

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Identifizierung von SOD1 als mögliches Zielgen der p53-Familie im HCC

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Großmann

2023

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Identifizierung von SOD1 als mögliches Zielgen der p53 Familie im HCC

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Großmann

2023

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Dirk Hellwig
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Marianne Federlin
Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2023

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern. Liebe Mama, lieber Papa, herzlichen Dank für die bedingungslose Liebe und Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.

1. Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	5
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom	5
1.2	Die p53-Familie	16
1.3	Die Superoxiddismutase 1	28
1.4	Bekannte Zusammenhänge: p53, SOD1, oxidativer Stress und Hepatokarzinogenese	33
1.5	Zielsetzung der Arbeit	36
2	<u>Material und Methoden</u>	38
2.1	Material	38
2.2	Methoden	51
2.3	Statistische Analysen	59
3	<u>Ergebnisse</u>	60
3.1	Die HCC-Zelllinien Huh7 und Hep3B weisen eine mittlere SOD1-Proteinexpression auf	60
3.2	Nachweis der Transduktionseffizienz bei adenoviralen Vektoren	63
3.3	SOD1 ist ein essentielles Protein in der oxidativen Abwehr	65
3.4	Untersuchung der relativen SOD1-RNA-Expression und der SOD1-Proteinsynthese in Huh7-Zellen nach Behandlung mit Antimycin A	74
3.5	Identifikation von mehreren neuen putativen p53-Bindestellen im SOD1-Gen	78
4	<u>Diskussion</u>	82
4.1	SOD1 im HCC: relative Proteinmenge und Bedeutung	83
4.2	Die Induktion von oxidativem Stress in Huh7-Zellen	86
4.3	SOD1 wird auf transkriptionaler und post-translationaler Ebene von p53 reguliert	87
5	<u>Zusammenfassung</u>	89
6	<u>Anhang</u>	91
6.1	Abbildungsverzeichnis	91

6.2	Tabellenverzeichnis	92
7	Literaturverzeichnis	93
8	Abkürzungsverzeichnis	112
9	Selbstständigkeitserklärung	115
10	Danksagung	116

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Die von der International Agency for Research on Cancer (IARC) im Jahr 2020 aktualisierte „Global Cancer Statistics“ stuft das hepatozelluläre Karzinom (HCC) mit 75-85 % als häufigstes primäres Malignom der Leber ein. Im Jahr 2020 wurden 906.000 neue Fälle registriert (1). Das hepatozelluläre Karzinom stellt das weltweit am sechsthäufigsten diagnostizierte Malignom dar. Es kommt bei Männern zwei bis drei Mal häufiger vor als bei Frauen (2). Daher rangiert es bezüglich der Inzidenz bei Männern auf Platz fünf und bei Frauen auf Platz neun im Vergleich zu anderen Tumorentitäten. Die Malignität des HCC wird im Hinblick auf die Mortalität deutlich. Es befindet sich in der Mortalitätsstatistik verglichen mit anderen Malignomen auf Platz zwei bei Männern und auf Platz sechs bei Frauen. Dies zeigt sich auch in einem 5-Jahresüberleben von weniger als 15 % (1). Die geographisch unterschiedliche Prävalenz der Haupt-Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC hat zur Folge, dass sich das Vorkommen des HCC relativ heterogen gestaltet. Dabei treten etwa 72 % der Fälle in Asien, 10 % in Europa, 7,8 % in Afrika, 5,1 % in Nordamerika und 4,6 % in Lateinamerika auf. Aber auch Südostasien verzeichnet ein hohes Vorkommen. Zwischen 2020 und 2040 wird ein Anstieg der HCC-Inzidenz von etwa 47 % erwartet (1), (2), (3).

Die Age-Standardized Incidence Rate (ASIR) zeigt zwischen 1990 und 2015 eine Zunahme von über 100 % in vielen Ländern mit hohem Socio-Demographic Index (SDI), wie zum Beispiel in den Vereinigten Staaten von Amerika, Kanada, Australien und den meisten europäischen Ländern. Im Gegensatz dazu erfuhren Länder mit sehr hohen Inzidenzraten für das HCC, wie China oder Länder im westlichen und östlichen sub-Sahara Raum eine Abnahme der ASIR von über 20 % (4). Diese Entwicklung der Inzidenzraten gründet in einer Veränderung der Risikofaktoren für das HCC. Während in der Vergangenheit die Prävalenz von Hepatitis-B-Virus- (HBV-) Infektionen bzw. Hepatitis-C-Virus- (HCV-) Infektionen die HCC-Inzidenz bestimmten, rücken heute durch die HBV-Immunisierung, das verstärkte HCV-Screening und verbesserte HCV-Behandlungsmöglichkeiten zunehmend nicht-virale Risikofaktoren in den Fokus (3). Insbesondere die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) wird in Zukunft, vor

allem in den Industriestaaten, einen sehr wichtigen HCC-Risikofaktor ausmachen (3), (5).

1.1.2 Ätiologie

In 80 bis 90 % der Fälle entwickelt sich das HCC auf der Grundlage einer Leberzirrhose, weshalb diese den wichtigsten Risikofaktor der Hepatokarzinogenese darstellt, unabhängig von der Ätiologie der Lebererkrankung (3), (6), (7). Das Risiko der Entstehung eines HCCs aus einer Leberzirrhose variiert zwischen 5 und 30 %, je nach Ätiologie, Stadium der Zirrhose, Region und ethnischer Zugehörigkeit. Im Vergleich der Geschlechter weisen Männer grundsätzlich ein höheres Risiko für die HCC-Entwicklung auf. Das liegt zum einen daran, dass sie eine höhere Inzidenz für die virale Hepatitis und die Alkohol-induzierte Leberzirrhose aufweisen. Zum anderen ist ihre Viruslast bei HBV-Infektionen größer und hohe Testosteronspiegel im Blut scheinen die HCC Entstehung zu begünstigen (8). Die HBV-Infektion ist weltweit die häufigste Ursache für die Entstehung des HCC (33 %) und die damit verbundenen Todesfälle. Es folgen der Alkoholabusus (30 %) und die HCV-Infektion (21 %) als zweit- und dritthäufigste Gründe. Die Verteilung der Ursachen variiert jedoch stark in verschiedenen Regionen der Welt. Während in Afrika und Ostasien das HCC meist basierend auf einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus entsteht (60 %), ist der Anteil in der westlichen Welt deutlich geringer (20 %). Hier sind hingegen das Hepatitis-C-Virus, Alkohol-Fehlgebrauch und die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) führend. Da noch kein HCV-Impfstoff zur Verfügung steht, kann nur mithilfe von antiviraler Therapie und konsequenter Überwachung die HCC-Inzidenz gesenkt werden (3).

Einen weiteren Risikofaktor stellt der chronische Alkohol-Fehlgebrauch dar. Beim Abbau des Alkohols in der Leber entstehen toxische Nebenprodukte. Diese reduzieren über die kontinuierliche Induktion von oxidativem Stress das Überleben der Hepatozyten, was langfristig zu einer Leberzirrhose durch Ersatz von funktionalem Lebergewebe durch Fasergewebe führt. Das Risiko für die HCC-Entstehung ist bei chronischem Alkoholabusus und hieraus resultierender Leberzirrhose verdoppelt und steht in Europa und den USA an Position zwei der am meisten verbreiteten Risikofaktoren für das HCC (2), (9), (10).

Während die Inzidenz der HBV-Infektion aufgrund der vorhandenen Möglichkeit der Immunisierung durch einen Impfstoff rückläufig ist (2), werden nicht-virale Ursachen für die HCC-Entstehung immer bedeutender (11). Allen voran ist die NAFLD ein Krankheitsbild, das sich mit einer geschätzten Prävalenz von 24 % weltweit zu einem Hauptfaktor für die Entstehung des HCC entwickelt. Die Inzidenzraten der NAFLD in den Industriestaaten steigen stetig an (12), (13). Es handelt sich bei der NAFLD um einen Überbegriff für die Steatosis hepatis mit Fetteinlagerung in die Hepatozyten, die nichtalkoholische Steatosis hepatitis (NASH) mit einer nekrotisch-entzündlichen Komponente, sowie deren Folgeerkrankungen. Zu diesen zählt neben der NASH-Leberzirrhose auch das HCC (2). Per Definition liegt bei einer NAFLD kein stark erhöhter Alkoholkonsum vor (<20 g/Tag bei Frauen, <30 g/Tag bei Männern) (14). Die Grundlage für den überaus deutlichen Anstieg dieses Krankheitsbildes bildet eine allgemeine Veränderung des Lebensstils. Eine kalorienvermehrte und sitzende Lebensweise führt zu einer globalen Epidemie der Adipositas (15). Diese ist ein Risikofaktor für das metabolische Syndrom, welches sich in der Leber durch vermehrte Einlagerung von Triglyceriden als NAFLD manifestiert (12). Als Folge liegt bei 75-100 % der adipösen Bevölkerung eine NAFLD vor (16). Die zunehmende Verbreitung von Diabetes mellitus Typ 2 trägt ebenfalls zum rasanten Anstieg der NAFLD-Inzidenz bei (13). Unabhängig davon ist im Allgemeinen durch die anhaltende Produktion von oxidativem Stress und damit verbundener hepatischer Inflammation das Risiko für die HCC-Entstehung bei Diabetes Typ 2-Patient:innen um das Doppelte bis Dreifache erhöht (10). Je nach Einfluss der Risikofaktoren wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 2, Gewichtszunahme oder Bluthochdruck kommt es bei ca. 10-30 % der NAFLD-Patient:innen zur Progression zur NASH. Die sich auf Grundlage der NASH entwickelnde Leberzirrhose geht mit einem erhöhten Risiko (2,6-12,8 %) für die HCC-Entstehung einher (Abbildung 1). Laut mehreren Querschnittsstudien ist mit über einem Viertel der HCC in NASH-Patient:innen ein steigender Anteil zu verzeichnen, der ohne vorhandene Leberzirrhose diagnostiziert wird (3), (17).

Aflatoxine sind natürliche Mykotoxine mit stark hepatokarzinogener Wirkung, die viele Arten von Grundgetreide und Ölsaaten kontaminieren (10). Sie werden vor allem von den zu der Gattung *Aspergillus* gehörenden Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* produziert (9). Im Zusammenhang mit der HCC-Karzinogenese stellt das Aflatoxin B1 (AFB1) das wichtigste Aflatoxin dar. Während die Belastung in

westlichen Ländern gering ist, herrschen vor allem im Sub-Sahara Raum durch unzureichende Nachernteverarbeitung hohe Belastungen vor. Dem AFB1-induzierten HCC liegen eine Reihe chemischer Umwandlungen zugrunde, bei welchen AFB1 nachweislich in mutagene oder karzinogene Verbindungen überführt wird (Aflatoxin-B1 → Aflatoxin-B1-8,9-Exo-Epoxid → 8,9-Dihydroxy-8-(N7)-Guanyl-9-hydroxy-Aflatoxin-B1-Addukt → Aflatoxin-B1-Formaminopyrimidin-Addukt). Diese chemischen Verbindungen können direkt eine Mutation am Codon 249 des Tumorsuppressorgens p53 hervorrufen, wodurch dessen tumorsuppressive Wirkung aufgehoben wird. Es ist zudem eine starke Interaktion zwischen HBV und Aflatoxin Exposition beschrieben, bei der es durch die HBV-Infektion zu einer Aktivierung der inaktiven Form von AFB1 in eine mutagene Form kommt (9).

Auf genetischer Ebene scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Tumor Nekrose Faktor-308 G/A Polymorphismus und einem erhöhten HCC-Risiko zu geben (18). Außerdem wirken sich Variationen in den Genen der Glutathion-S-Transferasen *GSTM1* und *GSTT1* durch Produktion nicht funktionierender „Null-Produkte“ förderlich auf die HCC-Entstehung aus (19). Im Jahr 2022 wurden die akute intermittierende Porphyrie, Glykogenspeichererkrankungen, Morbus Gaucher und Tyrosinämie Typ I als Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC in der S3-Leitlinie der AWMF ergänzt.

