten

Zur Ermittlung des Proteingehaltes der Protein-Lysate wurde ein BCA-Test durchgeführt. Hierzu wurde in einer 96-Wellplatte eine Standardreihe mit einem festgelegten Proteingehalt von 2.000 µg/ml, 1.500 µg/ml, 1.000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml und RIPA-Puffer in einem Volumen von 10 µl pro Well in Duplikaten pipettiert. Die Protein-Lysate wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit RIPA-Puffer verdünnt. Hiervon wurden jeweils 10 µl in zwei Wells der 96-Wellplatte zur Doppelbestimmung gegeben. Anschließend wurden pro Well 200 µl des *working reagent* aus 50 Teilen Bicinchoninic Acid Solution und einem Teil Kupfer(II)-Sulfat-Lösung zugegeben. Zusätzlich wurden je 200 µl dieses Reagenz in zwei Wells als Blindwert pipettiert. Die Platte wurde für 30 Sekunden auf einem Schüttler bewegt, bevor sie für ca. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde. Nachdem ein Farbumschlag sichtbar geworden war, wurde die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Aus den Ergebnissen wurde die jeweilige Proteinkonzentration und das nötige Probenvolumen für Western Blots berechnet.

2.2.11 Western Blot

Für Western Blot-Analysen wurden zum Nachweis von p73, p63 und p53 12%ige Gele mit 7 ml Trenngel und 3 ml Sammelgel gegossen. Diese wurden zur Probenauftrennung in Elektrophorese-Kammern mit SDS-Puffer gegeben und ein geeigneter Größenstandard zur Versuchsauswertung sowie die Proben mit einem Proteingehalt von 5 bis 20 µg in die Geltaschen pipettiert. Zuvor wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt, der durch farbige Markierung den Fortschritt der Elektrophorese anzeigt. Das Proben-Puffer-Gemisch wurde für fünf Minuten im Thermoblock aufgekocht und wieder abzentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgte pro Gel für 20 Minuten bei 25 mA und 40 Minuten bei 40 mA. Zum anschließenden Proteintransfer der Banden vom Gel auf eine Membran wurde ein Filterpapier in Anodenpuffer A und zwei Filterpapiere in Anodenpuffer B getaucht und die Methanol-getränkte PVDF-Membran sowie das Sammelgel darauf positioniert. Abgedeckt wurde das Gel mit drei von Kathodenpuffer benetzten Filterpapieren. Zum Proteintransfer wurde für eine Stunde ein elektrisches Feld mit 80 mA pro Gel angelegt. Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran mittels 5%igem BSA geblockt. Hierfür wurden 2,5 g BSA in 50 ml Waschpuffer gelöst und die Membran mit 10 ml dieser Lösung für 30 bis 60 Minuten auf einem Schüttler versetzt. Anschließend wurde die BSA-Lösung entfernt, eine BSA-Primärantikörper-Mischung im Verhältnis 1:1.000 zugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde die Inkubation für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fortgesetzt.

Nach Entfernen der Lösung wurde die Membran dreimal für je fünf Minuten mit ELISA-Waschpuffer auf einem Schüttler gewaschen, um Reste des Antikörper-Gemisches zu entfernen. Danach erfolgte die einstündige Inkubation mit 10 ml eines BSA-Sekundärantikörper-Gemisches im Verhältnis 1:3.000 bei RT unter Schütteln. Nach Entfernen der Lösung wurde die PVDF-Membran einem erneuten Waschvorgang von dreimal je fünf Minuten mit ELISA-Waschpuffer unterzogen. Zur Vorbereitung auf die Detektion der Proteine wurden zu 5 ml ECL-Lösung 1,53 μ l H₂O₂ gegeben und diese Mischung für eine Minute über die Membran bewegt. Proteinbanden wurden nach Abgießen des Gemisches für 1.800 Sekunden mittels Chemilumineszenz detektiert, wobei das erste von 30 Bildern nach drei Sekunden aufgenommen wurde. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen in den einzelnen Probenspuren wurde anschließend eine Ladekontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die Membran nach der Detektion mit VE-Wasser gespült und 10 ml einer Reblot-Stripping-Lösung zugeben. Nach Inkubation der Lösung für 20 Minuten bei RT unter Schütteln wurde die Membran ein weiteres Mal mit VE-Wasser gespült und für 30 Minuten mit 3-5%iger Milchpulver-Lösung geblockt. Als Primärantikörper für die Ladekontrolle wurde ein β -Aktin-Antikörper verwendet, der in einem Mischungsverhältnis von 1:10.000 in einem Volumen von 10 ml der Membran zugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 Minuten unter Schütteln bei RT, weiterem dreimaligen Waschen und Inkubation mit dem ECL-H₂O₂-Gemisch wurde die Detektion mit 30 Bildern zwischen drei und 180 Sekunden durchgeführt.

2.2.12 MTS-Assay

Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Stoffwechselaktivität der HCC-Zellen wurde im MTS-Assay untersucht. Dazu wurden Hep3B-Zellen in einer Dichte von 7.500 und HepG2-Zellen von 10.000 Zellen in 100 μ l Gesamtvolumen pro Well in 96-Wellplatten ausgesät. In Abhängigkeit vom jeweiligen Versuchsaufbau fand zum Teil eine Transduktion mit rAd-GFP mit MOI 10 oder rAd-TAp73 mit MOI 20 statt. Zur Behandlung der Zellen wurden Tivantinib, DMSO, Antimycin A oder reines Medium verwendet. Tivantinib-Lösungen wurden je mit 50 μ l Volumen pro Well eingesetzt, mit einer Endkonzentration von 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 5,4 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 54 μ M oder 100 μ M. Auch DMSO und reines Medium wurden je in einem Volumen von 50 μ l zugegeben. Bei der Behandlung mit Antimycin A wurden jeweils 100 μ l mit einer Endkonzentration von 100 μ M, 200 μ M, 1 mM oder 2 mM verwendet. Sämtliche Behandlungen wurden in Triplikaten angesetzt. 24, 48 oder 72 Stunden nach der Wirkstoffbehandlung wurde das Volumen in den Wells mit Medium auf 200 μ l angeglichen, zudem wurde mit Medium ein Blindwert-Triplikat angesetzt. Anschließend wurden in jedes Well 10 μ l MTS-PMS-Lösung (aus 1 ml MTS und 50 μ l PMS)

pipettiert und der Ansatz für fünf bis 24 Stunden im Brutschrank inkubiert bis ein Farbumschlag sichtbar wurde. Dieser wurde am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen und die Triplikate des jeweiligen Versuchsansatzes gemittelt. Die Abnahme der Stoffwechsellleistung wurde prozentual berechnet. Unter Annahme von 100% metabolischer Aktivität wurde die DMSO-Kontrolle als Basis der zugehörigen Verdünnungsreihe der Tivantinib-Behandlung gegenübergestellt.

2.2.13 Ergebnisdarstellung und statistische Auswertung

Die Abbildung der Ergebnisse erfolgte bei qRT-PCR- sowie MTS-Assay-Daten anhand des Mittelwertes \pm Standardabweichungen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der erhobenen Daten wurde das Programm SigmaPlot (Version 14.5, Systat Software GmbH, Erkrath) verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand der Rohdaten mithilfe von Kruskal Wallis ANOVA on Ranks, One Way ANOVA oder Student's t-Tests. Zur Post-hoc-Analyse wurde die Tukey- oder Dunn's-Methode verwendet. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit p-Werten $<0,05$ (gekennzeichnet mit *) und als statistisch hochsignifikant mit p-Werten $<0,001$ (dargestellt mit **) gewertet. Zur Darstellung der zueinander signifikanten Gruppen in Balkendiagrammen wurden Klammern verwendet, bei Signifikanzen einer Gruppe gegenüber der Kontrolle erfolgte die Kennzeichnung jeweils direkt oberhalb des Balkens im Diagramm.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von p73-Isoformen auf tumorsuppressive miRs

Als Grundlage für diese Arbeit dienten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen die Expression verschiedener miRs in Abhängigkeit der Transkriptionsfaktoren p53 und p73 untersucht wurde. Hierbei zeigte sich in Microarray-Analysen in Hep3B-Zellen eine verstärkte Expression von miR-34a nach adenoviral induzierter Expression von p53. Bei Transduktion mit rAd-TAp73 wurde neben miR-34a auch miR-149 als mögliche Zielstruktur von TAp73 identifiziert. In anschließenden qRT-PCR-Analysen wurden die induktiven Effekte auf miR-34a und miR-149 bei Überexpression von TAp73 verifiziert sowie eine Induktion von miR-145 beobachtet. Auch für rAd-p53-transduzierte Zellen zeigte sich eine Steigerung der relativen Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149. Demgegenüber wurde für miR-192 und miR-194 [243], für die ebenfalls tumorsuppressive Eigenschaften im HCC bekannt sind [171,204–206], bei keinem dieser Untersuchungsverfahren eine Expressionssteigerung durch p53 oder TAp73 beobachtet [243].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten nun die Auswirkungen der p73-Expression auf unterschiedliche miRs genauer evaluiert werden. Hierzu wurde die Expression der oben genannten miRs unter Einfluss verschiedener p73-Isoformen untersucht, denen unterschiedliche Eigenschaften in der Pathogenese von Tumorerkrankungen zugeschrieben werden [96]. Dabei sollte geklärt werden, ob die Expression tumorsuppressiver miRs, deren Induktion durch Proteine der p53-Familie in den Vorversuchen gezeigt wurde, durch unterschiedliche Isoformen von p73 spezifisch beeinflusst wird. Basierend auf unseren Vorergebnissen wurden für die vorliegende Arbeit miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 untersucht. Zu Beginn wurde der Einfluss einer Überexpression verschiedener p73-Isoformen, respektive TAp73 und Δ Np73, auf das Expressionsprofil dieser miRs in p53-defizienten Hep3B-Zellen und auf die endogene Expression des p53-Familienmitglieds p63 im Zeitverlauf analysiert. Dies erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Transduktion mit rAd-GFP, rAd-TAp73 oder rAd- Δ Np73.

Zur Bestätigung der adenoviralen Überexpression wurden Western Blots durchgeführt. Dabei ergab sich eine ausgeprägte Expression von p73-Isoformen nach Transduktion mit rAd-TAp73 sowie rAd- Δ Np73 im Vergleich zu unbehandelten und rAd-GFP-transduzierten Kontrollen (Abb. 15). Zur Evaluation des Verhaltens der p53-Familienmitglieder bei Überexpression eines einzelnen Transkriptionsfaktors wurde bei intrinsischer p53-Defizienz

der Hep3B-Zellen auch der p63-Gehalt im Western Blot untersucht. Bei Transduktionsbehandlungen mit adenoviralen Vektoren zeigte sich allgemein im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein reduzierter Gehalt des p63-Proteins nach 24 und 48 Stunden. Dieser Unterschied wurde nach 72 Stunden nicht mehr beobachtet (Abb. 15).

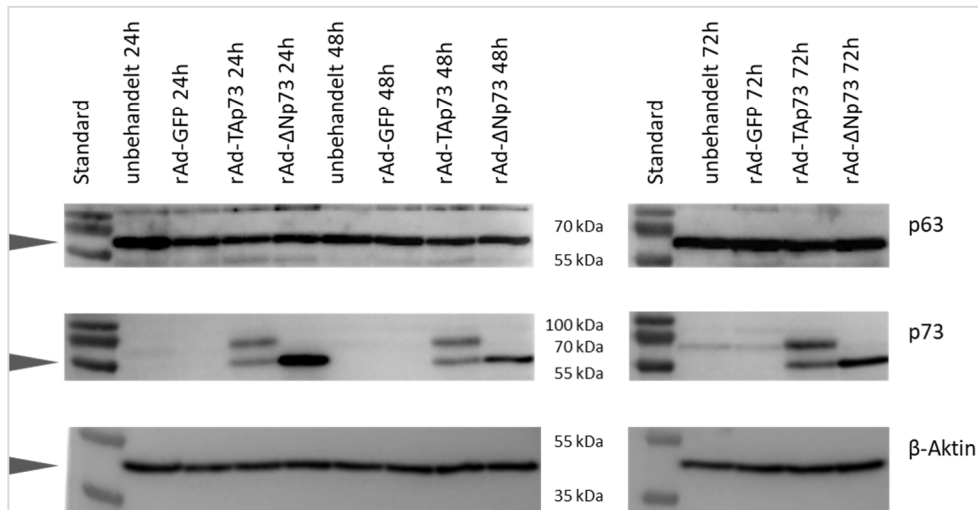


Abb. 15: Nachweis der Überexpression der p73-Isoformen nach adenoviraler Transduktion im Western Blot. Adenovirale Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP, rAd-TAp73 oder rAd-ΔNp73 und Inkubation für 24, 48 und 72 Stunden. Nachweis der Expression der p73-Isoformen (n=4) und Einfluss auf die endogenen p63-Spiegel (n=2) bei p53-Defizienz der Hep3B-Zellen mittels Western Blot.

Zur Bestimmung der Auswirkungen einer Überexpression der p73-Isoformen TAp73 und ΔNp73 auf die Expression tumorsuppressiver miRs im HCC erfolgte im Anschluss die Analyse des miR-Gehaltes mittels qRT-PCR. Dabei zeigte sich nach Überexpression von TAp73 eine Induktion von miR-34a, miR-145 und miR-149 im Vergleich zur GFP-Kontrolle. Nach 24 Stunden ergab sich eine relative Expression der miR-34a von $2,2 \pm 0,8$, der miR-145 von $3,3 \pm 3,6$ und der miR-149 von $2,5 \pm 1,5$ (Abb. 16 a)). Nach 48 Stunden wurde für miR-34a eine relative Expression mit einem Induktionsfaktor von $5,7 \pm 4,1$, für miR-145 von $4,7 \pm 2,3$ und für miR-149 von $5,4 \pm 2,7$ beobachtet. Für miR-34a sowie miR-149 war der Anstieg unter rAd-TAp73- gegenüber rAd-ΔNp73-Transduktion signifikant (Abb. 16 b)). Nach 72 Stunden zeigte sich für miR-34a eine $5,0 \pm 2,1$ -fache, für miR-145 eine $10,6 \pm 4,6$ -fache und für miR-149 eine signifikante $8,1 \pm 0,2$ -fache Steigerung der Expression in Bezug zur GFP-Kontrolle. Gegenüber ΔNp73 waren diese Ergebnisse für miR-34a, miR-145 sowie miR-149 ebenso signifikant (Abb. 16 c)) wie die Expression von miR-145 und miR-149 unter Einfluss einer TAp73-Überexpression im Zeitverlauf zwischen 24 und 72 Stunden (Abb. 17). Demgegenüber ergaben sich für miR-192 und miR-194 im Zeitverlauf keine relevanten oder signifikanten Veränderungen der Expression. Nach 48 Stunden wurde

lediglich eine Induktion um den Faktor $1,4 \pm 1,1$ bzw. $1,5 \pm 1,2$ (Abb. 16 b)), nach 72 Stunden von $1,2 \pm 0,3$ bzw. $1,1 \pm 0,2$ beobachtet (Abb. 16 c)). Des Weiteren wurde keine relevante Veränderung der miR-Expression durch Überexpression von $\Delta Np73$ (maximaler Induktionsfaktor $1,4 \pm 0,9$ bei miR-149 nach 24 Stunden (Abb. 16 a)) oder bei nicht-transduzierten Zellen (maximal $1,3 \pm 0,8$ -fach bei miR-149 nach 72 Stunden (nicht dargestellt)) beobachtet.

Somit zeigten sich hier signifikante unterschiedliche Effekte von TAp73 und $\Delta Np73$ auf die Expression von tumorsuppressiven miRs (Abb. 17), die aufgrund der antagonistischen Eigenschaften dieser Transkriptionsfaktoren zu erklären sind. Dies legt nahe, dass miR-34a, miR-145 und miR-149 im Gegensatz zu miR-192 und miR-194 im HCC Zielstrukturen der p53-Familie, insbesondere der Isoform TAp73 sind.

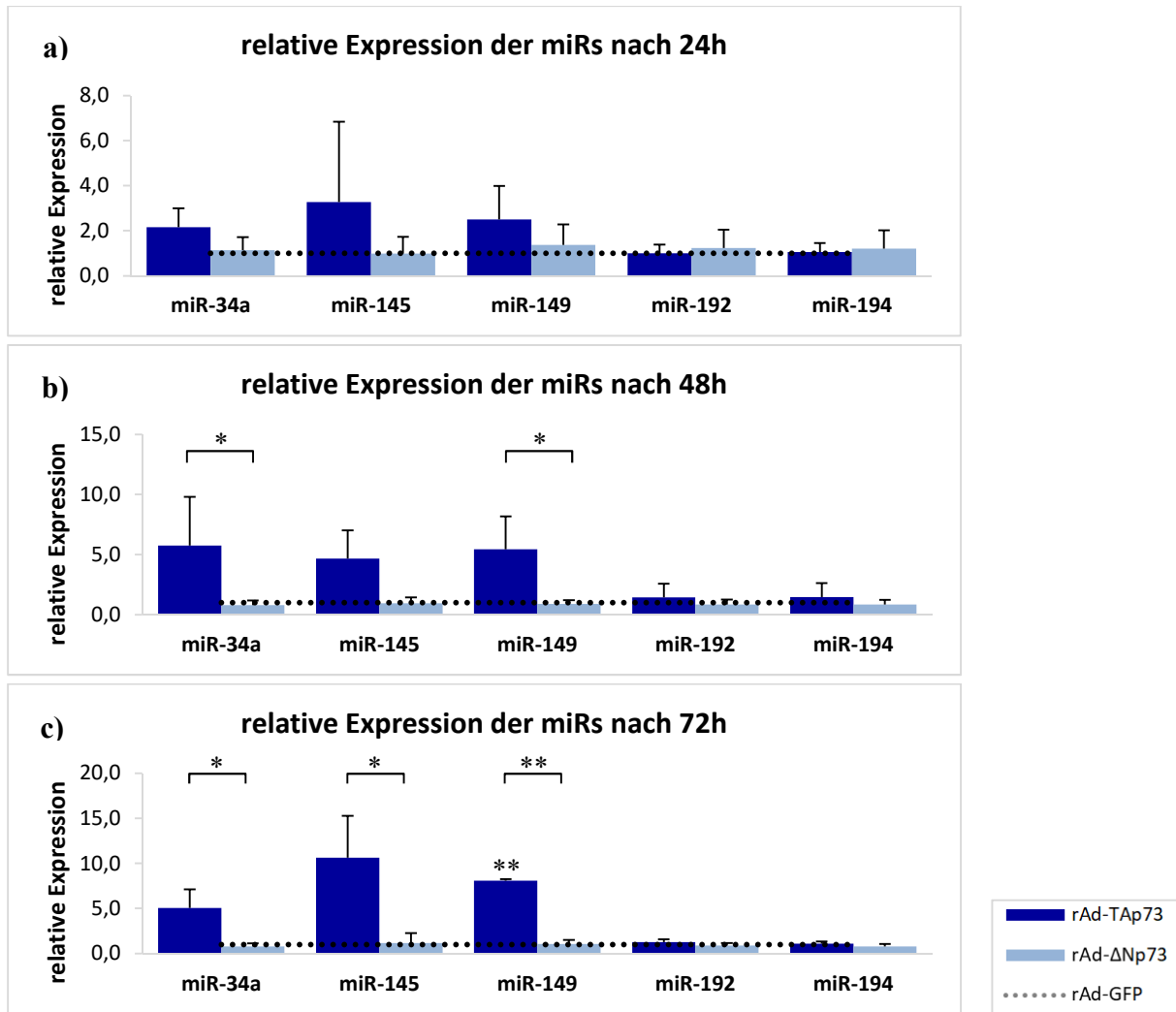


Abb. 16: Induktion der Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch adenovirale medierte Überexpression von TAp73. Adenovirale Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP, rAd-TAp73 oder rAd-ΔNp73 und Inkubation für bis zu 72 Stunden. Untersuchung der Effekte von TAp73 und ΔNp73 auf die Expression von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 anhand von qRT-PCR-Analysen im Zeitverlauf im Vergleich zu GFP als Kontrolle, n=4, * p<0,05, ** p<0,001. miR-Expression nach **a)** 24 Stunden, **b)** 48 Stunden, Signifikanz für miR-34a und miR-149 nach TAp73- gegenüber ΔNp73-Überexpression (jeweils p=0,017; Kruskal Wallis ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test) sowie **c)** 72 Stunden, Signifikanz für miR-34a und miR-145 nach rAd-TAp73- gegenüber rAd-ΔNp73-Transduktion (jeweils p=0,017; Kruskal Wallis ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test) sowie für miR-149 durch TAp73 sowohl gegenüber ΔNp73 als auch gegenüber GFP (jeweils p<0,001; One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test).

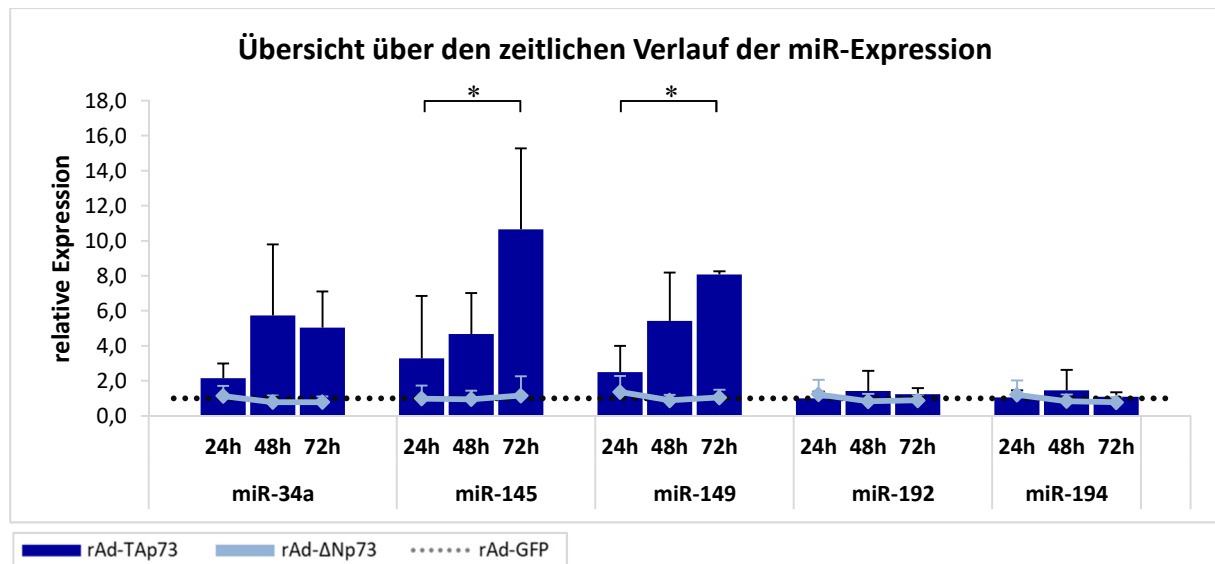


Abb. 17: Expressionsveränderung verschiedener miRs im Zeitverlauf unter Überexpression von TAp73 oder ΔNp73. Adenovirale Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP, rAd-TAp73 oder rAd-ΔNp73 und Inkubation für bis zu 72 Stunden. Untersuchung der Effekte von TAp73 und ΔNp73 auf die Expression von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 anhand von qRT-PCR-Analysen im Zeitverlauf im Vergleich zu GFP als Kontrolle, n=4, * p<0,05. Zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse aus Abb. 16. Signifikante Steigerung der Expression von miR-145 (p=0,045) und miR-149 (p=0,005; jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse) in rAd-TAp73-transduzierten Zellen im Zeitverlauf zwischen 24 und 72 Stunden.

3.2 Einfluss verschiedener HCC-relevanter Therapeutika auf die Expression von miRs in Abhängigkeit von p73-Isoformen

Im Anschluss an den Nachweis der Regulation von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch die Expression von TAp73 sollte geklärt werden, welchen Einfluss tumorsuppressive Medikamente auf das Expressionsprofil dieser Moleküle ausüben. Hierzu wurden verschiedene in der klinischen Anwendung befindliche Wirkstoffe – in Konzentrationen entsprechend erreichbarer Plasmaspiegel von Patienten unter Therapie – eingesetzt [70,82,250–252]. Zum einen wurden die Chemotherapeutika Doxorubicin und Bleomycin verwendet, die zwar im HCC keinen leitliniengemäßen Einsatz als systemische Therapeutika finden, aber durch die Induktion von DNA-Schäden über Interkalation bzw. Doppelstrangbrüche geeignete Substanzen zur Aktivierung der p53-Familie sind [78,86]. Zudem wird Doxorubicin im Rahmen der TACE als lokales Verfahren zur Therapie des HCC eingesetzt [24]. Zum anderen fanden Sorafenib, Regorafenib und Tivantinib Verwendung, die zur Klasse der *targeted therapies* gezählt werden. Sorafenib kann als systemisches Therapeutikum als *first-line*-Therapie im fortgeschrittenen Stadium der HCC-Erkrankung, Regorafenib leitliniengemäß als *second-line*-Therapie eingesetzt werden [24,37]. Zu Beginn

dieser Arbeit befand sich der Wirkstoff Tivantinib im Studiendesign in Anwendung als *second-line*-Therapie nach Sorafenib-Behandlung. Die initialen Daten der Phase-II-Studie, die bei Start unserer Versuchsreihen bereits publiziert waren, zeigten vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf Überlebensvorteile durch das Therapeutikum [76]. Die Phase-III-Studie, die diese Beobachtungen nicht bestätigte, wurde erst nach Abschluss unserer experimentellen Arbeiten veröffentlicht [77].

Zur Untersuchung der Effekte durch die genannten Wirkstoffe auf die p73-abhängige Expression von miRs wurden Hep3B-Zellen 24 Stunden nach adenoviraler Transduktion mit möglichen Serumkonzentrationen dieser Therapeutika behandelt. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 24, 48 oder 72 Stunden wurde die Expression der miRs in den Zellen untersucht. Im Zeitverlauf zeigte sich für miR-34a, miR-145 und miR-149 eine Expressionssteigerung in unterschiedlicher Ausprägung durch alle verwendeten Substanzen in Verbindung mit einer TAp73-Expression gegenüber den rAd-GFP-transduzierten DMSO- und Wirkstoffkontrollen. Dabei wurden Unterschiede bezüglich des Peaks der Expression in der Kinetik ersichtlich. Während bei miR-34a nach Behandlung mit Doxorubicin, Sorafenib und Tivantinib die höchste Induktionsrate nach 72 Stunden zu beobachten war (Abb. 18 a), d), e)), wurde unter Bleomycin ein Expressionshöhepunkt nach 24 Stunden (Abb. 18 b)), bei Regorafenib nach 48 Stunden erreicht (Abb. 18 c)). Bei der Untersuchung von miR-145 und miR-149 zeigte sich hingegen für alle Substanzen eine maximale Expressionssteigerung nach 72 Stunden (Abb. 19, Abb. 20). Nach Behandlung mit Chemotherapeutika wurde zudem teilweise eine Verringerung der miR-Expression nach 48 Stunden gegenüber dem 24-Stunden-Wert beobachtet (Abb. 18 b), Abb. 19 a), b), Abb. 20 b)). Gegenüber allen anderen Wirkstoffen zeigten sich durch Zugabe von Tivantinib kombiniert mit einer TAp73-Überexpression die stärksten induktiven Effekte auf miR-34a, miR-145 und miR-149 (Abb. 21 a), b) c)).

72 Stunden nach Behandlung mit Doxorubicin erreichte der miR-34a-Gehalt unter TAp73-Überexpression eine relative Steigerung gegenüber der rAd-GFP-transduzierten DMSO-Kontrollgruppe um den Faktor $3,6 \pm 1,8$ (Abb. 18 a)), durch Bleomycin um den Faktor $3,9 \pm 1,8$ (Abb. 18 b)). Unter den *targeted therapies* war nach Zugabe von Regorafenib eine signifikante Expressionssteigerung um das $2,9 \pm 1,3$ -Fache (Abb. 18 c)) und bei Tivantinib um das $9,4 \pm 2,6$ -Fache zu beobachten (Abb. 18 e)). Durch Sorafenib ergab sich ein relativer Anstieg um das $3,0 \pm 1,6$ -Fache (Abb. 18 d)). Die höchste Expression nach Zugabe von Bleomycin zeigte sich nach 24 Stunden in einer Steigerung um den Faktor $4,7 \pm 2,3$ (Abb. 18 b)), bei Regorafenib nach 48 Stunden um den Faktor $4,1 \pm 2,2$ (Abb. 18 c)). Zusätzliche signifikante Expressionsveränderungen ergaben sich bei TAp73-Überexpression

im Vergleich zur normierten Kontrolle für Bleomycin nach 48 (Abb. 18 b)) und für Tivantinib nach 24 Stunden (Abb. 18 e)). Im Vergleich Wirkstoff-behandelter Zellen wurde nach rAd-TAp73- gegenüber rAd-GFP-Transduktion eine statistisch signifikante Veränderung der miR-34a-Level unter Doxorubicin zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abb. 18 a)) beobachtet. Unter Bleomycin und Sorafenib zeigte sich ein signifikantes Ergebnis nach 24 und 48 Stunden (Abb. 18 b), d)), unter Tivantinib nach 24 und 72 Stunden (Abb. 18 e)). Im Vergleich zu Δ Np73 wurde bei TAp73-Überexpression in Kombination mit Bleomycin nach 48, mit Sorafenib nach 24 und mit Tivantinib nach 24 und 72 Stunden ein statistischer Unterschied berechnet (Abb. 21).

Durch Chemotherapeutika wurde für miR-145 nach 72-stündiger Behandlung eine relative Expressionssteigerung um den Faktor $5,3 \pm 1,8$ für Doxorubicin (Abb. 19 a)) bzw. $8,3 \pm 4,4$ für Bleomycin induziert (Abb. 19 b)). Regorafenib, Sorafenib und Tivantinib vermittelten einen Anstieg um das $6,8 \pm 2,4$ -, $5,6 \pm 2,6$ - und $14,6 \pm 7,2$ -Fache (Abb. 19 c), d), e)). Im Vergleich zu miR-34a ergaben sich für miR-145 deutlich weniger signifikante Veränderungen im Expressionsprofil unter den beschriebenen Versuchsbedingungen. Diese wurden bei TAp73-Überexpression lediglich für Bleomycin nach 24 (Abb. 19 b)) sowie für Regorafenib und Tivantinib nach 72 Stunden (Abb. 19 c), e)) gegenüber rAd-GFP-transduzierten Kontrollzellen nachgewiesen. Durch Behandlung mit dem Glykopeptid-Antibiotikum zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied nach 24 Stunden zwischen rAd-TAp73- und rAd-GFP-Transduktion (Abb. 19 b)), durch Regorafenib nach 72 Stunden im Vergleich von TAp73 und Δ Np73 (Abb. 21 b)).

Der Einfluss der Therapien auf miR-149 manifestierte sich nach 72 Stunden durch eine Expressionssteigerung um den Faktor $6,7 \pm 4,8$ und $8,0 \pm 6,7$ durch Doxorubicin (Abb. 20 a)) und Bleomycin (Abb. 20 b)), um den Faktor $4,2 \pm 3,9$ sowie $3,4 \pm 1,7$ und $14,9 \pm 7,3$ durch Regorafenib, Sorafenib und Tivantinib (Abb. 20 c), d), e)). Regorafenib stellte für diese miR das einzige Therapeutikum ohne signifikante Expressionsveränderungen dar. Für alle anderen Wirkstoffe ergaben sich – wenn auch nicht zu allen Zeitpunkten – statistisch relevante Effekte von TAp73-überexprimierenden Zellen gegenüber rAd-GFP- oder rAd- Δ Np73-transduzierten Zellen (Abb. 20 a), b), d), e), Abb. 21 c)). Signifikante Veränderungen zur DMSO-Kontrolle wurden in rAd-TAp73-transduzierten Zellen für Bleomycin (Abb. 20 b)) und Sorafenib (Abb. 20 d)) nach 48 Stunden nachgewiesen.

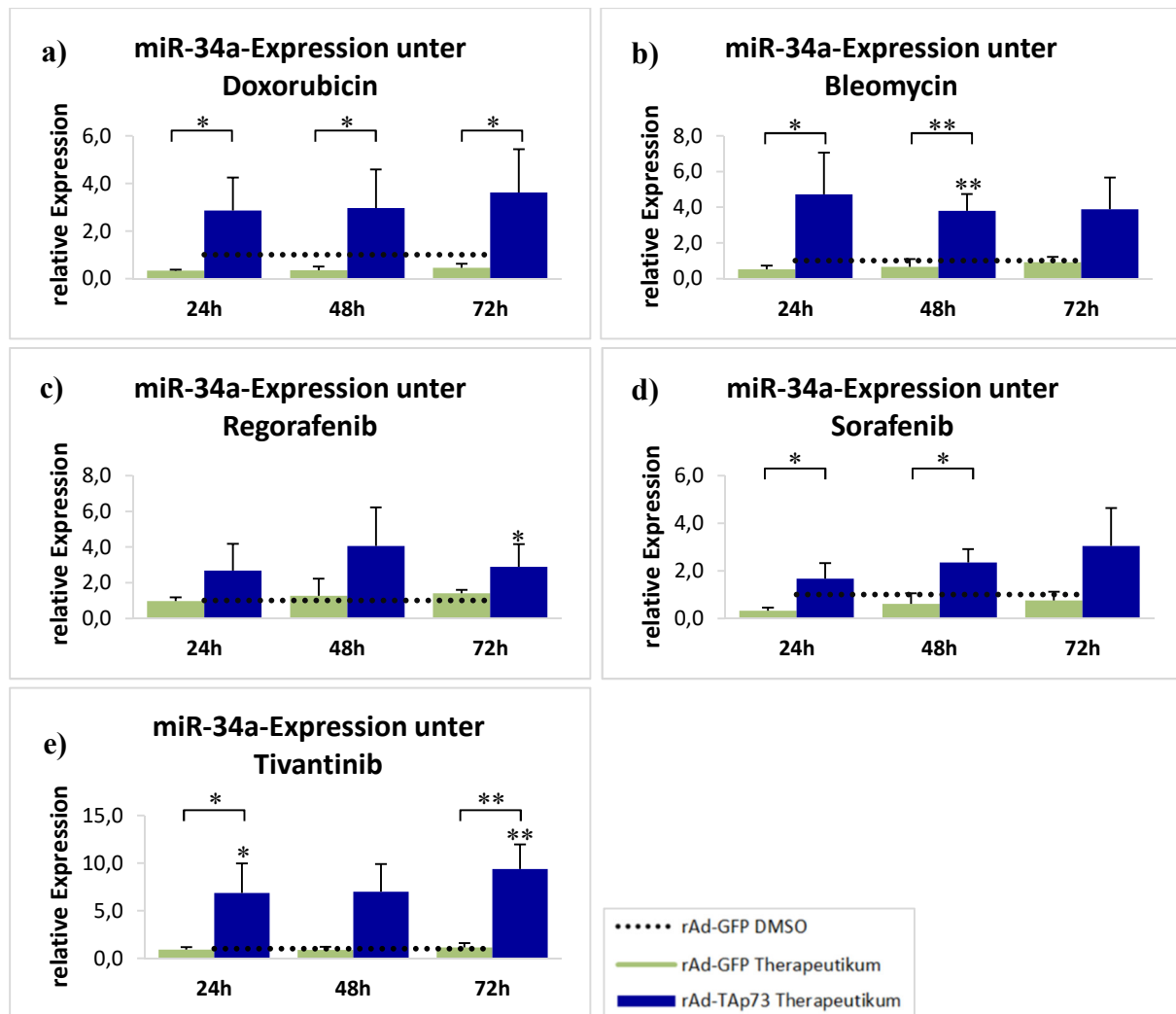


Abb. 18: Einfluss von HCC-Therapeutika auf die miR-34a-Expression. Adenovirale Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP oder rAd-TAp73 und anschließende Inkubation mit verschiedenen Therapeutika für 24, 48 und 72 Stunden. Analyse der miR-Expression mittels qRT-PCR gegenüber DMSO-behandelten Zellen unter GFP-Expression, n=3, * p<0,05, ** p<0,001. **a)** Doxorubicin [0,04 µM], signifikante Expressionsveränderung von TAp73- versus GFP-exprimierenden Zellen nach 24 (p=0,014), 48 (p=0,039) und 72 Stunden (p=0,020, jeweils Kruskal Wallis ANOVA, Dunn's-Post-hoc-Test). **b)** Bleomycin [2 µM], Signifikanz zwischen rAd-TAp73- und rAd-GFP-transduzierten Zellen nach 24 (p=0,039, Kruskal Wallis ANOVA, Dunn's-Post-hoc-Test) und 48 Stunden (p<0,001) sowie zwischen TAp73-exprimierenden Zellen unter Wirkstoffbehandlung und DMSO-Kontrollzellen nach rAd-GFP-Transduktion (p<0,001, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test). **c)** Regorafenib [5,1 µM], signifikante Expressionsveränderung unter TAp73-Überexpression gegenüber der GFP-DMSO-Kontrolle nach 72 Stunden (p=0,045, One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test). **d)** Sorafenib [4,5 µM], Signifikanz von TAp73-exprimierenden Zellen gegenüber GFP-Kontrollen unter Wirkstoffbehandlung nach 24 (p=0,007) und 48 Stunden (p=0,031, One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test). **e)** Tivantinib [5,4 µM], signifikanter Anstieg der miR-Expression nach rAd-TAp73-Transduktion gegenüber der GFP-DMSO-Kontrolle nach 24 (p=0,012) und 72 Stunden (p<0,001) sowie gegenüber GFP-transduzierten und Tivantinib-behandelten Zellen nach 24 (p=0,011) und 72 Stunden (p<0,001, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Test).