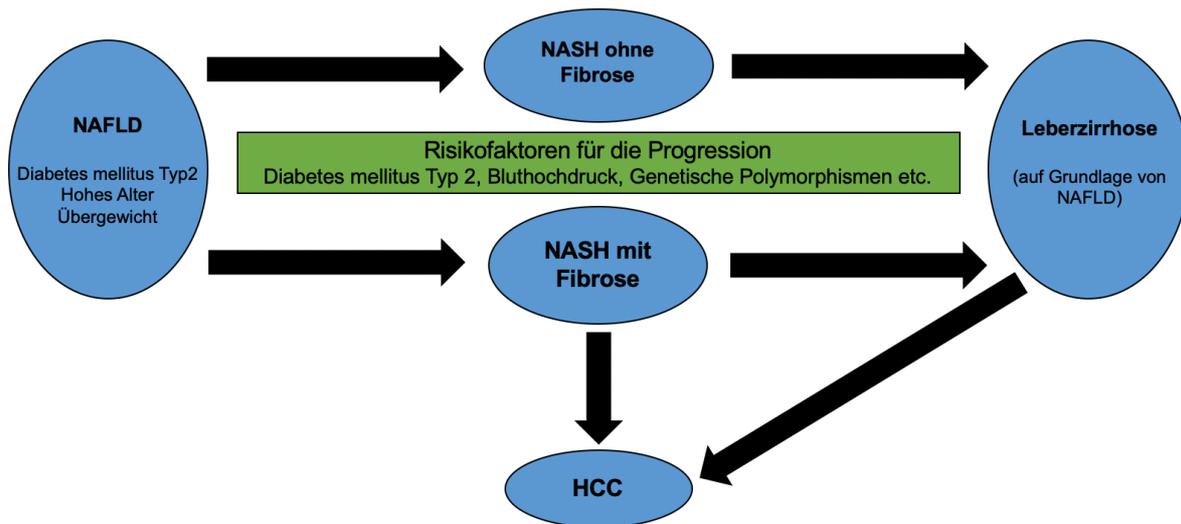


Abbildung 1: Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) kann unter Einfluss bestimmter Risikofaktoren zur Steatosis hepatitis (NASH) fortschreiten. Zu den Folgeerkrankungen zählen die Leberzirrhose und das Hepatozelluläre Karzinom (HCC). (modifiziert nach Bertot et al. (20))

1.1.3 Therapieoptionen für das HCC

Die Behandlung des HCC folgt einer interdisziplinären Entscheidungsfindung (10). Die therapeutischen Strategien berücksichtigen den HCC-Tumorstatus nach BCLC-Kriterien bei Therapiebeginn, die Leberfunktion sowie das Fortschreiten des Tumors unter Behandlung oder Unverträglichkeiten bzw. Nebenwirkungen einer aktuellen Behandlung („treatment stagemigration“) (21).

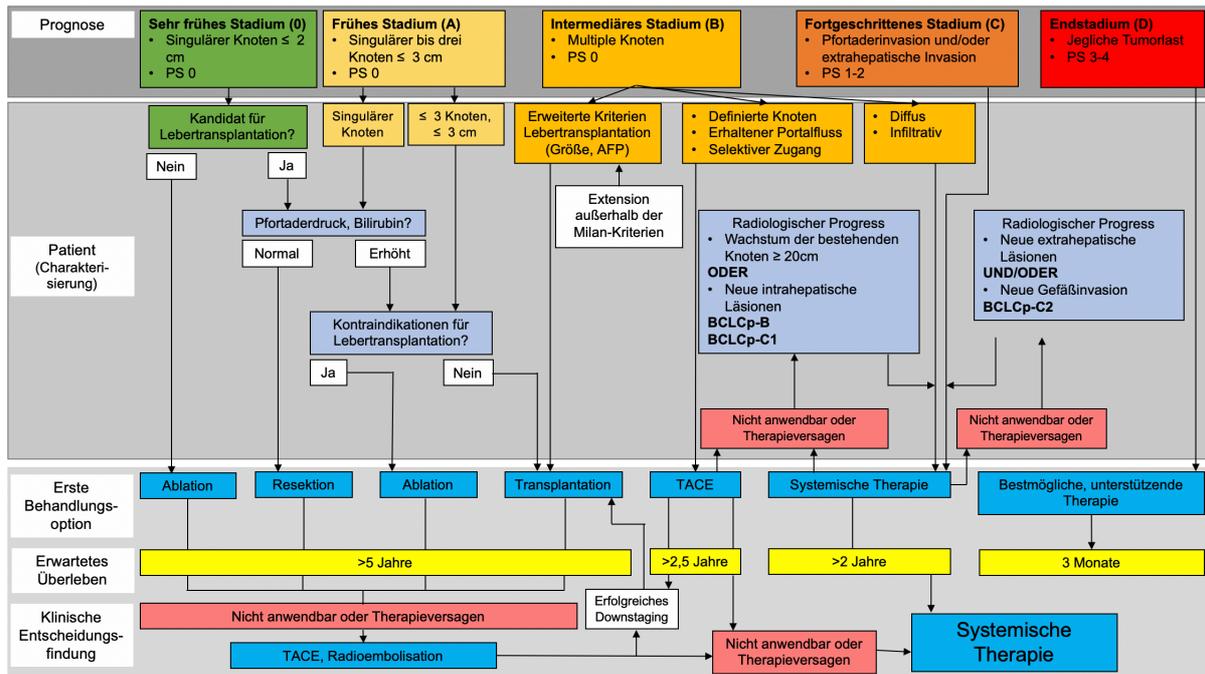


Abbildung 2: Modifiziertes BCLC Staging System und Behandlungsstrategie

Die BCLC Klassifikation gibt Therapieempfehlungen basierend auf Tumor Stadium und Leberfunktion von HCC-Patient:innen. Die Prognose wird in fünf Stadien eingeteilt und richtet sich nach Tumorlast, Leberfunktion und Performance Status (PS) des Patienten. Das BCLC Staging System inkludiert auch das erwartete Überleben. Es sind zudem neue Arbeitsabläufe während der radiologischen Progression zwischen den Stadien enthalten (BCLCp-B, BCLCp-C1, BCLCp-C2).

Abkürzungen: PS= Performance Status nach ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group): Klassifikation des allgemeinen Gesundheitszustandes/Symptome, TACE (Transarterielle Chemoembolisation); modifiziert nach Tümen et al. (21), (22), (23).

Chirurgische Resektion sowie lokale, ablativ Therapien einschließlich Radiofrequenzablation (RFA) und Mikrowellenablation (MWA) sind etablierte therapeutische Optionen im BCLC-Stadium 0 und BCLC-Stadium A, wobei die Leberfunktion des Patienten erhalten bleiben muss. Eine RFA bei Tumorknoten <2 cm bietet die gleichen Überlebensraten wie die chirurgische Resektion. Für Patient:innen mit Tumorknoten zwischen 2 und 4 cm wird die MWA empfohlen, da sie deutlicher Zelltod (Nekrose) induziert (21).

1.1.3.1 Transarterielle Chemoembolisation (TACE) bei BCLC Stadium B

Beim HCC im mittleren Stadium, klassifiziert als BCLC-Stadium B, ist die transarterielle Chemoembolisation (TACE) die Standardbehandlung. Dieser Ansatz stützt sich auf die europäischen und amerikanischen Leitlinien (24), (25). Die TACE kann auch bei

HCC im Frühstadium (BCLC-Stadium A) als Überbrückungstherapie zur Lebertransplantation eingesetzt werden (26), (27).

Es wird zwischen zwei Techniken der Embolisation unterschieden. Die konventionelle TACE (cTACE), bei der Lipiodol als Trägermedium verwendet wird, und die DEB-TACE, bei der arzneimittelfreisetzende Beads (DEB) eingesetzt werden. Die am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika für die TACE zur Behandlung des HCC sind Doxorubicin, Epirubicin, Mitomycin C und Cisplatin (28).

Konventionelle TACE (cTACE):

Das Ziel der cTACE ist eine hypoxische Schädigung der Tumorzellen durch Injektion einer Mischung aus Lipiodol und zytotoxischen Chemotherapeutika. Lipiodol wurde erstmals zur Behandlung von HCC mit markiertem Jod-131 eingesetzt (29). Bei intraarterieller Verabreichung wurde gezeigt, dass das jodierte Lipiodol selektiv im Tumorgewebe zurückgehalten wird. Es wird diskutiert, dass Lipiodol durch einen Membrantransporter in HCC-Krebszellen gelangt. Nach dem Transfer in die intrazelluläre Matrix wird der Transportmechanismus durch Hypoxie deaktiviert, sodass Lipiodol und das zytotoxische Chemotherapeutikum in den hepatozellulären Tumorzellen verbleiben (30).

Drug-Eluting-Bead TACE (DEB-TACE):

DEB-TACE ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Verabreichung einer Kombination von Wirkstoffen zur Embolisation und zytotoxischer Chemotherapie (z.B. Doxorubicin, Epirubicin). Das Chemotherapeutikum wird in Mikrobeads geladen, aus denen es langsam freigesetzt wird. Die Wirkung der zytotoxischen Komponente beruht auf der Wirkstofffreisetzung in den distalen Arteriolen. Die weitere Verteilung erfolgt durch Diffusion oder Konvektion (31).

Kombination von TACE und Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI)

Es gibt Daten, die für eine additive oder synergistische Wirkungen von TACE und systemischer Therapie sprechen. Die Signale für die Wirksamkeit einer Kombination von TACE und TKI stammen aus der TACTICS-Studie. In dieser Studie zeigte TACE plus Sorafenib eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu TACE allein (25,2 Monate vs. 13,5 Monate) (32). Im Gegensatz zum progressionsfreien Überleben zeigte die Analyse des medianen Gesamtüberlebens

keine Unterschiede zwischen TACE plus Sorafenib und TACE allein (36,2 Monate vs. 30,8 Monate; Hazard Ratio 0,861; $p = 0.40$).

Kombination von TACE und Immuntherapie

Derzeit werden mehrere Studien durchgeführt, die sich hauptsächlich mit der Kombination von TACE mit Immuntherapie befassen. Die Kombination von TACE und Tremelimumab (anti-CTLA-4) zeigte günstige Ergebnisse, mit einer Teilansprechrate von 26 % und einem Gesamtüberleben von 12,3 Monaten (NCT01853618) (33).

Eine Phase-III-Studie zur Kombinationstherapie mit TACE plus Durvalumab (anti-PD-1L) und/oder Bevacizumab (anti-VEGF) (EMERALD-1-Studie) wird derzeit durchgeführt (NCT03937830). Eine doppelte Immun-Checkpoint-Hemmung wird in einer laufenden Phase-II-Studie zur CTLA-4/PD-L1-Blockade mit Durvalumab anti-PD-1L) und Tremelimumab (anti-CTLA-4) nach TACE untersucht (NCT03638141). TACE-3 ist eine randomisierte Phase II/III-Studie mit Nivolumab (anti-PD-1) in Kombination mit TACE bei Patient:innen mit HCC im mittleren Stadium (NCT04268888).

In der klinischen Phase I/II-Studie PETAL wird die Kombination von TACE und Pembrolizumab (anti-PD-1) untersucht (NCT03397654). CheckMate74W ist eine Phase-III-Studie, in der die Kombination von Nivolumab (anti-PD-1) plus Ipilimumab (anti-CTLA-4) in Verbindung mit TACE untersucht wird (NCT04340193). Eine weitere Studie ist die deutsche Phase-II-Studie IMMUTACE (NCT03572582), in der die Auswirkungen von TACE in Kombination mit Nivolumab (anti-PD-1) bei HCC im mittleren Stadium untersucht werden. IMMUTACE hat ihren primären Endpunkt (Gesamtansprechrate) erreicht und die Wirksamkeit der Kombinationstherapie bei HCC im mittleren Stadium nachgewiesen. Weitere Daten zu den sehr wichtigen sekundären Endpunkten wie Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben müssen noch abgewartet werden. Weitere randomisierte klinische Studien der Phase III sind notwendig, um den Nutzen der Kombination von TACE und Immuntherapie in der aktuellen Therapielandschaft zu bewerten (21), (33), (34), (35).

Aufgrund der höheren Ansprechraten der modernen Systemtherapie wird in den klinischen Leitlinien empfohlen, frühzeitig von der TACE auf ein systemisches Therapieschema umzusteigen, wenn der/die Patient:in progredient unter einer TACE-Therapie ist. Grundsätzlich wird in den Behandlungsleitlinien empfohlen, dass die

Indikation für die Fortsetzung der TACE nach zwei Behandlungszyklen von einem multidisziplinären Tumorboard überprüft werden sollte (21).

1.1.3.2 Lokoregionäre Behandlungsmöglichkeiten

Eine weitere potenziell kurative Behandlungsoption für das HCC im Frühstadium ist die perkutane, lokale Ablation, die in Form der RFA oder der MWA durchgeführt werden soll (10). In der Regel wird die minimalinvasive, perkutane Herangehensweise gewählt. In Fällen mit erschwerter anatomischer Zugänglichkeit zur Läsion kann ein laparoskopisches oder offenes Vorgehen durchgeführt werden (6), (24).