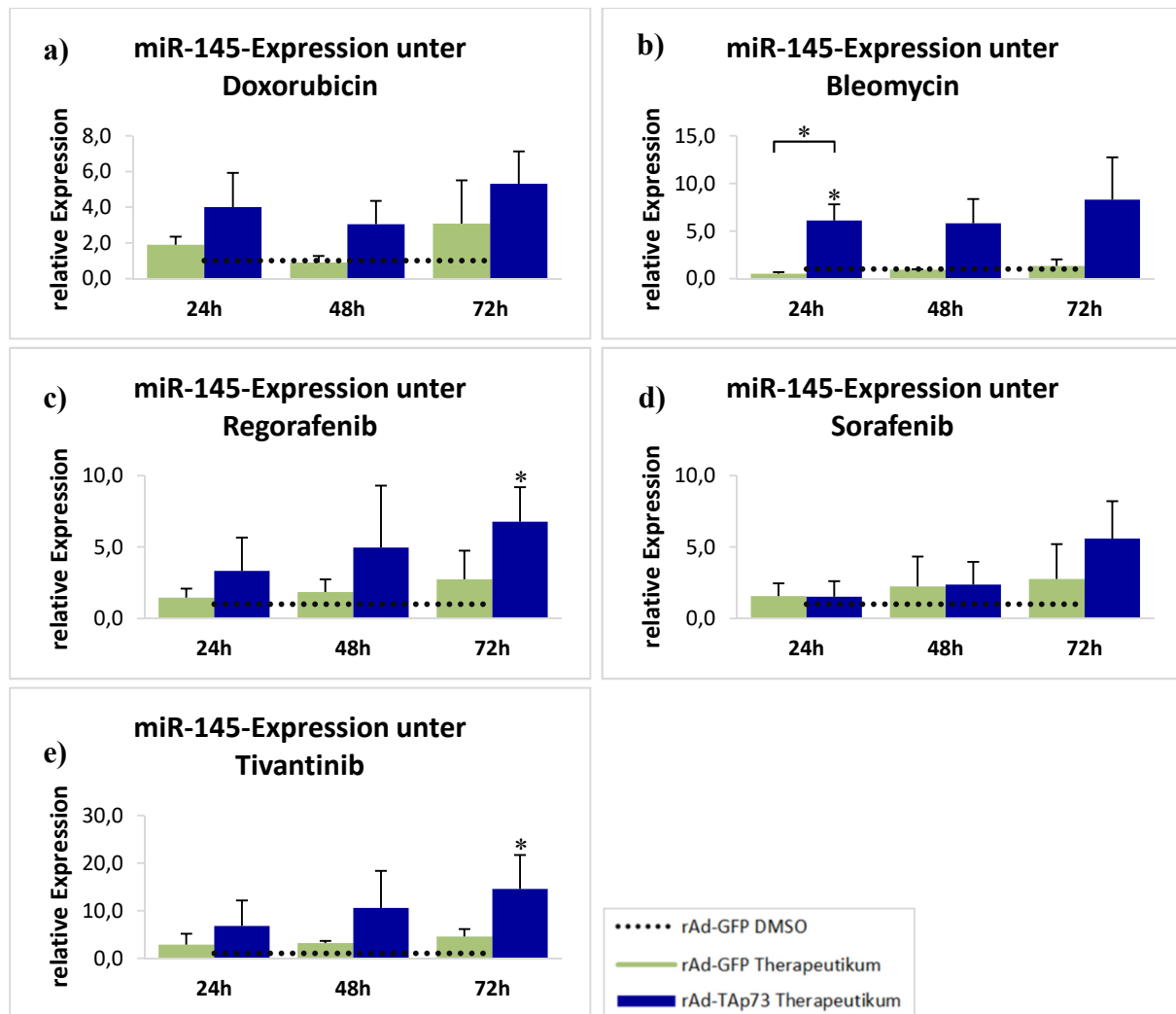


Abb. 19: Einfluss von HCC-Therapeutika auf die miR-145-Expression. Adenovirale Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP oder rAd-TAp73 und anschließende Inkubation mit verschiedenen Wirkstoffen für 24, 48 oder 72 Stunden. Analyse der miR-Expression mittels qRT-PCR gegenüber DMSO-behandelten Zellen unter GFP-Expression, n=3, * p<0,05. **a)** Doxorubicin [0,04 μ M]. **b)** Bleomycin [2 μ M], signifikante Expressionsveränderung nach 24 Stunden bei TAp73-Überexpression im Vergleich zu rAd-GFP-transduzierten Zellen mit Wirkstoffbehandlung (p=0,009) sowie zu DMSO-behandelten Zellen (p=0,016; jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse). **c)** Regorafenib [5,1 μ M], Signifikanz nach 72 Stunden durch TAp73-Überexpression und Wirkstoffbehandlung gegenüber der GFP-DMSO-Kontrolle (p=0,009, One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse). **d)** Sorafenib [4,5 μ M]. **e)** Tivantinib [5,4 μ M], signifikante Expressionssteigerung durch rAd-TAp73-Transduktion und *targeted therapy* im Vergleich zur GFP-DMSO-Kontrolle (p=0,014, Kruskal Wallis ANOVA, Dunn's-Post-hoc-Analyse).

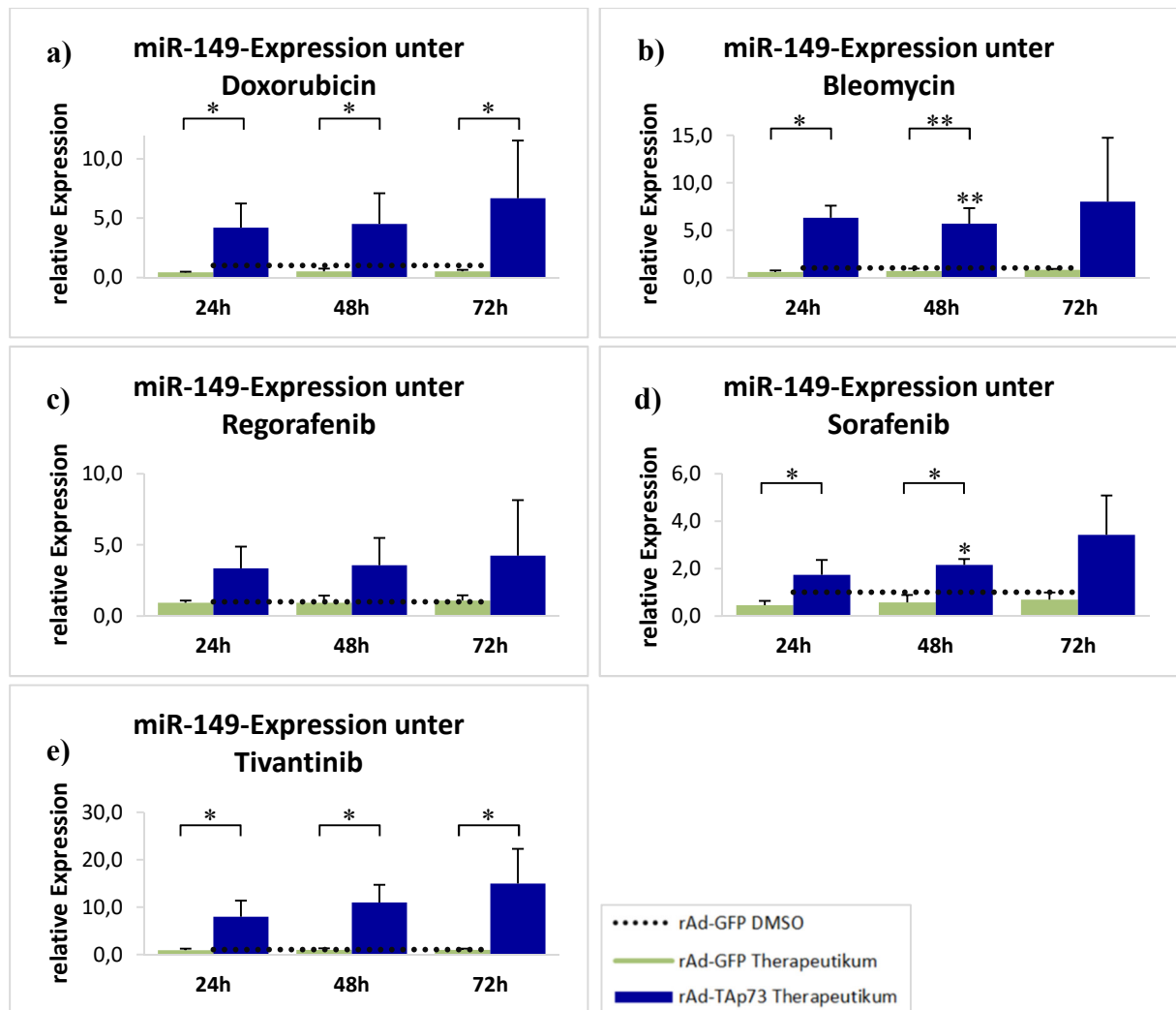


Abb. 20: Einfluss von HCC-Therapeutika auf die miR-149-Expression. Adenovirale Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP oder rAd-TAp73 und anschließende Inkubation mit Chemotherapeutika oder *targeted therapies* für 24, 48 oder 72 Stunden. Analyse der miR-Expression mittels qRT-PCR gegenüber DMSO-behandelten Zellen unter GFP-Expression, n=3, * p<0,05, ** p<0,001. **a)** Doxorubicin [0,04 μ M], signifikante Expressionsveränderung durch Wirkstoffbehandlung zwischen TAp73- und GFP-exprimierenden Zellen nach 24 (p=0,014), 48 (p=0,02) sowie 72 Stunden (p=0,028, jeweils Kruskal Wallis ANOVA, Dunn's-Post-hoc-Analyse). **b)** Bleomycin [2 μ M], Signifikanz zwischen rAd-TAp73- und rAd-GFP-transduzierten Zellen durch Chemotherapeutikum nach 24 (p=0,02, Kruskal Wallis ANOVA, Dunn's-Post-hoc-Analyse) und 48 Stunden (p<0,001), hier zudem gegenüber GFP-DMSO-Behandlung (p<0,001, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse). **c)** Regorafenib [5,1 μ M]. **d)** Sorafenib [4,5 μ M], signifikante Expressionsveränderung zwischen rAd-TAp73- und rAd-GFP-transduzierten Zellen durch Wirkstoffzugabe nach 24 (p=0,028, Kruskal Wallis ANOVA, Dunn's-Post-hoc-Analyse) und 48 Stunden (p=0,001), hier zudem gegenüber GFP-DMSO-Behandlung (p=0,01, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-Hoc-Analyse). **e)** Tivantinib [5,4 μ M], signifikante Expressionsveränderung zwischen TAp73- und GFP-exprimierenden Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden (jeweils p=0,039, Kruskal Wallis ANOVA, Dunn's-Post-hoc-Analyse).

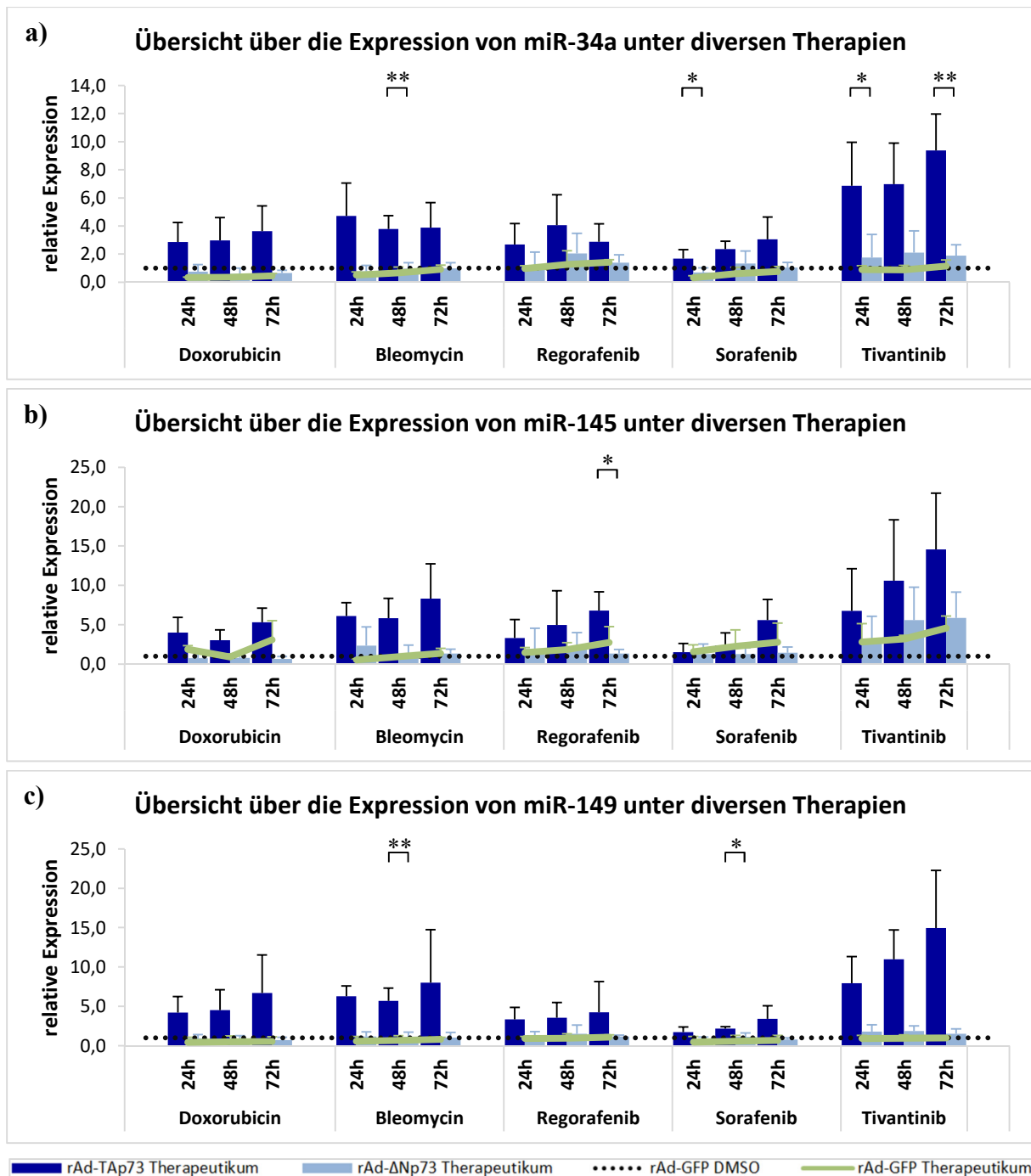


Abb. 21: Expressionsveränderungen von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch unterschiedliche HCC-spezifische Wirkstoffe unter Einfluss von p73-Isoformen. Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP, rAd-TAp73 oder rAd-ΔNp73 und Inkubation mit verschiedenen Wirkstoffen für bis zu 72 Stunden. Analyse der miR-Expression mittels qRT-PCR gegenüber rAd-GFP- und DMSO-behandelten Zellen. Erhebung der Daten nach rAd-GFP-/ rAd-TAp73- (n=3) und rAd-ΔNp73-Transduktion (n=4) in unabhängigen Experimenten, * p<0,05, ** p<0,001. **a)** miR-34a, Signifikanz zwischen TAp73- und ΔNp73-exprimierenden Zellen unter Behandlung mit Bleomycin nach 48 (p<0,001), mit Sorafenib nach 24 (p=0,027) und mit Tivantinib nach 24 (p=0,018) und 72 Stunden (p<0,001). **b)** miR-145, Signifikanz von rAd-TAp73- versus rAd-ΔNp73-transduzierten Zellen durch Regorafenib nach 72 Stunden (p=0,013). **c)** miR-149, Signifikanz von TAp73- zu ΔNp73-exprimierenden Zellen durch Behandlung mit Bleomycin nach 48 (p<0,001) sowie durch Sorafenib nach 48 Stunden (p=0,014), (jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse).

Im Gegensatz zu den starken induktiven Effekten, die bei Überexpression von TAp73 erzielt wurden, wurde nach adenoviraler Transduktion von Δ Np73 nur ein geringes oder fehlendes Ansprechen der untersuchten miRs beobachtet. Dies stimmt mit den bekannten antagonistischen Eigenschaften dieses Transkriptionsfaktors gegenüber TAp73 überein. In unseren Analysen bewegten sich die Werte für die relative Expression meist um Faktoren zwischen 0,6 und 2,1 und entsprachen somit in etwa der Referenzprobe unter GFP-Transduktion und DMSO-Zugabe (Abb. 22 a), b)). Lediglich für miR-145 zeigten sich zum Teil höhere Werte, die allerdings auch mit hohen Standardabweichungen vergesellschaftet waren. Die höchste Expression für miR-145 war bei Behandlung mit Tivantinib zu beobachten, hier ergab sich nach 72 Stunden ein Induktionsfaktor von $5,9 \pm 3,3$ (Abb. 22 b)). Signifikante Veränderungen durch eine rAd- Δ Np73-Transduktion in Kombination mit einer Wirkstoffbehandlung gegenüber der Referenz ergaben sich für keine der untersuchten miRs.

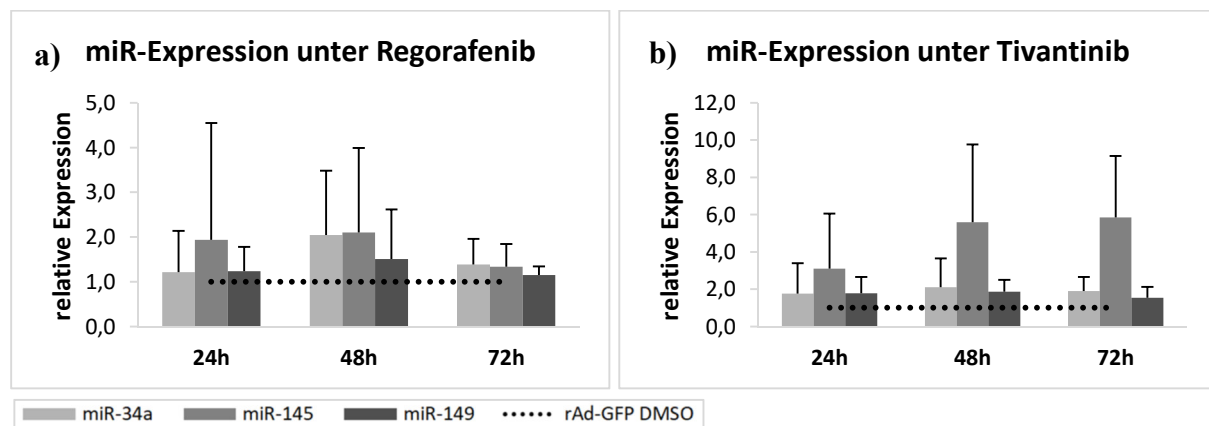


Abb. 22: Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 nach Behandlung mit Regorafenib und Tivantinib bei Überexpression von Δ Np73. Zugabe von a) Regorafenib [5,1 μ M] sowie b) Tivantinib [5,4 μ M] zu Hep3B-Zellen 24 Stunden nach rAd- Δ Np73-Transduktion und Inkubation für 24, 48 und 72 Stunden. Analyse der miR-Expression mittels qRT-PCR gegenüber DMSO-behandelten Zellen unter GFP-Expression, n=4.

Die Analyse von miR-192 und miR-194 ergab auch in diesem Ansatz keine relevante Expressionssteigerung. Wie bereits bei Überexpression von TAp73 oder Δ Np73 alleine wurde auch nach Kombination der adenoviralen Transduktion von p73-Isoformen mit einer medikamentösen Behandlung keine vergleichbare Induktion zu miR-34a, miR-145 und miR-149 erreicht. Lediglich bei Behandlung von TAp73-überexprimierenden Zellen mit Regorafenib und Tivantinib wurde eine leichte, jedoch nicht signifikante Expression beobachtet. Die höchste Expression zeigte sich hierbei für miR-192 nach 48 Stunden unter Regorafenib-Behandlung und einem Steigerungsfaktor von $1,7 \pm 1,2$ (Abb. 23 a)) sowie nach 24 Stunden unter Tivantinib mit einer Induktion um das $1,2 \pm 0,4$ -Fache bei Überexpression

von TAp73 (Abb. 23 b)). miR-194 wies zu den gleichen Zeitpunkten nach Zugabe von Regorafenib einen Induktionsfaktor von $1,6 \pm 1,1$ (Abb. 23 c)) und nach Tivantinib-Behandlung von $1,4 \pm 0,6$ auf (Abb. 23 d)). Bei Überexpression von Δ Np73 bewegten sich die relativen Expressionsfaktoren dieser miRs nach Regorafenib- oder Tivantinib-Behandlung zwischen 0,6 und 1,3, bei TAp73-Überexpression für alle anderen Therapeutika zwischen 0,5 und 1,2 (Abb. 24 a), b)). Die einzig signifikante Expressionssteigerung ergab sich für miR-194 72 Stunden nach Sorafenib-Behandlung im Vergleich von rAd-TAp73- zu rAd-GFP-transduzierten Zellen (Abb. 24 b)). miR-192 hingegen zeigte lediglich einen signifikant verringerten Gehalt bei Überexpression von Δ Np73 oder GFP nach Behandlung mit Doxorubicin zum Zeitpunkt 72 Stunden im Vergleich zur DMSO-Referenzbehandlung (Abb. 24 a)). Die gezeigten Werte der miR-Expression unter TAp73- und Δ Np73-Überexpression beziehen sich dabei für alle miRs nach mehrfacher Reproduktion der Daten auf unabhängige Versuchsansätze.

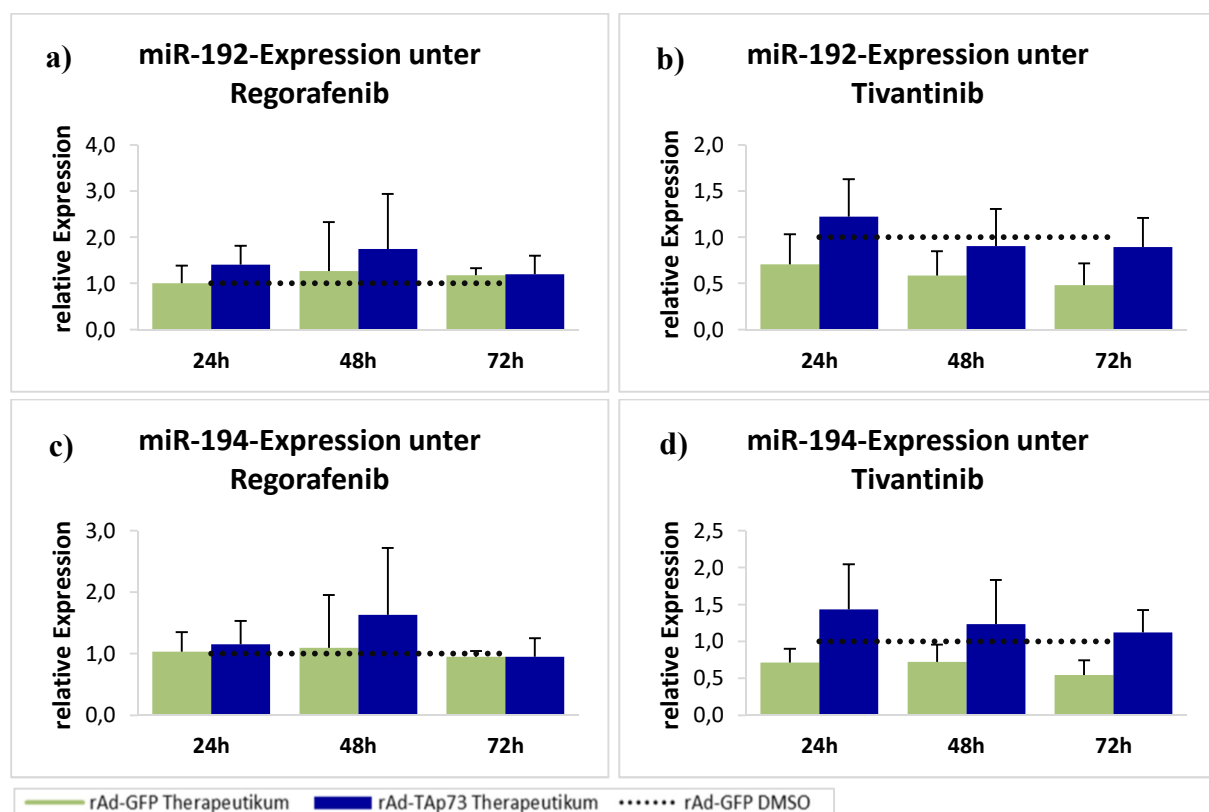


Abb. 23: Expressionsveränderung von miR-192 und miR-194 unter Therapeutika-Zugabe bei TAp73-Überexpression. Analyse der miR-Expression nach adenoviraler Überexpression von TAp73 in Hep3B-Zellen für miR-192 unter Behandlung mit **a)** Regorafenib [5,1 μ M] und **b)** Tivantinib [5,4 μ M] sowie für miR-194 unter Behandlung mit **c)** Regorafenib [5,1 μ M] und **d)** Tivantinib [5,4 μ M] mittels qRT-PCR nach 24, 48 und 72 Stunden gegenüber rAd-GFP-transduzierten Hep3B-Zellen unter DMSO-Behandlung als Kontrolle, n=3.

Zusammenfassend zeigten sich auch nach Behandlung mit HCC-Therapeutika keine regulatorischen Effekte auf miR-192 und miR-194 in p73-überexprimierenden Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in Kombination mit einer Überexpression von TAp73 ein induktiver Einfluss durch Chemotherapeutika und *targeted therapies*, insbesondere durch den Wirkstoff Tivantinib auf die Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 in Hep3B-Zellen nachgewiesen sowie der antagonistische Effekt von Δ Np73 bestätigt.

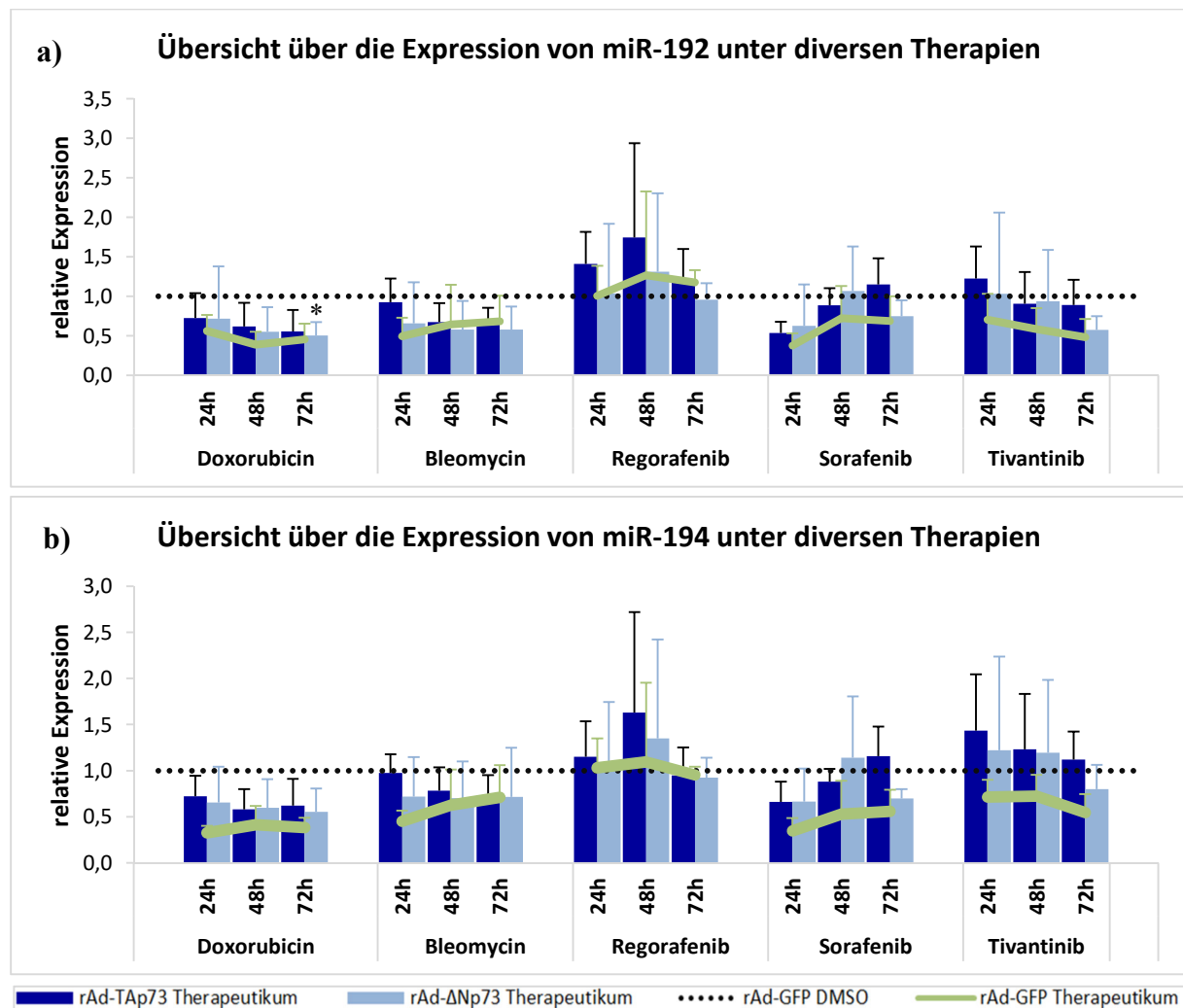


Abb. 24: Übersicht der Expressionsveränderung von miR-192 und miR-194 unter Therapeutika-Zugabe bei TAp73- oder Δ Np73-Überexpression. Analyse des Gehalts an miR-192 und miR-194 unter Behandlung mit verschiedenen Therapeutika nach 24, 48 oder 72 Stunden bei adenoviraler Überexpression von TAp73 oder Δ Np73 in Hep3B-Zellen. Untersuchung mittels qRT-PCR gegenüber rAd-GFP-transduzierten Hep3B-Zellen unter DMSO-Behandlung. Erhebung der Daten nach rAd-GFP-/ rAd-TAp73- (n=3) und rAd Δ Np73-Überexpression (n=4) in unabhängigen Experimenten, * p<0,05. **a)** miR-192, nach 72 Stunden signifikant höhere Expression in GFP-DMSO-Kontrollzellen gegenüber Doxorubicin-behandelten Zellen nach rAd-GFP-Transduktion (p=0,026) oder nach rAd- Δ Np73-Transduktion (p=0,029). **b)** miR-194, signifikante Expressionssteigerung in GFP-exprimierenden Zellen durch DMSO gegenüber Doxorubicin nach 72 Stunden (p=0,022) sowie durch Sorafenib-Behandlung in rAd-TAp73- gegenüber rAd-GFP-transduzierten Zellen nach 72 Stunden (p=0,019, One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse).

3.3 Einfluss von Tivantinib auf die basale miR-Expression in Hep3B-Zellen

Nachdem sich eine Induktion von miR-34a, miR-145 sowie miR-149 unter Überexpression von TAp73 und gleichzeitiger Wirkstoffbehandlung gezeigt hatte, sollten im Folgenden Auswirkungen einer medikamentösen Behandlung auf die basale miR-Expression ohne Überexpression von Transkriptionsfaktoren in Hep3B-Zellen untersucht werden. Aufgrund der fehlenden Regulation von miR-192 und miR-194 unter den bisherigen Versuchsbedingungen wurden diese miRs für die nachfolgenden Versuche als Kontrolle betrachtet und ihre Expression daher weiter analysiert. Da die stärksten induktiven Effekte auf die p73-abhängige miR-Expression in den vorherigen Versuchen durch Tivantinib beobachtet wurden, verwendeten wir zur Untersuchung weiterer Effekte auf HCC-Zellen ausschließlich diesen Wirkstoff. In Anbetracht der noch weitgehend ungeklärten Wirkweise dieses Medikaments erschien zudem eine weitere Betrachtung der molekularen Mechanismen sinnvoll. Daher wurden Hep3B-Zellen mit Tivantinib behandelt und für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden nach der Zellernte wie bereits in den vorherigen Versuchen Western Blots sowie qRT-PCR-Analysen durchgeführt.

Die Untersuchung der endogenen Proteinspiegel von p63 ergab Schwankungen, die nicht einheitlich einer bestimmten Behandlung zuzuordnen waren. Die Expression des endogenen p73 zeigte dagegen keine ausgeprägten Unterschiede im Probenvergleich (Abb. 25 a)). Tivantinib scheint im Zeitverlauf somit keinen relevanten Einfluss auf die endogenen Proteinmengen von p63 und p73 in Hep3B-Zellen zu nehmen.