Das lokoregionäre Standardverfahren ist die RFA. Ihre Durchführung ist bei HCC mit einem maximalen Durchmesser von 3 cm indiziert, wenn die Lokalisation des HCC für die Resektion ungünstig ist (6). Das Prinzip der Ablation beruht auf der lokalen Erzeugung von hochfrequentem Wechselstrom, der durch die entstehende Hyperthermie zu einer Koagulationsnekrose des Tumorgewebes führt (24).

Bei nicht resektablem HCC mit der Hauptindikation im BCLC-Stadium B ohne kurative Therapieoption wird am häufigsten die Transarterielle Chemoembolisation (TACE) eingesetzt. Eine weitere Indikation für den Einsatz der TACE ist vor der Thermoablation/RFA bei einem HCC-Herd größer als 3, aber kleiner als 5 cm bei erhaltener Leberfunktion. Der synergistische Effekt dieser beiden Methoden wird genutzt um die bei dieser Tumorgroße vermehrt vorkommende periläsionale Tumorausssaat durch größeren Sicherheitsabstand zu kontrollieren.

Die Transarterielle Embolisation (TAE) nutzt ausschließlich die Embolisation, da es Hinweise gibt, dass diese den Großteil des antitumorösen Effekts ausmacht. Zum Eingang in die klinische Praxis muss die Datenlage jedoch noch durch weitere Studien untermauert werden (10).

Eine weitere transarterielle Therapieform, die zur primären Behandlung nicht resektabler HCC verwendet wird, ist die Transarterielle Radioembolisation (TARE) oder auch Selektive Interne Radiotherapie (SIRT) (6), (10). Bei dieser Methode reichern sich radioaktive Mikrosphären durch die Hypervaskularisation vornehmlich im Tumorgebiet an. Sie emittieren dort Yttrium-90-Isotope, was ohne Verursachung einer Ischämie zu einer höheren lokalen Strahlenapplikation im Vergleich zur externen Radiotherapie führt. Die Indikationsstellung wurde durch erfolgreiche Anwendung im

BCLC-Stadium C und als palliative Therapie bei großen Tumoren erweitert. Auch wenn die TARE als komplikationsärmste Embolisierungstechnik identifiziert worden ist, haben sich bisher verglichen zur TACE und der systemischen Behandlung keine Vorteile im Gesamtüberleben gezeigt (6), (10), (36).

1.1.3.3 Systemtherapie

Die HCC-Diagnose erfolgt bei einem Großteil der betroffenen Personen oft erst im fortgeschrittenen Stadium (37).

Das HCC ist eines der chemoresistentesten Malignome, weshalb eine Chemotherapie sowohl als Einzelwirkstofftherapie, als auch in Kombination keine Wirksamkeit zeigte. Als Folge des verbesserten Verständnisses der Karzinogenese des HCC haben sich mit der zielgerichteten Immuntherapie vielversprechende Ansätze zur HCC-Therapie eröffnet (38). Die dauerhafte Antigenexposition in der Leber durch das Pfortadersystem und die mit der Zirrhose vergesellschaftete Dysfunktion des Immunsystems führen zur Entstehung eines immunsuppressiven intratumoralen Milieus. Dieses Phänomen der Immunevasion macht das HCC zu einem therapeutischen Ziel für die Immuntherapie und speziell für Immuncheckpoint Inhibitoren (39).

Nach der deutschen S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome vom Juli 2022 (6) soll den HCC-Patient:innen im Child-Pugh-Stadium A und BCLC B oder C, mit Fernmetastasen oder einer Tumorlokalisation, die lokoregionär nicht kontrolliert oder reseziert werden kann, als Erstlinientherapie eine Kombination von Atezolizumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen PD-L1) und Bevacizumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF) angeboten werden. Patient:innen mit einer Kontraindikation für eine Immuntherapie soll eine Erstlinientherapie mit einem der beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Lenvatinib oder Sorafenib angeboten werden. Wenn bei HCC-Patient:innen Atezolizumab/Bevacizumab nicht angewandt werden kann und ein Tumorprogress unter der Therapie mit Sorafenib/Levatinib vorliegt, soll eine weitere Systemtherapie angeboten werden. Hierfür stehen die beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Regorafenib und Cabozantinib oder bei einem Alpha-Fetoprotein-Wert von ≥ 400 ng/ml der

VEGFR2-Antikörper Ramucirumab (neutralisierender, humanisierter Antikörper) zur Verfügung. Die Therapieoptionen sind immer noch begrenzt und Resistenzen erschweren eine erfolgreiche Behandlung. Eine neue Phase III Studie (NCT03298451; HIMALAYA), in der Durvalumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen PD-L1) und Tremelimumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4) zur Anwendung kommen, zeigte ein erhöhtes Gesamtüberleben in der Erstlinientherapie im Vergleich zu Sorafenib. Diese Kombinationsbehandlung ist momentan noch nicht in die aktuelle S3-Leitlinie integriert. Im Ausblick auf zukünftige Fortschritte in der HCC-Therapie werden derzeit Kombinationstherapien von Immuncheckpoint-Inhibitoren mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, lokoregionären oder transarteriellen Verfahren untersucht (40). Außerdem befinden sich Peptid-Impfstoffe und onkolytische Viren in verschiedenen Stadien klinischer Studien (41).

Die durchschnittliche Lebenserwartung von drei bis vier Monaten im BCLC-Stadium D resultiert in der bestmöglichen, unterstützenden Behandlung. Diese umfasst die Schmerztherapie, psychologische Betreuung und die Ernährungsberatung (24). Die Abbildung 3 zeigt den Ablauf der HCC-Therapie.

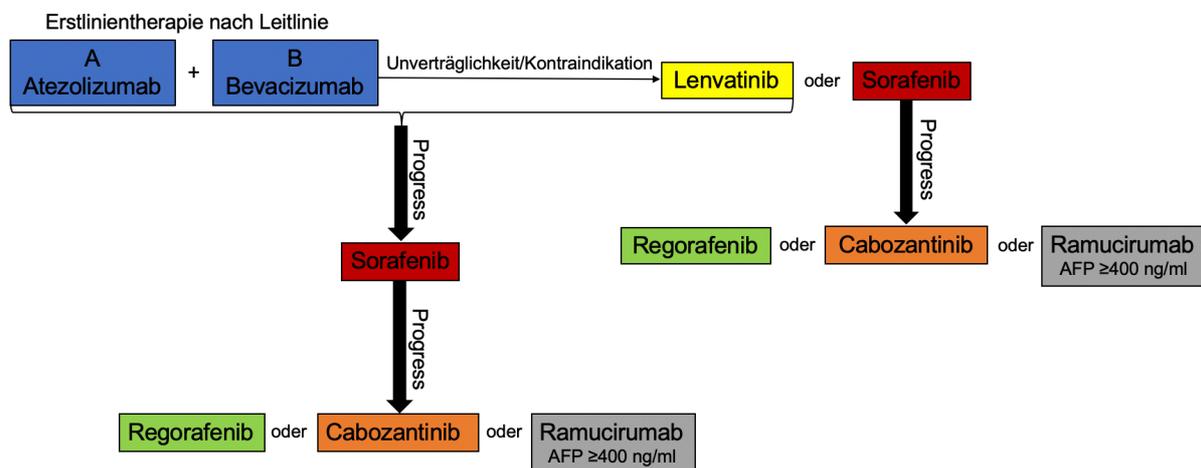


Abbildung 3: Die HCC-Therapie

Die S3-Leitlinie sieht als Erstlinientherapie für die Systemtherapie des HCC die monoklonalen Antikörper Atezolizumab und Bevacizumab vor. Bei Unverträglichkeit oder Kontraindikation wird die Therapie mit Lenvatinib oder Sorafenib durchgeführt. Kommt es zum Progress unter Atezolizumab und Bevacizumab, soll auf Sorafenib gewechselt werden. Im Fall eines weiteren Fortschreitens der Erkrankung werden Cabozantinib, Regorafenib oder Ramucirumab eingesetzt (6).

1.2 Die p53-Familie

Die dargestellten Aspekte zur HCC-Therapie legen nahe, dass sich durch Fortschritte im molekularbiologischen Verständnis der HCC-Karzinogenese neue Behandlungsoptionen ergeben. Die p53-Familie stellt einen essentiellen Ansatzpunkt in der molekularen Krebstherapie dar (42), (43), (44), (45), (46), (47). p53 wird auch als „guardian of the genome“ bezeichnet und wirkt unter anderem als Transkriptionsfaktor. p53 wird durch zellulären Stress wie ionisierende Strahlung, Hypoxie oder oxidativen Stress induziert. Nach der Aktivierung übernimmt p53 unter anderem wichtige Funktionen in der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptoseinduktion und der DNA-Reparatur (46), (47), (48), (49), (50), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (57), (58), (59), (60), (61), (62), (63), (64), (65), (66), (67), (68), (69), (70), (71). Komplettiert wird die p53-Familie durch die zu p53 strukturell homologen Proteine p63 und p73, die sowohl ähnliche Funktionen wie p53 ausführen, aber auch davon verschiedene Aufgaben erfüllen (70).

1.2.1 Gen- und Proteinstruktur der p53-Familie

Aus phylogenetischer Sicht leiten sich die drei Familienmitglieder von einem gemeinsamen „Ur-Gen“ ab. In chronologischer Reihenfolge existierte zuerst p63, gefolgt von p73 und schließlich p53. Das 1979 entdeckte humane *TP53*-Gen umfasst elf Exons und befindet sich auf Chromosom 17 (17p13.1) (72), (73). Die mit *TP53* verwandten Gene *TP63* und *TP73* wurden erst 1997 entdeckt. Sie bestehen aus jeweils 15 Exons und sind auf dem kurzen Arm von Chromosom drei (3q27) bzw. dem langen Arm von Chromosom eins (1p36.3) lokalisiert (72), (74).

Die Proteinstruktur der drei Familienmitglieder weist mit ihrem modularen Aufbau einen hohen Grad an Ähnlichkeit auf (Abbildung 4). Die Transaktivierungsdomäne (TAD), die DNA-bindende Domäne (DBD) und die Oligomerisierungsdomäne (OLD) sind die drei Hauptdomänen (72). Sie sind hochkonserviert (68), (73), (75).

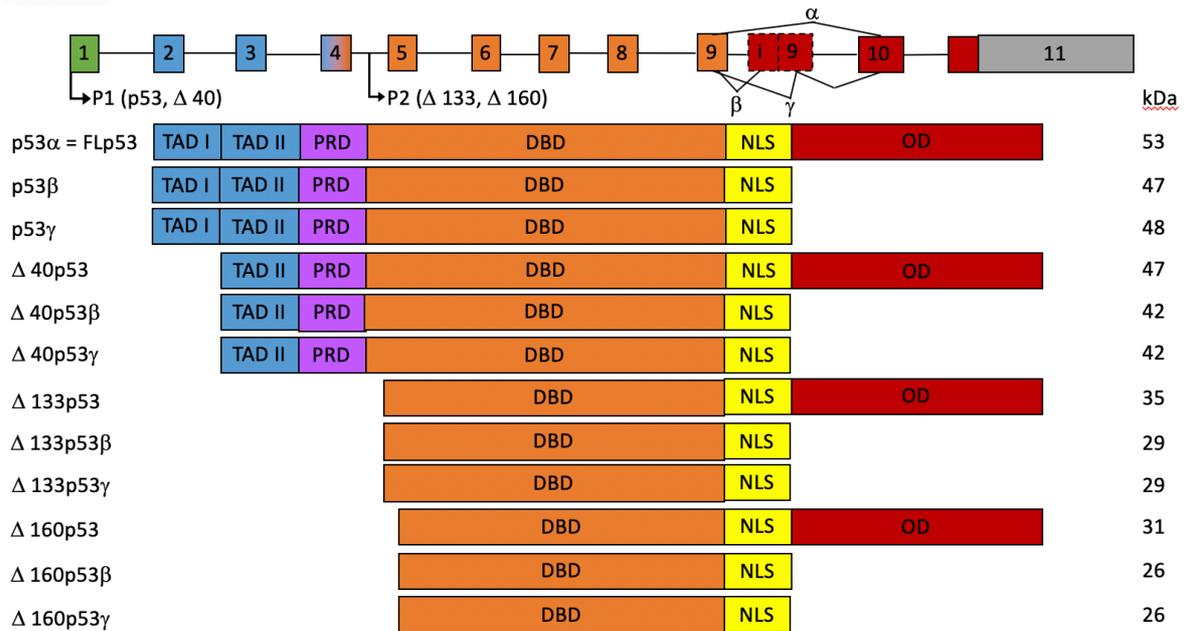


Abbildung 4: p53 Gen- bzw. Proteinstruktur

p53 ist in Bezug auf seine Gen- bzw. Proteinstruktur modular aufgebaut. Durch den Einsatz zwei verschiedener Promotoren bei der Transkription, multiples Splicen und die alternative Initiation der Translation werden insgesamt zwölf Isoformen von p53 generiert (p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53, Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53, Δ 160p53 β , Δ 160p53 γ), (modifiziert nach Surget et al. 2014 (75), Bourdon et al. 2007 (76), Marcel et al. 2010 (77))

p53 hat eine molekulare Masse von 53 kDa. Es setzt sich aus 393 Aminosäuren zusammen, die in vier identischen Untereinheiten zu einem sogenannten Homooligomer organisiert sind (78). Die modulare Struktur wird aus sechs Domänen gebildet.