Die Zugabe von Tivantinib zu nativen Hep3B-Zellen führte zu einer Steigerung der miR-Level im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle, die sich bei allen untersuchten miRs mit einem Expressionspeak nach 48 Stunden zeigte. Die stärksten induktiven Effekte wurden bei miR-145 beobachtet. Hier zeigte sich nach 48 Stunden eine Steigerung um den Faktor $7,4 \pm 4,5$. Für miR-34a ergab sich eine maximale Expressionssteigerung um den Faktor $3,6 \pm 1,4$. miR-149, miR-192 und miR-194 zeigten relativ ähnliche Induktionsraten nach 48 Stunden, diese bewegten sich zwischen 2,1 und 2,5. Eine signifikante Expressionsveränderung durch die Zugabe von Tivantinib im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ergab sich nach 24 Stunden für miR-34a und miR-145 sowie nach 48 Stunden für miR-34a, miR-192 und miR-194. Im weiteren Zeitverlauf kam es bei allen miRs zu einer Abnahme der Expression auf vergleichbare Level zu den 24-Stunden-Werten, die für miR-192 und miR-194 signifikant war (Abb. 25 b)).

Vergleichend mit den Vorergebnissen wurden somit durch eine alleinige Tivantinib-Therapie geringere Induktionsraten für miR-34a, miR-145 und miR-149 sowie ein früherer Peak der Expression als nach einer Kombinationsbehandlung mit TAp73-Überexpression erreicht. Zudem zeigten auch diese Ergebnisse keine relevanten induktiven Effekte des Therapeutikums auf die Expression von miR-192 und miR-194.

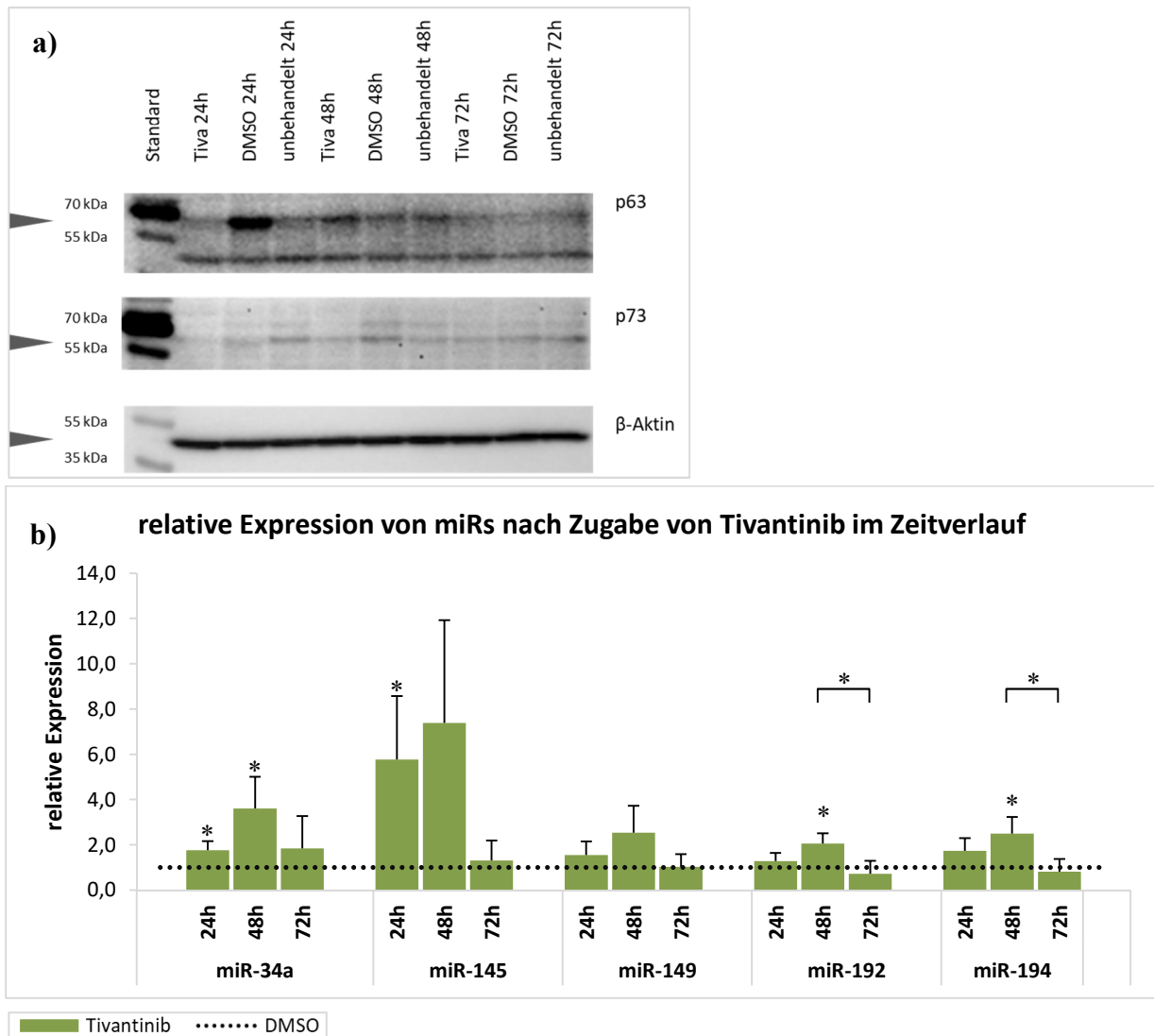


Abb. 25: Einfluss von Tivantinib auf die Expression von tumorsuppressiven miRs und p53-Familienmitgliedern. Behandlung nativer Hep3B-Zellen für 24, 48 und 72 Stunden mit Tivantinib (Tiva) [5,4 μ M]. **a)** Untersuchung der endogenen Expression von p63 und p73 mittels Western Blots, n=3. **b)** qRT-PCR-Analyse der miR-Level von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 gegenüber DMSO-behandelten Hep3B-Zellen, n=3, * p<0,05. Signifikante Expressionszunahme durch Tivantinib im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach 24 Stunden für miR-34a (p=0,034) und miR-145 (p=0,0427). Maximale Expressionssteigerung aller analysierten miRs durch Tivantinib im Vergleich zur DMSO-Behandlung nach 48 Stunden mit Signifikanz für miR-34a (p=0,0323), miR-192 (p=0,015) sowie miR-194 (p=0,0242, jeweils Student's t-Test). Nach 72 Stunden regrediente Level aller miRs mit signifikant geringerer Expression für miR-192 (p=0,016) und miR-194 (p=0,022, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse) im Vergleich zu den 48-Stunden-Werten.

3.4 Dosisabhängige Effekte von Tivantinib auf die miR-Expression bei basaler p73-Expression in Hep3B-Zellen

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob eine Dosis-Wirkungsbeziehung von Tivantinib auf die miR-Expression nicht-transduzierter Hep3B-Zellen besteht und ob ein Einfluss durch verschiedene Dosierungen des Therapeutikums auf die Expression der p53-Familienmitglieder nachweisbar ist. Hierzu wurden native Hep3B-Zellen mit unterschiedlichen Tivantinib-Konzentrationen behandelt. Die Konzentrationen wurden ausgehend von der zuvor verwendeten Dosis von 5,4 μM bestimmt. Es wurde ein Konzentrationsspektrum zwischen 0,5 und 10 μM festgelegt, für das Verdünnungsreihen angelegt wurden. Nach der Zugabe des Wirkstoffes zu den Zellen wurden diese für einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert und anschließend RNA und Proteine extrahiert.

Im Western Blot zeigte sich in allen Replikaten eine erhöhte Expression des p63-Proteins nach einer Behandlung mit 5,4 und 10 μM Tivantinib im Vergleich zu einer Dosierung von 2,5 μM . Bei Konzentrationen von 0,5 und 1 μM zeigten sich dagegen keine einheitlichen Veränderungen der Proteinmenge von p63. Ein relevanter Effekt auf die endogene Bildung von p73 durch verschiedene Dosierungen von Tivantinib war nicht nachweisbar (Abb. 26 a)).

Bei Analysen der miR-Expression mittels qRT-PCR zeigte sich für keine der untersuchten miRs ein konzentrationsabhängiger Effekt durch Tivantinib gegenüber den DMSO-behandelten Kontrollen. Die höchsten Expressionsraten wurden für alle miRs bei einer Konzentration von 2,5 μM erzielt. Für miR-145 und miR-149 ergab sich dabei ein signifikanter Expressionsanstieg im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zudem zeigten sich bei dieser Dosis für alle miRs ähnliche Expressionsraten. miR-34a zeigte die höchste Expressionssteigerung mit dem Faktor $3,4 \pm 1,8$, für miR-145 und miR-192 ergab sich der Faktor $2,4 \pm 0,1$ bzw. $2,4 \pm 1,2$, für miR-149 $2,6 \pm 1,1$ und für miR-194 der Faktor $2,8 \pm 1,0$. Im Gegensatz zum vorangehenden Versuch kam es bei der zuvor gewählten Konzentration von 5,4 μM zu keinem relevanten induktiven Effekt auf die Expression dieser miRs (Abb. 26 b)). Für einzelne Dosisintervalle ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede, ein stringenter dosisabhängiger induktiver Effekt von Tivantinib auf die Expression von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 nativer Hep3B-Zellen wurde unter diesen Versuchsbedingungen aber nicht nachgewiesen.

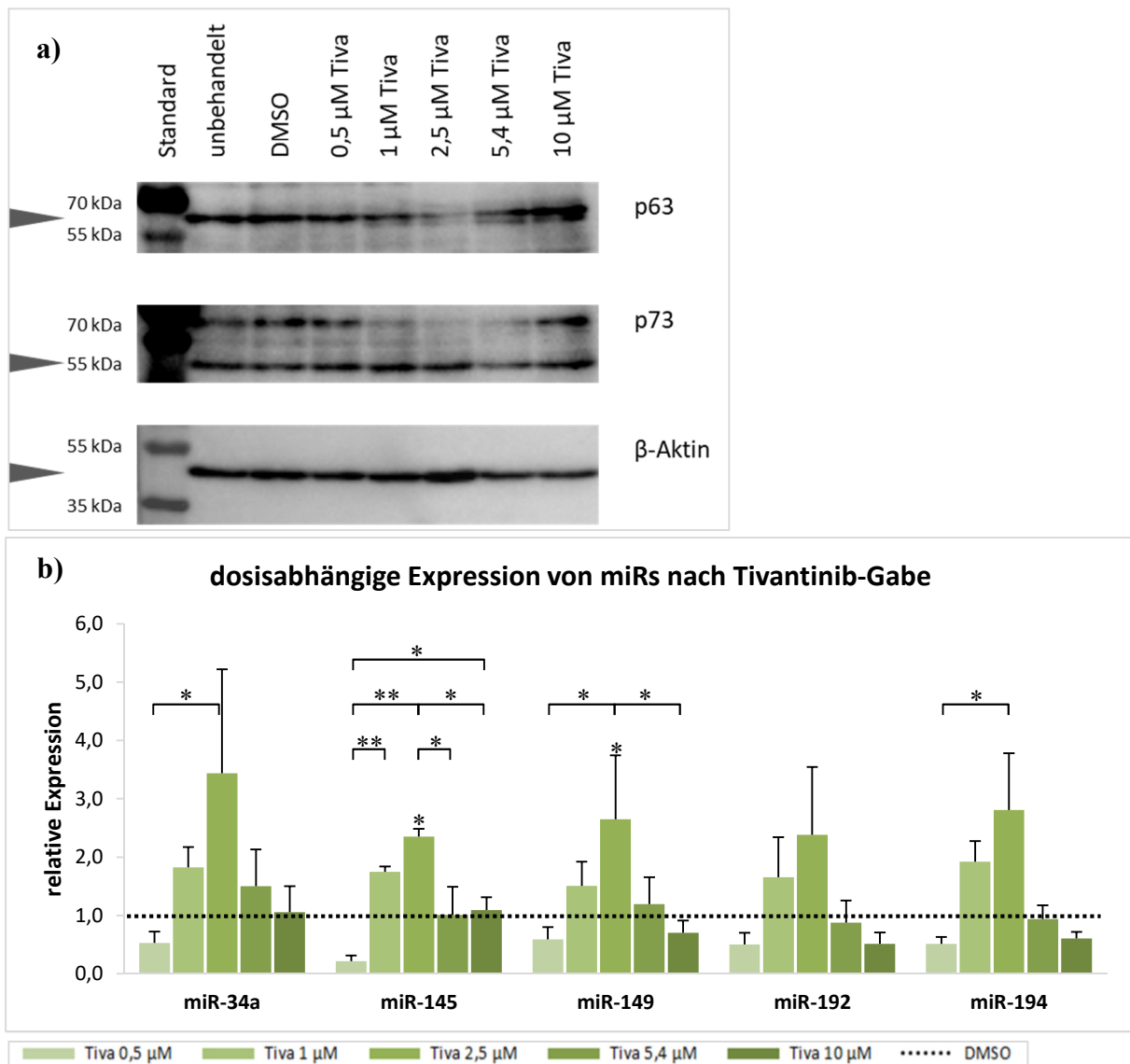


Abb. 26: Untersuchung dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die endogene Expression von p63 und p73 und die Bildung tumorsuppressiver miRs. Behandlung nativer Hep3B-Zellen für 48 Stunden mit 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5,4 μ M sowie 10 μ M Tivantinib (Tiva). **a)** Analyse der endogenen Expression von p63 und p73 auf dosisabhängige Veränderungen, n=3. **b)** Untersuchung der Expression von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 mittels qRT-PCR gegenüber DMSO-behandelten Zellen, n=3, * p<0,05, ** p<0,001. Höchste Expressionsraten für alle miRs bei einer Tivantinib-Konzentration von 2,5 μ M mit signifikantem Ergebnis gegenüber der DMSO-Kontrolle für miR-145 (p=0,001) und miR-149 (p=0,029, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse). Keine nachweisbaren dosisabhängigen Effekte auf analysierte miRs. Bei steigender Wirkstoff-Konzentration von 0,5 auf 2,5 μ M signifikant erhöhte Expressionsraten für miR-34a (p=0,033, Kruskal Wallis ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse), für miR-145 (p<0,001), für miR-149 (p=0,005, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse) sowie für miR-194 (p=0,022 Kruskal Wallis ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse). Signifikante Veränderungen für miR-145 bei einer Konzentration zwischen 0,5 und 1 μ M (p<0,001), 0,5 und 10 μ M (p=0,032), 2,5 und 5,4 μ M (p=0,001) sowie 2,5 und 10 μ M (p=0,002), zudem signifikant verminderte miR-149-Expression bei einem Konzentrationsgefälle von 2,5 und 10 μ M (p=0,009, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse).

3.5 Dosisabhängiger Einfluss von Tivantinib auf miR-Level bei adenoviraler TAp73-Überexpression

Da kein Einfluss einer Dosisänderung von Tivantinib auf die miR-Expression nativer Hep3B-Zellen nachweisbar war, wurde im Anschluss untersucht, ob Tivantinib in Gegenwart von p73 dosisabhängige Effekte auf den miR-Gehalt ausübt. Bei Wirkstoff-Konzentrationen zwischen 0,5 und 10 μ M in Kombination mit GFP- oder TAp73-Überexpression wurde die miR-Expression nach 48 Stunden analysiert. Zudem wurde mittels Western Blot der Nachweis einer TAp73-Überexpression in transduzierten Zellen geführt (Abb. 27 a)). Um auch Veränderungen der endogenen Expression der p53-Familienmitglieder unter einer adenoviralen Transduktion zu berücksichtigen und damit mögliche weitere Einflussfaktoren auf die miR-Expression auszumachen, wurden die p73-Level in rAd-GFP-transduzierten Zellen und der endogene p53- sowie p63-Gehalt mit und ohne TAp73-Überexpression untersucht. Eine endogene Expression von p53 zeigte sich aufgrund der bekannten p53-Defizienz der Hep3B-Zellen nicht (Abb. 27 b)). Während die Überexpression von p73 im Western Blot deutlich nachweisbar war, ergab sich durch die Versuchsbedingungen kein Einfluss auf die endogenen p63- und p73-Spiegel der Zellen (Abb. 27 a)).

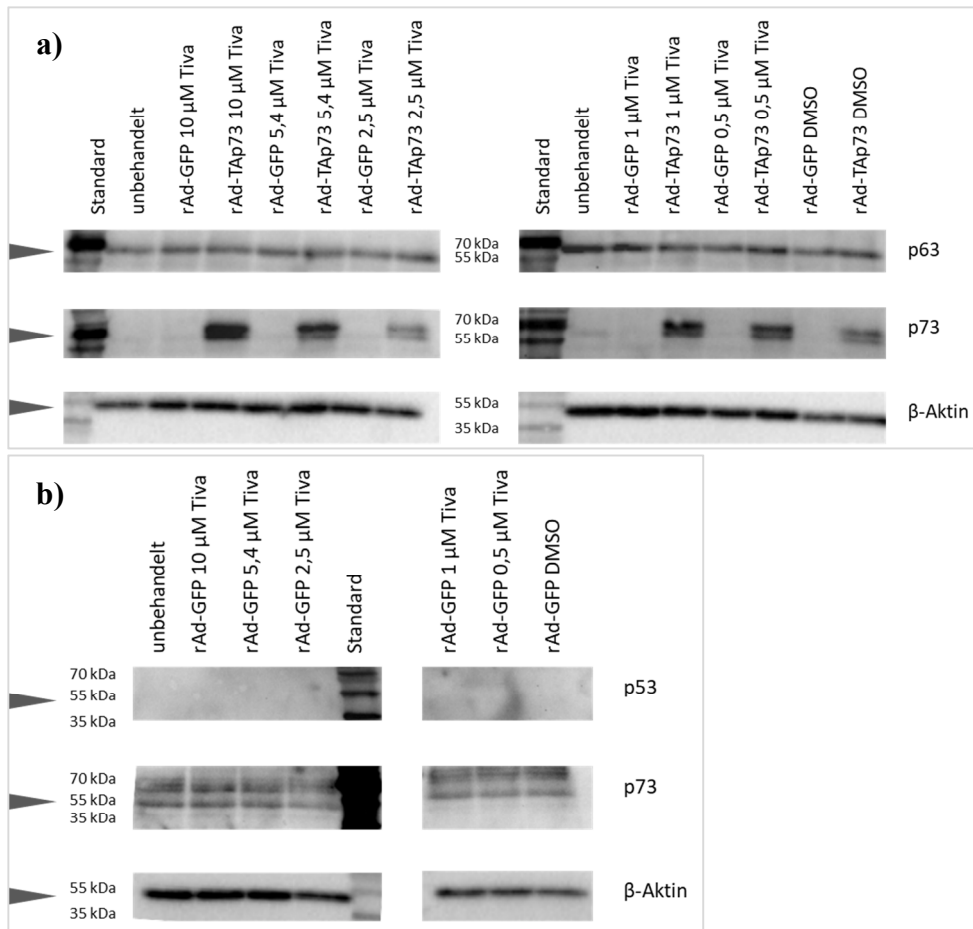


Abb. 27: Analyse dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die Expression von p53, p63 und p73 bei Überexpression von Tap73 oder GFP. Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-TAp73 bzw. rAd-GFP und Inkubation für 48 Stunden mit Tivantinib (Tiva) in einer Konzentration von 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5,4 μ M oder 10 μ M, Verwendung von DMSO als Kontrolle. **a)** Untersuchung der endogenen p63-Expression und der Überexpression von p73, n=3. **b)** Analyse des endogenen p53-Gehaltes, n=2 und der endogenen p73-Expression, n=3 in rAd-GFP-transduzierten Hep3B-Zellen.

Die qRT-PCR-Daten zeigten eine Induktion aller untersuchten miRs. Diese war bei miR-34a, miR-145 und miR-149 unter Überexpression von TAp73 am stärksten ausgeprägt. Vor allem in Gegenwart einer Konzentration von 5,4 μ M oder 10 μ M wurden erhöhte Expressionsraten erzielt. Für miR-34a wurde bei höchster Tivantinib-Konzentration eine relative Expressionssteigerung um den Faktor $15,5 \pm 3,7$ bei vorheriger rAd-TAp73-Transduktion beobachtet, während in der GFP-Kontrolle nur ein Faktor von $1,6 \pm 1,3$ erreicht wurde (Abb. 28 a)). Die Expression von miR-145 steigerte sich um den Faktor $11,3 \pm 3,1$ bzw. $24,4 \pm 6,6$ bei einer Konzentration von 5,4 μ M bzw. 10 μ M Tivantinib in Kombination mit einer TAp73-Überexpression; bei GFP-Expression kam es zu einem Anstieg um den Faktor $4,1 \pm 2,1$ bzw. $7,4 \pm 7,2$. In der Analyse der miR-145-Level ergab sich durch Kombination aus Überexpression von TAp73 und der höchsten getesteten Tivantinib-Konzentration eine

signifikante Expressionszunahme gegenüber allen anderen Behandlungen (Abb. 28 b), nur teilweise dargestellt). Die insgesamt höchsten Expressionsraten dieser Versuchsreihe zeigten sich für miR-149. Auffallend war eine anhaltend hohe Expression von miR-149 über alle verwendeten Dosen hinweg. Bereits bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,5 μ M zeigte sich nach rAd-TAp73-Transduktion eine relative Expressionsrate von $20,5 \pm 15,0$. Auch die Kontrollbehandlung mit DMSO führte zu einer starken Expressionssteigerung um den Faktor $16,6 \pm 5,4$. Unter Zugabe von 5,4 μ M Tivantinib wurde bei rAd-TAp73-Transduktion ein Induktionsfaktor von $25,0 \pm 17,9$ gegenüber $1,3 \pm 0,6$ bei rAd-GFP-Transduktion erreicht. Die Behandlung mit der höchsten Tivantinib-Dosis führte zu einem Anstieg der miR-149-Spiegel um den Faktor $27,4 \pm 15,8$ mit TAp73-Überexpression gegenüber der Kontrolle. Nach rAd-GFP-Transduktion ergab sich lediglich der Faktor $1,2 \pm 1,0$ in der Kontrolle (Abb. 28 c)). Demnach zeigten sich für miR-149 große induktive Effekte, die allerdings im Vergleich zu miR-34a und miR-145 über alle Konzentrationen stark ausgeprägt waren und im Vergleich einen geringeren prozentualen Anstieg in Abhängigkeit der Dosis beobachten ließen. Zudem fiel auf, dass es auch unter Zugabe von DMSO bei vorheriger rAd-TAp73-Transduktion im Vergleich zur GFP-Kontrolle zu einer Steigerung der Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 kam, die für letztere wiederum am stärksten ausgeprägt war. Somit ist hier von einem p73-abhängigen Effekt auszugehen, der anhand dieser Ergebnisse den größten Einfluss auf miR-149 auszuüben scheint. Dies zeigt sich auch in nur geringen Induktionsraten unter rAd-GFP-Transduktion mit maximal $2,4 \pm 1,1$ für miR-34a, $7,4 \pm 7,2$ für miR-145 und $2,8 \pm 1,2$ für miR-149.

miR-192 und miR-194 hingegen zeigten auch unter Einfluss von TAp73 nur in Gegenwart von 10 μ M Tivantinib relevante Expressionsänderungen. Diese waren mit Steigerungsraten von $2,1 \pm 0,5$ bzw. $2,4 \pm 0,6$ im Vergleich zu den anderen miRs am geringsten ausgeprägt. Signifikante Veränderungen wurden nicht beobachtet. Unter rAd-GFP-Transduktion wurde dagegen keine Expressionsänderung gegenüber der DMSO-Kontrolle erzielt (relative Expression von $0,9 \pm 0,8$ bzw. $1,0 \pm 1,0$) (Abb. 28 d), e)).

Zusammenfassend wurde für alle untersuchten miRs eine Zunahme der bereits beschriebenen induktiven Effekte durch eine Kombination aus TAp73-Überexpression und Tivantinib bei hoher Wirkstoff-Konzentration erzielt (Abb. 29).

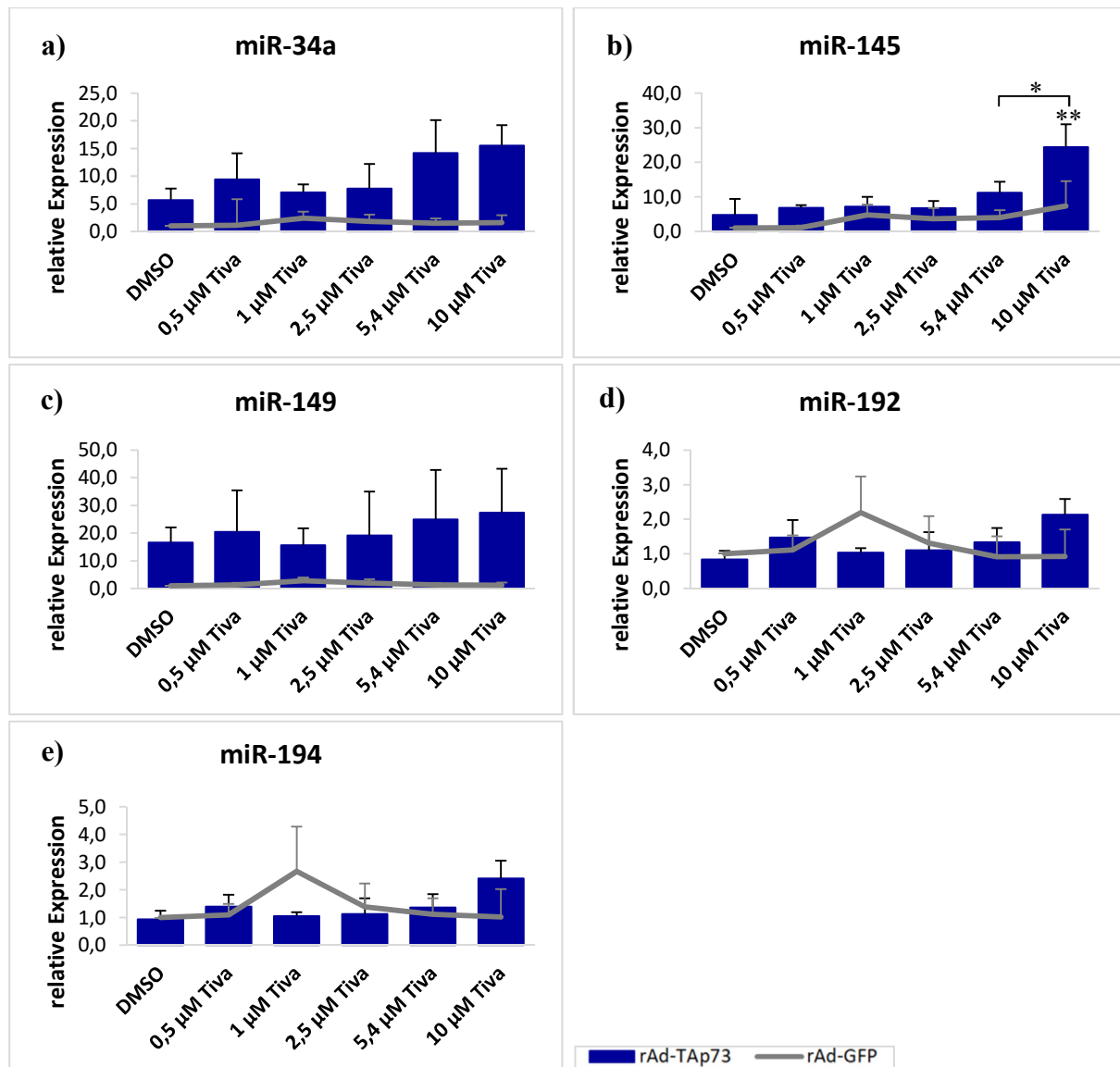


Abb. 28: Analyse dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die Expression von miRs bei Überexpression von TAp73 oder GFP. Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-TAp73 bzw. rAd-GFP und anschließende Inkubation mit Tivantinib (Tiva) in den Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5,4 µM sowie 10 µM für 48 Stunden, Verwendung von DMSO als Kontrolle (relative Expression 1,0, nicht dargestellt). Analyse des Gehalts verschiedener miRs durch qRT-PCR-Analysen gegenüber DMSO-behandelten GFP-Kontrollen, n=3, * p<0,05, ** p<0,001. Deutlich gesteigerte miR-Expression unter Behandlung mit Tivantinib nach rAd-TAp73- gegenüber rAd-GFP-Transduktion in allen Konzentrationen für **a)** miR-34a, **b)** miR-145, mit signifikanten Expressionsveränderungen nach rAd-TAp73-Transduktion und Behandlung mit 10 µM Tivantinib gegenüber DMSO (p<0,001), 0,5 µM (p<0,001), 1 µM (p<0,001), 2,5 µM (p<0,001), 5,4 µM (p=0,009) sowie gegenüber rAd-GFP-transduzierten Zellen und Behandlung mit DMSO (p<0,001), 0,5 µM (p<0,001), 1 µM (p<0,001), 2,5 µM (p<0,001), 5,4 µM (p<0,001) und 10 µM Tivantinib (p<0,001, jeweils One Way ANOVA, Tukey-Post-hoc-Analyse, **c)** miR-149. Keine signifikanten Expressions-Veränderungen für **d)** miR-192 und **e)** miR-194 bei diesen Versuchsbedingungen.

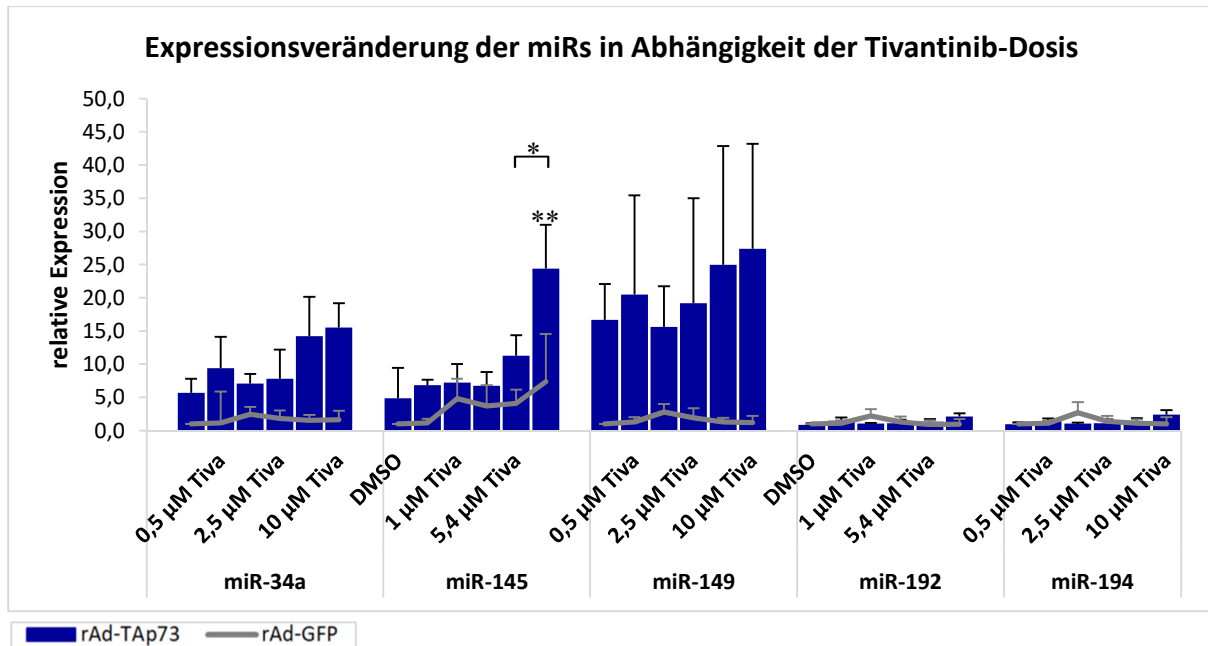


Abb. 29: Zusammenfassende Übersicht der Analyse dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die Expression von miRs bei Überexpression von TAp73 oder GFP. Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-TAp73 bzw. rAd-GFP und anschließende Inkubation mit Tivantinib (Tiva) für 48 Stunden in den Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5,4 µM oder 10 µM, Verwendung von DMSO als Kontrolle (relative Expression 1,0, nicht dargestellt). Zusammenfassende Übersicht der Expressionsanalyse und Signifikanzen für miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194, n= 3, * p<0,05, ** p<0,001.

3.6 Einfluss von Tivantinib auf die Expression von Mitgliedern der p53-Familie und miRs in HepG2-Zellen im Zeitverlauf

Im Anschluss an den Nachweis einer Dosis-Wirkungsbeziehung von Tivantinib auf einige miRs unter TAp73-Überexpression in p53-defizienten Hep3B-Zellen sollte der Einfluss der *targeted therapy* auf Zellen mit basaler Expression aller p53-Familienmitglieder untersucht werden. Hierfür wurden HepG2-Zellen verwendet, da diese sowohl p53, p63 als auch p73 in der Wildtyp-Form exprimieren. In Analogie zu den vorhergehenden Experimenten wurden die Zellen mit einer Konzentration von 5,4 µM Tivantinib behandelt und für bis zu 72 Stunden inkubiert. Nach Ernte der Zellen wurden Analysen mittels qRT-PCR und Western Blot angeschlossen. Auch hier wurden zur Kontrolle und Normierung DMSO-behandelte Zellen verwendet, die unter den gleichen Versuchsbedingungen kultiviert wurden. Im Western Blot erfolgte die Untersuchung der endogenen Expression der Mitglieder der p53-Familie. Dabei ergab sich ein Anstieg der endogenen p53-Expression durch eine Behandlung mit Tivantinib im Zeitverlauf, während es zu einer Verminderung der endogenen p63-Level kam. Demgegenüber wurde keine Veränderung des endogen gebildeten p73 unter Tivantinib-Behandlung festgestellt. DMSO-behandelte Zellen zeigten dagegen eine Abnahme

der p53-Expression nach 72 Stunden. Die p63-Bildung schien hier unbeeinflusst, während sich in einem Teil der replizierten Blots ein Anstieg an p73 nach 72 Stunden abzeichnete. In Analogie zu DMSO ergab sich bei Analyse der unbehandelten Zellen eine Verminderung der p53-Proteinmenge über die Zeit. Die Synopse der Versuchsreplikate ließ in diesen Zellen einen leichten Anstieg der p63-Expression vermuten, während der Gehalt an p73 über den Zeitverlauf der Behandlung konstant oder leicht absteigend erschien (Abb. 30).