Am N-Terminus befindet sich zunächst die TAD, die sich aus den nicht äquivalenten Untereinheiten TAD I und TAD II zusammensetzt. Sie interagieren mit verschiedenen Proteinen und sorgen für die Vermittlung der DNA-Bindung. Als nächstes folgt in Richtung C-Terminus die Prolin-reiche Domäne (PRD). Mit ihrem Aufbau aus vier Kopien des PXXP-Motivs liegt ihre Aufgabe in der Apoptoseinduktion und Wachstumshemmung. Die zentrale DBD ist entscheidend für die Bindung des Transkriptionsfaktors an kongruente DNA-Abschnitte. Auf die DBD folgt die OLD, deren Zweck der Zusammenschluss von Monomeren zu aktiven Oligomeren ist. Der C-Terminus wird von der „Basic Region“ (BR) gebildet, welche an der Kontrolle der DNA-Bindungsaffinität beteiligt ist. Im Allgemeinen verfestigt sich die ansonsten kreuzförmig offene und am N- bzw. C- Terminus ungeordnete Struktur von p53 erst mit der Bindung an einen DNA-Abschnitt (72), (75), (79). Während die BR bei p63 und

p73 grundsätzlich nicht vorhanden ist, ist bei einigen Isoformen eine Sterile-Alpha-Motiv Domäne (SAMM) für Interaktionen zwischen Proteinen oder eine Transaktivierungs-inhibierende Domäne (TID) eingebaut. Manche Isoformen enthalten auch beide Domänen (51), (72).

Bei allen drei Mitgliedern der p53-Familie ermöglicht der Einsatz zweier verschiedener Promotoren bei der Transkription, multiples Splicen und die alternative Initiation der Translation die Generation mehrerer Isoformen des jeweiligen Proteins. Die unterschiedliche Lokalisation der Promotoren führt zu p53-, p63- und p73-Isoformen mit zwei unterschiedlichen N-terminalen Domänen. Unter Erhalt der kompletten Transaktivierungsdomäne existieren TA-Formen, während diese nach N-terminaler Trunkierung bei den Δ N-Formen vollständig oder teilweise fehlt (46), (76), (80).

Aktuell sind zwölf verschiedene Isoformen von p53 bekannt, die alle durch Verkürzung des „full length“ p53 (FLp53) am N- oder C-Terminus entstehen und daher als trunkierte Isoformen bezeichnet werden (79). Eine Transkription durch den proximalen Promotor P1 ohne N-terminale Trunkierung sowie klassisches oder alternatives Splicen am C-Terminus von p53 resultiert in der p53 α -, p53 β - bzw. p53 γ -Isoform. Die Benennung der N-terminal verkürzten Isoformen impliziert deren Abbruchstelle. Δ 40p53-Isoformen werden von dem upstream von Exon eins gelegenen P1 transkribiert. Ihnen fehlt die TAD1. Noch stärker verkürzt sind die Δ 130 Varianten von p53. Es fehlt neben der TAD1/II auch ein Teil der DBD. Δ 160p53-Isoformen sind am stärksten verkürzt und werden genauso wie die Δ 130p53-Varianten vom internen Promotor (P2) im Intron vier transkribiert. Die mögliche Kombination der α , β , γ - Formen mit Δ 40p53, Δ 130p53 oder Δ 160p53 ergibt zwölf Isoformen (75), (76), (79).

Im Allgemeinen sind Δ N-Formen durch die fehlende TAD nicht in der Lage die Transkription zu aktivieren, woraus sich ihr dominant-negatives Verhalten ergibt, welches genau dieser Transaktivierung entgegenwirkt (81).

1.2.2 Aktivierung und Regulationsmechanismen von p53

Humane Zellen sind oftmals externem und internem genotoxischem Stress ausgesetzt (70). Zu diesen Stressfaktoren gehört neben der DNA-Schädigung, beispielsweise durch UV- oder ionisierende Strahlung, der Applikation zytotoxischer Medikamente wie Chemotherapeutika, auch die Überexpression von Onkogenen oder ein hypoxischer

Zustand (82). Genominstabilität ist ein „Hallmark of cancer“ und schließt strukturelle Aberrationen wie Insertionen oder Deletionen und numerische Anomalien der Chromosomen wie beispielsweise Polyploidie ein (83), (84). Der Transkriptionsfaktor p53 übernimmt beim Schutz der Zelle vor derartigen Schäden des Genoms, die zur Tumorentstehung führen können, eine unentbehrliche Schlüsselfunktion ein (45), (47), (54), (69), (83), (85). Ein Beleg dafür ist das Li-Fraumeni Syndrom, bei dem Keimbahnmutationen von *TP53* zur Entwicklung multipler Tumoren bereits bei jungen Menschen führen (70).

Seine Wirkung entfaltet p53 durch spezifische Bindung an Konsensussequenzen bestehend aus je zwei palindromischen Nukleotidmotiven 5-RRRCWWGYYY-3', wobei R für Purin, Y für Pyrimidin, W für Adenin und Thymin, G für Guanin und C für Cytosin steht. Getrennt werden die beiden Dekanukleotide durch variable Spacer (86). Die intrazellulären Proteinspiegel von p53 werden streng reguliert. Im physiologischen Zustand ist p53 zum Teil kaum nachweisbar (87). Die E3-Ligase MDM2 bildet als direktes p53-Zielgen mit diesem eine negative Feedbackschleife. Zusätzlich zur Bindung und Blockade der Transaktivierungsdomäne fördert MDM2 durch seine Ubiquitinierung die proteosomale Degradation von p53 (50) (Abbildung 5). Bei Aktivierung von p53 durch die oben genannten Stimuli kommt es zu einem starken p53-Anstieg. Dies wird zum einen durch die Hemmung von MDM2 und zum anderen durch extensive posttranslationale Modifizierung von p53 in Form von Acetylierung und Phosphorylierung erreicht (55), (82), (87). Folglich wird die unter physiologischen Bedingungen geltende, relativ kurze Halbwertszeit von 20 min verlängert (70) und p53 akkumuliert zur Ausübung seiner Funktionen im Zellkern (82).

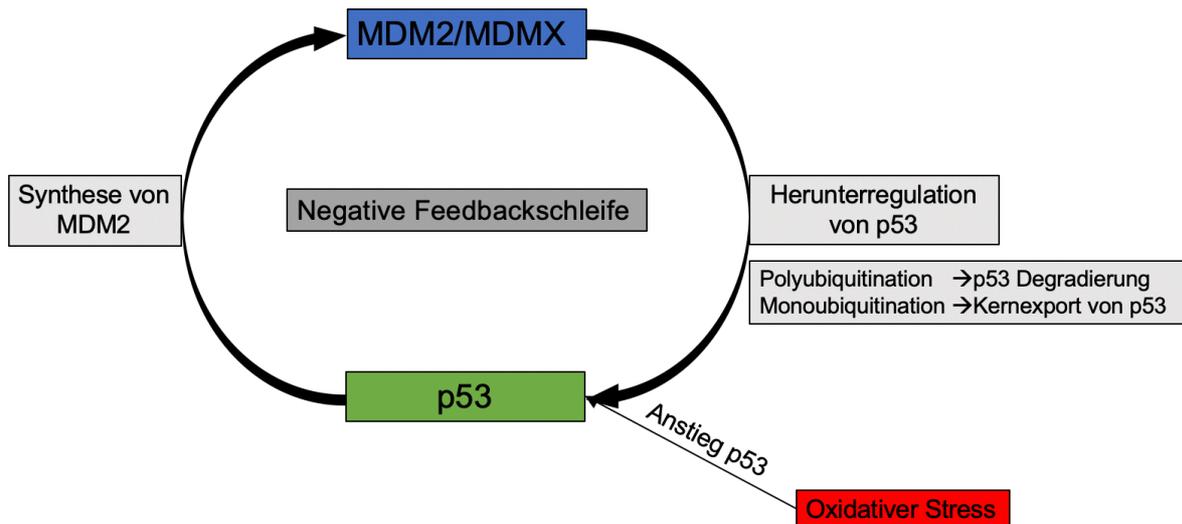


Abbildung 5: Die Regulation von p53

Der Anstieg von p53 wird durch oxidativen Stress initiiert. Bei Anstieg von p53 wird die Synthese von MDM2 gesteigert. MDM2 verursacht eine Herunterregulation von p53. Dieser Ablauf entspricht einer negativen Feedbackschleife (88).

1.2.3 Funktionen von p53

p53 übt zahlreiche Funktionen aus. Die Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Wichtigsten.

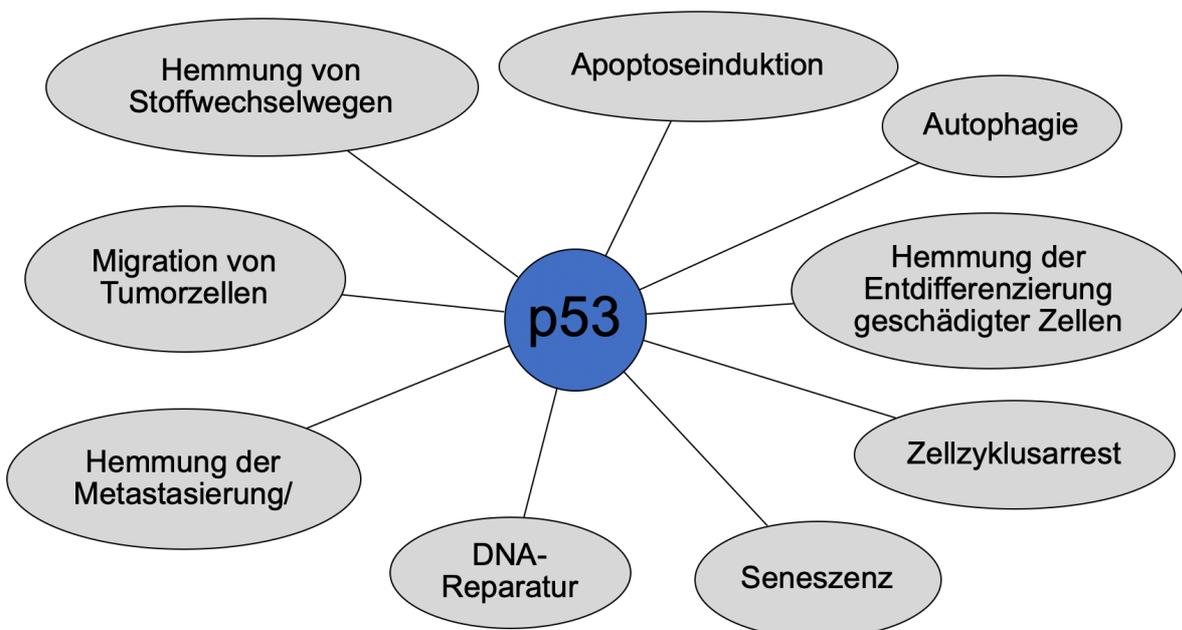


Abbildung 6: Die Funktionen von p53

p53 übt zahlreiche Funktionen aus. Die Abbildung zeigt die wichtigsten Funktionen; modifiziert nach Pflaum et al. (70)

1.2.3.1 Apoptose

Die Apoptoseinduktion ist durch die Eliminierung geschädigter Zellen eine wichtige Funktion der Tumorsuppression. p53 kann seine apoptotischen Funktionen sowohl transkriptionsabhängig, als auch -unabhängig realisieren (48), (49), (50), (51), (53), (54), (55), (58), (59), (60), (61), (62), (70), (89), (90). Bei der Apoptose unterscheidet man einen extrinsischen von einem intrinsischen Weg. In letzterem dominieren die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl2-Proteinfamilie. BAX, PUMA, NOXA, BID und APAF-1 sind Teil der proapoptotischen Untergruppe und gleichzeitig direkte Zielgene von p53. Als Folge des p53-Anstiegs wird das Gleichgewicht in Richtung proapoptotischer Proteine verschoben. Sie wirken an unterschiedlichen Stufen des Permeabilisierungsprozesses der äußeren Mitochondrienmembran mit. Durch diese Porenbildung wird unter anderem Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt, was die Bildung des Apoptosoms fördert. Schließlich werden über die Procaspase 9 weitere Caspasen aktiviert und dadurch der Zelltod induziert (57), (82), (91), (92), (93).