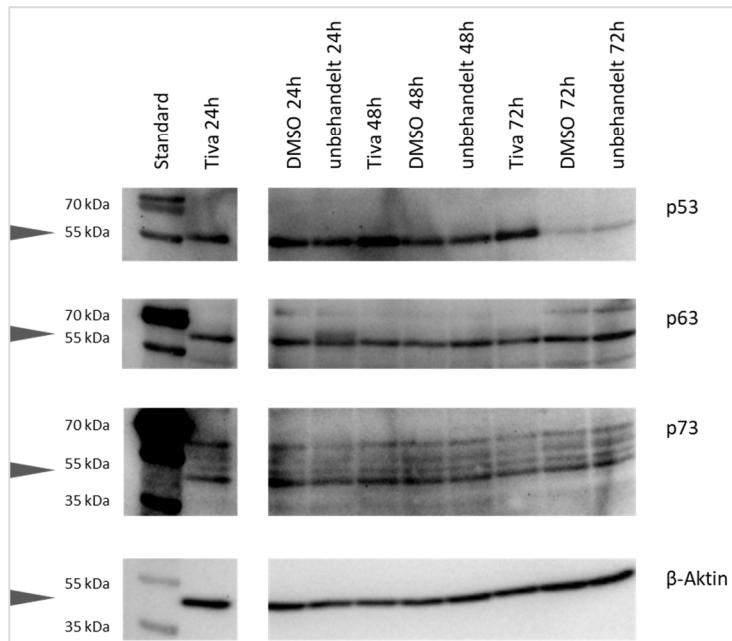


Abb. 30: Untersuchung von Tivantinib-abhängigen Veränderungen der Expression von p53-Familienmitgliedern in HepG2-Zellen im Zeitverlauf. Inkubation von HepG2-Zellen für 24, 48 und 72 Stunden mit Tivantinib (Tiva) [5,4 µM], anschließende Analyse der Expression des endogenen p53-, p63- und p73-Proteins im Western Blot, n=3.

Die Ergebnisse der qRT-PCR ergaben eine leichte Expressionssteigerung aller untersuchten miRs nach 24 Stunden. miR-34a zeigte einen Induktionsfaktor von $3,2 \pm 2,1$, miR-145 von $3,3 \pm 2,6$ und miR-149 von $1,9 \pm 0,9$. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der meisten vorherigen Versuche wurde auch eine Induktion von miR-192 und miR-194 beobachtet. Dabei zeigte sich eine Steigerung der Expression um den Faktor $2,2 \pm 1,4$ bzw. $2,4 \pm 1,4$ gegenüber der DMSO-Kontrolle. Ein signifikanter Expressionsunterschied ergab sich aufgrund hoher Standardabweichungen in den Triplikaten lediglich für miR-192 nach 72 Stunden mit einem deutlich verminderten miR-Gehalt nach Tivantinib-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Auffallend war, dass sich für alle untersuchten miRs eine Abnahme der Expressionsraten nach 48 und 72 Stunden zeigte. Im Unterschied zu den Vorergebnissen in Hep3B-Zellen zeigte sich in HepG2-Zellen also ein früherer Peak der Expression bei basalen p53-, p63- und p73-Leveln (Abb. 31).

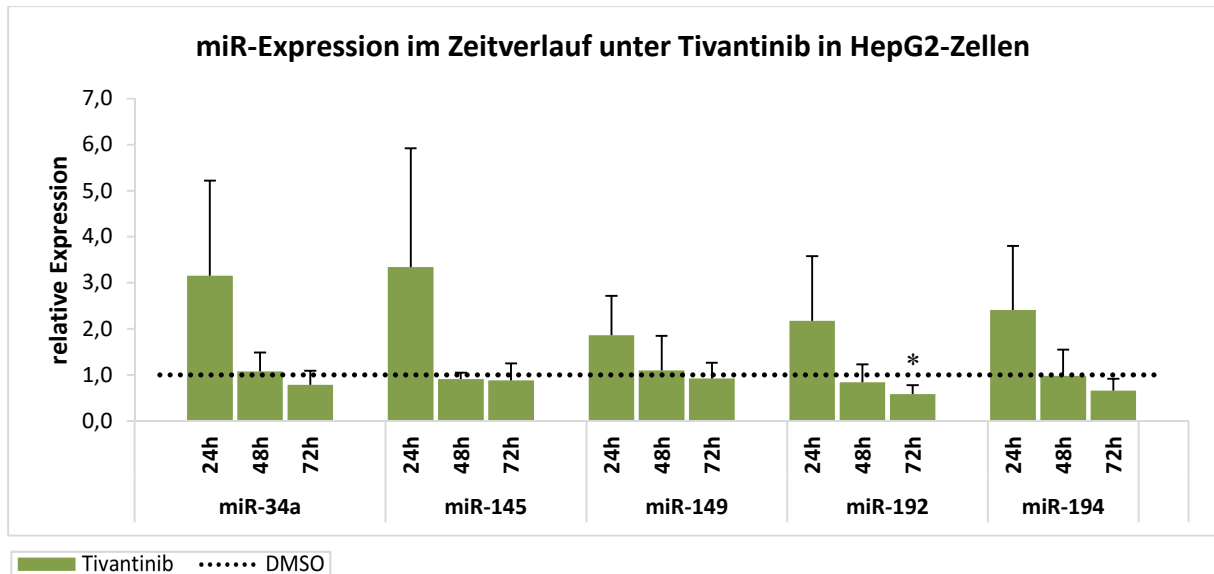


Abb. 31: Untersuchung von Tivantinib-abhängigen Veränderungen des Gehaltes von tumorsuppressiven miRs in HepG2-Zellen im Zeitverlauf. Inkubation von HepG2-Zellen mit Tivantinib [5,4 μ M] für 24, 48 und 72 Stunden und anschließende Analyse der Expression von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 gegenüber DMSO-behandelten Zellen mittels qRT-PCR-Analysen, n=3, * $p < 0,05$. Signifikante Expressionsabnahme unter Tivantinib-Behandlung für miR-192 nach 72 Stunden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($p = 0,022$, Student's t-Test).

3.7 Wirkung von Tivantinib auf die metabolische Aktivität von nativen HepG2- und adenoviral transduzierten Hep3B-Zellen

Abschließend wurde der Einfluss einer Tivantinib-Behandlung auf die Stoffwechselaktivität von HCC-Zelllinien untersucht. Durch MTS-Assays sollte geklärt werden, ob eine Inkubation mit dem Therapeutikum über 24, 48 oder 72 Stunden und die damit verbundenen Effekte auf das miR-Profil zu Veränderungen im Metabolismus der Zellen anhand einer Bestimmung der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH führen. Initial sollte der Einfluss der Therapie bei basaler Expression der p53-Familienmitglieder untersucht werden. Daher wurden HepG2-Zellen in Analogie zu den vorherigen Untersuchungen in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10 μ M Tivantinib über 48 Stunden behandelt. Als Positivkontrolle für die Veränderung der NAD(P)H-Menge und die Auslösung von Zelltod wurde Antimycin A zugegeben, das durch Hemmung von Komplex-III der Atmungskette in Mitochondrien zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit konsekutiver Auslösung von Apoptose führt [253–255]. Da für Hepa 1-6- und Huh-7-Zellen ein leichtgradiger zytotoxischer Effekt bei einer Konzentration von 1 μ g/ml beschrieben ist [256], wurde für die Verwendung des Wirkstoffes als Kontrollsubstanz eine Dosis von 100 μ M gewählt, um eine möglichst starke zellschädigende Wirkung zu erreichen. Unter diesen Bedingungen zeigte

sich jedoch nur eine geringe Veränderung der Stoffwechselaktivität der Zellen. Durch die höchste Tivantinib-Konzentration wurde in Relation zur DMSO-behandelten Kontrolle weiterhin eine zelluläre NAD(P)H-Konzentration von 91,9% gemessen, unter Antimycin A sogar von 95,5% (nicht dargestellt). Aufgrund der nur geringen Veränderung der metabolischen Leistung in diesem Konzentrationsbereich wurde in den Folgeversuchen eine Dosiseskulation mit einem zusätzlichen Konzentrationsbereich von 5 bis 100 μM Tivantinib durchgeführt. Die Dosis von Antimycin A wurde auf 200 μM , 1 mM und 2 mM erhöht. Im Dosisbereich von 0,5 bis 10 μM des c-Met-Inhibitors wurde auch bei Reproduktion der Versuche nur eine mäßige Verringerung der Substratumsetzung des MTS-Reagenz erzielt. Im Mittel zeigte sich eine Abnahme der zellulären NAD(P)H-Konzentration von $92,3\% \pm 6,2\%$ bei einer Konzentration von 0,5 μM Tivantinib auf $84,1\% \pm 12,1\%$ bei 10 μM Tivantinib im Vergleich zur DMSO-Behandlung (Abb. 32 a)). Demgegenüber kam es im eskalierten Dosisbereich zu einem kontinuierlichen Abfall der metabolischen Aktivität der HepG2-Zellen von $92,2\% \pm 2,0\%$ bei einer Konzentration von 5 μM Tivantinib auf $5,4\% \pm 1,0\%$ unter 100 μM der *targeted therapy* (Abb. 32 b)). Eine eskalierte Dosis an Antimycin A, egal ob 1 oder 2 mM, vermittelte demgegenüber allerdings nur eine Verminderung der Stoffwechselleistung auf 33,8% bzw. 36,5%. Somit wurde mittels dieser Versuchsreihe nachgewiesen, dass eine hohe Konzentration des Therapeutikums Tivantinib zu einer ausgeprägten Einschränkung der metabolischen Aktivität von HepG2-Zellen unter basaler Expression der Transkriptionsfaktoren der p53-Familie führt.

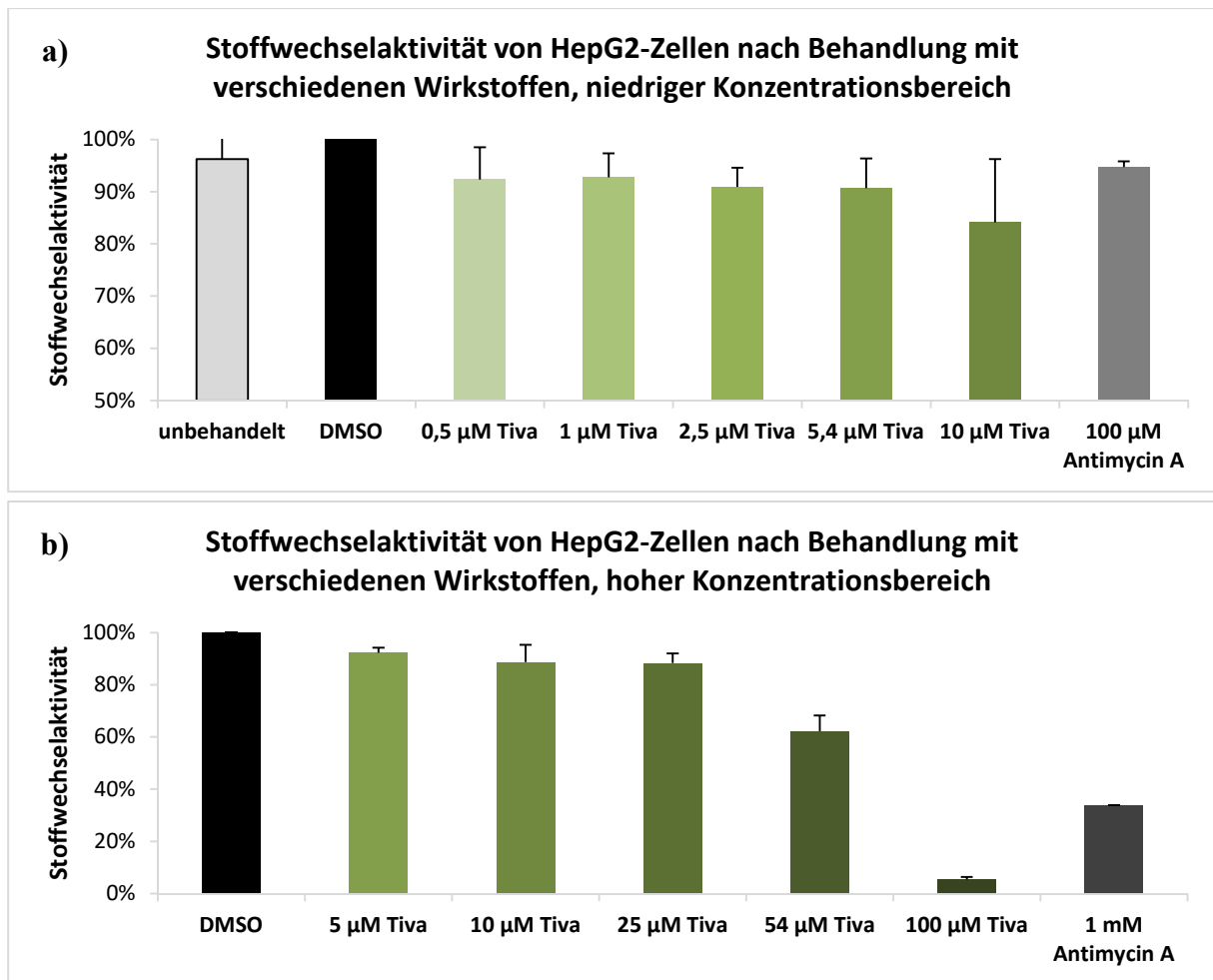


Abb. 32: Untersuchung der Stoffwechselaktivität von HepG2-Zellen nach Zugabe von Tivantinib. Inkubation nativer HepG2-Zellen mit Tivantinib (Tiva) in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen für 48 Stunden. Verwendung von Antimycin A, DMSO sowie unbehandelten Zellen als Kontrolle, Festsetzung der Stoffwechselaktivität DMSO-behandelter Zellen auf 100% als Referenz. Anfertigung von Triplikaten für jede Behandlung innerhalb eines Versuches zur Ermittlung eines Mittelwertes.

a) Stoffwechselaktivität nativer HepG2-Zellen ohne Behandlung, nach DMSO-Zugabe, unter 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5,4 µM oder 10 µM Tivantinib, n=3 oder 100 µM Antimycin A, n=2.

b) Stoffwechselaktivität nativer HepG2-Zellen unter DMSO-Behandlung, nach Zugabe von 5 µM, 10 µM, 25 µM, 54 µM oder 100 µM Tivantinib, n=2 oder 1 mM Antimycin A, n=1.

Im Anschluss sollte geklärt werden, wie sich Hep3B-Zellen unter diesen Versuchsbedingungen verhalten. In Analogie zu und zur besseren Vergleichbarkeit mit den Vorergebnissen wurde eine TAp73- bzw. GFP-Überexpression durch adenovirale Transduktion induziert. Daraufhin wurden die Zellen für 24, 48 oder 72 Stunden mit den oben genannten Konzentrationen von Tivantinib behandelt. Antimycin A wurde in einer Dosis von 100 µM und 1 mM verwendet, DMSO-behandelte Zellen dienten auch hier als Kontrolle. Nach 24 Stunden zeigte sich lediglich bei einer Konzentration von 100 µM Tivantinib sowohl

unter Überexpression von GFP als auch von TAp73 eine deutliche Reduktion der Stoffwechsellleistung auf 25,7% bzw. 33,2% (Abb. 33 a), b)).

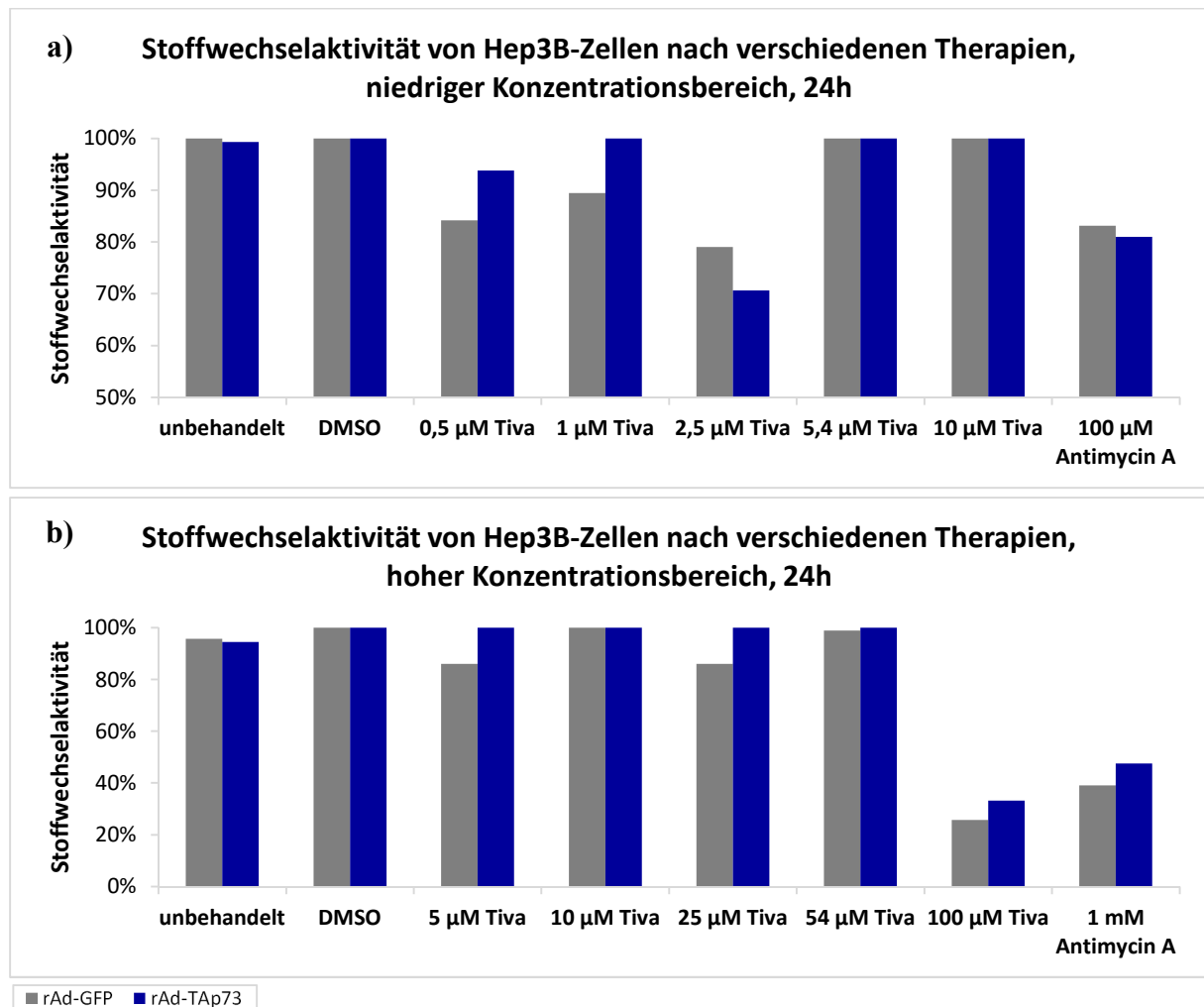


Abb. 33: Untersuchung der Stoffwechselaktivität von Hep3B-Zellen 24 Stunden nach Zugabe von Tivantinib. Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP oder rAd-TAp73 und Inkubation für 24 Stunden unbehandelt oder nach Behandlung mit Tivantinib (Tiva), Antimycin A oder DMSO. Festsetzung der Stoffwechselaktivität DMSO-behandelter Zellen auf 100% als Referenzwert. Anfertigung von Triplikaten für jede Behandlung innerhalb eines Versuches zur Generierung von Mittelwerten.

a) Stoffwechselaktivität von rAd-GFP- oder rAd-TAp73-transduzierten Hep3B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation ohne Behandlung, nach DMSO-Zugabe, unter 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5,4 µM oder 10 µM Tivantinib oder 100 µM Antimycin A, n=1.

b) Stoffwechselaktivität von rAd-GFP- oder rAd-TAp73-transduzierten Hep3B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation ohne Behandlung, unter DMSO-Behandlung, nach Zugabe von 5 µM, 10 µM, 25 µM, 54 µM oder 100 µM Tivantinib oder 1 mM Antimycin A, n=1.

Bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde hingegen nach rAd-GFP-Transduktion bereits bei einer Konzentration von 10 µM Tivantinib eine Verminderung der metabolischen Aktivität auf 85,5% und bei einer Dosis von 100 µM Tivantinib auf 11,7% beobachtet (Abb. 34 a), b)). Demgegenüber zeigte sich bei Überexpression von TAp73 zu diesem

Zeitpunkt kein kontinuierlicher Abfall im Substratumsatz bei steigender Konzentration der *targeted therapy*. Im Dosisbereich zwischen 0,5 und 10 μM wurde die niedrigste Stoffwechselaktivität bei einer Konzentration von 1 μM beobachtet, sie betrug im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 75,6% (Abb. 34 a)). Bei Steigerung der Dosis auf die Höchstkonzentration von 100 μM kam es zu einer Reduktion auf 17,7% (Abb. 34 b)).

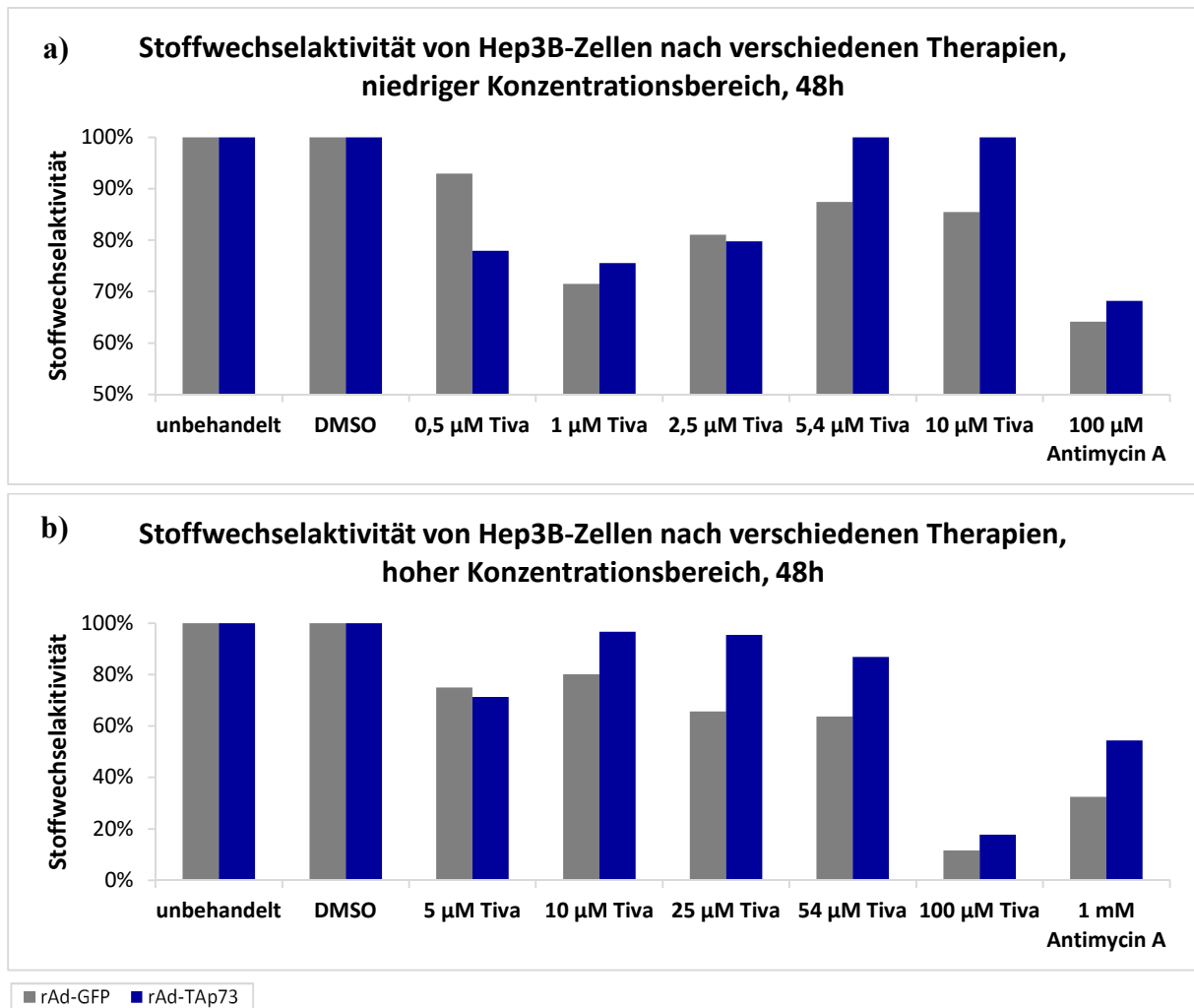


Abb. 34: Untersuchung der Stoffwechselaktivität von Hep3B-Zellen 48 Stunden nach Zugabe von Tivantinib. Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP oder rAd-TAp73 und Inkubation für 48 Stunden unbehandelt oder nach Behandlung mit Tivantinib (Tiva), Antimycin A oder DMSO. Festsetzung der Stoffwechselaktivität DMSO-behandelter Zellen auf 100% als Referenzwert. Anfertigung von Triplikaten für jede Behandlung innerhalb eines Versuches zur Generierung von Mittelwerten.

a) Stoffwechselaktivität von rAd-GFP- oder rAd-TAp73-transduzierten Hep3B-Zellen nach 48-stündiger Inkubation ohne Behandlung, nach DMSO-Zugabe, unter 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5,4 μM oder 10 μM Tivantinib oder 100 μM Antimycin A, n=1.

b) Stoffwechselaktivität von rAd-GFP- oder rAd-TAp73-transduzierten Hep3B-Zellen nach 48-stündiger Inkubation ohne Behandlung, unter DMSO-Behandlung, nach Zugabe von 5 μM , 10 μM , 25 μM , 54 μM oder 100 μM Tivantinib oder 1 mM Antimycin A, n=1.

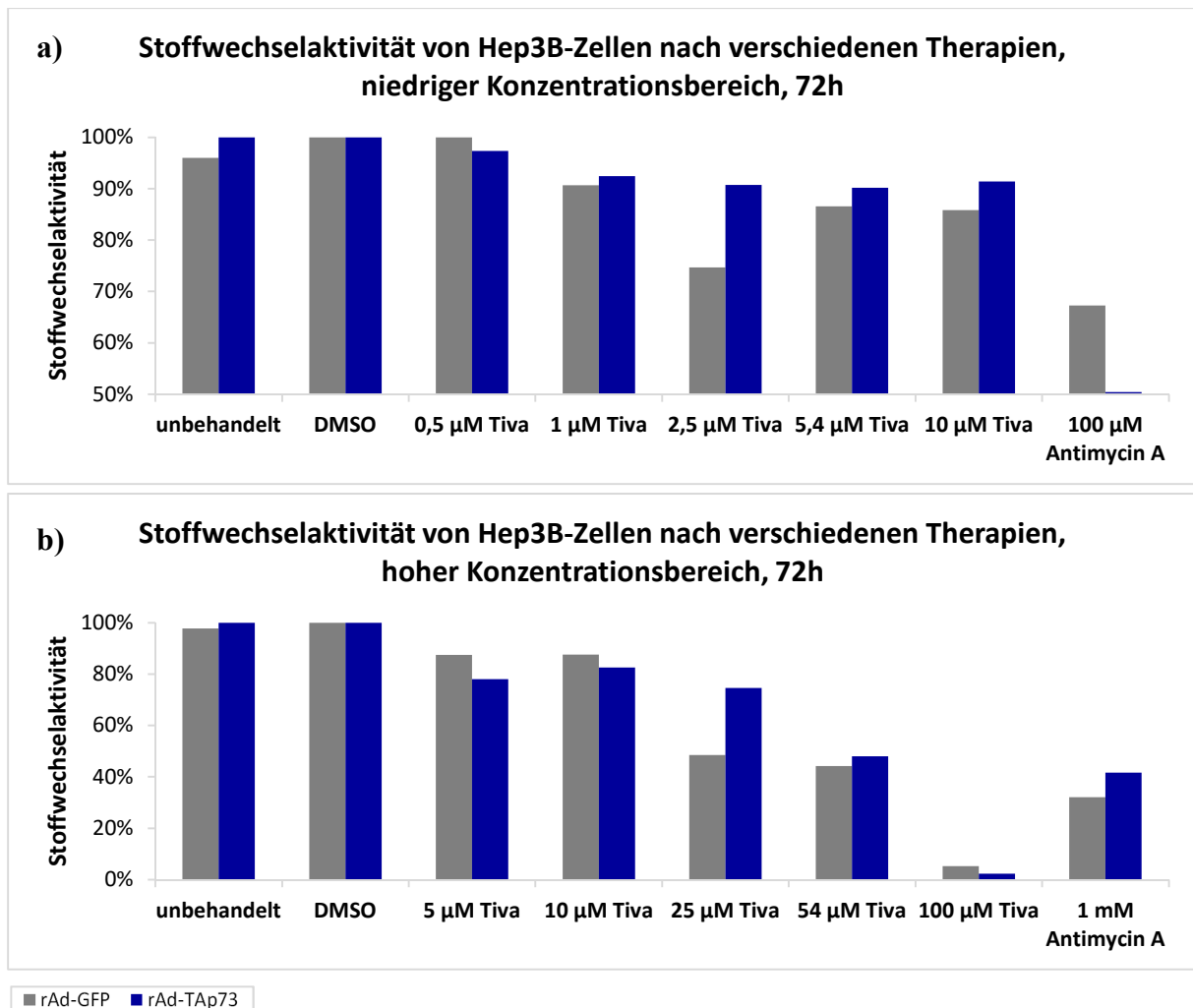


Abb. 35: Untersuchung der Stoffwechselaktivität von Hep3B-Zellen 72 Stunden nach Zugabe von Tivantinib. Transduktion von Hep3B-Zellen mit rAd-GFP oder rAd-TAp73 und Inkubation für 72 Stunden unbehandelt oder nach Behandlung mit Tivantinib (Tiva), Antimycin A oder DMSO. Festsetzung der Stoffwechselaktivität DMSO-behandelter Zellen auf 100% als Referenzwert. Anfertigung von Triplikaten für jede Behandlung innerhalb eines Versuches zur Generierung von Mittelwerten.

a) Stoffwechselaktivität von rAd-GFP- oder rAd-TAp73-transduzierten Hep3B-Zellen nach 72-stündiger Inkubation ohne Behandlung, nach DMSO-Zugabe, unter 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5,4 µM oder 10 µM Tivantinib oder 100 µM Antimycin A, n=1.

b) Stoffwechselaktivität von rAd-GFP- oder rAd-TAp73-transduzierten Hep3B-Zellen nach 72-stündiger Inkubation ohne Behandlung, unter DMSO-Behandlung, nach Zugabe von 5 µM, 10 µM, 25 µM, 54 µM oder 100 µM Tivantinib oder 1 mM Antimycin A, n=1.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden zeigte sich in beiden Behandlungszweigen für beide Konzentrationsbereiche ein relativ kontinuierlicher Abfall der metabolischen Kapazität bei Steigerung der Tivantinib-Dosis. Bei Konzentrationen zwischen 0,5 und 10 µM des Therapeutikums zeigte sich unter GFP-Überexpression eine stärkere Reduktion des Substratumsatzes, im eskalierten Dosisbereich hingegen kam es unter TAp73-Überexpression zu größeren Effekten. So wurde nach rAd-GFP-Transduktion bei einer Dosis von 10 µM eine

Aktivität von 85,8% im Vergleich zu 91,4% unter rAd-TAp73 beobachtet (Abb. 35 a)). Bei einer Konzentration von 100 μ M der *targeted therapy* kam es dagegen unter Überexpression von TAp73 zu einer Reduktion auf 2,2% im Gegensatz zu 5,2% bei GFP-Behandlung (Abb. 35 b)).

Im Gegensatz zu den im Vorfeld beschriebenen Ergebnissen bei Analyse der HepG2-Zellen erwies sich in den Hep3B-Zellen eine Zugabe von Antimycin A sowohl in einer Konzentration von 100 μ M als auch von 1 mM als starker Einflussfaktor auf die metabolische Aktivität. Bei Überexpression von GFP ergab sich im Zeitverlauf eine Reduktion der Stoffwechsellistung von 83,1% auf 67,3% in der geringeren Konzentration und von 39,1% auf 32,1% bei höherer Dosis. Eine vorherige rAd-TAp73-Transduktion führte zu einer Verminderung von 81,0% auf 50,4% in der niedrigeren Dosierung im Vergleich zu einem Abfall von 47,5% auf 41,6% bei einer Konzentration von 1 mM Antimycin A (Abb. 33 – 35). Entsprechend zeigte sich auch bei dieser Substanz eine kinetische Abhängigkeit in Bezug auf die Inkubationszeit.

Zusammenfassend führte Tivantinib nicht nur zur beschriebenen Induktion tumorsuppressiver miRs in HCC-Zelllinien, sondern sowohl in HepG2-Zellen unter basaler Expression der p53-Familie als auch in Hep3B-Zellen unabhängig von einer TAp73-Überexpression zu einer Verminderung der Stoffwechsellistung. Hohe Konzentrationen des Therapeutikums Tivantinib nehmen somit Einfluss auf die metabolische Aktivität verschiedener HCC-Zelllinien. Dies stellt eine potenzielle Endstrecke der Veränderungen des miR-Profiles im HCC dar.

4 Diskussion

4.1 Rolle von miRs im HCC

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Isoformen TAp73 und Δ Np73 auf die Expression von miRs in HCC-Zelllinien, auch unter Berücksichtigung verschiedener Systemtherapien untersucht. Die Relevanz unterschiedlicher miRs im HCC ist in der Literatur beschrieben. Analysen von Gewebeproben primärer Leberkarzinome haben veränderte Expressionsmuster verschiedener miRs gezeigt. Dies gilt auch für die hier untersuchten miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194. Während für miR-34a und miR-149 in verschiedenen Arbeiten eine zum Teil erhöhte, zum Teil erniedrigte Expression im Tumorgewebe beschrieben wurde [257–260], wiesen miR-145, miR-192 und miR-194 verminderte Level im HCC auf [258,261–263]. Allen genannten miRs werden überwiegend tumorsuppressive Funktionen zugesprochen [257,259,261,262,264]. Allerdings wurden die Effekte der Tumorunterdrückung nicht in allen Arbeiten und Geweben nachgewiesen [213,260,265]. Die Vielzahl an Studien und die teilweise Inkongruenz der erhobenen Daten bezüglich der Eigenschaften und des Verhaltens dieser miRs in unterschiedlichen Zelllinien und Geweben zeigt, dass es sich um komplexe gewebeabhängige Signalsysteme handelt, die einer sensiblen Regulation unterliegen.

4.2 TAp73-abhängige Induktion von miR-34a, miR-145 und miR-149

Dass die Expression von miR-34a und miR-145 einer direkten Regulation und Induktion durch den „Wächter des Genoms“ p53 unterliegt [266,267], ist bereits bekannt. Auch miR-149 wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als Zielstruktur von p53 identifiziert [243]. Welche Rolle andere Transkriptionsfaktoren der p53-Familie und deren Isoformen für die Expression dieser miRs spielen, ist im HCC im Gegensatz zu anderen Geweben allerdings bisher nicht untersucht. miR-34a wird beispielweise in Osteosarkom- und Neuroblastom-Zelllinien durch Überexpression von TAp73 α und TAp73 β induziert [228,229]. Auch eine Induktion von miR-145 durch TAp73- und Δ Np73-Isoformen in der akuten Promyelozytenleukämie wurde beobachtet [232]. Durch den Nachweis signifikanter induktiver Effekte durch TAp73 im Vergleich zu Δ Np73 auf die Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 in Hep3B-Zellen bestätigen unsere Ergebnisse die in den Vorarbeiten beschriebene p73-abhängige Regulation dieser drei miRs im HCC [243]. Da sich weder in unbehandelten Kontroll-Zellen noch unter Überexpression der als onkogen geltenden Isoform Δ Np73 ein relevanter Expressionsanstieg der untersuchten miRs zeigte, handelt es sich hier

um einen TAp73-spezifischen und anhand unserer Daten ebenso zeitabhängigen Effekt. Angesichts der bekannten pro-apoptotischen Eigenschaften von TAp73 legt diese miR-Induktion einen neuen Mechanismus der Tumorsuppression im HCC nahe. Zusammenfassend wurde in unserer Arbeitsgruppe durch diese Arbeit und die Vorarbeiten somit erstmals die Regulation der Expression von miR-149 durch TAp73 und von miR-34a, miR-145 und miR-149 im HCC nachgewiesen (Abb. 36).

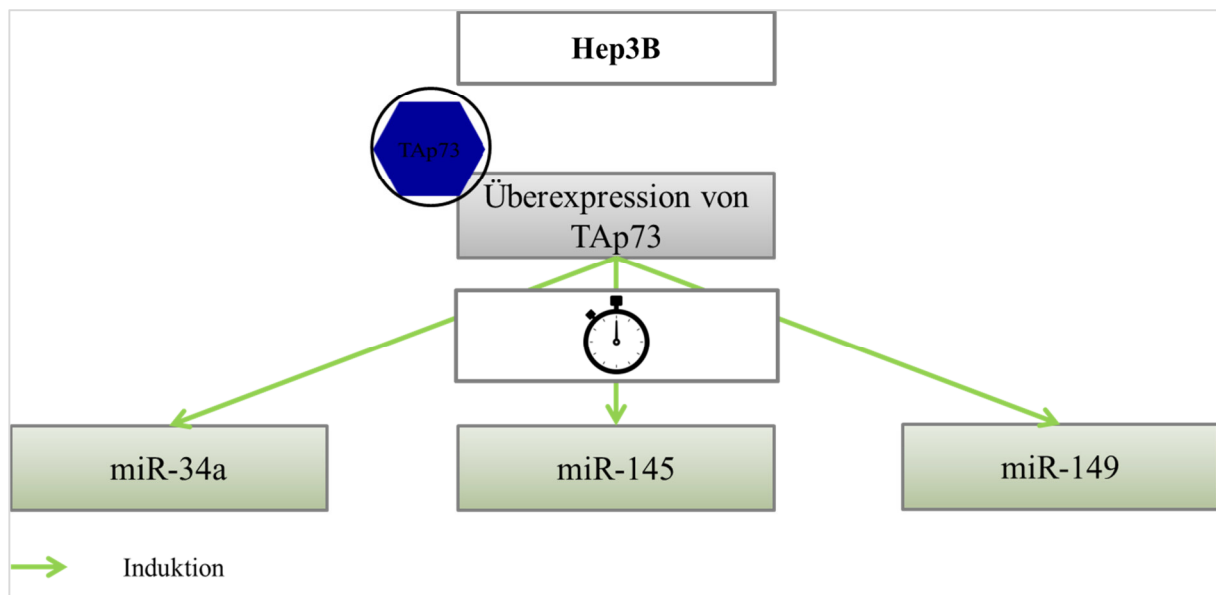


Abb. 36: Induktion von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch Überexpression von TAp73 in Hep3B-Zellen im Zeitverlauf.

4.3 TAp73-unabhängige Expression von miR-192 und miR-194

Demgegenüber wurden für miR-192 und miR-194 keine relevanten TAp73-abhängigen Expressionsveränderungen beobachtet (Abb. 37). Andere Studien zeigten verschiedene Regulationsmechanismen für diese miRs, ein Zusammenspiel mit TAp73 findet sich darunter – wie bei unseren Ergebnissen – nicht. Das Chemotherapeutikum Cisplatin beispielsweise führt in Blasenkarzinomen zu einer gesteigerten Expression von miR-194-5p [268], unter Einfluss von Methotrexat wurde Ähnliches für miR-192 in Kolonkarzinomzellen nachgewiesen. *Song et al.* zeigten dabei eine Regulationsschleife mit dem Transkriptionsfaktor p53 auf, der bei ektopter Expression von miR-192 induziert wird und unter Behandlung mit dem Dihydrofolat-Reduktase-Inhibitor selbst zu einer vermehrten Bildung von miR-192 beiträgt. Dies ermöglicht tumorsuppressive Effekte, wie Zellzykluskontrolle oder verminderte Zellproliferation [184]. In Kongruenz zu diesen Ergebnissen wurde eine direkte Regulation von miR-192 und miR-194 durch p53 nachgewiesen [266,267,269–271], auch in HCC-Zellen [272,273]. Bei Bender wurden die

induktiven Effekte von p53 auf die genannten miRs in Hep3B-Zellen in Microarray- und qRT-PCR-Analysen jedoch nicht beobachtet. Ebenso ergab sich weder in den Vorarbeiten noch in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss durch eine Überexpression von TAp73 [243]. Eine mögliche Erklärung stellt das Fehlen komplementärer Bindestellen zwischen der von uns verwendete TAp73-Isoform und den beiden miRs dar. Für die 3'UTR von p53-Isoformen ist eine unterschiedliche Anzahl von Bindestellen für verschiedene miRs beschrieben. Dadurch können inkongruente Effekte zwischen der Expression von miRs, verschiedenen Transkriptionsfaktoren und deren Isoformen entstehen [271]. Absente Bindestellen bedingen so möglicherweise die fehlende Regulation von miR-192 und miR-194 durch TAp73. Da sich in den Signalsystemen, in die die miRs und die p53-Superfamilie eingreifen, häufig Feedback-Schleifen finden, lassen sich im Umkehrschluss auch spezifische Effekte der Transkriptionsfaktoren auf die miRs in Abhängigkeit der Isoform vermuten. Zur Beurteilung möglicher Interaktionen von miR-192 und miR-194 mit TAp73 ist somit eine Auswertung von Bindestellen in HCC-Zelllinien nötig, angesichts der aktuellen Datenlage ist allerdings kein tumorsuppressiver Effekt von TAp73 durch miR-192 und miR-194 zu vermuten.

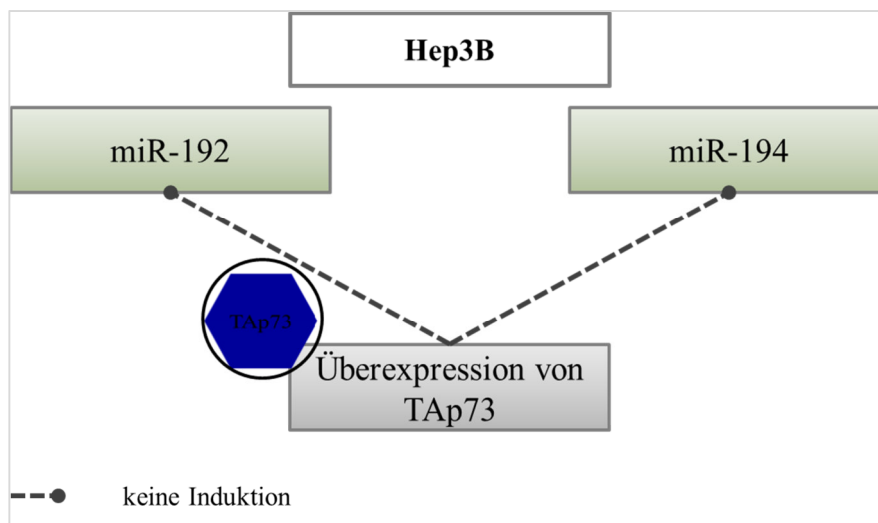


Abb. 37: Fehlende signifikante Expressionsveränderung von miR-192 und miR-194 durch TAp73-Expression in Hep3B-Zellen.

4.4 Unbeeinflusste Expression oder negative Regulation der untersuchten miRs durch Δ Np73

Im Gegensatz zu TAp73 handelt es sich bei den bekannten Interferenzen der onkogenen Δ Np73-Isoform mit tumorsuppressiv wirkenden miRs um negative Effekte im Sinne einer Expressionsminderung. *Alla et al.* zeigten beispielsweise eine gesteigerte Chemoresistenz durch eine Δ Np73-abhängige Unterdrückung der Expression von miR-205 im malignen

Melanom [233]. Durch eine Verminderung der tumorsuppressiven miR-885-5p und eine Steigerung der Expression des Transmembranrezeptors für IGF-1 durch Δ Np73 wurde zudem ein Einfluss auf Therapieansprechen und Stammzeleigenschaften von Melanomzellen nachgewiesen [234]. Diese Arbeiten bestätigen onkogene Eigenschaften von Δ Np73 durch Hemmung tumorsuppressiver miRs, Auswirkungen auf die Expression von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 sind aber nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden in Hep3B-Zellen keine signifikanten Expressionsveränderungen der untersuchten miRs durch diesen Transkriptionsfaktor nachgewiesen (Abb. 38). Der unveränderte Gehalt an miR-192 und miR-194 sowohl unter Überexpression von TAp73 als auch von Δ Np73 legt nahe, dass diese beiden miRs in HCC-Zelllinien generell keinem Einfluss durch p73-Isoformen unterliegen. Dagegen wurden erstmals signifikante und spezifische Effekte von TAp73 gegenüber Δ Np73 auf miR-34a, miR-145 und miR-149 nachgewiesen, die die bekannten antagonistischen Eigenschaften dieser beiden Isoformen untermauern. Unsere Ergebnisse bestätigen somit den tumorsuppressiven Effekt von TAp73 durch Induktion von miR-34a, miR-145 und miR-149 in Hep3B-Zellen sowie eine gegenläufige Regulation durch die dominant negativen Isoformen von p73.

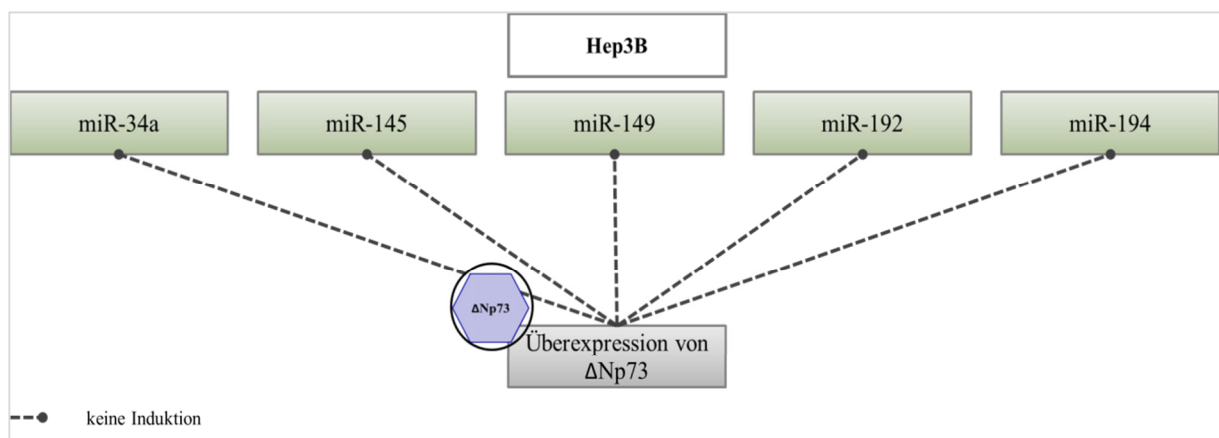


Abb. 38: Unveränderte Expression oder negative Regulation der untersuchten miRs durch Δ Np73.

4.5 Steigerung der TAp73-abhängigen Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch Tivantinib

Die Kombination der rAd-TAp73-Transduktion mit verschiedenen HCC-relevanten therapeutischen Wirkstoffen ergab unterschiedliche Expressionsveränderungen von miR-34a, miR-145 und miR-149. Zwar ergaben sich nach Behandlung mit den Therapeutika bei TAp73-Expression signifikante Expressionssteigerungen im Vergleich zur rAd-GFP-

transduzierten Wirkstoff- oder DMSO-Kontrolle, synergistische Effekte ließen sich für die Chemotherapeutika sowie Sorafenib und Regorafenib dennoch nicht nachweisen. Während bei kombinierter Behandlung mit Sorafenib geringere Induktionsraten im Vergleich zur alleinigen TAp73-Überexpression gezeigt wurden, erzielten Doxorubicin, Bleomycin und Regorafenib eine zusätzliche Expressionssteigerung zum Zeitpunkt 24 Stunden. Im Gegensatz zu den anderen Substanzen führte Tivantinib bei Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze in TAp73-transduzierten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten zu einer deutlich erhöhten Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 gegenüber der alleinigen TAp73-Überexpression (Abb. 39). Aufgrund der fehlenden Induktion nach adenoviraler GFP-Transduktion und der im Vergleich zu den Kontrollen signifikanten Ergebnisse zeigt die miR-Expression unter Tivantinib einen p73-abhängigen Mechanismus. Tivantinib induziert hier somit additive Effekte zu TAp73 auf die miR-Expression.

Die fehlende Expressionssteigerung unter GFP-Expression lässt keinen relevanten direkten, von der p53-Familie unabhängigen Einfluss der verwendeten Wirkstoffe auf die untersuchten miRs in Hep3B-Zellen vermuten. In nativen HepG2-Zellen (Wildtyp p53) wurde bei Bender sowohl durch Doxorubicin als auch durch Bleomycin eine dosisabhängige Regulation von miR-34a, miR-145 und miR-149 nachgewiesen. Verminderte Expressionsraten nach kombiniertem Silencing von p53 und p73 bestätigten dabei die Vermittlung dieses Effektes durch die Mitglieder der p53-Familie [243].

In verschiedenen Nicht-HCC-Zelllinien wurden direkte Effekte von Chemotherapeutika beschrieben. In humanen Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen wurde ebenso wie in einer murinen kardialen Muskelzelllinie, in myokardialen Progenitorzellen, Fibroblasten, aortalen Endothelzellen, im Plasma von Ratten und Mäusen sowie bei Herzmuskelzellen von Ratten nach Behandlung mit Doxorubicin eine Induktion von miR-34a bzw. miR-34a-5p nachgewiesen [274–278], zudem auch in Prostata-Karzinomzellen [279]. Daneben wurden gesteigerte Expressionsraten dieser miR durch das Chemotherapeutikum in einer Brustkrebs-, einer Zervixkarzinom-, einer Ösophaguskarzinom- sowie einer Kolonkarzinom-Zelllinie beobachtet [280–283]. Auch ein Anstieg der Expression von miR-145 wurde unter Behandlung mit Doxorubicin in Keratinozyten und Kolonkarzinom-Zellen gezeigt [176,284]. Für miR-149 wurde in gesunden Mammazellen sowie in einer Brustkrebs-Zelllinie ein induktiver Effekt durch das Chemotherapeutikum beobachtet [285].

Bleomycin zeigte sowohl in Zelllinien aus dem Lungenepithel von Ratten als auch im Mausmodell eine Steigerung der Expression von miR-34a [286,287]. Im murinen Modell wurde dabei zudem eine Induktion von p53 und Apoptose durch das Chemotherapeutikum

nachgewiesen. Gleichzeitig ergab sich bei p53-Defizienz keine Induktion der miR-34a-Level, vermehrte Apoptoseraten wurden in diesen Zellen ebenso wenig beobachtet. Hierdurch wurde eine gegenseitige Regulation von p53 und miR-34a gezeigt [287]. Für miR-145 wurde bei Mäusen ein Beitrag zur Entstehung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose – einer klassischen Nebenwirkung dieses Chemotherapeutikums – festgestellt [288]. Zudem wurde eine Induktion dieser miR in humanem Umbilikalvenenendothel und in Gewebeproben aus venösen Malformationen nachgewiesen [289].

Im Gegensatz zu den Chemotherapeutika ist nur wenig zur Expression der untersuchten miRs in Abhängigkeit der verwendeten *targeted therapies* bekannt. Für Regorafenib wurde in verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien eine gesteigerte Expression von miR-34a nachgewiesen [290], ebenso durch Sorafenib in Gewebeproben von Lungenmetastasen gegenüber primärem Tumorgewebe beim HCC [291]. Vergleichsdaten zu den Auswirkungen aller untersuchten Wirkstoffe sowie zu Interferenzen mit einer TAp73-Transduktion bezüglich der Expression der untersuchten miRs in Hep3B-Zellen existieren bisher nicht.

In dieser Arbeit ergab sich für miR-34a eine spezifische Regulation der Expression in Abhängigkeit der Wirkstoffe unter TAp73-Überexpression, die keinen Substanzklassenspezifischen Effekt von Chemotherapeutika oder Kinaseinhibitoren darstellte. Unter Doxorubicin, Sorafenib und Tivantinib zeigte sich eine kontinuierliche Expressionssteigerung mit Maximum nach 72 Stunden. Unter Bleomycin wurde die höchste Expression nach 24, unter Regorafenib nach 48 Stunden erreicht. Bezüglich der Auswirkungen von Doxorubicin auf die Expression von miR-34a bzw. miR-34a-5p wurde für Linsenepithelien und Kolonkarzinom-Zellen über 48 Stunden, für Ösophaguskarzinom-Zellen über 72 Stunden sowie für humane Kardiomyozyten konzentrationsabhängig über einen Zeitraum von 14 Tagen eine stete Steigerung im Zeitverlauf beschrieben [282,283,292,293], sodass ein kontinuierlicher Expressionsanstieg auch in Hep3B-Zellen zu erwarten war. Für Bleomycin und die von uns verwendeten *targeted therapies* fehlten bisher Untersuchungen in hepatischen Zelllinien, insbesondere bezüglich der Interaktion mit p73. *Shetty et al.* wiesen eine Bleomycin-bedingte Induktion von miR-34a in murinen Alveolarepithelzellen nach, die in p53-defizienten Mäusen nicht zu beobachten war und daher p53-abhängig zu sein schien [287]. Auch die Effekte von Doxorubicin auf die miR-Expression in Linsenepithelien zeigten sich durch p53 bedingt [292]. Aufgrund der p53-Defizienz der Hep3B-Zellen ist eine solche Interferenz in unserem Ansatz auszuschließen. *Seitz et al.* wiesen eine Erhöhung der p63- und p73-Expression in Hep3B-Zellen sowohl durch Bleomycin als auch durch Doxorubicin nach [82]. Regulatorische Eigenschaften von p63 auf miR-34a können somit für

Expressionsunterschiede verantwortlich sein [95,96], wurden bis dato allerdings nur als repressive Effekte gezeigt [294,295] und im HCC nicht untersucht. Ein Anstieg des p63-Gehaltes durch Bleomycin könnte somit eine verminderte miR-34a-Expression erklären.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten miRs zeigte sich kein regulatorischer Effekt auf miR-192 und miR-194 bei Behandlung mit einer Kombination aus Wirkstoffen und TAp73- oder Δ Np73-Überexpression (Abb. 39). Aus Vorarbeiten ist eine Verminderung der miR-192-Expression unter Doxorubicin in Brustkrebszellen [285] und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Doxorubicin durch eine exogene Induktion von miR-192-5p bekannt [296], Untersuchungen in HCC-Zellen finden sich allerdings nicht. Für die Überexpression von miR-194 ist eine Steigerung der Sensitivität gegenüber Sorafenib im HCC beschrieben [206], ein Einfluss des Wirkstoffes auf die endogene Expression der miRs ist aber auch hier nicht untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass weder durch eine Überexpression von p73-Isoformen noch durch HCC-relevante Therapeutika eine Regulation von miR-192 und miR-194 in Hep3B-Zellen induziert wird.

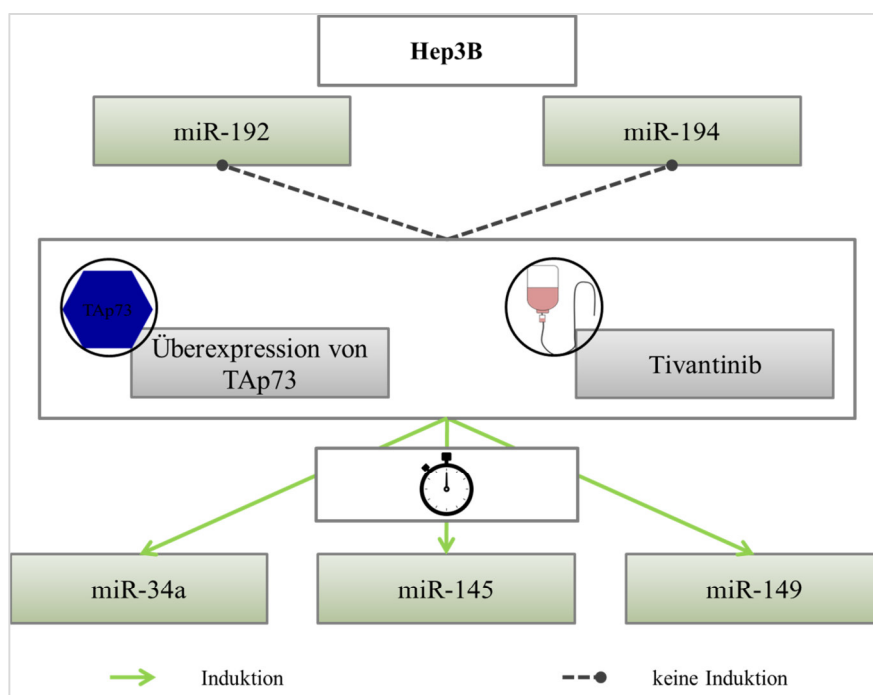


Abb. 39: Spezifischer Einfluss einer Kombination aus TAp73-Expression und Tivantinib auf die Expression von miRs in Hep3B-Zellen. Gesteigerte Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 bei gleichbleibendem Gehalt an miR-192 und miR-194 nach rAd-TAp73-Transduktion und Tivantinib-Zugabe in Hep3B-Zellen im Zeitverlauf.

Zusammenfassend ergeben sich signifikante Veränderungen der miR-Expression bei TAp73-Überexpression gegenüber rAd-GFP-transduzierten Kontrollen. Im Vergleich der Expressionsdaten einer alleinigen rAd-TAp73-Transduktion mit einer Wirkstoffbehandlung

zeigen sich keine eindeutigen regulatorischen Effekte durch Doxorubicin, Bleomycin, Regorafenib und Sorafenib auf die Expression der untersuchten miRs. Tivantinib dagegen weist eine deutliche TAp73-abhängige Regulation des Gehaltes von miR-34a, miR-145 sowie miR-149 mit signifikanten Unterschieden zu den Kontrollbehandlungen in Hep3B-Zellen auf.

4.6 Spezifische Effekte von Tivantinib auf die miR-Expression nativer Hep3B- und HepG2-Zellen

Zur genaueren Evaluation der Effekte von Tivantinib auf miRs im HCC in Abhängigkeit der basalen Expression der p53-Familie wurden neben nativen Hep3B- auch HepG2-Zellen analysiert. Angesichts der endogenen Expression der Transkriptionsfaktoren p53, p63 und p73 erschienen letztere als passendes Modell zur Untersuchung des Wirkstoffes unter „physiologischen“ Bedingungen. Da eine Vielzahl von HCC-Geweben eine Veränderung in der Expression der p53-Familie zeigt, am häufigsten im Sinne einer Mutation mit Funktionsverlust von p53 [3,8,297], sind die Eigenschaften von HepG2-Zellen nicht auf alle hepatischen Tumore übertragbar. Der Einfluss von p53 auf die miR-Expression im HCC sollte aber in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Bei Bender führte die adenovirale Überexpression von p53 in Hep3B-Zellen zu einer Induktion von miR-34a, miR-145 und miR-149. Durch die Zugabe von Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Bleomycin und Mitoxantron wurde auch in HepG2-Zellen eine Expressionssteigerung dieser miRs nachgewiesen, die auf eine Zytostatika-vermittelte Induktion von p53 und p73 zurückgeführt wurde [243]. Der bisher gezeigte induktive Einfluss von Tivantinib auf die miR-Expression bestätigte sich in unterschiedlicher Ausprägung in nativen Hep3B- und HepG2-Zellen. In HepG2-Zellen erzielte die Zugabe des Wirkstoffes bereits nach 24 Stunden einen leichten, aber im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanten Anstieg der miR-Expression (Abb. 40). Die geringeren Expressionsraten zum gleichen Zeitpunkt in p53-defizienten Hep3B-Zellen für miR-34a, miR-149, miR-192 und miR-194 lassen einen p53-abhängigen Effekt vermuten.

Nach 48 Stunden wurde in HepG2-Zellen keine Induktion der miRs mehr nachgewiesen. Stattdessen zeigte sich nun ein deutlicher Expressionsanstieg aller untersuchten miRs im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in nativen Hep3B-Zellen, der noch stärker ausgeprägt war als unter rAd-GFP-Transduktion. Inwieweit die Unterschiede der miR-Induktion der beiden HCC-Zelllinien bei Tivantinib-Behandlung durch die spezifische Expression der p53-Familienmitglieder bedingt sind, muss noch weiter untersucht werden.

Zusammenfassend zeigten wir somit erstmals die Induktion von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 durch die *targeted therapy* Tivantinib in Hep3B-Zellen (Abb. 40).

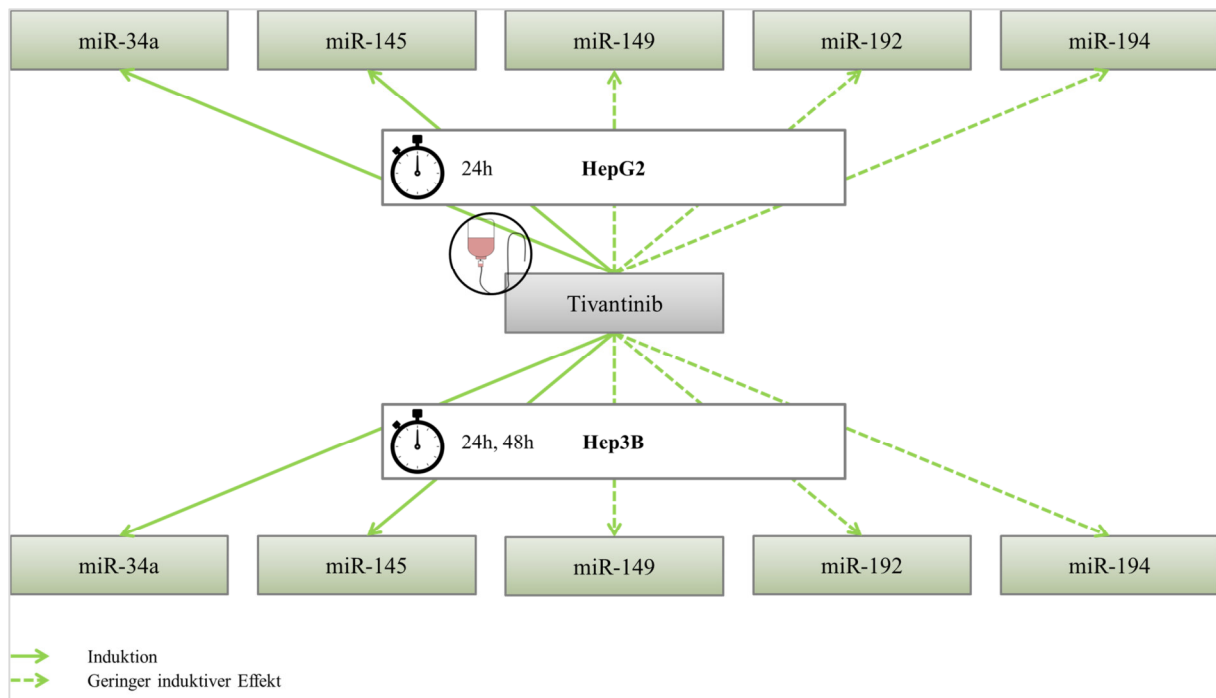


Abb. 40: Induktion spezifischer miRNAs durch Tivantinib in Hep3B- und HepG2-Zellen. Induktion von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 in HepG2-Zellen 24 Stunden nach Inkubation mit Tivantinib, in Hep3B-Zellen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden.

4.7 Ausgeprägte dosisabhängige, potenziell synergistische Effekte auf miR-34a, miR-145 und miR-149 durch Kombination aus Tivantinib und TAp73-Überexpression

Die angeschlossenen Versuche zur Untersuchung einer Dosis-Wirkungsbeziehung von Tivantinib unter TAp73-Überexpression bestätigten p73-abhängige Effekte auf die untersuchten miRNAs: Auch unter DMSO-Behandlung zeigte sich eine Expressionssteigerung von miR-34a, miR-145 und miR-149 bei TAp73-Überexpression im Vergleich zur GFP-Kontrolle. Interessanterweise ergaben sich für die Regulation durch die *targeted therapy* unterschiedliche Effekte: miR-34a und miR-145 wurden durch eine Kombination aus Tivantinib und einer TAp73-Überexpression reguliert. Hier zeigten sich sowohl bei alleiniger Expression von TAp73 als auch bei alleiniger Wirkstoffbehandlung leichte, teils signifikante induktive Effekte, die bei Kombination nicht nur im Zeitverlauf, sondern auch in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration weiter gesteigert wurden (Abb. 41). Für miR-34a ergab sich dabei im Zeitverlauf für fast alle Zeitpunkte ein potenziell synergistischer Effekt mit einer stärkeren Steigerung der Induktionsraten bei Kombination beider Behandlungen im Vergleich zur Summe der Expressionsraten der Einzelbehandlungen. miR-145 dagegen zeigte bei gleichzeitiger Tivantinib-Behandlung und TAp73-Überexpression lediglich nach

72 Stunden eine erhöhte Expressionssteigerung im Sinne eines potenziellen Synergismus. Nach 24 und 48 Stunden hingegen wurden additive Effekte erzielt, bei denen sich die Induktionsraten unter Kombinationsbehandlung im Bereich der Summe der Expressionsraten der Einzelbehandlungen bewegten. Im Rahmen des Dosis-Wirkungsversuchs ergab sich wiederum für beide miRs bei einem Großteil der verwendeten Wirkstoffkonzentrationen ein potenziell synergistischer Einfluss. Zudem zeigte sich für miR-145 bei Kombination aus höchster getesteter Tivantinib-Konzentration und rAd-TAp73-Transduktion ein signifikantes Ergebnis gegenüber allen anderen Behandlungsverfahren.

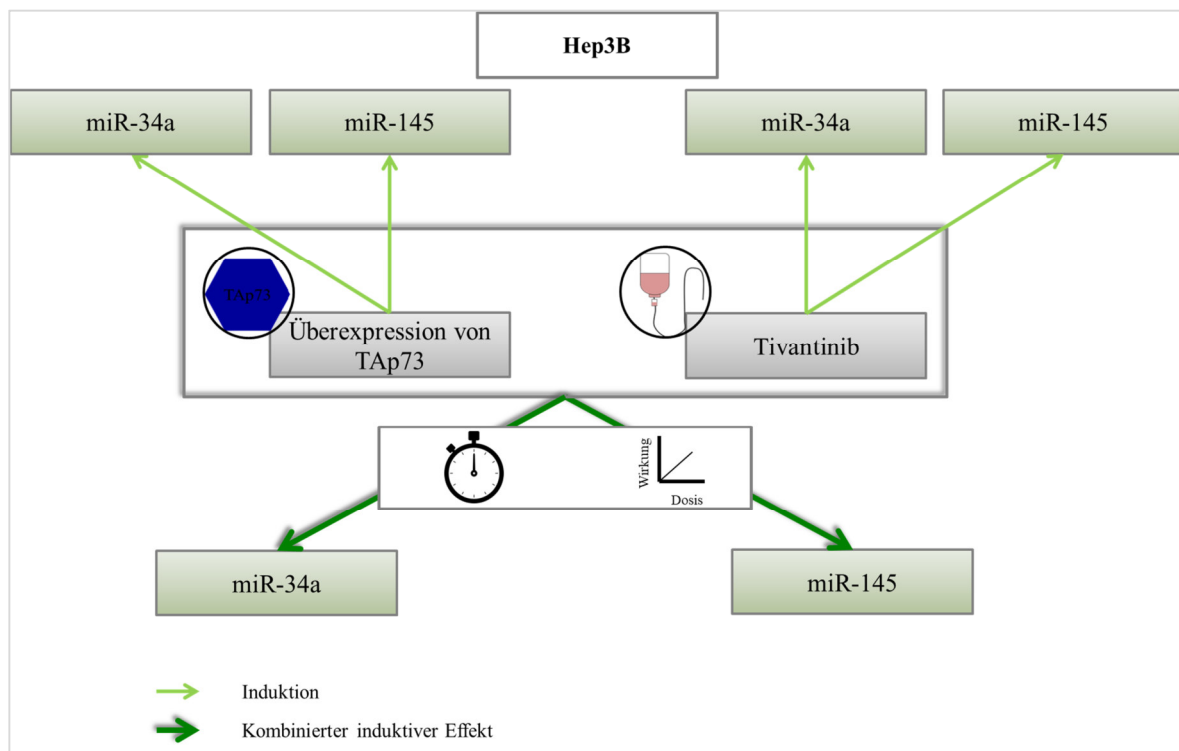


Abb. 41: Verstärkung der induktiven Effekte einer alleinigen TAp73-Überexpression oder Tivantinib-Behandlung auf miR-34a und miR-145 in Kombination sowohl im Zeitverlauf als auch in Abhängigkeit der Wirkstoff-Dosierung in Hep3B-Zellen.

Dagegen bestanden bei miR-149 induktive Effekte überwiegend bei Überexpression von TAp73 mit signifikanter Expressionssteigerung im Zeitverlauf und im Vergleich zu Δ Np73, während durch eine alleinige Behandlung mit Tivantinib nur leichte Effekte ohne statistische Relevanz auf die Expression erreicht wurden. Bei Kombination zeigte sich hingegen eine potenziell synergistische Steigerung der TAp73-vermittelten Induktion, sowohl in der kinetischen – mit signifikantem Ergebnis gegenüber der GFP-Kontrolle für die einzelnen Zeitpunkte – als auch in der dosisabhängigen Betrachtung (Abb. 42). Somit handelt es sich bei der Veränderung der miR-149-Expression überwiegend um TAp73-abhängige Effekte mit

nur geringem Einfluss der Tivantinib-Dosis. Insgesamt ergaben sich im Vergleich aller untersuchten miRs die stärksten Effekte durch TAp73 und Tivantinib für miR-149.