Der extrinsische Weg wird auch Todesrezeptorweg genannt. Dazu gehören der Fas/CD95 oder auch der TNF-related apoptosis-inducing-Rezeptor (TRAIL)-1/2 und der TNF-Rezeptor (48), (49), (82), (92), (94). Diese Rezeptoren aktivieren die Caspase-Kaskade und leiten auf diese Weise die Apoptose ein (91). p53 kann auch transkriptionsunabhängig durch direkte Bindung und Regulation von Bcl-2-Proteinen im Zytoplasma auf oxidativen Stress reagieren (82), (93).

p53 verhält sich bezüglich seiner Funktionalität dichotom. Während es einerseits die Transkription apoptotischer Gene veranlasst, unterstützt es andererseits das Überleben von Zellen. Die Entscheidung über das Schicksal der Zellen basiert auf einem komplexen Prozess. Es fließen Faktoren wie das p53-Expressionsniveau, die Expression der unterschiedlichen p53-Isoformen, die Art des Stresssignals und der zelluläre Kontext zu diesem Zeitpunkt ein. Außerdem spielen der Zelltyp und die unterschiedliche Affinität von p53 zu den Promotoren für Apoptose bzw. Zellzyklusarrest der entsprechenden Zielgene eine entscheidende Rolle (70), (91), (92).

1.2.3.2 Zellzyklusarrest

Der von p53 induzierte Zellzyklusarrest ermöglicht Zeit für die DNA-Reparatur, wodurch geschädigte Zellen dem Zelltod entkommen können. p21 ist eine Cyclin-abhängige Kinase (CDK) und wurde als erstes Zielgen von p53 identifiziert. Sie gilt als primärer Mediator des p53-vermittelten Zellzyklusarrests. Der Induktion von p21 durch p53 folgt die Bindung an Cyclin-CDK-Komplexe. Über mehrere Zwischenschritte kommt es zum Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus. Nach erfolgter DNA-Reparatur kehrt die Zelle wieder in den Zellzyklus zurück (57), (62), (82), (91).

Die Seneszenz ist eine stabile Form des Zellzyklusarrests, die grundsätzlich als irreversibel gilt (62). Nur unter sehr speziellen Bedingungen wie der stabilen Unterdrückung von p53 ist eine Rückkehr in den Zellzyklus möglich. Die replikative Seneszenz beschreibt dabei einen Zustand, in dem das Replikationsvermögen einer Zelle am Ende der zellulären Lebensspanne erschöpft ist. Die mit dem Alterungsprozess der Zelle verbundene Verkürzung der Telomere aktiviert p53, welches wiederum die Seneszenz einleitet. Auch in der onkogen induzierten Seneszenz, nimmt p53 eine zentrale Rolle ein. Die p53-vermittelte Seneszenz ist ein komplexer Mechanismus, der noch nicht vollständig verstanden ist. Es ist jedoch gezeigt, dass p53 ausschlaggebend für die Einleitung der Seneszenz ist und dass dabei verschiedene Signalwege zusammenwirken. Beispielsweise nimmt p53 im Zusammenhang mit von reaktiven Sauerstoffspezies verursachten Schäden eine gewisse Doppelrolle ein. Auf der einen Seite ist p53 in der Lage, nach Aktivierung die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu induzieren und dadurch die Seneszenz hervorzurufen. Es kann sie jedoch auf der anderen Seite durch die Transkriptionsregulation von Antioxidationsgenen unterdrücken (50), (66), (91), (95), (96).

1.2.3.3 DNA-Reparatur

Schäden im Genom fördern die Entstehung von Malignomen. p53 ermöglicht nicht nur durch Zellzyklusarrest Zeit für die hochspezifischen Reparaturmechanismen, sondern greift auch direkt in diese ein. Bei der Nukleotid-Exzisionsreparatur erhöht es die Zellkapazität für Schadenslokalisation und -reparatur durch Aktivierung verschiedener Zielgene. p53 kommen allerdings auch transkriptionsunabhängige Funktionen zu, bei denen die Senkung der Helikaseaktivität und die daraus resultierende verbesserte

Läsionserkennung im Vordergrund steht. Zudem tritt p53 als Modulator der Basen-Exzisionsreparatur auf. Im G₀- und G₁- Stadium des Zellzyklus kann es diesen Reparaturmechanismus aktivieren und dadurch oxidative Basenmodifikationen eliminieren. Auch bei Doppelstrangbrüchen hat p53 sowohl transkriptionsabhängige, als auch -unabhängige reparative Funktionen inne (54), (97).

1.2.3.4 Hemmung von Stoffwechselwegen

Die schnelle Proliferation der Tumorzellen erfordert eine metabolische Anpassung zur Deckung des erhöhten Energiebedarfs. Folglich wird insbesondere die im Gegensatz zur oxidativen Phosphorylierung weniger effiziente Glykolyse induziert, da die Energie schneller zur Verfügung steht. Dieser sogenannte Warburg-Effekt wird im Zuge der metabolischen Reprogrammierung von Onkogenen initiiert. p53 wirkt diesem durch Hemmung der Transkription von Rezeptoren für die Glucose-Aufnahme in die Zelle, sowie unter anderem durch direkte Hemmung von Schlüsselenzymen der Glykolyse entgegen (54), (58).

Die Synthese von Phospholipidmembranen ist für die Tumorprogression essentiell. Daher ist die Fettsäure- und Cholesterinsynthese in Tumorzellen erhöht. p53 wirkt hierbei insofern tumorsuppressiv, als dass es der Fettsäuresynthese durch Hemmung des Pentosephosphatwegs das erforderliche Nicotinamidadenindinukleotidphosphat entzieht und die Fettsäureoxidation fördert. Die Nukleotidsynthese wird von p53 bidirektional beeinflusst. Einerseits erfolgt eine Hemmung durch Unterdrückung des Schlüsselenzyms für die Purinsynthese. Andererseits erleichtert p53 die DNA-Reparatur durch gesteigerte Nukleotidsynthese (54), (60), (98).

1.2.3.5 Hemmung der Metastasierung

Die extrahepatische Metastasierung des HCC kommt bei etwa einem Drittel der Patient:innen vor und ist ein unabhängiger Prädiktor für ein eingeschränktes Überleben (99). p53 inhibiert die Entstehung von Metastasen und die Migration von Tumorzellen (54), (100), (101).

1.2.3.6 Hemmung der Entdifferenzierung von Zellen

Eine weitere Funktion von p53 liegt in der Regulation von Differenzierungs- und Entdifferenzierungsprozessen. Durch direkte Hemmung von Schlüsselproteinen wird die Entdifferenzierung geschädigter Zellen gehemmt und einer Tumorentstehung vorgebeugt (102).

P63 und p73 sind als Mitglieder der p53-Familie in der Lage p53-Zielgene zu aktivieren und dadurch Apoptose, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur auszulösen (103). Neben diesen überlappenden Funktionen führen sie, trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu p53, auch ein anderes Spektrum von Funktionen aus. p63 kommt eine entscheidende Rolle in der epidermalen Entwicklung zu, was dadurch verdeutlicht wird, dass p63-Knock-out-Mäuse ohne Haut zur Welt kommen und nur wenige Tage überlebensfähig sind. Sie weisen auch häufig kraniofaziale Fehlbildungen auf. P63 trägt auch entscheidend zur Entwicklung von Zähnen und Drüsen bei (68). Das p73-Protein hat unterschiedliche Funktionen, vor allem in der neuronalen Entwicklung. Es ist für die Entwicklung bipolarer Neurone im Hippocampus verantwortlich und trägt entscheidend zur Neurogenese bei. Zudem ist das Sozialverhalten von p73-Knock-out-Tieren gestört, was auf Störungen der pheromonalen Signalübertragung aufgrund des Fehlens von p73 zurückzuführen ist (51), (67), (68), (104).

1.2.4 p53 und Karzinogenese

TP53 ist in über 50 % der menschlichen Tumoren durch eine Mutation inaktiviert und stellt damit die häufigste genetische Veränderung in menschlichen Krebsarten dar, (48), (49), (51), (54), (55), (56), (57), (70), (105), (106). Mit etwa 75 % handelt es sich dabei in erster Linie um Missense-Mutationen. Das Vorkommen dieser Genveränderungen wurde in allen kodierenden Exons von p53 nachgewiesen, jedoch zeigt sich eine starke Dominanz in Exon vier bis neun. Dieser Bereich kodiert für die DBD (57), (107), (108). Folglich geht die Fähigkeit zur Erkennung, Bindung und Aktivierung kanonischer p53-Zielsequenzen der DNA verloren. Funktionell bedeutet dies einen Verlust der tumorsuppressiven Funktion des mutierten p53 (42), (59), (109). Man unterscheidet zwei Klassen von Mutanten. Während bei den Kontaktmutanten direkt die mit der DNA interagierenden Aminosäuren betroffen sind, sorgt bei den Konformationsmutanten eine Veränderung der dreidimensionalen Proteinstruktur für den Affinitätsverlust gegenüber den p53-Konsensussequenzen (109), (110).

Es hat sich gezeigt, dass p53-Mutationen nicht nur mit einem Funktionsverlust von p53, sondern auch mit einem Gewinn von zusätzlichen Funktionen einhergehen können. Dieser „gain-of-function“ (GFO) bewirkt eine zum Wildtyp-p53-Protein (wt p53) antagonistische onkogene Aktivität. Neben der Bindung an für mutante p53-Proteine (mt p53) spezifische Response-Elemente als onkogener Transkriptionsfaktor, entfalten die p53-GOF-Mutanten ihre Funktionen auch durch Inhibition oder Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren, sowie durch direkte Interaktion mit Proteinen (50), (110). Mt p53 übt beispielsweise in der heterozygoten Situation eine dominant-negative Funktion auf das verbleibende wt p53 aus (108). Auch p63 und p73 können von mutiertem p53 gebunden und ihre Funktion dadurch antagonisiert werden (110). Das Ergebnis dieses Funktionszugewinns ist im Allgemeinen ein aggressiveres Tumorprofil (109). GOF-Mutanten von p53 fördern dabei im Speziellen die Zellmigration und -invasion, die Angiogenese und die Zellproliferation. Einen weiteren Faktor der onkogenen Aktivität stellt die Verstärkung der Chemoresistenz dar (42), (110).

Neben p53 spielen auch p63 und p73 eine Rolle in der Hepatokarzinogenese (53), (63). Alle p53-Familienmitglieder können aufgrund struktureller Ähnlichkeiten an sehr ähnliche DNA-Motive binden. Folglich überlappen sich auch die Zielgensätze der p53-Familie. Beispielsweise kann p73 einige p53-Zielgene aktivieren oder unterdrücken, die den Zellzyklus oder die Apoptose regulieren (p21, BAX, Fas, BUMA) (54). P73 ist neben dem Zellzyklusarrest auch in der Antwort auf oxidativen Stress von Bedeutung. In der Karzinogenese spielt p73 abhängig von der vorliegenden Isoform eine duale Rolle. Die transkriptionell aktiven (TA)p73-Isoformen verhalten sich während der Karzinogenese proapoptotisch und antionkogen (68), (69), (71). Als Gegenspieler zu TAp73 gilt die dominant negative Isoform Δ Np73, die antiapoptotische und proonkogene Eigenschaften aufweist und als wichtiger prognostischer Faktor in der Hepatokarzinogenese gilt (47), (85). Das Verhältnis von TAp73- und Δ Np73-Isoformen bestimmt die Apoptose und Chemosensitivität und ist in vielen Krebsarten gestört. Δ Np73 ist im Vergleich zu gesundem Lebergewebe im HCC hochreguliert und hemmt die p53-, TAp63 α -, TAp73 β und von Chemotherapeutika vermittelte Apoptose. Folglich fördert Δ Np73 die Tumorprogression und Medikamentenresistenz, was ein schlechteres klinisches Outcome für die Patient:innen zur Folge hat (43), (47), (63), (71).

P63 liegt, ähnlich wie p73, als TAp63-Isoform mit Transaktivierungsdomäne und als N-terminal trunkierte Δ Np63-Isoform vor. Vergleichbar zu p73 wird TAp63 die Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben, während Δ Np63 als Tumorpromotor gilt. TAp63 aktiviert Zielgene der Apoptose. Δ Np63 hemmt TAp63 und damit die Apoptose und fördert folglich die Karzinogenese. Ein Verlust der p63-Funktion geht mit erhöhter Metastasierung einher, wodurch die Rolle von TAp63 als Tumorsuppressor unterstützt wird. Auch in Bezug auf die Chemosensitivität verhalten sich die p63-Isoformen ähnlich zu p73. Während TAp63 die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose unterstützt, korreliert die Expression von Δ Np63 direkt mit reduziertem Therapieansprechen (46), (52), (64), (65), (68), (71), (111).

Zusammenfassend ist der Status des Netzwerks aus p53, p63 und p73 entscheidend für die Prognose und Chemosensitivität des HCC. Dabei stellen die therapeutische Modulation der Verhältnisse von TAp63 und Δ Np63 bzw. TAp73 und Δ Np73 sowie die Neutralisation verschiedener p53-Mutationen und die Wiederherstellung der Aktivität von wt p53 attraktive Ansatzpunkte in der HCC-Therapie dar (42), (46).

1.2.5 p53 und oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht von freien Radikalen bzw. reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und deren reaktiven Metaboliten. Bei Einwirkung über einen längeren Zeitraum, kann es durch oxidativen Zellstress zur Schädigung von Zellstrukturen und -funktionen kommen. Folglich steigt aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit von DNA-Mutationen das Risiko für die maligne Transformation von Zellen und damit für die Initiation der Karzinogenese (112).

p53 nimmt als Tumorsuppressor eine wichtige und sehr komplexe Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress in Zellen ein. Bei hohen Mengen an intrazellulärem ROS wird die prooxidative Aktivität von p53 verstärkt. Dies äußert sich in der Induktion eines Transkriptionsprogramms mit dem Ziel der Apoptoseeinleitung. Im Gegensatz dazu initiiert p53 bei niedrigen ROS-Spiegeln die Transkription antioxidativer Zielgene, wie zum Beispiel der Superoxiddismutasen. Dieser Weg zielt auf das Überleben der Zelle ab (62), (113), (114). p53 nimmt somit durch transkriptionelle Aktivierung von antioxidativen Enzymen auch eine wichtige Rolle in der Redox-Hämostase ein. Welcher der beiden Wege eingeschlagen wird, hängt von der Art, der Intensität und der Dauer des einwirkenden oxidativen Stresses ab (115).

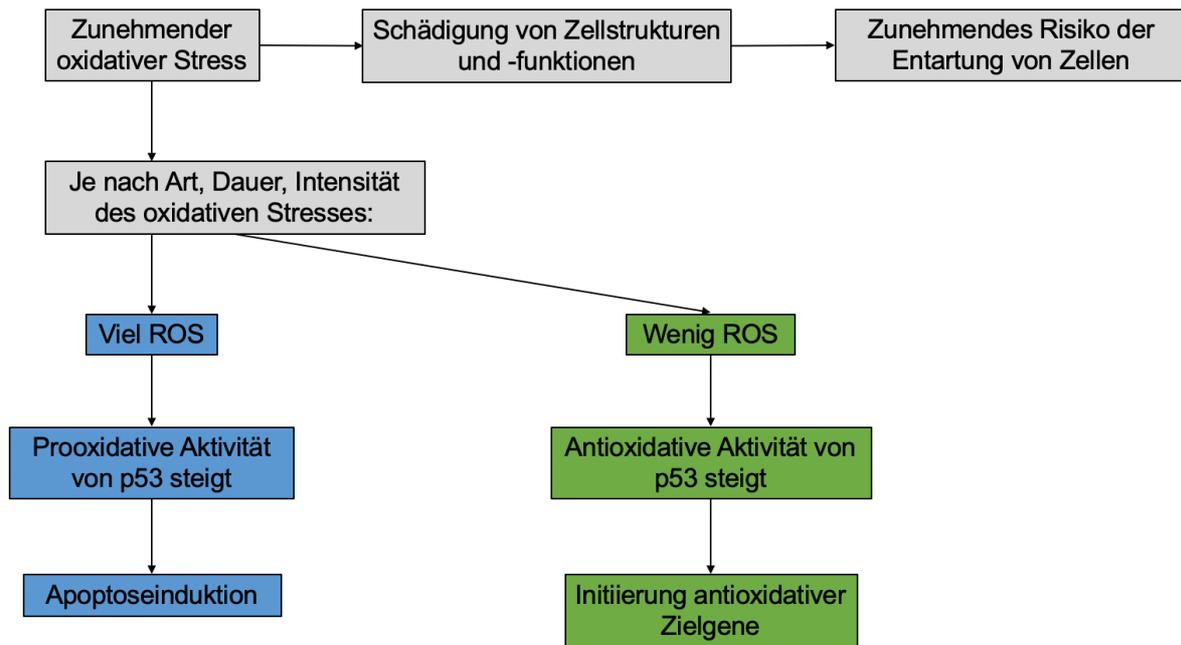


Abbildung 7: Oxidativer Stress und p53

Bei Zunahme des oxidativen Stresses in Zellen kommt es zunehmend zur Schädigung von Zellstrukturen, wodurch das Risiko für die Entartung der Zellen zunimmt. Die Art, Dauer und Intensität des einwirkenden oxidativen Stresses bestimmen die Menge der vorhandenen ROS. p53 übt bei hohen ROS-Spiegeln prooxidative Funktionen aus und induziert die Apoptose. Bei niedrigen ROS-Spiegeln initiiert p53 die Transkription antioxidativer Zielgene (siehe 1.2.5).

1.3 Die Superoxiddismutase 1

Die ubiquitär vorkommenden Superoxiddismutasen (SODs) katalysieren die Disproportionierung von Superoxid zu molekularem Sauerstoff und Peroxid und sind somit entscheidend für den Schutz der Zelle vor den toxischen Produkten der aeroben Atmung (116), (117). Drei unterschiedliche SODs wurden im Menschen identifiziert: SOD1, auch Cu/Zn-SOD genannt, SOD2, die auch MnSOD heißt, und SOD3. SOD1 liegt im Zytosol und Intermembranraum der Mitochondrien vor, SOD2 in der mitochondrialen Matrix, und SOD3 wird in die extrazelluläre Matrix sezerniert (118). Obwohl die Enzyme in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind und andere Metallionen als Ko-Faktoren besitzen ist ihre Aufgabe dieselbe: die Konvertierung von Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid (118), (119), (120).

1.3.1 Genstruktur und Regulation der Expression von *SOD1*

SOD1 wird konstitutiv exprimiert und wird daher auch als „Housekeeper Gen“ zum Vergleich der Expression der anderen Superoxiddismutasen verwendet. (119), (121), (122). Das für *SOD1* kodierende, hochkonservierte Gen befindet sich auf Chromosom 21q22.11 und besteht aus fünf Exons, die durch vier Introns ergänzt werden. Insgesamt ergibt sich daraus eine Genlänge von 9307 Basenpaaren (bp) (121), (122), (123). Zudem ist am 3'-Ende eine Poly(A)-Signalsequenz lokalisiert, die die Expression zweier mRNAs mit unterschiedlicher Polyadenylierung ermöglicht. Das längere Transkript (0,9 kb) ist dabei etwa vier Mal seltener zu detektieren, als das kürzere Transkript (0,7 kb) (119), (122). Man vermutet, dass die stärkere Polyadenylierung zu einer Stabilisation der mRNA beiträgt. In der Region des proximalen Promotors befinden sich neben TATA- und CCAAT-Boxen auch hochkonservierte Bereiche, die reich an Guanin und Cytosin sind (124). An diesem basalen Promotor befinden sich Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören unter anderem CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs), die für die konstitutive Expression von *SOD1* sorgen. Es handelt sich dabei um eine Proteingruppe bestehend aus sechs Mitgliedern. Sie können sowohl durch direkte DNA-Bindung, aber auch durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die *SOD1*-Expression induzieren. Diese Funktionen sind auch beim Zinkfingerprotein Specificity Protein 1 (Sp1) zu finden, welches neben der basalen auch die induzierte Transkription von *SOD1* reguliert. Außerdem binden vor allem Transkriptionsfaktoren,

die als Antwort auf Stresssignale wie Strahlung, Zytokinausschüttung, oxidativen oder mechanischen Stress induziert werden. Zu dieser Gruppe gehört neben dem Early Growth Response Protein (Egr1) auch das Activating Protein 1 (AP1) und NF- κ B. Thyroid Hormone Receptors regulieren als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren eine große Bandbreite an Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung oder Proteinmetabolismus (121), (122).

Andere exogene Faktoren, die eine Induktion des *SOD1*-Gens verursachen sind Hitzeschock, Scherkräfte und die Schwermetall-, Ozon- oder Stickstoffmonoxidexposition. Auch xenochemische Verbindungen wie Naphthoflavon haben einen derartigen Effekt (119).

Die Leber ist als Hauptorgan des xenobiotischen Stoffwechsels sowie des Eisentransports und der Eisenspeicherung dauerhaft freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt. Aus diesem Grund sind besonders hier große Mengen antioxidativer Enzyme vorhanden. Im Vergleich zu Herz, Lunge oder Skelettmuskel ist die *SOD1*-Aktivität in der Leber in etwa um das Zehnfache höher. Die Katalase-Aktivität ist sogar um das Zehn- bis Zwanzigfache erhöht (125), (126).

1.3.2 Proteinstruktur von *SOD1*

Das *SOD1*-Gen kodiert für ein monomeres *SOD1*-Polypeptid mit einer Masse von 16 kDa, bestehend aus 153 Aminosäuren (122). Das *SOD1*-Protein liegt unter physiologischen Bedingungen als stabiles Homodimer vor, wobei sich die aktiven Zentren der beiden Untereinheiten gegenüberliegen (124) (Abbildung 8). Jedes Monomer besteht aus einem achtsträngigen β -Barrel und hat jeweils ein Kupfer- und ein Zink-Ion gebunden (123). Während das Zn^{2+} -Ion für die Enzymstabilität von Bedeutung ist, hat das Cu^{2+} -Ion seine Funktion in der Oxidation und Reduktion der jeweiligen Substrate und ist essentiell für die enzymatische Aktivität (121). Es wechselt dabei zwischen einer tetraedischen Bindungsgeometrie in der oxidierten Form ($Cu(II)$) und einer trigonal planaren Geometrie in der reduzierten Form ($Cu(I)$).

Das *SOD1*-Protein liegt in einem Gleichgewicht unterschiedlicher Zustände vor. Je nach Temperatur, Proteinkonzentration und Mutationen sind der gefaltete, ungefaltete oder ein intermediärer Zustand möglich. Für eine korrekte Proteinfaltung und -stabilität sind vier posttranslationale Reifungsschritte erforderlich. Neben der Insertion des Zn^{2+} -

Ions und des Cu^{2+} -Ions gehören dazu auch die Dimerisierung und die Ausbildung von Disulfidbrücken. Es gibt pro Untereinheit eine Disulfidbindung, wobei diese auch die Proteinaktivität bestimmt. Das aktive Zentrum ist im Gegensatz zum Großteil der Proteinoberfläche positiv geladen. Besonders wichtig für den Mechanismus der SOD1-Aktivität ist Arg143, welches zusammen mit Thr137 die Größe der Anionen limitiert, die die Kupfer-aktive Seite erreichen können. Durch die Reduktion des Kupferions und der bereits erwähnten Veränderung der Bindungskoordination kommt es zur Relaxation der Molekülgeometrie. Das für Metalloenzyme charakteristische Histidin (His63), das die beiden Metallionen überbrückt, ist dadurch für die Protonierung zugänglich (123).