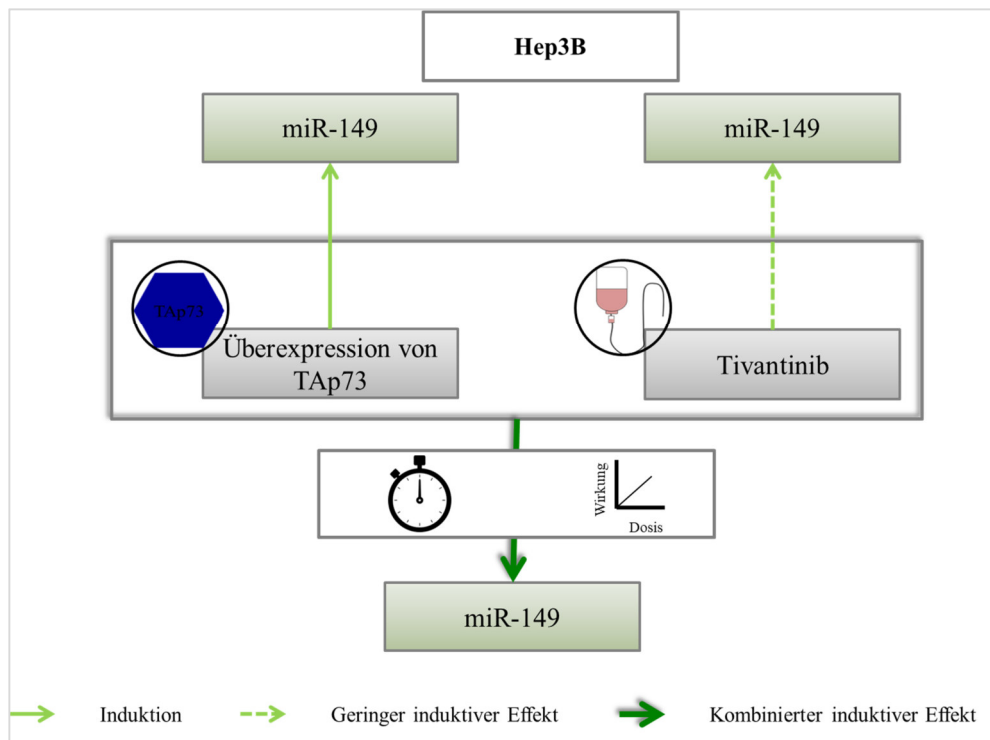


Abb. 42: Induktion von miR-149 bei TAp73-Überexpression und Tivantinib-Behandlung in Hep3B-Zellen sowohl im Zeitverlauf als auch in Abhängigkeit der Dosis. Bei alleiniger Tivantinib-Zugabe nur geringe Veränderungen der miR-149-Expression, dahingegen starker Anstieg des miR-Gehaltes unter rAd-TAp73-Transduktion mit zusätzlicher Steigerung durch Kombination aus TAp73-Überexpression und Wirkstoff-Behandlung.

Zusammenfassend wiesen wir hier zum ersten Mal eine Regulation von miR-34a und miR-145 durch eine Kombination aus TAp73-Überexpression und Tivantinib-Behandlung sowie eine überwiegend p73-abhängige Induktion von miR-149 nach. Da für diese miRs tumorsuppressive Eigenschaften beschrieben sind, ergibt sich hieraus möglicherweise auch eine therapeutische Konsequenz. Aus verschiedenen Arbeiten ist bekannt, dass eine niedrige Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 mit einem schlechteren Überleben von HCC-Patienten assoziiert ist [200,259,298,299]. Eine Induktion von miR-34a dagegen bewirkte eine Verminderung von Proliferation, Migration und Lebensfähigkeit sowie eine Steigerung von Apoptose in HCC-Zelllinien [200,300,301]. Ähnliches wurde auch für miR-149 nachgewiesen. Die externe Zugabe oder virale Induktion der miR führte zur Hemmung von Proliferation, Invasion und Migration im HCC [259,299,302]. Schlussfolgernd wird somit ein Einfluss durch die Induktion dieser tumorsuppressiven miRs auf positive prognostische Marker von Tumorzellen ersichtlich. Zudem trugen gesteigerte Level an

miR-34a in HCC-Zellen im experimentellen Ansatz zu einem verbesserten Ansprechen auf die *first-line* Therapie Sorafenib [200] sowie in HepG2-Zellen auf eine Therapie mit Doxorubicin bei [300]. Ebenso steigerte eine hohe Rate an miR-149 im HCC die Sensitivität der Zellen gegenüber einer Radiatio oder Doxorubicin-Behandlung [302]. Eine Induktion dieser miRs, wie in unseren Ergebnissen, dient somit potenziell der Entwicklung neuer Kombinationstherapien mit bereits verwendeten Wirkstoffen. Durch die Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen tumorsuppressiver miRs ergeben sich somit Ansatzpunkte für neue Therapieoptionen im HCC.

4.8 Ausgleich von p63-Induktion durch hohe Tivantinib-Dosierungen und regressivem Einfluss adenoviraler Vektoren

Im Rahmen der verschiedenen Versuchsansätze wurden Western-Blots zur Evaluation des Protein-Gehaltes der p53-Familie in Hep3B-Zellen durchgeführt. Dabei ergaben sich in allen adenoviral-transduzierten Zellen nach 24 und 48 Stunden gegenüber unbehandelten Kontroll-Zellen erniedrigte Spiegel von endogenem p63. Da sich dieser Effekt unabhängig vom transportierten Gen zeigte, ist von einem Einfluss durch den adenoviralen Vektor selbst auszugehen. Auswirkungen adenoviral gebildeter Proteine auf die Expression der p53-Familie sind bekannt. Für p53 wurden, je nach untersuchtem Protein, unterschiedliche Effekte im Sinne einer Funktionseinschränkung, eines vermehrten Abbaus oder einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors gezeigt, für p73 wurde ein gesteigerter Proteingehalt unter adenoviralem Einfluss in diversen Zelllinien unabhängig vom intrinsischen p53-Status beobachtet [303,304]. Dagegen ist eine Reduktion der Δ Np63-Expression durch adenovirale p53-Transduktion beschrieben. Zudem wurde eine Abnahme der p63-Expression durch Einführung eines adenoviralen Vektors in Keratinozyten unabhängig vom transportierten Gen gezeigt [152]. Dies legt auch in den hier untersuchten Hep3B-Zellen eine Verringerung des p63-Protein-Gehaltes durch die Verwendung adenoviraler Vektoren nahe.

Veränderungen der p63-Expression ergaben sich auch unter Behandlung mit Tivantinib. Während sich im Zeitverlauf keine Unterschiede zeigten, wurden im Dosis-Wirkungsversuch bei Wirkstoff-Konzentrationen von 0,5 und 1 μ M gegenüber 2,5 μ M Schwankungen der Protein-Level festgestellt, die aufgrund von Unterschieden zwischen den Triplikaten als Artefakt zu werten sind. Dagegen zeigte sich eine erhöhte Expression von p63 nach einer Behandlung mit 5,4 und 10 μ M Tivantinib im Vergleich zu einer Dosis von 2,5 μ M. In Anbetracht der p53-Defizienz der Hep3B-Zellen und der tumorsuppressiven Eigenschaften von p63 ist dabei eine Substitution der p53-Funktionen durch p63 zu vermuten.

Möglicherweise trägt eine vermehrte Expression von p63 unter dem zellschädigenden Einfluss einer höheren Dosis der *targeted therapy* dazu bei, die gestörte p53-Achse zur Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose zu ersetzen. Somit könnte die Steigerung der p63-Bildung Ergebnis einer physiologischen zellulären Stressreaktion sein. Zur Bestätigung dieser Vermutung sind weitere Arbeiten nötig. Zusammenfassend zeigt sich, dass Tivantinib in Hep3B-Zellen unter den getesteten Versuchsbedingungen keinen relevanten Einfluss auf die endogene Expression von p73 ausübt, in hoher Dosierung aber zu einer gesteigerten Bildung von p63 beiträgt.

4.9 Tivantinib-abhängige Induktion von p53 in HepG2-Zellen

Neben der Veränderung des miR-Profiles durch Tivantinib in HepG2-Zellen ergab sich auch eine Steigerung des endogenen p53-Gehaltes (Abb. 43). Dies legt nahe, dass der zellschädigende Einfluss der Substanz ausreichend groß zur Vermittlung einer Aktivierung und Stabilisierung des „Genomwächters“ und konsekutiv einer tumorsuppressiven Reaktion in den Zellen ist. Somit wären Proliferationshemmung durch Zellzyklusarrest und Zelltod durch Apoptose als typische Effektor-Eigenschaften von p53 zu erwarten [91]. Sowohl DMSO-behandelte als auch unbehandelte Zellen zeigten dagegen eine starke Verminderung des p53-Gehaltes im Zeitverlauf, sodass die Expression nach 72 Stunden kaum noch nachweisbar war. Die fehlende p53-Induktion in den Kontroll-Zellen bestätigt somit eine Tivantinib-abhängige Steigerung der p53-Expression im HCC.

Die p63-Expression sank dagegen unter Tivantinib-Behandlung im Zeitverlauf ab (Abb. 43). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Hep3B-Zellen, bei denen sich nur unter adenoviralem Einfluss eine Abnahme des Proteingehaltes zeigte. Die Verminderung von p63 in Kombination mit der Zunahme an p53 im Zeitverlauf legt einen gekoppelten Effekt nahe. In anderen Arbeiten wurde bereits eine Destabilisierung von TAp63-Isoformen durch p53 beschrieben [153]. Eine Verminderung von p63 aufgrund einer Zunahme von p53 in Abhängigkeit des zellschädigenden Einflusses der *targeted therapy* erscheint daher wahrscheinlich. Übereinstimmend dazu wurden in DMSO-behandelten und nativen Zellen, die eine Verminderung des p53-Gehaltes gezeigt hatten, nur geringfügige Schwankungen des p63- und p73-Proteingehaltes beobachtet.

Analog zu Hep3B-Zellen zeigten auch HepG2-Zellen unter Behandlung mit Tivantinib keine Veränderungen der endogenen p73-Expression. Dies bestätigt die fehlende Regulation von p73-Bildung und -Aktivität im HCC durch Tivantinib (Abb. 43).

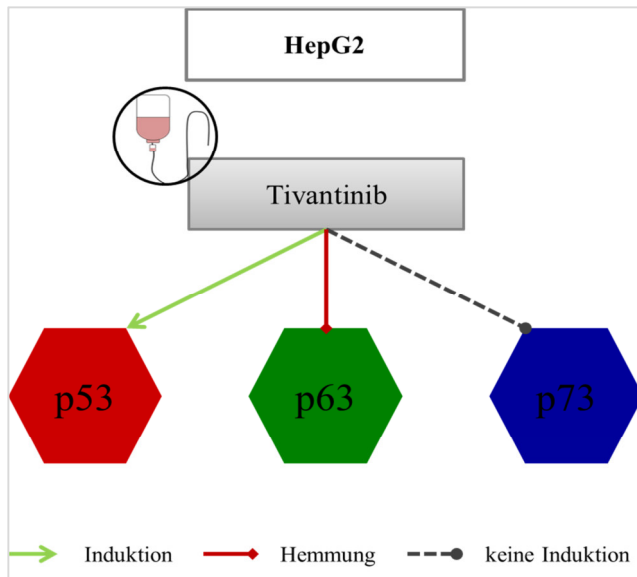


Abb. 43: Induktion von p53 und Hemmung von p63 bei unveränderter Expression von p73 durch Tivantinib in HepG2-Zellen.

4.10 Hemmung der Stoffwechselaktivität von HCC-Zelllinien durch hohe Konzentrationen von Tivantinib unabhängig von TAp73

Nach dem Nachweis der Expressionssteigerung verschiedener tumorsuppressiver miRs durch Tivantinib wurde möglichen Effekten dieser Induktion im HCC nachgegangen. Da unsere Ergebnisse eine Regulation der miR-Expression durch Transkriptionsfaktoren der p53-Familie gezeigt haben, lag ein Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen bzw. die Auslösung von Zelltod als potenzielle Endstrecke der miR-Wirkung nahe. Die damit verbundenen Veränderungen der metabolischen Aktivität der HCC-Zelllinien wurden im MTS-Assay untersucht. Hier wurden im Konzentrationsbereich zwischen 5 und 100 μM Tivantinib für alle Zellen – ungeachtet des p53-Status – ausgeprägte Effekte auf die Stoffwechselaktivität erzielt. Bei HepG2-Zellen sank nach 48-stündiger Inkubation die metabolische Leistung im Dosisgefälle stark ab. In Hep3B-Zellen zeigten sich nach 24 Stunden nur geringe Effekte, nach 48 und 72 Stunden wurde bei zunehmender Medikamentendosierung jeweils eine relativ kontinuierliche Abnahme der MTS-Umsetzung beobachtet (Abb. 44). Somit ergab sich hier ein zeitabhängiger Einfluss: Eine längere Inkubationszeit führte in diesem Dosisbereich zu einer Verstärkung der nachweisbaren Effekte. Analog zu anderen Arbeiten, die auch bei geringeren Tivantinib-Konzentrationen nach mehrtägiger Inkubation im hepatischen bzw. cholangiozellulären Karzinom Veränderungen von Metabolismus und Lebensfähigkeit nachgewiesen haben [72,305], stützt dies die Vermutung, dass sich bei Ausweitung der

Inkubationszeit auch bei geringerer Dosierung des Wirkstoffes relevante Effekte auf den Zellstoffwechsel erzielen lassen.

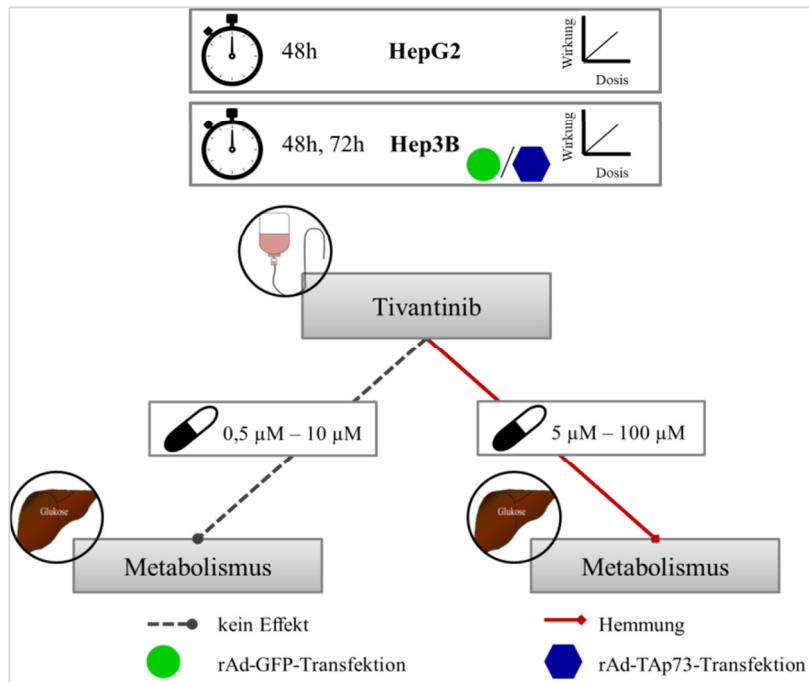


Abb. 44: Hemmung des Metabolismus von HepG2-Zellen nach 48 Stunden sowie von Hep3B-Zellen im Zeitverlauf bei hoher Dosierung von Tivantinib ohne relevanten Einfluss durch rAd-GFP- bzw. rAd-TAp73-Transduktion.

4.11 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die Expression von miRs im hepatozellulären Karzinom unter Einfluss von TAp73 und Δ Np73 untersucht. Den analysierten miRs werden dabei ebenso wie TAp73 überwiegend tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen [115,171,181,200,204–206], während Δ Np73 als Onkogen gilt [140,151]. Anhand der hier dargestellten Versuche wurde eine spezifische Regulation von miRs durch diese antagonistischen p73-Isoformen nachgewiesen. miR-34a, miR-145 und miR-149 werden dabei durch die Expression von TAp73 in teils signifikantem Ausmaß gegenüber Δ Np73 induziert. Dies bestätigt die bekannten antagonistischen Funktionen dieser Transkriptionsfaktoren. Für miR-192 und miR-194 zeigte sich demgegenüber keine relevante Expressionsveränderung, sodass die beobachteten Effekte als spezifische Regulation von miR-34a, miR-145 und miR-149 zu werten sind. Die *targeted therapy* Tivantinib übt in HCC-Zellen ebenso eine zum Teil signifikante induktive Wirkung auf die untersuchten miRs aus. In Kombination mit einer TAp73-Expression werden für miR-34a, miR-145 und miR-149 hier synergistische Effekte erzielt. miR-34a und miR-145 werden dabei vor allem durch die Kombination beider

Behandlungen beeinflusst. Die Expression von miR-149 hingegen zeigt eine starke Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor TAp73 (Abb. 45 a), b)).

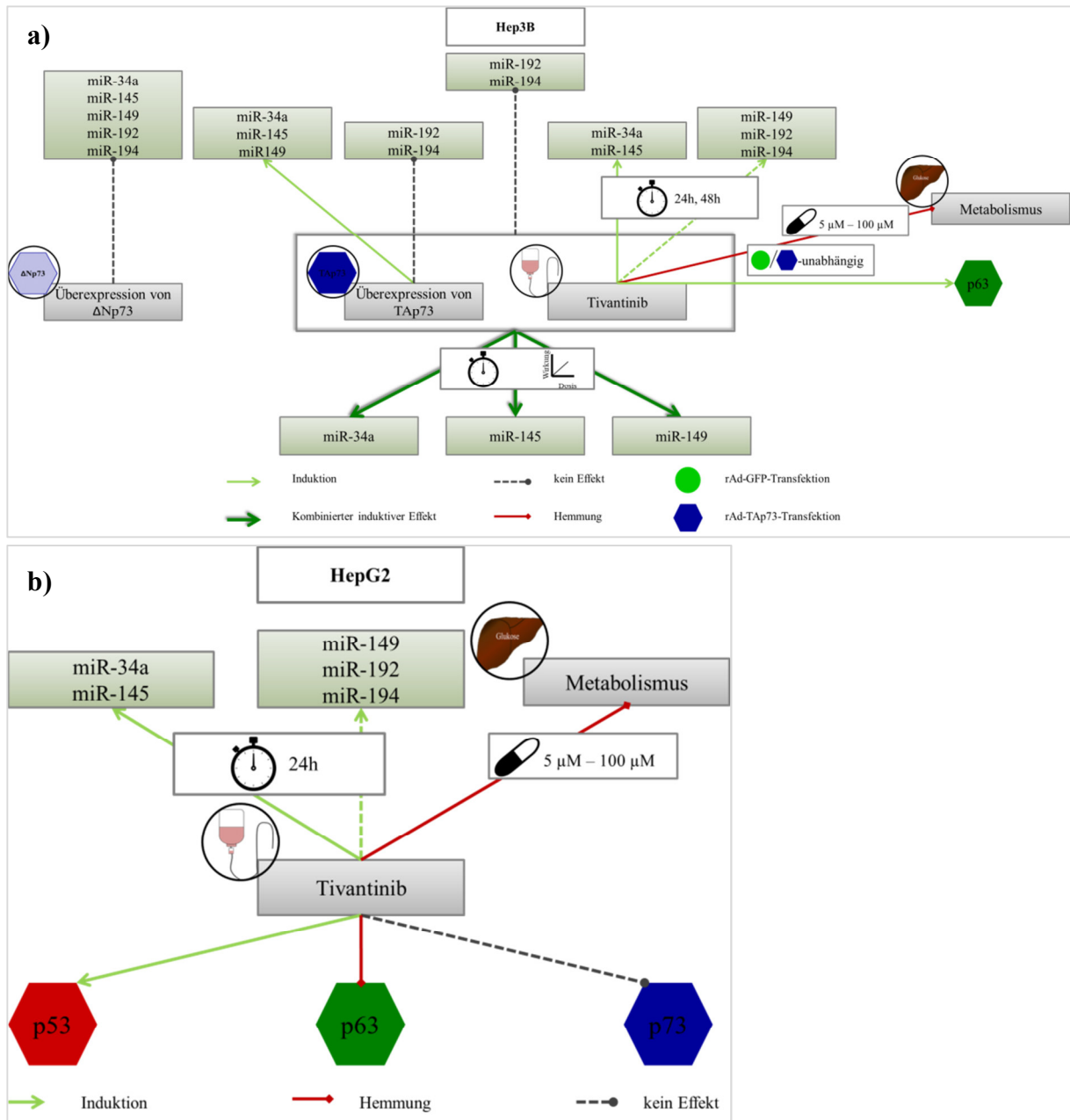


Abb. 45: Zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse.

a) Ergebnisse der Versuche in Hep3B-Zellen. b) Ergebnisse der Versuche in HepG2-Zellen.

Andere HCC-relevante Wirkstoffe (Doxorubicin, Bleomycin, Regorafenib und Sorafenib) üben unter TAp73-Expression ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Expression von miRs aus, zeigen im Gegensatz zu Tivantinib aber keinen zusätzlichen Effekt im Vergleich zu TAp73 allein.

Anhand der Ergebnisse der MTS-Assays ergibt sich eine Hemmung der metabolischen Aktivität durch hohe Konzentrationen von Tivantinib in HCC-Zelllinien.

Die Expressionsveränderungen von p53 und p63 in den HCC-Zellen nach Zugabe der *targeted therapy* legen zudem Funktionen dieser Transkriptionsfaktoren in der Wirkung des Therapeutikums nahe. Einfluss auf die bekannten Endstrecken des „Wächters des Genoms“ und seiner Familienmitglieder im Sinne von Zellzyklusarrest, Proliferationshemmung und Apoptose erscheinen somit möglich. Dadurch ergibt sich auch eine wichtige klinische Relevanz. Aufgrund der tumorsuppressiven Wirkung der untersuchten miRs mit Einfluss auf Prognose [200,259,298–302] und Therapieansprechen von Tumoren [200,300,302], konnten wir in dieser Dissertation erstmals für das hepatozellulärem Karzinom zeigen, dass TAp73 und Tivantinib über die Induktion spezifischer miRs zu einer Reduktion onkogener Eigenschaften führen. Übertragen auf die Situation in der Klinik ist so eine Verbesserung des Überlebens von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom durch die Wirkstoff-assoziierte Induktion dieser miRs vorstellbar.

5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Regulation verschiedener miRs in HCC-Zelllinien durch den Transkriptionsfaktor TAp73 sowie das Therapeutikum Tivantinib. Dabei erwies sich zur Induktion von miR-34a und miR-145 vor allem eine Kombination aus beiden Behandlungen als wirksam. Für miR-149 wurde erstmals eine ausgeprägte TAp73-Abhängigkeit nachgewiesen. Da es sich bei diesen miRs um tumorsuppressiv wirkende Moleküle handelt [171,181,200], sind Auswirkungen auf den Metabolismus und die Lebensfähigkeit hepatischer Tumorzellen potenzielle Endpunkte der vermittelten Signalwege. Eine erhöhte Expression von miR-34a und miR-149 ist im hepatozellulärem Karzinom mit einer Proliferationshemmung [200,299,301,302] und einer Verbesserung des Therapieansprechens auf etablierte Therapieregime [200,300,302] vergesellschaftet. Somit besteht durch die Induktion dieser miRs eine wichtige klinische und therapeutische Relevanz. Die Induktion des pro-apoptotischen TAp73 und der Einsatz von Tivantinib können so möglicherweise Einfluss auf das Therapieansprechen und die Prognose von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom nehmen. Im Gegensatz zur Phase-II-Studie zeigte Tivantinib in

einer Phase-III-Studie im klinischen Setting keine Verbesserung des Überlebens von HCC-Patienten [76,77]. Die Studiengruppen in den Arzneimittelstudien wurden anhand der c-Met-Expression unterschieden, allerdings ließ sich die initial vermutete Wirkweise des Therapeutikums als Met-Inhibitor nicht in allen Untersuchungen im hepatozellulärem Karzinom bestätigen [71]. Die genaue Wirkweise von Tivantinib ist daher weiterhin ungeklärt. Zudem wurden in der Phase-III-Studie geringere Wirkstoffkonzentrationen verwendet als in der vorhergehenden Arbeit [76,77]. Erneute Studien unter anderen Einschlusskriterien und Voraussetzungen scheinen daher sinnvoll, um einen Effekt des Therapeutikums auf verschiedene Subgruppen von HCC-Patienten und die besten Therapiebedingungen zu evaluieren. Zudem bedürfen die Endstrecken der miR-Signalwege im hepatozellulärem Karzinom zur besseren Einschätzung therapeutischer Optionen einer weiteren wissenschaftlichen Untersuchung. Unsere Ergebnisse legen aufgrund der tumorsuppressiven Eigenschaften der untersuchten miRs und der gezeigten Einschränkung der metabolischen Aktivität der Tumorzellen einen therapeutisch günstigen Effekt durch Tivantinib im hepatozellulärem Karzinom nahe. Dieser Wirkstoff erscheint somit als potenziell relevantes Therapeutikum für diese Tumorentität. Aufgrund der Effekte der induzierten miRs [171,181,200] ist möglicherweise ein Einsatz als Kombinationstherapeutikum zur Verbesserung des Therapieansprechens auf andere etablierte Wirkstoffe sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Als eine der häufigsten Tumorentitäten und Krebstodesursachen weltweit stellt das HCC eine enorme und wachsende Herausforderung für die globalen Gesundheitssysteme dar [1]. Viele wissenschaftliche Arbeiten beschäftigen sich mit therapeutischen Optionen, doch viele Studien scheitern [66,306–310]. Systemtherapien sind häufig nur begrenzt wirksam, die molekularen Wirkmechanismen vieler Medikamente nicht abschließend geklärt. Durch die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze wurde eine neue *first-line*-Therapie mit vielversprechendem *Studienoutcome* [48] empfohlen [311] und in der Leitlinie etabliert [24]. Die Erprobung (un)bekannter Wirkstoffe als Mono- oder Kombinationstherapie im Rahmen von Studienprotokollen [312–314] wecken Hoffnung auf neue Therapieoptionen. Dennoch sind die Behandlungsmöglichkeiten hepatischer Karzinome aktuell deutlich eingeschränkt.

Wie auch in vielen anderen Tumorentitäten finden sich im HCC häufig Mutationen der Transkriptionsfaktoren der p53-Familie [110,116]. Zu dieser gehören neben p53 auch p63 und p73 sowie deren Isoformen [91,115]. In Abhängigkeit der Splice-Variante entstehen verschiedene Moleküle, die unterschiedliche Zielgene beeinflussen und zum Teil antagonistische Eigenschaften aufweisen. TAp73, das eine N-terminale TAD trägt [138], werden p53-kongruente, vorwiegend tumorsuppressive Funktionen zugesprochen [94,133], während die N-terminal trunkierte Form Δ Np73 als Onkogen gilt [140,147]. Neben der direkten Bindung an ihre Zielgene wirken diese Transkriptionsfaktoren auch durch Regulation verschiedener miRs [227]. miRs sind kleine, nicht-codierende RNA-Moleküle von ca. 22 Nukleotiden Länge [156], die durch Einfluss auf die Genregulation tumorsuppressive oder onkogene Effekte erzielen können [170,171]. In dieser Arbeit wurden Auswirkungen von TAp73, Δ Np73 und verschiedenen HCC-relevanten Therapeutika auf die Expression von miR-34a, miR-145, miR-149, miR-192 und miR-194 im HCC mittels qRT-PCR analysiert und Expressionsveränderungen der p53-Familienmitglieder im Western Blot untersucht. Der Einfluss von Tivantinib auf die Stoffwechselaktivität von Hep3B- und HepG2-Zellen wurde im MTS-Assay evaluiert. Dabei zeigten p53-defiziente Hep3B-Zellen bei adenoviral induzierter Expression von TAp73 im Zeitverlauf eine gesteigerte Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149. Die Expression der onkogenen Isoform Δ Np73 hingegen führte zu keiner relevanten Veränderung der Expressionsmuster aller untersuchten miRs. Für einzelne Zeitpunkte ergaben sich im Vergleich der TAp73- und der Δ Np73-abhängigen miR-Expression signifikante Unterschiede. Unter Behandlung mit der *targeted therapy* Tivantinib wurde ein teils signifikanter Anstieg des miR-Gehaltes für miR-34a, miR-145, miR-149,

miR-192 sowie miR-194 beobachtet. Bei Kombination einer Expression von TAp73 und einer Zugabe von Tivantinib wurde eine Steigerung der Expressionsraten für miR-34a, miR-145 und miR-149 in Hep3B-Zellen beobachtet. Diese wurde sowohl im Zeitverlauf als auch in Abhängigkeit der Dosierung des Wirkstoffs nachgewiesen. Der größte Einfluss ergab sich dabei für miR-149. Andere HCC-relevante Chemotherapeutika und Kinaseinhibitoren erbachten geringere, wenn auch ebenso signifikante Expressionsveränderungen der drei genannten miRs. Die Expression der antagonistischen Isoform $\Delta Np73$ führte demgegenüber nicht zu einer Veränderung der analysierten miR-Expressionsmuster. Diese Ergebnisse wurden in einer zweiten Zelllinie, in HepG2-Zellen, die neben der endogenen Expression von p63 und p73 auch eine Bildung der Wildtyp-Form von p53 aufweisen, bestätigt. HepG2-Zellen zeigten bereits zum Zeitpunkt 24 Stunden einen erhöhten Gehalt der untersuchten miRs nach Zugabe von Tivantinib. Die *targeted therapy* führte hier auch zu einer gesteigerten Expression von p53. Zudem wurde für beide Zellarten eine dosisabhängige Einschränkung der metabolischen Aktivität durch hohe Tivantinib-Konzentrationen unabhängig von p73 im MTS-Assay nachgewiesen. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit somit die Rolle von TAp73 in der Induktion der Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 im HCC gezeigt.

Systemische Therapieoptionen im HCC sind stark limitiert. In dieser Arbeit wurde erstmals die Regulation tumorsuppressiver miRs, insbesondere von miR-34a, miR-145 sowie miR-149, durch die *targeted therapy* Tivantinib sowohl in nativen Hep3B- und HepG2-Zellen als auch in Abhängigkeit einer TAp73-Expression in Hep3B-Zellen nachgewiesen und dabei potenziell synergistische, dosisabhängige Effekte von TAp73 und dem Therapeutikum identifiziert. Der stärkste Einfluss zeigte sich dabei für miR-149, vorwiegend in Abhängigkeit von TAp73, während miR-34a und miR-145 vor allem durch eine Kombination aus TAp73 und Tivantinib induziert wurden. Aufgrund der bekannten tumorsuppressiven Eigenschaften der untersuchten miRs [171,181,200] ergibt sich aus diesen Ergebnissen ebenso wie aus der p53-Induktion durch das Therapeutikum in HepG2-Zellen ein neuer Therapieansatz für Patienten mit HCC.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel
Abbildung 1	Entstehung des HCC.
Abbildung 2	Diagnostisches Vorgehen bei Leberläsionen.
Abbildung 3	Wirkweise von Atezolizumab und Bevacizumab.
Abbildung 4	Wirkweise von Sorafenib.
Abbildung 5	Wirkungen von Regorafenib.
Abbildung 6	Wirkungen von Doxorubicin.
Abbildung 7	Wirkungen von Bleomycin.
Abbildung 8	Vereinfachte Gen-Struktur von p53, p63 und p73.
Abbildung 9	Funktionen der p53-Familie.
Abbildung 10	Aufbau des <i>TP73</i> -Gens.
Abbildung 11	Aufbau und Bildung von miRs.
Abbildung 12	Zusammenspiel von p53 und miRs.
Abbildung 13	Zusammenspiel von p73 und miRs.
Abbildung 14	Untersuchung der Effekte einer Expression von p73-Isoformen und der Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen auf das miR-Profil in HCC-Zellen.
Abbildung 15	Nachweis der Überexpression der p73-Isoformen nach adenoviraler Transduktion im Western Blot.
Abbildung 16	Induktion der Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch adenoviral medierte Überexpression von TAp73.
Abbildung 17	Expressionsveränderung verschiedener miRs im Zeitverlauf unter Überexpression von TAp73 oder Δ Np73.
Abbildung 18	Einfluss von HCC-Therapeutika auf die miR-34a-Expression.
Abbildung 19	Einfluss von HCC-Therapeutika auf die miR-145-Expression.
Abbildung 20	Einfluss von HCC-Therapeutika auf die miR-149-Expression.
Abbildung 21	Expressionsveränderungen von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch unterschiedliche HCC-spezifische Wirkstoffe unter Einfluss von p73-Isoformen.
Abbildung 22	Expression von miR-34a, miR-145 und miR-149 nach Behandlung mit Regorafenib und Tivantinib bei Überexpression von Δ Np73.
Abbildung 23	Expressionsveränderung von miR-192 und miR-194 unter Therapeutika-Zugabe bei TAp73-Überexpression.
Abbildung 24	Übersicht der Expressionsveränderung von miR-192 und miR-194 unter Therapeutika-Zugabe bei TAp73- oder Δ Np73-Überexpression.
Abbildung 25	Einfluss von Tivantinib auf die Expression von tumorsuppressiven miRs und p53-Familienmitgliedern.

- Abbildung 26 Untersuchung dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die endogene Expression von p63 und p73 und die Bildung tumorsuppressiver miRs.
- Abbildung 27 Analyse dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die Expression von p53, p63 und p73 bei Überexpression von TAp73 oder GFP.
- Abbildung 28 Analyse dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die Expression von miRs bei Überexpression von TAp73 oder GFP.
- Abbildung 29 Zusammenfassende Übersicht der Analyse dosisabhängiger Effekte von Tivantinib auf die Expression von miRs bei Überexpression von TAp73 oder GFP.
- Abbildung 30 Untersuchung von Tivantinib-abhängigen Veränderungen der Expression von p53-Familienmitgliedern in HepG2-Zellen im Zeitverlauf.
- Abbildung 31 Untersuchung von Tivantinib-abhängigen Veränderungen des Gehaltes von tumorsuppressiven miRs in HepG2-Zellen im Zeitverlauf.
- Abbildung 32 Untersuchung der Stoffwechselaktivität von HepG2-Zellen nach Zugabe von Tivantinib.
- Abbildung 33 Untersuchung der Stoffwechselaktivität von Hep3B-Zellen 24 Stunden nach Zugabe von Tivantinib.
- Abbildung 34 Untersuchung der Stoffwechselaktivität von Hep3B-Zellen 48 Stunden nach Zugabe von Tivantinib.
- Abbildung 35 Untersuchung der Stoffwechselaktivität von Hep3B-Zellen 72 Stunden nach Zugabe von Tivantinib.
- Abbildung 36 Induktion von miR-34a, miR-145 und miR-149 durch Überexpression von TAp73 in Hep3B-Zellen im Zeitverlauf.
- Abbildung 37 Fehlende signifikante Expressionsveränderung von miR-192 und miR-194 durch TAp73-Expression in Hep3B-Zellen.
- Abbildung 38 Unveränderte Expression oder negative Regulation der untersuchten miRs durch Δ Np73.
- Abbildung 39 Spezifischer Einfluss einer Kombination aus TAp73-Expression und Tivantinib auf die Expression von miRs in Hep3B-Zellen.
- Abbildung 40 Induktion spezifischer miRs durch Tivantinib in Hep3B- und HepG2-Zellen.
- Abbildung 41 Verstärkung der induktiven Effekte einer alleinigen TAp73-Überexpression oder Tivantinib-Behandlung auf miR-34a und miR-145 in Kombination sowohl im Zeitverlauf als auch in Abhängigkeit der Wirkstoff-Dosierung in Hep3B-Zellen.
- Abbildung 42 Induktion von miR-149 bei TAp73-Überexpression und Tivantinib-Behandlung in Hep3B-Zellen sowohl im Zeitverlauf als auch in Abhängigkeit der Dosis.
- Abbildung 43 Induktion von p53 und Hemmung von p63 bei unveränderter Expression von p73 durch Tivantinib in HepG2-Zellen.
- Abbildung 44 Hemmung des Metabolismus von HepG2-Zellen nach 48 Stunden sowie von Hep3B-Zellen im Zeitverlauf bei hoher Dosierung von Tivantinib ohne relevanten Einfluss durch rAd-GFP- bzw. rAd-TAp73-Transduktion.
- Abbildung 45 Zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse.

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel
Tabelle 1	Einteilung des HCC in <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i> (BCLC)-Stadien.
Tabelle 2	Wirkungen ausgewählter miRs in verschiedenen Karzinomentitäten.
Tabelle 3	Tumorsuppressive miRs und ihre Zielgene und Funktionen im HCC.
Tabelle 4	Onkogene miRs und ihre Zielgene und Funktionen im HCC.