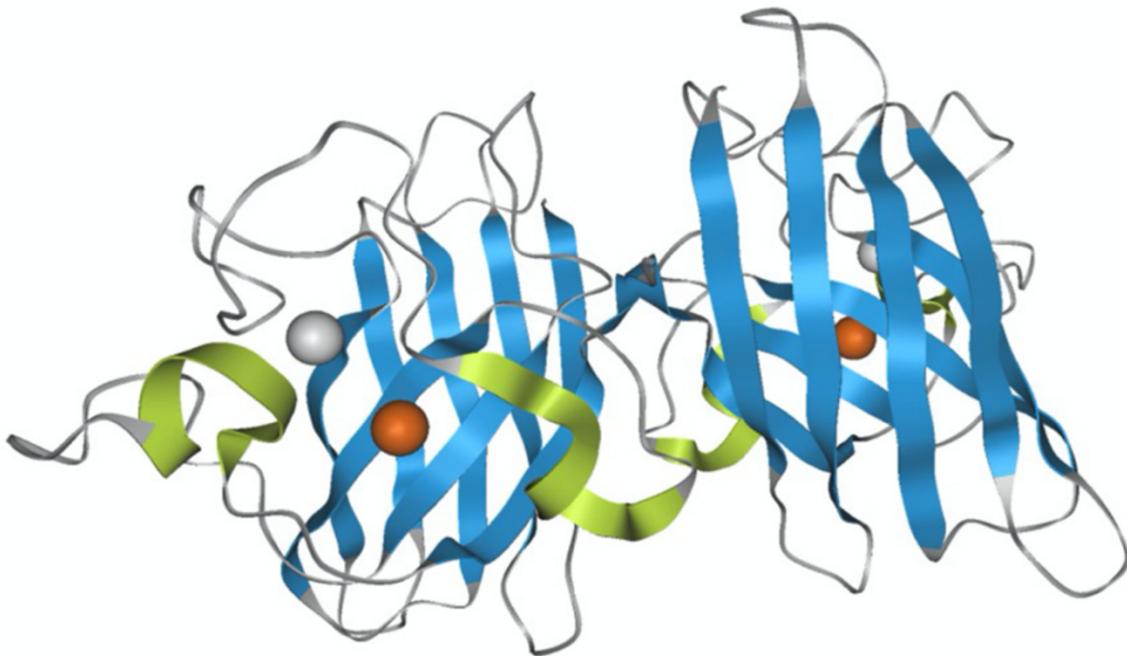


Abbildung 8: Die SOD1-Struktur

SOD1 ist ein Homodimer. Jede Untereinheit besteht aus einem achtsträngigen β -Barrel. Jede der zwei Untereinheiten hat ein Cu^{2+} - bzw. ein Zn^{2+} - Ion gebunden (127).

1.3.3 Funktionen von SOD1

Bei seiner Entdeckung wurde SOD1 zunächst für ein Kupferspeicherprotein gehalten. Seine katalytische Funktion wurde erst später durch McCord und Fridovich entdeckt (122). Die zentrale Funktion von SOD1 als detoxifizierendes Enzym ist die Entfernung von freien Sauerstoffradikalen, um eine Schädigung der Zelle zu vermeiden. Zu den

reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gehören neben den Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) auch Hydroxylradikale ($\cdot\text{HO}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Ihre Elimination findet in erster Linie durch das Zusammenspiel der drei oben benannten SODs mit weiteren enzymatischen Systemen wie Katalase, oder Antioxidantien wie dem Tripeptid Gluthation statt. SODs sind verantwortlich für die Konvertierung von Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Wasserstoffperoxid wird dann von der Katalase in Sauerstoff und Wasser aufgespalten (117).

SOD1 stellt die wichtigste intrazelluläre SOD dar. SOD1 kommt im Zytosol, Zellkern und im Intermembranraum der Mitochondrien vor. In der mitochondrialen Matrix sorgt ausschließlich SOD2 für die schnelle Entfernung schädlicher Sauerstoffradikale, während die SOD3 im extrazellulären Raum wirkt (116), (121). Die von der SOD1 katalysierte Reaktion folgt einem „Ping-Pong-Mechanismus“. Dies bedeutet, dass von zwei Superoxidmolekülen, jeweils ein Molekül zu Sauerstoff oxidiert und das andere zu Wasserstoffperoxid reduziert wird (Abbildung 9) (123). Diese Dismutations- oder auch Disproportionierungsreaktion von Superoxidanionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid läuft auch enorm schnell, das heißt ohne enzymatische Beteiligung ab (10^5 - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dennoch ist SOD1 in der Lage, diese Reaktion um den Faktor 10^4 zu beschleunigen, und stellt somit eine der schnellsten enzymatischen Reaktionen überhaupt dar (128).

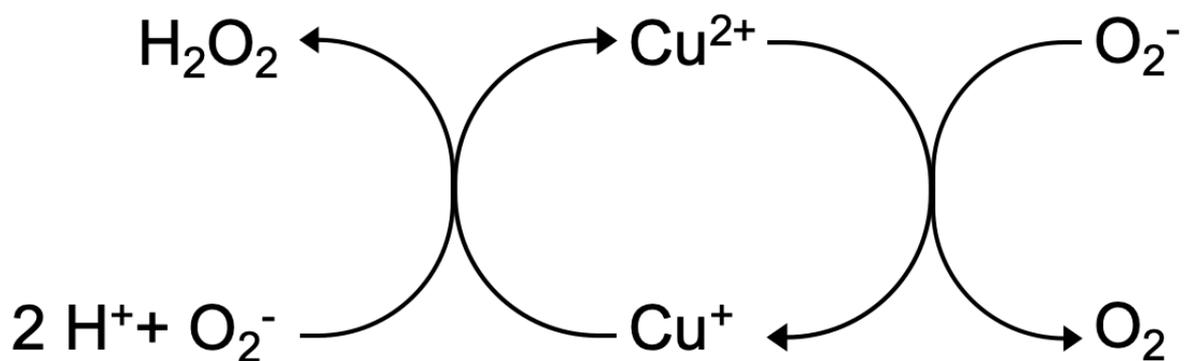


Abbildung 9: SOD1- Katalysierte Reaktion

Die von SOD1 katalysierte Reaktion folgt einem Ping-Pong-Mechanismus. Im aktiven Zentrum von SOD1 befindet sich ein Kupfer-Ion. Bei der sogenannten Disproportionierungs- bzw. Dismutationsreaktion wird von zwei Superoxidmolekülen eines zu Sauerstoff oxidiert und das andere zu Wasserstoffperoxid reduziert (123).

Das Wasserstoffperoxid wird anschließend durch das Enzym Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff weiterverarbeitet (116). Neben der klassischen Funktion als detoxifizierendes Enzym ist SOD1 auch in die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse involviert. Es kontrolliert die zelluläre REDOX (Reduktions-Oxidations)-Homöostase. Ein pro-oxidatives REDOX-Equilibrium fördert das Zellwachstum, wodurch SOD1 indirekt an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist (129). Außerdem konnte SOD1 als sequenzspezifisches DNA-bindendes Protein identifiziert werden. Es reguliert eine große Gruppe von Genen, die an der Zellantwort auf DNA-Schädigung beteiligt sind. Durch diese Rolle im Nukleus ist SOD1 auch für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität von Bedeutung (116). SOD1 bindet im Zellkern an Promotoren und reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die in die Antwort auf oxidativen Stress involviert sind (130).

1.3.4 Pathophysiologie von SOD1

Im Jahr 1993 wurde *SOD1* von Rosen et al. als erstes Gen identifiziert, das bei Amyotropher Lateralsklerose (ALS) mutiert ist (131). Heute sind neben *SOD1* 210 weitere Mutationen bekannt, die mit ALS assoziiert werden (132). ALS oder auch Lou-Gehrig-Syndrom ist eine tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankung. Die selektive Zerstörung der oberen und unteren Motoneuronen, die für die Kontrolle der willkürlichen Muskelbewegungen verantwortlich sind, führt zu einer rapiden progressiven Lähmung (133), (134), (135). Der Tod durch Atemlähmung tritt zwei bis drei Jahre nach dem Auftritt der ersten klinischen Symptome ein. In etwa 90 % der ALS Fälle ist das Auftreten sporadisch (sALS) und die Ursache noch nicht genau verstanden. Bei den restlichen 10 % wird die ALS auslösende Genmutation innerhalb der Familie weitervererbt, weshalb man von der familiären ALS spricht (fALS) (135). Obwohl es sich bei ALS um die häufigste motoneuronale Erkrankung bei Erwachsenen handelt, existiert aktuell noch keine Heilungsmöglichkeit. Einzig das Benzothiazol Riluzole verlangsamt nachweislich die Progression der Erkrankung und verlängert das Überleben um etwa drei Monate. Das *SOD1*-Gen ist in 12 % der familiären und in 1 % der sporadischen ALS-Patient:innen mutiert. Die *SOD1*-Mutationen werden bei der familiären Form autosomal-dominant vererbt (135). Die beiden Formen sind bezüglich ihres klinischen Erscheinungsbildes nicht unterscheidbar (133).

Es existieren zahlreiche Mutationen von SOD1, von denen nur ein Teil pathogene Eigenschaften aufweist. (136). Die mit ALS assoziierten SOD1-Mutationen weisen einen enorm heterogenen Phänotyp auf (133), (136). Der Mechanismus der selektiven Degeneration von Motoneuronen ist allerdings noch unklar. Da das Fehlen von endogenem Wildtyp-SOD1 (wt SOD1) keinen offensichtlichen Einfluss auf die ALS-Induktion hat, deutet alles auf einen Funktionsgewinn der mutierten SOD1 (mt SOD1) hin. Die Konzepte zur Pathogenese von ALS stützen sich zum Großteil auf ein ungünstiges Zusammenspiel aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen (137). Die Aggregation von fehlgefaltetem oder instabilem SOD1-Protein gilt als Kennzeichen der Erkrankung (134). Schlussendlich bleiben bezüglich der Beziehung von SOD1 und ALS noch einige Fragen ungeklärt (133).

SOD1 spielt auch bei anderen pathogenen Prozessen eine Rolle. Die Balance zwischen Produktion und Elimination von ROS durch SODs ist entscheidend in die Pathophysiologie der Leberzirrhose involviert. Einzelnukleotid-Polymorphismen können die Gen- und Proteinfunktion von SOD1 verändern, wodurch die Elimination von ROS und damit die gesamte Balance in der Leber gestört sein kann. Die Folge sind oft Entzündungen und Fibrose. In diesem Zusammenhang wurde eine signifikante Assoziation des SOD1 Einzelnukleotid-Polymorphismus rs1041740 zu Aszites und spontaner bakterieller Peritonitis bei bestehender Leberzirrhose identifiziert. Genauere Untersuchungen zu diesem Zusammenhang stehen noch aus (138).

1.4 Bekannte Zusammenhänge: p53, SOD1, oxidativer Stress und Hepatokarzinogenese

90 % der HCC entstehen basierend auf einer hepatischen Inflammation und einer Leberzirrhose. Dies führt durch die dauerhafte Produktion von ROS und reaktiver Stickstoffspezies (RNS) neben der Lipidperoxidation auch zur Generation promutagener DNA-Addukte (139). Die erhöhte DNA-Mutationsrate ist Voraussetzung für die neoplastische Transformation. Daher spielt oxidativer Stress eine entscheidende Rolle bei der Hepatokarzinogenese (140). Beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress nimmt SOD1 eine zentrale Position ein. Die Bedeutung der Funktion von SOD1 wird bei Versuchen mit SOD1-Knock-out-Mäusen deutlich. Bei diesen Tieren ist durch den Verlust einer wichtigen Komponente des antioxidativen Abwehrsystems die Hepatokarzinogenese stark erhöht. Oxidativer Stress ist nicht nur

für die Induktion des HCC, sondern auch für die Progression und Metastasierung entscheidend (125), (140).

Mehrere patientenbasierte Studien mit verschiedenen Stadien des HCC zeigen außerdem eine Korrelation zwischen niedrigen SOD-Spiegeln im Lebergewebe und besonders schweren HCC-Verläufen. Zudem wirkt sich die Aktivität von SODs in Tumoren und im umliegenden Gewebe positiv auf das postoperative Überleben der Patient:innen aus. Es festigt sich zunehmend die Annahme, dass die SOD1 eine wichtige Rolle in der Entstehung und Prognose des HCC spielt. Die spontane Entstehung von Tumoren ist dabei auf die Leber begrenzt, was in ihrer Rolle als Hauptorgan für den Transport und die Lagerung von Eisen begründet wird (116). Unterstützt wird dies durch Erkenntnisse zur Hämochromatose. Hierbei entstehen aufgrund freier Eisenionen (Fe^{2+}) und der oxidativen Deregulation mehr ROS. Insgesamt geht dies mit einem etwa 200-fach erhöhten HCC-Risiko einher. In dem Fall der Hämochromatose wurde neben der Generation mutagener DNA-Produkte auch die p53-Mutation als wichtiger Einflussfaktor für die Hepatokarzinogenese identifiziert (141). Physiologisch ist die Hochregulation von p53-Zielgenen als Antwort auf oxidativen Stress in Leberproben nachgewiesen (142).