9 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):16018. doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
3. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog.* 2017;16:1. doi: 10.4103/jcar.JCar_9_16. PubMed PMID: 28694740.
4. McGlynn KA, London WT. The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future. *Clin Liver Dis.* 2011;15(2):223-43, vii-x. doi: 10.1016/j.cld.2011.03.006. PubMed PMID: 21689610.
5. Wong MCS, Jiang JY, Goggins WB, Liang M, Fang Y, Fung FDH, et al. International incidence and mortality trends of liver cancer: a global profile. *Sci Rep.* 2017;7:45846. doi: 10.1038/srep45846. PubMed PMID: 28361988.
6. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2021;73 Suppl 1:4–13. doi: 10.1002/hep.31288. PubMed PMID: 32319693.
7. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol.* 2018;69(4):896–904. doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.036. PubMed PMID: 29886156.
8. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2557–76. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.061. PubMed PMID: 17570226.
9. Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, Hsieh CC, Lagiou P, Adami HO, et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2000;85(4):498–502. PubMed PMID: 10699921.
10. Wang L-Y, You S-L, Lu S-N, Ho H-C, Wu M-H, Sun C-A, et al. Risk of hepatocellular carcinoma and habits of alcohol drinking, betel quid chewing and cigarette smoking: a cohort of 2416 HBsAg-seropositive and 9421 HBsAg-seronegative male residents in Taiwan. *Cancer Causes Control.* 2003;14(3):241–50. PubMed PMID: 12814203.
11. Schütze M, Boeing H, Pischon T, Rehm J, Kehoe T, Gmel G, et al. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ.* 2011;342:d1584. PubMed PMID: 21474525.
12. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: Consider the population. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47 Suppl:S2-6. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182872f29. PubMed PMID: 23632345.

13. Stroth L in der, Tharehalli U, Günes C, Lechel A. Telomeres and Telomerase in the Development of Liver Cancer. *Cancers*. 2020;12(8):2048. doi: 10.3390/cancers12082048.
14. Nault J-C, Ningarhari M, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(9):544–58. doi: 10.1038/s41575-019-0165-3.
15. Bayard Q, Meunier L, Peneau C, Renault V, Shinde J, Nault J-C, et al. Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. *Nat Commun*. 2018;9(1):378. doi: 10.1038/s41467-018-07552-9.
16. Paterlini-Bréchet P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*. 2003;22(25):3911–6. doi: 10.1038/sj.onc.1206492.
17. Jang J-W, Kim H-S, Kim J-S, Lee S-K, Han J-W, Sung P-S, et al. Distinct Patterns of HBV Integration and TERT Alterations between in Tumor and Non-Tumor Tissue in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(13):7056. doi: 10.3390/ijms22137056.
18. Puigvehí M, Moctezuma-Velázquez C, Villanueva A, Llovet JM. The oncogenic role of hepatitis delta virus in hepatocellular carcinoma. *JHEP Reports*. 2019;1(2):120–30. doi: 10.1016/j.jhepr.2019.05.001.
19. Kew MC. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int*. 2003;23(6):405–9. doi: 10.1111/j.1478-3231.2003.00869.x.
20. Ioannou GN, Green PK, Berry K. HCV eradication induced by direct-acting antiviral agents reduces the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018;68(1):25–32. doi: 10.1016/j.jhep.2017.08.030.
21. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, Cao Y, El-Serag HB. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology*. 2017;153(4):996-1005.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.012.
22. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;68(2):723–50. doi: 10.1002/hep.29913. PubMed PMID: 29624699.
23. Ioannou GN, Beste LA, Green PK, Singal AG, Tapper EB, Waljee AK, et al. Increased Risk for Hepatocellular Carcinoma Persists Up to 10 Years After HCV Eradication in Patients With Baseline Cirrhosis or High FIB-4 Scores. *Gastroenterology*. 2019;157(5):1264-1278.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2019.07.033.
24. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome: Langversion 2.0; 2021. AWMF-Registernummer: 032 - 053OL.

25. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(4):643-54.e1-9; quiz e39-40. doi: 10.1016/j.cgh.2014.04.014. PubMed PMID: 24768810.
26. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: Current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(7):411–28. doi: 10.1038/s41575-019-0145-7.
27. Ringelhan M, Pfister D, O’Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol.* 2018;19(3):222–32. doi: 10.1038/s41590-018-0044-z.
28. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018;24(7):908–22. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9. PubMed PMID: 29967350.
29. Guri Y, Colombi M, Dazert E, Hindupur SK, Roszik J, Moes S, et al. mTORC2 Promotes Tumorigenesis via Lipid Synthesis. *Cancer Cell.* 2017;32(6):807-823.e12. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.011.
30. Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, Medina-Echeverz J, Kleiner DE, Jin P, et al. NAFLD causes selective CD4+ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature.* 2016;531(7593):253–7. doi: 10.1038/nature16969.
31. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, et al. Metabolic Activation of Intrahepatic CD8+ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. *Cancer Cell.* 2014;26(4):549–64. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.003.
32. Gomes AL, Teijeiro A, Burén S, Tummala KS, Yilmaz M, Waisman A, et al. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell.* 2016;30(1):161–75. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.020.
33. Shalpour S, Lin X-J, Bastian IN, Brain J, Burt AD, Aksenov AA, et al. Inflammation-induced IgA+ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature.* 2017;551(7680):340–5. doi: 10.1038/nature24302.
34. Sutti S, Albano E. Adaptive immunity: An emerging player in the progression of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(2):81–92. doi: 10.1038/s41575-019-0210-2. PubMed PMID: 31605031.
35. Park EJ, Lee JH, Yu G-Y, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell.* 2010;140(2):197–208. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.052.
36. European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56(4):908–43. doi: 10.1016/j.jhep.2011.12.001. PubMed PMID: 22424438.

37. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;69(1):182–236. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019. PubMed PMID: 29628281.
38. Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2016;150(4):835–53. doi: 10.1053/j.gastro.2015.12.041. PubMed PMID: 26795574.
39. Subramaniam S, Kelley RK, Venook AP. A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems. *Chin Clin Oncol.* 2013;2(4):33. doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2013.07.05. PubMed PMID: 25841912.
40. Pons F, Varela M, Llovet JM. Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford).* 2005;7(1):35–41. doi: 10.1080/13651820410024058. PubMed PMID: 18333159.
41. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion Deutsches Ärzteblatt. Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 TPG: Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation. Deutsches Ärzteblatt. 2019.
42. Kallini JR, Gabr A, Salem R, Lewandowski RJ. Transarterial Radioembolization with Yttrium-90 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Adv Ther.* 2016;33(5):699–714. doi: 10.1007/s12325-016-0324-7. PubMed PMID: 27039186.
43. Hack SP, Spahn J, Chen M, Cheng A-L, Kaseb A, Kudo M, et al. IMbrave 050: A Phase III trial of atezolizumab plus bevacizumab in high-risk hepatocellular carcinoma after curative resection or ablation. *Future Oncol.* 2020;16(15):975–89. doi: 10.2217/fon-2020-0162. PubMed PMID: 32352320.
44. Chen DS, Hurwitz H. Combinations of Bevacizumab With Cancer Immunotherapy. *Cancer J.* 2018;24(4):193–204. doi: 10.1097/PPO.0000000000000327. PubMed PMID: 30119083.
45. Lee MS, Ryoo B-Y, Hsu C-H, Numata K, Stein S, Verret W, et al. Atezolizumab with or without bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma (GO30140): An open-label, multicentre, phase 1b study. *Lancet Oncol.* 2020;21(6):808–20. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30156-X. PubMed PMID: 32502443.
46. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: Opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(5):325–40. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.29. PubMed PMID: 29508855.
47. Hegde PS, Wallin JJ, Mancao C. Predictive markers of anti-VEGF and emerging role of angiogenesis inhibitors as immunotherapeutics. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 2):117–24. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.12.002. PubMed PMID: 29229461.
48. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2020;382(20):1894–905. doi: 10.1056/NEJMoa1915745.

49. Pinter M, Scheiner B, Peck-Radosavljevic M. Immunotherapy for advanced hepatocellular carcinoma: A focus on special subgroups. *Gut*. 2021;70(1):204–14. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321702. PubMed PMID: 32747413.
50. Greten TF, Abou-Alfa GK, Cheng A-L, Duffy AG, El-Khoueiry AB, Finn RS, et al. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immunotherapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2021;9(9). doi: 10.1136/jitc-2021-002794. PubMed PMID: 34518290.
51. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64(19):7099–109. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1443. PubMed PMID: 15466206.
52. Chang YS, Adnane J, Trail PA, Levy J, Henderson A, Xue D, et al. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59(5):561–74. doi: 10.1007/s00280-006-0393-4. PubMed PMID: 17160391.
53. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378–90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857. PubMed PMID: 18650514.
54. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*. 2006;66(24):11851–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377. PubMed PMID: 17178882.
55. Bruix J, Cheng A-L, Meinhardt G, Nakajima K, Sanctis Y de, Llovet J. Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies. *J Hepatol*. 2017;67(5):999–1008. doi: 10.1016/j.jhep.2017.06.026.
56. Bruix J, Takayama T, Mazzaferro V, Chau G-Y, Yang J, Kudo M, et al. Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): A phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(13):1344–54. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00198-9.
57. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: A randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2018;391(10126):1163–73. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1. PubMed PMID: 29433850.
58. Finn RS, Ikeda M, Zhu AX, Sung MW, Baron AD, Kudo M, et al. Phase Ib Study of Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2020;38(26):2960–70. doi: 10.1200/JCO.20.00808. PubMed PMID: 32716739.

59. Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018. doi: 10.1038/s41571-018-0073-4. PubMed PMID: 30061739.
60. Tai W-T, Chu P-Y, Shiau C-W, Chen Y-L, Li Y-S, Hung M-H, et al. STAT3 mediates regorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(22):5768–76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0725. PubMed PMID: 25248379.
61. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;389(10064):56–66. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32453-9.
62. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer*. 2011;129(1):245–55. doi: 10.1002/ijc.25864. PubMed PMID: 21170960.
63. Abou-Elkacem L, Arns S, Brix G, Gremse F, Zopf D, Kiessling F, et al. Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(7):1322–31. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1162. PubMed PMID: 23619301.
64. Finn RS, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, Pracht M, et al. Outcomes of sequential treatment with sorafenib followed by regorafenib for HCC: Additional analyses from the phase III RESORCE trial. *J Hepatol*. 2018;69(2):353–8. doi: 10.1016/j.jhep.2018.04.010. PubMed PMID: 29704513.
65. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;379(1):54–63. doi: 10.1056/NEJMoa1717002. PubMed PMID: 29972759.
66. Zhu AX, Park JO, Ryoo B-Y, Yen C-J, Poon R, Pastorelli D, et al. Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib (REACH): A randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(7):859–70. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00050-9. PubMed PMID: 26095784.
67. Zhu AX, Kang Y-K, Yen C-J, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, et al. 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. *Lancet Oncol*. 2019;20(2):282–96. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30937-9. PubMed PMID: 30665869.
68. Zhu AX, Finn RS, Edeline J, Cattani S, Ogasawara S, Palmer D, et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): A non-randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(7):940–52. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30351-6. PubMed PMID: 29875066.

69. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): An open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017;389(10088):2492–502. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31046-2. PubMed PMID: 28434648.
70. Munshi N, Jeay S, Li Y, Chen C-R, France DS, Ashwell MA, et al. ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-Met receptor tyrosine kinase with antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(6):1544–53. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1173. PubMed PMID: 20484018.
71. Xiang Q, Zhen Z, Deng DY, Wang J, Chen Y, Li J, et al. Tivantinib induces G2/M arrest and apoptosis by disrupting tubulin polymerization in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:118. doi: 10.1186/s13046-015-0238-2. PubMed PMID: 26458953.
72. Lu S, Török H-P, Gallmeier E, Kolligs FT, Rizzani A, Arena S, et al. Tivantinib (ARQ 197) affects the apoptotic and proliferative machinery downstream of c-MET: role of Mcl-1, Bcl-xl and Cyclin B1. *Oncotarget*. 2015;6(26):22167–78. doi: 10.18632/oncotarget.4240. PubMed PMID: 26259250.
73. Davis PD, Elliott LH, Harris W, Hill CH, Hurst SA, Keech E, et al. Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. *J Med Chem*. 1992;35(6):994–1001. doi: 10.1021/jm00084a004. PubMed PMID: 1552513.
74. Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991;266(24):15771–81. PubMed PMID: 1874734.
75. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol*. 2018;48:36–52. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.012. PubMed PMID: 28571764.
76. Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, van Laethem JL, et al. Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: A randomised, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(1):55–63. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70490-4.
77. Rimassa L, Assenat E, Peck-Radosavljevic M, Pracht M, Zagonel V, Mathurin P, et al. Tivantinib for second-line treatment of MET-high, advanced hepatocellular carcinoma (METIV-HCC): A final analysis of a phase 3, randomised, placebo-controlled study. *The Lancet Oncology*. 2018;19(5):682–93. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30146-3.
78. Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: Nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today*. 2017;22(2):270–81. doi: 10.1016/j.drudis.2016.11.005. PubMed PMID: 27890669.

79. Richter G, Radeleff B, Stroszczyński C, Pereira P, Helmberger T, Barakat M, et al. Safety and Feasibility of Chemoembolization with Doxorubicin-Loaded Small Calibrated Microspheres in Patients with Hepatocellular Carcinoma: Results of the MIRACLE I Prospective Multicenter Study. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2018;41(4):587–93. doi: 10.1007/s00270-017-1839-2. PubMed PMID: 29167967.
80. Varela M, Real MI, Burrell M, Forner A, Sala M, Brunet M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: Efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol*. 2007;46(3):474–81. doi: 10.1016/j.jhep.2006.10.020. PubMed PMID: 17239480.
81. Tang S, Bao H, Zhang Y, Yao J, Yang P, Chen X. 14-3-3 ϵ mediates the cell fate decision-making pathways in response of hepatocellular carcinoma to Bleomycin-induced DNA damage. *PLoS One*. 2013;8(3):e55268. doi: 10.1371/journal.pone.0055268. PubMed PMID: 23472066.
82. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, et al. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer*. 2010;126(9):2049–66. doi: 10.1002/ijc.24861. PubMed PMID: 19711344.
83. Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest*. 1997;99(3):403–13. doi: 10.1172/JCI119174. PubMed PMID: 9022073.
84. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*. 1998;188(11):2033–45. PubMed PMID: 9841917.
85. Jaroszeski MJ, Coppola D, Pottinger C, Benson K, Gilbert RA, Heller R. Treatment of hepatocellular carcinoma in a rat model using electrochemotherapy. *European Journal of Cancer*. 2001;37(3):422–30. doi: 10.1016/S0959-8049(00)00412-3.
86. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: Towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(2):102–12. doi: 10.1038/nrc1547. PubMed PMID: 15685195.
87. Ingrand I, Defossez G, Lafay-Chebassier C, Chavant F, Ferru A, Ingrand P, et al. Serious adverse effects occurring after chemotherapy: A general cancer registry-based incidence survey. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;86(4):711–22. doi: 10.1111/bcp.14159. PubMed PMID: 31658394.
88. Levrero M, Laurenzi V de, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: Overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*. 2000;113(Pt 10):1661–70. PubMed PMID: 10769197.
89. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323–31. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81871-1. PubMed PMID: 9039259.

90. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(9):a004887. doi: 10.1101/cshperspect.a004887. PubMed PMID: 20484388.
91. Pflaum J, Schlosser S, Muller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol.* 2014;4:285. doi: 10.3389/fonc.2014.00285. PubMed PMID: 25374842.
92. Chillemi G, Kehrlöesser S, Bernassola F, Desideri A, Dötsch V, Levine AJ, et al. Structural Evolution and Dynamics of the p53 Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(4). doi: 10.1101/cshperspect.a028308. PubMed PMID: 27091942.
93. Levrero M, Laurenzi V de, Costanzo A, Gong J, Melino G, Wang JY. Structure, function and regulation of p63 and p73. *Cell Death Differ.* 1999;6(12):1146–53. PubMed PMID: 10637429.
94. Vikhрева P, Melino G, Amelio I. p73 Alternative Splicing: Exploring a Biological Role for the C-Terminal Isoforms. *J Mol Biol.* 2018;430(13):1829–38. doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.034. PubMed PMID: 29733853.
95. Lin C, Li X, Zhang Y, Guo Y, Zhou J, Gao K, et al. The microRNA feedback regulation of p63 in cancer progression. *Oncotarget.* 2015;6(11):8434–53. doi: 10.18632/oncotarget.3020. PubMed PMID: 25726529.
96. Candi E, Agostini M, Melino G, Bernassola F. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat.* 2014;35(6):702–14. doi: 10.1002/humu.22523. PubMed PMID: 24488880.
97. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 1979;17(1):43–52. PubMed PMID: 222475.
98. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):749–58. doi: 10.1038/nrc2723. PubMed PMID: 19776744.
99. Oren M. p53: Not just a tumor suppressor. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(7):539–43. doi: 10.1093/jmcb/mjz070. PubMed PMID: 31291648.
100. Panatta E, Zampieri C, Melino G, Amelio I. Understanding p53 tumour suppressor network. *Biol Direct.* 2021;16(1):14. doi: 10.1186/s13062-021-00298-3. PubMed PMID: 34362419.
101. Amelio I, Melino G. Context is everything: Extrinsic signalling and gain-of-function p53 mutants. *Cell Death Discov.* 2020;6:16. doi: 10.1038/s41420-020-0251-x. PubMed PMID: 32218993.
102. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408(6810):307–10. doi: 10.1038/35042675. PubMed PMID: 11099028.
103. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 1992;356(6366):215–21. doi: 10.1038/356215a0. PubMed PMID: 1552940.

104. Schlereth K, Charles JP, Bretz AC, Stiewe T. Life or death: P53-induced apoptosis requires DNA binding cooperativity. *Cell Cycle*. 2010;9(20):4068–76. doi: 10.4161/cc.9.20.13595. PubMed PMID: 20948308.
105. Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*. 2006;13(6):941–50. doi: 10.1038/sj.cdd.4401925. PubMed PMID: 16601750.
106. Shi Y, Norberg E, Vakifahmetoglu-Norberg H. Mutant p53 as a Regulator and Target of Autophagy. *Front Oncol*. 2020;10:607149. doi: 10.3389/fonc.2020.607149. PubMed PMID: 33614491.
107. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413–31. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037. PubMed PMID: 19410540.
108. Boutelle AM, Attardi LD. p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends Cell Biol*. 2021;31(4):298–310. doi: 10.1016/j.tcb.2020.12.011. PubMed PMID: 33518400.
109. Pitolli C, Wang Y, Candi E, Shi Y, Melino G, Amelio I. p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers*. 2019;11(12). doi: 10.3390/cancers11121983. PubMed PMID: 31835405.
110. Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):724–37. doi: 10.1038/nrc2730. PubMed PMID: 19776742.
111. Lahalle A, Lacroix M, Blasio C de, Cissé MY, Linares LK, Le Cam L. The p53 Pathway and Metabolism: The Tree That Hides the Forest. *Cancers*. 2021;13(1). doi: 10.3390/cancers13010133. PubMed PMID: 33406607.
112. Niklison-Chirou MV, Agostini M, Amelio I, Melino G. Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(14). doi: 10.3390/ijms21144869. PubMed PMID: 32660154.
113. Pentimalli F, Grelli S, Di Daniele N, Melino G, Amelio I. Cell death pathologies: Targeting death pathways and the immune system for cancer therapy. *Genes Immun*. 2019;20(7):539–54. doi: 10.1038/s41435-018-0052-x. PubMed PMID: 30563970.
114. Friedel L, Loewer A. The guardian's choice: How p53 enables context-specific decision-making in individual cells. *FEBS J*. 2021. doi: 10.1111/febs.15767. PubMed PMID: 33590949.
115. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat*. 2006;9(6):288–306. doi: 10.1016/j.drug.2007.01.001. PubMed PMID: 17287142.
116. Pitolli C, Wang Y, Mancini M, Shi Y, Melino G, Amelio I. Do Mutations Turn p53 into an Oncogene? *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(24). doi: 10.3390/ijms20246241. PubMed PMID: 31835684.
117. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a001008. doi: 10.1101/cshperspect.a001008. PubMed PMID: 20182602.

118. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991;351(6326):453–6. doi: 10.1038/351453a0. PubMed PMID: 2046748.
119. Kadosh E, Snir-Alkalay I, Venkatachalam A, May S, Lasry A, Elyada E, et al. The gut microbiome switches mutant p53 from tumour-suppressive to oncogenic. *Nature*. 2020;586(7827):133–8. doi: 10.3390/molecules22030353. PubMed PMID: 32728212.
120. Schilling T, Kairat A, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Oren M, et al. Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(3):817–23. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.082. PubMed PMID: 20233581.
121. Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L, Müller M, Wallach D, Goncharov TM, et al. Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene*. 2003;22(36):5667–76. doi: 10.1038/sj.onc.1206724. PubMed PMID: 12944915.
122. Fedorova O, Petukhov A, Daks A, Shuvalov O, Leonova T, Vasileva E, et al. Orphan receptor NR4A3 is a novel target of p53 that contributes to apoptosis. *Oncogene*. 2019;38(12):2108–22. doi: 10.1038/s41388-018-0566-8. PubMed PMID: 30455429.
123. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999;398(6729):714–8. doi: 10.1038/19539. PubMed PMID: 10227294.
124. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000;404(6773):99–103. doi: 10.1038/35003607. PubMed PMID: 10716451.
125. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999;398(6729):708–13. doi: 10.1038/19531. PubMed PMID: 10227293.
126. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev*. 2008;22(19):2677–91. doi: 10.1101/gad.1695308. PubMed PMID: 18805989.
127. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998;2(3):305–16. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80275-0. PubMed PMID: 9774969.
128. Ory B, Ellisen LW. A microRNA-dependent circuit controlling p63/p73 homeostasis: p53 family cross-talk meets therapeutic opportunity. *Oncotarget*. 2011;2(3):259–64. doi: 10.18632/oncotarget.244. PubMed PMID: 21436470.
129. Fisher ML, Balinth S, Mills AA. p63-related signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2020;133(17). doi: 10.1242/jcs.228015. PubMed PMID: 32917730.

130. Jacobs WB, Govoni G, Ho D, Atwal JK, Barnabe-Heider F, Keyes WM, et al. p63 is an essential proapoptotic protein during neural development. *Neuron*. 2005;48(5):743–56. doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.027. PubMed PMID: 16337913.
131. Candi E, Dinsdale D, Rufini A, Salomoni P, Knight RA, Mueller M, et al. TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle*. 2007;6(3):274–85. doi: 10.4161/cc.6.3.3797. PubMed PMID: 17264681.
132. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997;90(4):809–19. PubMed PMID: 9288759.
133. Melino G. Molecular Mechanisms and Function of the p53 Protein Family Member - p73. *Biochemistry (Mosc)*. 2020;85(10):1202–9. doi: 10.1134/S0006297920100089. PubMed PMID: 33202205.
134. Amelio I, Panatta E, Niklison-Chirou MV, Steinert JR, Agostini M, Morone N, et al. The C terminus of p73 is essential for hippocampal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(27):15694–701. doi: 10.1073/pnas.2000917117. PubMed PMID: 32571922.
135. Davis PK, Dowdy SF. p73. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(10):935–9. PubMed PMID: 11470228.
136. Stiewe T, Pützer BM. Role of p73 in malignancy: Tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ*. 2002;9(3):237–45. doi: 10.1038/sj.cdd.4400995. PubMed PMID: 11859406.
137. Knight RA, Candi E, Melino G. The p53 homology trap. *Cancer Biol Ther*. 2003;2(1):63–6. PubMed PMID: 12673119.
138. Schuster A, Schilling T, Laurenzi V de, Koch AF, Seitz S, Staib F, et al. DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle*. 2010;9(13):2629–39. doi: 10.4161/cc.9.13.12110. PubMed PMID: 20581467.
139. Brune M, Müller M, Melino G, Bierhaus A, Schilling T, Nawroth PP. Depletion of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) sensitizes towards apoptosis via p53 and p73 posttranslational regulation. *Oncogene*. 2013;32(11):1460–8. doi: 10.1038/onc.2012.150. PubMed PMID: 22543586.
140. Müller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, et al. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ*. 2005;12(12):1564–77. doi: 10.1038/sj.cdd.4401774. PubMed PMID: 16195739.
141. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, et al. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J*. 2005;24(13):2458–71. doi: 10.1038/sj.emboj.7600708. PubMed PMID: 15944736.

142. González R, La Rosa AJ de, Rufini A, Rodríguez-Hernández MA, Navarro-Villarán E, Marchal T, et al. Role of p63 and p73 isoforms on the cell death in patients with hepatocellular carcinoma submitted to orthotopic liver transplantation. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174326. doi: 10.1371/journal.pone.0174326. PubMed PMID: 28350813.
143. Schilling T, Schleithoff ES, Kairat A, Melino G, Stremmel W, Oren M, et al. Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(2):399–404. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.063. PubMed PMID: 19615968.
144. Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Müller M. Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(2):335–41. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.093. PubMed PMID: 20403333.
145. Soares E, Zhou H. Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(7):1179–90. doi: 10.1007/s00018-017-2701-z. PubMed PMID: 29103147.
146. Sethi I, Romano R-A, Gluck C, Smalley K, Vojtesek B, Buck MJ, et al. A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. *BMC Genomics*. 2015;16:584. doi: 10.1186/s12864-015-1793-9. PubMed PMID: 26251276.
147. Ramadan S, Terrinoni A, Catani MV, Sayan AE, Knight RA, Mueller M, et al. p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(3):713–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.156. PubMed PMID: 15865927.
148. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*. 2000;289(5477):304–6. doi: 10.1126/science.289.5477.304. PubMed PMID: 10894779.
149. Buckley N, Panatta E, Morone N, Noguchi M, Scorrano L, Knight RA, et al. P73 C-terminus is dispensable for multiciliogenesis. *Cell Cycle*. 2020;19(14):1833–45. doi: 10.1080/15384101.2020.1783055. PubMed PMID: 32584647.
150. Grob TJ, Novak U, Maise C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*. 2001;8(12):1213–23. doi: 10.1038/sj.cdd.4400962. PubMed PMID: 11753569.
151. Maise C, Munarriz E, Barcaroli D, Melino G, Laurenzi V de. DNA damage induces the rapid and selective degradation of the DeltaNp73 isoform, allowing apoptosis to occur. *Cell Death Differ*. 2004;11(6):685–7. doi: 10.1038/sj.cdd.4401376. PubMed PMID: 15150543.
152. Waltermann A, Kartasheva NN, Dobbstein M. Differential regulation of p63 and p73 expression. *Oncogene*. 2003;22(36):5686–93. doi: 10.1038/sj.onc.1206859. PubMed PMID: 12944917.

153. Li N, Li H, Cherukuri P, Farzan S, Harmes DC, DiRenzo J. TA-p63-gamma regulates expression of DeltaN-p63 in a manner that is sensitive to p53. *Oncogene*. 2006;25(16):2349–59. doi: 10.1038/sj.onc.1209270. PubMed PMID: 16331262.
154. Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: Defining the network. *Oncogene*. 2007;26(36):5169–83. doi: 10.1038/sj.onc.1210337. PubMed PMID: 17334395.
155. Nemajerova A, Amelio I, Gebel J, Dötsch V, Melino G, Moll UM. Non-oncogenic roles of TAp73: From multiciliogenesis to metabolism. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):144–53. doi: 10.1038/cdd.2017.178. PubMed PMID: 29077094.
156. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281–97. PubMed PMID: 14744438.
157. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*. 2010;38(3):323–32. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.013. PubMed PMID: 20471939.
158. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597–610. doi: 10.1038/nrg2843. PubMed PMID: 20661255.
159. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097–101. doi: 10.1038/nsmb1167. PubMed PMID: 17099701.
160. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011–6. doi: 10.1101/gad.1158803. PubMed PMID: 14681208.
161. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21(17):4663–70. PubMed PMID: 12198168.
162. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415–9. doi: 10.1038/nature01957. PubMed PMID: 14508493.
163. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(8):475–88. doi: 10.1038/nrm3611. PubMed PMID: 23800994.
164. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(11):1444–55. doi: 10.4161/15384047.2014.955442. PubMed PMID: 25482951.
165. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–55. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035. PubMed PMID: 19239886.
166. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9779–84. doi: 10.1073/pnas.1630797100. PubMed PMID: 12902540.

167. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305(5689):1437–41. doi: 10.1126/science.1102513. PubMed PMID: 15284456.
168. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005;309(5740):1573–6. doi: 10.1126/science.1115079. PubMed PMID: 16081698.
169. Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 2006;21(4):533–42. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.031. PubMed PMID: 16483934.
170. Klingenberg M, Matsuda A, Diederichs S, Patel T. Non-coding RNA in hepatocellular carcinoma: Mechanisms, biomarkers and therapeutic targets. *J Hepatol*. 2017. doi: 10.1016/j.jhep.2017.04.009. PubMed PMID: 28438689.
171. Pollutri D, Gramantieri L, Bolondi L, Fornari F. TP53/MicroRNA Interplay in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12). doi: 10.3390/ijms17122029. PubMed PMID: 27918441.
172. Qiao P, Li G, Bi W, Yang L, Yao L, Wu D. microRNA-34a inhibits epithelial mesenchymal transition in human cholangiocarcinoma by targeting Smad4 through transforming growth factor-beta/Smad pathway. *BMC Cancer*. 2015;15:469. doi: 10.1186/s12885-015-1359-x. PubMed PMID: 26077733.
173. Agostini M, Knight RA. miR-34: From bench to bedside. *Oncotarget*. 2014;5(4):872–81. doi: 10.18632/oncotarget.1825. PubMed PMID: 24657911.
174. Zhang J, Guo H, Zhang H, Wang H, Qian G, Fan X, et al. Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer*. 2011;117(1):86–95. doi: 10.1002/ncr.25522. PubMed PMID: 20737575.
175. Sachdeva M, Mo Y-Y. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. *Am J Transl Res*. 2010;2(2):170–80. PubMed PMID: 20407606.
176. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3207–12. doi: 10.1073/pnas.0808042106. PubMed PMID: 19202062.
177. Lei C, Du F, Sun L, Li T, Li T, Min Y, et al. miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3101. doi: 10.1038/cddis.2017.493. PubMed PMID: 29022908.
178. Götte M, Mohr C, Koo C-Y, Stock C, Vaske A-K, Viola M, et al. miR-145-dependent targeting of junctional adhesion molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene*. 2010;29(50):6569–80. doi: 10.1038/onc.2010.386. PubMed PMID: 20818426.
179. Wang S, Bian C, Yang Z, Bo Y, Li J, Zeng L, et al. miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *Int J Oncol*. 2009;34(5):1461–6. PubMed PMID: 19360360.

180. Sachdeva M, Mo Y-Y. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res.* 2010;70(1):378–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2021. PubMed PMID: 19996288.
181. He Y, Yu D, Zhu L, Zhong S, Zhao J, Tang J. miR-149 in Human Cancer: A Systemic Review. *J Cancer.* 2018;9(2):375–88. doi: 10.7150/jca.21044. PubMed PMID: 29344284.
182. Okato A, Arai T, Yamada Y, Sugawara S, Koshizuka K, Fujimura L, et al. Dual Strands of Pre-miR-149 Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion through Targeting FOXM1 in Renal Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18(9). doi: 10.3390/ijms18091969. PubMed PMID: 28902136.
183. Shin CH, Lee H, Kim HR, Choi KH, Joung J-G, Kim HH. Regulation of PLK1 through competition between hnRNPk, miR-149-3p and miR-193b-5p. *Cell Death Differ.* 2017;24(11):1861–71. doi: 10.1038/cdd.2017.106. PubMed PMID: 28708135.
184. Song B, Wang Y, Kudo K, Gavin EJ, Xi Y, Ju J. miR-192 Regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit. *Clin Cancer Res.* 2008;14(24):8080–6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1422. PubMed PMID: 19088023.
185. Feng S, Cong S, Zhang X, Bao X, Wang W, Li H, et al. MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(15):6669–78. doi: 10.1093/nar/gkr232. PubMed PMID: 21511813.
186. Jin Z, Selaru FM, Cheng Y, Kan T, Agarwal R, Mori Y, et al. MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer in vivo and suppress ALCAM expression in vitro. *Oncogene.* 2011;30(13):1577–85. doi: 10.1038/onc.2010.534. PubMed PMID: 21119604.
187. Pichiorri F, Suh S-S, Rocci A, Luca L de, Taccioli C, Santhanam R, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell.* 2010;18(4):367–81. doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.005. PubMed PMID: 20951946.
188. Khella HWZ, Bakhet M, Allo G, Jewett MAS, Girgis AH, Latif A, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: A convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2013;34(10):2231–9. doi: 10.1093/carcin/bgt184. PubMed PMID: 23715501.
189. Wang Y, Zhang S, Xu Y, Zhang Y, Guan H, Li X, et al. Upregulation of miR-192 inhibits cell growth and invasion and induces cell apoptosis by targeting TCF7 in human osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2016;37(11):15211–20. doi: 10.1007/s13277-016-5417-z. PubMed PMID: 27683056.
190. Li S, Li F, Niu R, Zhang H, Cui A, An W, et al. Mir-192 suppresses apoptosis and promotes proliferation in esophageal squamous cell carcinoma by targeting Bim. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8048–56. PubMed PMID: 26339371.

191. Sun J, Fan Z, Lu S, Yang J, Hao T, Huo Q. MiR-192 suppresses the tumorigenicity of prostate cancer cells by targeting and inhibiting nin one binding protein. *Int J Mol Med.* 2016;37(2):485–92. doi: 10.3892/ijmm.2016.2449. PubMed PMID: 26743688.
192. Zhang M, Zhuang Q, Cui L. MiR-194 inhibits cell proliferation and invasion via repression of RAP2B in bladder cancer. *Biomed Pharmacother.* 2016;80:268–75. doi: 10.1016/j.biopha.2016.03.026. PubMed PMID: 27133066.
193. Wang Y, Sun G, Wang C, Guo W, Tang Q, Wang M. MiR-194-5p inhibits cell migration and invasion in bladder cancer by targeting E2F3. *J BUON.* 2018;23(5):1492–9. PubMed PMID: 30570877.
194. Zhang Z, Lei B, Wu H, Zhang X, Zheng N. Tumor suppressive role of miR-194-5p in glioblastoma multiforme. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):9317–22. doi: 10.3892/mmr.2017.7826. PubMed PMID: 29152664.
195. Bao J, Zou J-H, Li C-Y, Zheng G-Q. miR-194 inhibits gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis by targeting KDM5B. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(21):4487–93. PubMed PMID: 27874950.
196. Miao J, Wang W, Wu S, Zang X, Li Y, Wang J, et al. miR-194 Suppresses Proliferation and Migration and Promotes Apoptosis of Osteosarcoma Cells by Targeting CDH2. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(5):1966–74. doi: 10.1159/000487973. PubMed PMID: 29518783.
197. Li P, Yang Y, Liu H, Yang A-K, Di J-M, Tan G-M, et al. MiR-194 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting Wee1. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):32. doi: 10.1186/s13045-017-0402-6. PubMed PMID: 28122647.
198. Cui G, Liu D, Li W, Li Y, Liang Y, Shi W, et al. Original Research: MiR-194 inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis by targeting KDM5B in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017;242(1):45–52. doi: 10.1177/1535370216662712. PubMed PMID: 27480251.
199. Wang B, Li D, Sidler C, Rodriguez-Juarez R, Singh N, Heyns M, et al. A suppressive role of ionizing radiation-responsive miR-29c in the development of liver carcinoma via targeting WIP1. *Oncotarget.* 2015;6(12):9937–50. doi: 10.18632/oncotarget.3157. PubMed PMID: 25888625.
200. Yang F, Li Q-j, Gong Z-b, Zhou L, You N, Wang S, et al. MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment. *Technol Cancer Res Treat.* 2014;13(1):77–86. doi: 10.7785/tcrt.2012.500364. PubMed PMID: 23862748.
201. Yang Z, Zhang Y, Wang L. A feedback inhibition between miRNA-127 and TGFβ/c-Jun cascade in HCC cell migration via MMP13. *PLoS One.* 2013;8(6):e65256. doi: 10.1371/journal.pone.0065256. PubMed PMID: 23762330.

202. Wang W, Ding B, Lou W, Lin S. Promoter Hypomethylation and miR-145-5p Downregulation- Mediated HDAC11 Overexpression Promotes Sorafenib Resistance and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:724. doi: 10.3389/fcell.2020.00724. PubMed PMID: 32903337.
203. Xu X, Fan Z, Kang L, Han J, Jiang C, Zheng X, et al. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2013;123(2):630–45. doi: 10.1172/JCI64265. PubMed PMID: 23321675.
204. Meng Z, Fu X, Chen X, Zeng S, Tian Y, Jove R, et al. miR-194 is a marker of hepatic epithelial cells and suppresses metastasis of liver cancer cells in mice. *Hepatology.* 2010;52(6):2148–57. doi: 10.1002/hep.23915. PubMed PMID: 20979124.
205. Tang H, Zhao H, Yu Z-Y, Feng X, Fu B-S, Qiu C-H, et al. MicroRNA-194 inhibits cell invasion and migration in hepatocellular carcinoma through PRC1-mediated inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Dig Liver Dis.* 2019. doi: 10.1016/j.dld.2019.02.012. PubMed PMID: 30948333.
206. Ran R-Z, Chen J, Cui L-J, Lin X-L, Fan M-M, Cong Z-Z, et al. miR-194 inhibits liver cancer stem cell expansion by regulating RAC1 pathway. *Exp Cell Res.* 2019;378(1):66–75. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.007. PubMed PMID: 30844391.
207. Xiao F, Zhang W, Zhou L, Xie H, Xing C, Ding S, et al. microRNA-200a is an independent prognostic factor of hepatocellular carcinoma and induces cell cycle arrest by targeting CDK6. *Oncol Rep.* 2013;30(5):2203–10. doi: 10.3892/or.2013.2715. PubMed PMID: 24009066.
208. Huang D-J, Huang J-Z, Yang J, Li Y-H, Luo Y-C, He H-Y, et al. Bioinformatic identification of IGF1 as a hub gene in hepatocellular carcinoma (HCC) and in-vitro analysis of the chemosensitizing effect of miR-379 via suppressing the IGF1/IGF1R signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(24):5098–106. PubMed PMID: 28051262.
209. Cui W, Huang Z, He H, Gu N, Qin G, Lv J, et al. MiR-1188 at the imprinted Dlk1-Dio3 domain acts as a tumor suppressor in hepatoma cells. *Mol Biol Cell.* 2015;26(8):1416–27. doi: 10.1091/mbc.E14-11-1576. PubMed PMID: 25694452.
210. Zhang Q, Cao L-Y, Cheng S-J, Zhang A-M, Jin X-S, Li Y. p53-induced microRNA-1246 inhibits the cell growth of human hepatocellular carcinoma cells by targeting NFIB. *Oncol Rep.* 2015;33(3):1335–41. doi: 10.3892/or.2015.3715. PubMed PMID: 25591821.
211. Wu H, Ng R, Chen X, Steer CJ, Song G. MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. *Gut.* 2016;65(11):1850–60. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308430. PubMed PMID: 26282675.
212. Chen L, Luo L, Chen W, Xu H-X, Chen F, Chen L-Z, et al. MicroRNA-24 increases hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion by targeting p53: miR-24 targeted p53. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1113–8. doi: 10.1016/j.biopha.2016.10.051. PubMed PMID: 27780140.

213. Yan-Chun L, Hong-Mei Y, Zhi-Hong C, Qing H, Yan-Hong Z, Ji-Fang W. MicroRNA-192-5p Promote the Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cell by Targeting SEMA3A. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(4):251–60. doi: 10.1097/PAI.0000000000000296. PubMed PMID: 26580097.
214. Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Marasco E, Capranico G, et al. In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. *J Pathol*. 2012;227(3):275–85. doi: 10.1002/path.3995. PubMed PMID: 22262409.
215. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*. 2012;482(7385):347–55. doi: 10.1038/nature10888. PubMed PMID: 22337054.
216. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009;460(7254):529–33. doi: 10.1038/nature08199. PubMed PMID: 19626115.
217. Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol*. 2011;3(1):44–50. doi: 10.1093/jmcb/mjq040. PubMed PMID: 21278451.
218. Liu J, Zhang C, Zhao Y, Feng Z. MicroRNA Control of p53. *J Cell Biochem*. 2017;118(1):7–14. doi: 10.1002/jcb.25609. PubMed PMID: 27216701.
219. Mraz M, Malinova K, Kotaskova J, Pavlova S, Tichy B, Malcikova J, et al. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*. 2009;23(6):1159–63. doi: 10.1038/leu.2008.377. PubMed PMID: 19158830.
220. He L, He X, Lim LP, Stanchina E de, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447(7148):1130–4. doi: 10.1038/nature05939. PubMed PMID: 17554337.
221. Mazza T, Mazzoccoli G, Fusilli C, Capocéfalo D, Panza A, Biagini T, et al. Multifaceted enrichment analysis of RNA-RNA crosstalk reveals cooperating micro-societies in human colorectal cancer. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(9):4025–36. doi: 10.1093/nar/gkw245. PubMed PMID: 27067546.
222. Sempere LF, Christensen M, Silaharoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res*. 2007;67(24):11612–20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5019. PubMed PMID: 18089790.
223. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007;72(5-6):397–402. doi: 10.1159/000113489. PubMed PMID: 18196926.
224. Li J, Aung LHH, Long B, Qin D, An S, Li P. miR-23a binds to p53 and enhances its association with miR-128 promoter. *Sci Rep*. 2015;5:16422. doi: 10.1038/srep16422. PubMed PMID: 26553132.

225. Candi E, Amelio I, Agostini M, Melino G. MicroRNAs and p63 in epithelial stemness. *Cell Death Differ.* 2015;22(1):12–21. doi: 10.1038/cdd.2014.113. PubMed PMID: 25168241.
226. Blandino G, Moll UM. p63 regulation by microRNAs. *Cell Cycle.* 2009;8(10):1466–7. doi: 10.4161/cc.8.10.8766. PubMed PMID: 19411828.
227. Logotheti S, Marquardt S, Pützer BM. p73-Governed miRNA Networks: Translating Bioinformatics Approaches to Therapeutic Solutions for Cancer Metastasis. *Methods Mol Biol.* 2019;1912:33–52. doi: 10.1007/978-1-4939-8982-9_2. PubMed PMID: 30635889.
228. Galtsidis S, Logotheti S, Pavlopoulou A, Zampetidis CP, Papachristopoulou G, Scorilas A, et al. Unravelling a p73-regulated network: The role of a novel p73-dependent target, MIR3158, in cancer cell migration and invasiveness. *Cancer Lett.* 2017;388:96–106. doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.036. PubMed PMID: 27919789.
229. Agostini M, Tucci P, Killick R, Candi E, Sayan BS, Di Rivetti Val Cervo P, et al. Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(52):21093–8. doi: 10.1073/pnas.1112061109. PubMed PMID: 22160687.
230. He M, Liu Y, Deng X, Qi S, Sun X, Liu G, et al. Down-regulation of miR-200b-3p by low p73 contributes to the androgen-independence of prostate cancer cells. *Prostate.* 2013;73(10):1048–56. doi: 10.1002/pros.22652. PubMed PMID: 23389960.
231. Lu Z, Jiao D, Qiao J, Yang S, Yan M, Cui S, et al. Restin suppressed epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in breast cancer cells through upregulating mir-200a/b expression via association with p73. *Mol Cancer.* 2015;14:102. doi: 10.1186/s12943-015-0370-9. PubMed PMID: 25972084.
232. Batliner J, Buehrer E, Fey MF, Tschan MP. Inhibition of the miR-143/145 cluster attenuated neutrophil differentiation of APL cells. *Leuk Res.* 2012;36(2):237–40. doi: 10.1016/j.leukres.2011.10.006. PubMed PMID: 22093444.
233. Alla V, Kowtharapu BS, Engelmann D, Emmrich S, Schmitz U, Steder M, et al. E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. *Cell Cycle.* 2012;11(16):3067–78. doi: 10.4161/cc.21476. PubMed PMID: 22871739.
234. Meier C, Hardtstock P, Joost S, Alla V, Pützer BM. p73 and IGF1R Regulate Emergence of Aggressive Cancer Stem-like Features via miR-885-5p Control. *Cancer Res.* 2016;76(2):197–205. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1228. PubMed PMID: 26554827.
235. Liao J-M, Zhou X, Zhang Y, Lu H. MiR-1246: A new link of the p53 family with cancer and Down syndrome. *Cell Cycle.* 2012;11(14):2624–30. doi: 10.4161/cc.20809. PubMed PMID: 22751441.
236. Gao Q, Zheng J. microRNA-323 upregulation promotes prostate cancer growth and docetaxel resistance by repressing p73. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:528–34. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.040. PubMed PMID: 29091904.

237. Tang L, Zhao B, Zhang H, Du Q, Zhu J, Zhao Z, et al. Regulation of nonylphenol-induced reproductive toxicity in mouse spermatogonia cells by miR-361-3p. *Mol Reprod Dev.* 2017;84(12):1257–70. doi: 10.1002/mrd.22923. PubMed PMID: 29024157.
238. Zhang X, Zhang M, Wang G, Tian Y, He X. Tumor promoter role of miR-647 in gastric cancer via repression of TP73. *Mol Med Rep.* 2018;18(4):3744–50. doi: 10.3892/mmr.2018.9358. PubMed PMID: 30106095.
239. Jiang H, Cheng L, Hu P, Liu R. MicroRNA-663b mediates TAM resistance in breast cancer by modulating TP73 expression. *Mol Med Rep.* 2018;18(1):1120–6. doi: 10.3892/mmr.2018.9064. PubMed PMID: 29845295.
240. Jiang X, Li H. MiR-1180-5p regulates apoptosis of Wilms' tumor by targeting p73. *Oncotargets Ther.* 2018;11:823–31. doi: 10.2147/OTT.S148684. PubMed PMID: 29497314.
241. Sampath D, Calin GA, Pudevalli VK, Gopisetty G, Taccioli C, Liu C-G, et al. Specific activation of microRNA106b enables the p73 apoptotic response in chronic lymphocytic leukemia by targeting the ubiquitin ligase Itch for degradation. *Blood.* 2009;113(16):3744–53. doi: 10.1182/blood-2008-09-178707. PubMed PMID: 19096009.
242. Ory B, Ramsey MR, Wilson C, Vadysirisack DD, Forster N, Rocco JW, et al. A microRNA-dependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2011;121(2):809–20. doi: 10.1172/JCI43897. PubMed PMID: 21293058.
243. Martin Helmut Bender. MicroRNA-Regulation durch die p53-Familie beim Hepatozellulären Karzinom- Bedeutung für Tumorentstehung und Therapieansprechen [Inauguraldissertation]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität; 2013.
244. Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, Wei H, Fan C, et al. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer.* 2018;17(1):45. doi: 10.1186/s12943-018-0796-y. PubMed PMID: 29455668.
245. Liu Y, Zhong L, Liu D, Ye H, Mao Y, Hu Y. Differential miRNA expression profiles in human keratinocytes in response to protein kinase C inhibitor. *Mol Med Rep.* 2017;16(5):6608–19. doi: 10.3892/mmr.2017.7447. PubMed PMID: 28901412.
246. Giglio S, Vecchione A. c-Met and miRs in Cancer. *Biomedicines.* 2015;3(1):32–44. doi: 10.3390/biomedicines3010032. PubMed PMID: 28536397.
247. Zhan H, Tu S, Zhang F, Shao A, Lin J. MicroRNAs and Long Non-coding RNAs in c-Met-Regulated Cancers. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:145. doi: 10.3389/fcell.2020.00145. PubMed PMID: 32219093.
248. Chiang C-W, Huang Y, Leong K-W, Chen L-C, Chen H-C, Chen S-J, et al. PKC α mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells. *J Biomed Sci.* 2010;17:35. doi: 10.1186/1423-0127-17-35. PubMed PMID: 20444294.
249. Mandal JP, Shiue C-N, Chen Y-C, Lee M-C, Yang H-H, Chang H-H, et al. PKC δ mediates mitochondrial ROS generation and oxidation of HSP60 to relieve RKIP inhibition on MAPK pathway for HCC progression. *Free Radic Biol Med.* 2021;163:69–87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.003. PubMed PMID: 33307168.

250. Rey J-B, Launay-Vacher V, Tournigand C. Regorafenib as a single-agent in the treatment of patients with gastrointestinal tumors: An overview for pharmacists. *Target Oncol.* 2015;10(2):199–213. doi: 10.1007/s11523-014-0333-x. PubMed PMID: 25213039.
251. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4293–300. doi: 10.1200/JCO.2005.01.3441. PubMed PMID: 16908937.
252. Baljevic M, Zaman S, Baladandayuthapani V, Lin YH, Partovi CM de, Berkova Z, et al. Phase II study of the c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) in patients with relapsed or relapsed/refractory multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2017;96(6):977–85. doi: 10.1007/s00277-017-2980-3. PubMed PMID: 28337527.
253. Panduri V, Weitzman SA, Chandel NS, Kamp DW. Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(6):L1220-7. doi: 10.1152/ajplung.00371.2003. PubMed PMID: 14766669.
254. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J.* 2001;353(Pt 2):411–6. doi: 10.1042/0264-6021:3530411. PubMed PMID: 11139407.
255. Wolvetang EJ, Johnson KL, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Letters.* 1994;339(1-2):40–4. doi: 10.1016/0014-5793(94)80380-3. PubMed PMID: 8313978.
256. Kastl L, Sauer SW, Ruppert T, Beissbarth T, Becker MS, Süß D, et al. TNF- α mediates mitochondrial uncoupling and enhances ROS-dependent cell migration via NF- κ B activation in liver cells. *FEBS Letters.* 2014;588(1):175–83. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.033. PubMed PMID: 24316229.
257. Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y, et al. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2009;275(1):44–53. doi: 10.1016/j.canlet.2008.09.035. PubMed PMID: 19006648.
258. Nagy Á, Lánckzy A, Menyhárt O, Györffy B. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci Rep.* 2018;8(1):9227. doi: 10.1038/s41598-018-27521-y. PubMed PMID: 29907753.
259. Luo G, Chao Y-L, Tang B, Li B-S, Xiao Y-F, Xie R, et al. miR-149 represses metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting actin-regulatory proteins PPM1F. *Oncotarget.* 2015;6(35):37808–23. doi: 10.18632/oncotarget.5676. PubMed PMID: 26498692.
260. Mei Y, You Y, Xia J, Gong J-P, Wang Y-B. Identifying Differentially Expressed MicroRNAs Between Cirrhotic and Non-Cirrhotic Hepatocellular Carcinoma and Exploring Their Functions Using Bioinformatic Analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(4):1443–56. doi: 10.1159/000492254. PubMed PMID: 30064138.

261. Zeng X, Lin Y, Yin C, Zhang X, Ning B-F, Zhang Q, et al. Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice. *Hepatology*. 2011;54(6):2036–47. doi: 10.1002/hep.24647. PubMed PMID: 21898499.
262. Zhao Y, Li F, Zhang X, Liu A, Qi J, Cui H, et al. MicroRNA-194 acts as a prognostic marker and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting MAP4K4. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):12446–54. PubMed PMID: 26722431.
263. Xu Y, Xie Y, Wang X, Chen X, Liu Q, Ying M, et al. Identification of cancer stem cells from hepatocellular carcinoma cell lines and their related microRNAs. *Oncol Rep*. 2013;30(5):2056–62. doi: 10.3892/or.2013.2703. PubMed PMID: 24002436.
264. Ding W, Tan H, Zhao C, Li X, Li Z, Jiang C, et al. MiR-145 suppresses cell proliferation and motility by inhibiting ROCK1 in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2016;37(5):6255–60. doi: 10.1007/s13277-015-4462-3. PubMed PMID: 26615424.
265. Ding S-L, Wang J-X, Jiao J-Q, Tu X, Wang Q, Liu F, et al. A pre-microRNA-149 (miR-149) genetic variation affects miR-149 maturation and its ability to regulate the Puma protein in apoptosis. *J Biol Chem*. 2013;288(37):26865–77. doi: 10.1074/jbc.M112.440453. PubMed PMID: 23873935.
266. Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(9):613–26. doi: 10.1038/nrc3318. PubMed PMID: 22898542.
267. Hüntten S, Kaller M, Drepper F, Oeljeklaus S, Bonfert T, Erhard F, et al. p53-Regulated Networks of Protein, mRNA, miRNA, and lncRNA Expression Revealed by Integrated Pulsed Stable Isotope Labeling With Amino Acids in Cell Culture (pSILAC) and Next Generation Sequencing (NGS) Analyses. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(10):2609–29. doi: 10.1074/mcp.M115.050237. PubMed PMID: 26183718.
268. Yu G, Zhou H, Yao W, Meng L, Lang B. lncRNA TUG1 Promotes Cisplatin Resistance by Regulating CCND2 via Epigenetically Silencing miR-194-5p in Bladder Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:257–71. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.017. PubMed PMID: 30925453.
269. Georges SA, Biery MC, Kim S-Y, Schelter JM, Guo J, Chang AN, et al. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer Res*. 2008;68(24):10105–12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1846. PubMed PMID: 19074876.
270. Sundaram P, Hultine S, Smith LM, Dews M, Fox JL, Biyashev D, et al. p53-responsive miR-194 inhibits thrombospondin-1 and promotes angiogenesis in colon cancers. *Cancer Res*. 2011;71(24):7490–501. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1124. PubMed PMID: 22028325.
271. Bailey SG, Sanchez-Elsner T, Stephanou A, Cragg MS, Townsend PA. Regulating the genome surveillance system: MiRNAs and the p53 super family. *Apoptosis*. 2010;15(5):541–52. doi: 10.1007/s10495-010-0456-1. PubMed PMID: 20091234.

272. Yang YM, Lee WH, Lee CG, An J, Kim E-S, Kim SH, et al. Ga12 gep oncogene deregulation of p53-responsive microRNAs promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2015;34(22):2910–21. doi: 10.1038/onc.2014.218. PubMed PMID: 25065598.
273. Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon Y-J, Volinia S, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med*. 2011;208(5):875–83. doi: 10.1084/jem.20110235. PubMed PMID: 21518799.
274. Gioffré S, Ricci V, Vavassori C, Ruggeri C, Chiesa M, Alfieri I, et al. Plasmatic and chamber-specific modulation of cardiac microRNAs in an acute model of DOX-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:1–8. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.042. PubMed PMID: 30453253.
275. Zhu J-N, Fu Y-H, Hu Z-Q, Li W-Y, Tang C-M, Fei H-W, et al. Activation of miR-34a-5p/Sirt1/p66shc pathway contributes to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Sci Rep*. 2017;7(1):11879. doi: 10.1038/s41598-017-12192-y. PubMed PMID: 28928469.
276. Piegari E, Russo R, Cappetta D, Esposito G, Urbanek K, Dell'Aversana C, et al. MicroRNA-34a regulates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Oncotarget*. 2016;7(38):62312–26. doi: 10.18632/oncotarget.11468. PubMed PMID: 27694688.
277. Chaudhari U, Nemade H, Gaspar JA, Hescheler J, Hengstler JG, Sachinidis A. MicroRNAs as early toxicity signatures of doxorubicin in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Arch Toxicol*. 2016;90(12):3087–98. doi: 10.1007/s00204-016-1668-0. PubMed PMID: 26842497.
278. Desai VG, C Kwekel J, Vijay V, Moland CL, Herman EH, Lee T, et al. Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;281(2):221–9. doi: 10.1016/j.taap.2014.10.006. PubMed PMID: 25448438.
279. Rokhlin OW, Scheinker VS, Taghiyev AF, Bumcrot D, Glover RA, Cohen MB. MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(8):1288–96. doi: 10.4161/cbt.7.8.6284. PubMed PMID: 18497571.
280. Hasanpourghadi M, Abdul Majid N, Rais Mustafa M. The role of miRNAs 34a, 146a, 320a and 542 in the synergistic anticancer effects of methyl 2-(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-1H-benzodimidazole-5-carboxylate (MBIC) with doxorubicin in breast cancer cells. *PeerJ*. 2018;6:e5577. doi: 10.7717/peerj.5577. PubMed PMID: 30245930.
281. Yuniarti L, Mustofa M, Aryandono T, Haryana SM. Synergistic Action of 1,2-Epoxy-3-(3-(3,4-dimethoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on) Propane with Doxorubicin and Cisplatin through Increasing of p53, TIMP-3, and MicroRNA-34a in Cervical Cancer Cell Line (HeLa). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(10):2955–62. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.10.2955. PubMed PMID: 30362332.

282. Ye Z, Fang J, Dai S, Wang Y, Fu Z, Feng W, et al. MicroRNA-34a induces a senescence-like change via the down-regulation of SIRT1 and up-regulation of p53 protein in human esophageal squamous cancer cells with a wild-type p53 gene background. *Cancer Lett.* 2016;370(2):216–21. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.023. PubMed PMID: 26523671.
283. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15472–7. doi: 10.1073/pnas.0707351104. PubMed PMID: 17875987.
284. Chinnathambi S, Wiechert S, Tomanek-Chalkley A, Winter MC, Bickenbach JR. Treatment with the cancer drugs decitabine and doxorubicin induces human skin keratinocytes to express Oct4 and the OCT4 regulator mir-145. *J Dermatol.* 2012;39(7):617–24. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01553.x. PubMed PMID: 22486352.
285. Rizzo S, Cangemi A, Galvano A, Fanale D, Buscemi S, Ciaccio M, et al. Analysis of miRNA expression profile induced by short term starvation in breast cancer cells treated with doxorubicin. *Oncotarget.* 2017;8(42):71924–32. doi: 10.18632/oncotarget.18028. PubMed PMID: 29069757.
286. Takano M, Nekomoto C, Kawami M, Yumoto R. Role of miR-34a in TGF- β 1- and Drug-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Type II Epithelial Cells. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2868–72. doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.002. PubMed PMID: 28408209.
287. Shetty SK, Tiwari N, Marudamuthu AS, Puthusseri B, Bhandary YP, Fu J, et al. p53 and miR-34a Feedback Promotes Lung Epithelial Injury and Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol.* 2017;187(5):1016–34. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.020. PubMed PMID: 28273432.
288. Yang S, Cui H, Xie N, Icyuz M, Banerjee S, Antony VB, et al. miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *FASEB J.* 2013;27(6):2382–91. doi: 10.1096/fj.12-219493. PubMed PMID: 23457217.
289. Xia H-F, Ren J-G, Zhu J-Y, Yu Z-L, Zhang W, Sun Y-F, et al. Downregulation of miR-145 in venous malformations: Its association with disorganized vessels and sclerotherapy. *Eur J Pharm Sci.* 2017;100:126–31. doi: 10.1016/j.ejps.2017.01.019. PubMed PMID: 28104472.
290. Cai M-H, Xu X-G, Yan S-L, Sun Z, Ying Y, Wang B-K, et al. Regorafenib suppresses colon tumorigenesis and the generation of drug resistant cancer stem-like cells via modulation of miR-34a associated signaling. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):151. doi: 10.1186/s13046-018-0836-x. PubMed PMID: 30005681.
291. Shi Y, Huang A. Effects of sorafenib on lung metastasis in rats with hepatocellular carcinoma: The role of microRNAs. *Tumour Biol.* 2015;36(11):8455–63. doi: 10.1007/s13277-015-3565-1. PubMed PMID: 26026584.

292. Feng D, Zhu N, Yu C, Lou D. MicroRNA-34a suppresses human lens epithelial cell proliferation and migration via downregulation of c-Met. *Clin Chim Acta*. 2019;495:326–30. doi: 10.1016/j.cca.2019.04.060. PubMed PMID: 30980790.
293. Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A, Sartipy P. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2016;34:26–34. doi: 10.1016/j.tiv.2016.03.009. PubMed PMID: 27033315.
294. Antonini D, Russo MT, De RL, Gorrese M, Del VL, Missero C. Transcriptional Repression of miR-34 Family Contributes to p63-mediated Cell Cycle Progression in Epidermal Cells. *The Journal of investigative dermatology* [Internet]. 2010;130(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20090763/>.
295. Ng WL, Chen G, Wang M, Wang H, Story M, Shay JW, et al. OCT4 as a target of miR-34a stimulates p63 but inhibits p53 to promote human cell transformation. *Cell Death Dis*. 2014;5(1):e1024-e1024. doi: 10.1038/cddis.2013.563.
296. Zhang Y, He Y, Lu L-L, Zhou Z-Y, Wan N-B, Li G-P, et al. miRNA-192-5p impacts the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin via targeting peptidylprolyl isomerase A. *Kaohsiung J Med Sci*. 2019;35(1):17–23. doi: 10.1002/kjm2.12004. PubMed PMID: 30844143.
297. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-1239.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.061. PubMed PMID: 26099527.
298. Li P, Fan H, He Q. Investigation of the clinical significance and prognostic value of microRNA-145 in human hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(51):e13715. doi: 10.1097/MD.00000000000013715. PubMed PMID: 30572504.
299. Zhang Y, Guo X, Xiong L, Yu L, Li Z, Guo Q, et al. Comprehensive analysis of microRNA-regulated protein interaction network reveals the tumor suppressive role of microRNA-149 in human hepatocellular carcinoma via targeting AKT-mTOR pathway. *Mol Cancer*. 2014;13:253. doi: 10.1186/1476-4598-13-253. PubMed PMID: 25424347.
300. Zheng S-Z, Sun P, Wang J-P, Liu Y, Gong W, Liu J. MiR-34a overexpression enhances the inhibitory effect of doxorubicin on HepG2 cells. *World J Gastroenterol*. 2019;25(22):2752–62. doi: 10.3748/wjg.v25.i22.2752. PubMed PMID: 31235998.
301. Han R, Chen X, Li Y, Zhang S, Li R, Lu L. MicroRNA-34a suppresses aggressiveness of hepatocellular carcinoma by modulating E2F1, E2F3, and Caspase-3. *Cancer Manag Res*. 2019;11:2963–76. doi: 10.2147/CMAR.S202664. PubMed PMID: 31114344.
302. Lin L, Zhang Y-d, Chen Z-Y, Chen Y, Ren C-P. The clinicopathological significance of miR-149 and PARP-2 in hepatocellular carcinoma and their roles in chemo/radiotherapy. *Tumour Biol*. 2016;37(9):12339–46. doi: 10.1007/s13277-016-5106-y. PubMed PMID: 27300349.
303. Steegenga WT, Shvarts A, Riteco N, Bos JL, Jochemsen AG. Distinct regulation of p53 and p73 activity by adenovirus E1A, E1B, and E4orf6 proteins. *Mol Cell Biol*. 1999;19(5):3885–94. doi: 10.1128/mcb.19.5.3885. PubMed PMID: 10207112.

304. Kühnel F, Gürlevik E, Wirth TC, Strüver N, Malek NP, Müller-Schilling M, et al. Targeting of p53-transcriptional dysfunction by conditionally replicating adenovirus is not limited by p53-homologues. *Mol Ther.* 2010;18(5):936–46. doi: 10.1038/mt.2009.298. PubMed PMID: 20040911.
305. Wei K, Li M, Zöller M, Wang M, Mehrabi A, Hoffmann K. Targeting c-MET by Tivantinib through synergistic activation of JNK/c-jun pathway in cholangiocarcinoma. *Cell Death Dis.* 2019;10(3):231. doi: 10.1038/s41419-019-1460-1. PubMed PMID: 30850583.
306. Zhu AX, Rosmorduc O, Evans TRJ, Ross PJ, Santoro A, Carrilho FJ, et al. SEARCH: A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sorafenib plus erlotinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(6):559–66. doi: 10.1200/JCO.2013.53.7746. PubMed PMID: 25547503.
307. Thomas MB, Garrett-Mayer E, Anis M, Anderton K, Bentz T, Edwards A, et al. A Randomized Phase II Open-Label Multi-Institution Study of the Combination of Bevacizumab and Erlotinib Compared to Sorafenib in the First-Line Treatment of Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology.* 2018;94(6):329–39. doi: 10.1159/000485384. PubMed PMID: 29719302.
308. Kudo M, Cheng A-L, Park J-W, Park JH, Liang P-C, Hidaka H, et al. Orantinib versus placebo combined with transcatheter arterial chemoembolisation in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENTAL): A randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3(1):37–46. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30290-X. PubMed PMID: 28988687.
309. Abou-Alfa GK, Shi Q, Knox JJ, Kaubisch A, Niedzwiecki D, Posey J, et al. Assessment of Treatment With Sorafenib Plus Doxorubicin vs Sorafenib Alone in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma: Phase 3 CALGB 80802 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(11):1582–8. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.2792. PubMed PMID: 31486832.
310. Cheng A-L, Thongprasert S, Lim HY, Sukeepaisarnjaroen W, Yang T-S, Wu C-C, et al. Randomized, open-label phase 2 study comparing frontline dovitinib versus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2016;64(3):774–84. doi: 10.1002/hep.28600. PubMed PMID: 27082062.
311. Gordan JD, Kennedy EB, Abou-Alfa GK, Beg MS, Brower ST, Gade TP, et al. Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2020;38(36):4317–45. doi: 10.1200/JCO.20.02672. PubMed PMID: 33197225.
312. Hu Y, Qin T, Li S, Zhang T, Xue J. Efficacy and Safety of SBRT Combined With Camrelizumab and Apatinib in HCC Patients With PVTT: Study Protocol of a Randomized Controlled Trial. *Front Oncol.* 2020;10:1589. doi: 10.3389/fonc.2020.01589. PubMed PMID: 32984021.

313. Lee D-W, Cho EJ, Lee J-H, Yu SJ, Kim YJ, Yoon J-H, et al. Phase II Study of Avelumab in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Previously Treated with Sorafenib. *Clin Cancer Res.* 2021;27(3):713–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3094. PubMed PMID: 33139266.
314. Ren Z, Xu J, Bai Y, Xu A, Cang S, Du C, et al. Sintilimab plus a bevacizumab biosimilar (IBI305) versus sorafenib in unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENT-32): A randomised, open-label, phase 2–3 study. *The Lancet Oncology.* 2021;22(7):977–90. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00252-7.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Müller-Schilling, für ihre unermüdlichen Bemühungen um ihre Doktoranden. Durch ihre große Begeisterung für Medizin und Forschung und ihren Ideenreichtum in der Betreuung dieser Arbeit hat sie den Grundstein für die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit dem hier bearbeiteten Thema gelegt. Daher danke ich ihr nicht nur für die Vergabe dieses Dissertationsthemas und die Möglichkeit, dieses in einem außerordentlich kollegialen Team zu behandeln, sondern auch für ihre steten Bestrebungen und ihren Eifer, die Arbeit durch neue Impulse voranzutreiben. Ich danke vor allem auch für die Unterstützung und Supervision bei der Bewerbung um das Promotionsstipendium der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg, das mir eine Verlängerung meiner experimentellen Tätigkeit unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Müller-Schilling ermöglicht hat. Durch ihr unermüdliches Engagement und ihren Einsatz bei der Erstellung und Bearbeitung von Abstracts, Postern und Vorträgen hatte ich die Möglichkeit, die Erkenntnisse dieser Arbeit auf zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen. Erstklassig war dabei nicht nur die fachliche und organisatorische Unterstützung bei den Kongressreisen, sondern auch die Betreuung auf den Veranstaltungen selbst. Diese außergewöhnliche, hervorragende Förderung hat mir bedeutende Erfahrungen über die Erstellung dieser Arbeit hinaus für meinen weiteren persönlichen und fachlichen Werdegang ermöglicht.

Weiterhin möchte ich Frau PD Dr. Claudia Kunst für die Betreuung im Labor und die Korrektur dieser Arbeit danken. Ihr offenes Ohr, ihre Unterstützung in der Versuchsplanung und (statistischen) Auswertung und in der Erstellung von Abstracts, Postern und Berichten haben maßgeblich zum Gelingen beigetragen. Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. Karsten Gülow, der mich bei der Strukturierung meiner Daten, der kritischen Auseinandersetzung mit den Ergebnissen und ihrer Aufarbeitung unterstützt hat.

Für die Bereitschaft, mir tagtäglich mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, sowie für das menschliche Miteinander danke ich dem gesamten Team im Labor: Dr. rer. physiol. Marika Haderer, Kirstin Pollinger, Heidi Gschwendtner und Martina Meisinger. Mein besonderer Dank gilt dabei vor allem auch Elisabeth Aschenbrenner für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Manuela Gunckel für die Hilfe bei der Bewältigung und Auswertung der zahlreichen qRT-PCRs.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. Sophie Schlosser für die Organisation der Kongressreisen, für die fachliche und menschliche Betreuung und Hilfestellung während der Veranstaltungen und für den Feinschliff der vorliegenden Arbeit durch ihre Korrektur.

Für die Vergabe des Promotionsstipendiums danke ich der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg.

Dankbar bin ich auch meinem Partner Florian Reitemann, der mich während meiner experimentellen Tätigkeit und der Erstellung dieser Arbeit immer unterstützt hat. Sein offenes Ohr, seine außerordentliche Geduld, sein Rat und sein Verständnis zur rechten Zeit und nicht zuletzt seine hervorragenden Software-Kenntnisse haben mir die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit deutlich erleichtert.

Zuletzt möchte ich es nicht versäumen, meiner Familie für ihren ausdauernden Beistand in allen Lebenslagen meinen Dank auszusprechen. Ihre stete Unterstützung und Förderung haben mir den Weg zu meinen Zielen geebnet. Nicht nur während meines Studiums und der Erarbeitung dieser Dissertation, sondern auch in allen anderen Bereichen meines Lebens konnte ich immer auf den bedingungslosen Rückhalt und Zuspruch meiner Eltern zählen. Ohne die Bereitschaft meiner Eltern und meiner Schwestern Katharina und Anja, mir immer unterstützend zur Seite zu stehen, ohne ihren Rat, ihr großes Verständnis, ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und unendliche Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich bin sehr dankbar für diese außerordentliche und allgegenwärtige Unterstützung, auf die immer Verlass ist.

Ohne das Zutun so vieler Menschen auf ganz unterschiedliche Art und Weise wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen – dafür möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.