Die Rolle von p53 in der Karzinogenese wurde bereits beschrieben (siehe 1.2.4). Die Mutationsrate des „Guardian of the genome“ im HCC liegt je nach Ätiologie bei bis zu 50 %. Ein Verlust der Tumorsuppressorfunktion, in manchen Fällen kombiniert mit einem proonkogenen „gain-of-function“ oder dominant-negativen Effekt auf die Funktion des wt p53, resultieren unter anderem in der ausbleibenden Aktivierung antioxidativer Enzyme (143). Die erhöhte Rate an oxidativem Stress trägt nachweislich zur Entstehung von Lebertumoren bei (125).

Über den Zusammenhang zwischen p53 und SOD1 ist bekannt, dass eine SOD1-Induktion die Hochregulation von p53 nach fokaler zerebraler Ischämie inhibiert (142). Ein weiterer Punkt ist die RNA-Interferenz von SOD1 (SOD1RNAi). Sie sorgt in menschlichen Fibroblasten für eine Verzögerung der Induktion von p53 bei zellulärer Seneszenz. Zusätzlich zu diesem Einfluss auf die Lebensspanne menschlicher Zellen, wurde in Tumorzellen eine erhöhte Aktivität von SOD1 festgestellt. Daher wird vermutet, dass die Induktion dieses Enzyms für den Abwehrmechanismus in der

Karzinogenese eine Rolle spielt (144). Diese Rolle konnte bisher allerdings nicht bestätigt werden (129).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl p53, als auch SOD1 in der Hepatokarzinogenese eine wichtige Rolle spielen. Die potentielle, direkte Regulation von SOD1 durch p53 im HCC wurde bisher nicht untersucht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Auch nach beträchtlichen Fortschritten in der Behandlung des HCC in den letzten Jahren (145), ist die Prognose bei den meisten Patient:innen limitiert. Daher werden in Zukunft neben der verbesserten molekularpathologischen Klassifikation, vor allem die Identifizierung weiterer molekularer Zusammenhänge zwischen Hepatokarzinogenese und p53 von Bedeutung sein (146), (147). Die Charakterisierung der molekularen Eigenschaften des Tumors bildet die Basis für die Etablierung von individualisierten Therapiestrategien für Patient:innen mit HCC.

Der Stellenwert der p53-Familie für die Apoptose, aber auch für die Prognose des HCC wurde unter anderem von unserer Arbeitsgruppe gezeigt (43), (44), (47), (111). In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde im Vergleich aus *in vitro* generierten, p53-abhängigen Zielgenexpressionsprofilen mit humanen *in vivo* Genexpressionsdatensätzen eine Zielgensignatur der p53-Familie im HCC identifiziert. Diese Gensignatur umfasst 28 gemeinsame Zielgene der p53-Familie, von denen 15 als einzelne Gene signifikant mit dem Überleben der Patient:innen mit HCC assoziiert sind (148). Unter diesen 15 Zielgenen, die für sich allein betrachtet, prognostisch relevant sind, befindet sich auch das Gen der Superoxiddismutase 1 (*SOD1*).

Die Bedeutung von *SOD1* als antioxidatives Enzym in der Leber ist gut belegt. Eine *SOD1*-Defizienz geht durch erhöhte Spiegel von ROS mit vermehrter DNA-Schädigung einher. Daraus ergibt sich eine gesteigerte Genominstabilität, wodurch eine Defizienz von *SOD1* letztendlich zur Hepatokarzinogenese beitragen kann (125), (140).

Neben der Regulation von *SOD1* durch p53 auf Transkriptionsebene, gehen wir auch davon aus, dass p53 über Protein-Protein-Wechselwirkungen auf *SOD1* wirkt. Um diesen neuen Aspekt der *SOD1*-Regulation genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein neues *in vitro* Modellsystem etabliert und folgende Fragestellungen analysiert:

1. Wird *SOD1* über Protein-Protein-Wechselwirkungen durch p53 reguliert?
 - Es sollte ein *in vitro* Modell zur genauen Analyse der Auswirkungen einer p53-Modulation unter Normalbedingungen und unter oxidativem Stress entwickelt werden.

2. Beeinflusst p53 die Protein-Expression von SOD1?

- Auf Basis des neu entwickelten *in vitro* Modells sollte die Auswirkung einer p53-Induktion auf die SOD1-Proteinexpression unter normalen Bedingungen und oxidativem Stress ermittelt werden.

3. Ist p53 ein transkriptioneller Aktivator des SOD1-Gens?

- Da wir bereits *in vitro* und im HCC-Gewebe von Patient:innen zeigen konnten, dass p53 SOD1 auf transkriptioneller Ebene reguliert (148), haben wir nach Bindungsstellen von p53 im SOD1-Gen gesucht:
- Hierzu sollten putative Bindungsstellen für p53 mittels eines *in silico* Ansatzes im SOD1-Gen gesucht werden.

Die Untersuchungen unter normalen Bedingungen und oxidativem Stress sind besonders wichtig, da die Entwicklung eines HCCs sowohl bei viraler Infektion, als auch bei Entwicklung aus einer Leberzirrhose mit einem Anstieg an oxidativem Stress einhergeht (149). Dieser oxidative Stress verursacht DNA-Schäden, die zur Tumorentstehung und schnellerem Tumorwachstum führen können. SOD1 als einer der Hauptregulatoren der REDOX-Balance ist somit ein entscheidender Faktor zur Vermeidung von oxidativem Stress und dadurch verursachter DNA-Schäden. Versteht man die Regulation von SOD1, so kann man möglicherweise auch präventiv die Entstehung eines HCCs verhindern oder zumindest das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Beschreibung	Hersteller
2100 Bioanalyser Instrument	Aligent Technologies, Santa Clara, USA
Analysenwaage Excellence XA105 DualRange	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Axiovert 200M Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
BD LSR Fortessa Cell Analyzer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
EMax Plus Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Gelkammer Multigel G44	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Heraeus Kendro Heracell Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kreisschüttler KS 260 Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
LightCycler 480	Roche, Basel, Schweiz
Magnetrührer, IKA RH basic 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Japan
Mikrozentrifuge 5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Nanophotometer IMPLN	Implen GmbH, München, Deutschland

PowerSupply E835	Consort, Turnhout, Belgien
Reinstwasseraufbereitungsanlage Milli-Q, Q-POD	Merck Millipore, Billerica, USA
Schüttelgerät Certomat R	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAIR HB2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
TE77XP Semidry Blotter	Hoefer Inc., San Francisco, USA
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Megafuge 16 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Transilluminator: Molecular Imager ChemiDoc XRS+	BioRad, Hercules, USA
Wasserbad	GFL: Gesellschaft für Labortechnik mbh, Burgwedel, Deutschland
Zellzähler Cellcounter TC 20	BioRad, Hercules, USA
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
ZOE Fluorescent Cell Imager	BioRad, Hercules, USA

2.1.2 Software

Image J	National Institute of Health, USA
Image Lab™	Bio-Rad, Hercules, USA
Image Studio™	LI-COR Biosciences
LightCycler® 480 Version 1,5	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Microsoft Excel, Power Point, Word (2016)	Microsoft, USA
Sigmaplot 14,0	Systat, Deutschland
SoftMax Pro 7	Molecular Devices, USA

2.1.3 Allgemeiner Laborbedarf

1-Butanol ROTIPURAN® ≥99,5 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
1,5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
1,5 ml Safe-Lock-Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2,0 ml Safe-Lock-Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube Falcon	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko
24 Well cell culture Plate 3524	Corning, Incorporated, Corning USA
30 % H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
50 ml Polypropylene Conical Tube Falcon	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko

96 Well cell culture Plate 3598	Corning Incorporated, Corning, USA
96 Well Microplate 655074	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
A9518 Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Antimycin A form Streptomyces sp., 50 mg	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bromphenol Blue, Sodium Salt, 10 g	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Cell Culture Flask T-175	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cell Culture Flask T-75	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cell culture plate TC 60	Sarstedt AG & Co. KG, Rheinbach, Deutschland
Cell scraper 25 cm	SARSTEDT Inc., Newton, USA
Combitips plus / advanced	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
cOmplete Tablets, Mini	Roche, Mannheim, Deutschland
Copper(II) sulfate solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Corning™ Falcon™ Röhrchen mit Zellenfilterkappe	Thermo Scientific, Rockford, USA
Costar Stripette 5-50 ml	Corning Inc., New York, USA
DAPI Solution	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
DMSO Dimethyl Sulfoxide, minimum 99,5 % GC	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

DTT, DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Erlenmeyerkolben mit Schikane	Thermo Scientific, Rockford, USA
Essigsäure (Eisessig) 100 % wasserfrei zur Analyse EMSURE® ACS ISO, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN® ≥70 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
G1397 Gentamicin solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Gelloading Spitzen 0,17 m	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LightCycler 480 Multiwell Plate 384, White	Roche, Mannheim, Deutschland
Luminol Sodium salt	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Methanol zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mini-Protean TGX Precast Protein Gels, 4-20 %, 10 Wells	BioRad, Hercules, USA
Molecular Probes™ CellROXTM Deep Red Reagent (2,5 mM in DMSO, 50 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Molecular Probes™ MitoSOXTM Red Indikator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

(50 µg pro Vial)	
Multipipette Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyde Solution 4 % in PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
p-Coumaric acid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
PCR-Tubes 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
PCR-Tubes 0,5 ml	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
PhosSTOP	Roche, Mannheim, Deutschland
Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Pipetten Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PVDF Transfer Membrane 0,45 µm	Thermo Scientific, Rockford, USA
Quali-Filterpipettenspitzen, steril	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
Re-Blot Plus Strong Solution (10x)	Millipore, Temecula, USA
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Roti®-Stock 20 % SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure ROTIPURAN® ≥25 %, p.a., ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Schwefelsäure 98 % zur Analyse EMSURE®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Temed zur Analyse	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TMB Liquid Substrate System for ELISA T0440	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
TransFectin Lipid Reagent	BioRad, Hercules, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trizma® hydrochloride	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Whatman TM Chromatography Paper 3 mm	GE Healthcare UK limited, Buckinghamshire, UK

2.1.4 Antikörper und Primer

2.1.4.1 Primärantikörper

Antikörper	Laufweite (kDa)	Verdünnung	Hersteller
Anti-p53 (DO-1), (sc-126)	53	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-SOD1 (FL-154), (sc-11407)	53	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-SOD1 (G-11), (sc-17767)	16	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Anti-Mouse IgG–Peroxidase antibody produced in rabbit (A9044)	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Anti-Rabbit IgG–Peroxidase antibody produced in goat (A0545)	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Monoclonal Anti- β -Actin-Peroxidase antibody	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

2.1.4.3 Primer

GAPDH-Primer Assay Hs_GAPDH_1_SG Cat. No. QT00088935	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
β 2M-Primer Assay Hs_B2M_1_SG Cat. No. QT00088935	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
SOD1-Primer Assay Hs_UBC_1_SG Cat. No. QT00234430	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.5 Arbeitslösungen und Puffer

10 x SDS Page Puffer	25 mM Tris Base 250 mM Glycin 0,1 % SDS pH 8,6
2 x Lämmli-Puffer	120 mM Tris pH 6,8 20 % Glycerin 4 % SDS 0,02 % Bromphenolblau DTT
6 x Lämmli-Puffer	375 mM Tris Base 12 mM EDTA 6 % Glycerin 6 % SDS 0,03 % Bromphenolblau 300 mM DTT
A-Anodenpuffer	300 mM Tris 20 % Methanol pH 10,4
B-Anodenpuffer	25 mM Tris 20 % Methanol pH 10,4
C-Kathodenpuffer	25 mM Tris 20 % Methanol 40 mM 6-Aminohexansäure pH 9,4
ELISA-Waschpuffer	0,05 % Tween 20 PBST
ECL-Mix	2,5 mM Luminol 0,4 mM p-Coumarin-Säure in DMSO 0,1 M Tris-HCl pH 8,5

Arbeitslösung ECL-Mix	ECL-Mix mit 0,03 % H ₂ O ₂
Arbeitslösung RIPA Buffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 0,25 % Deoxycholsäure 1 % NP-40 1 mM EDTA versetzt mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren
TE-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RLT Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.6 Kits und Enzyme

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAshredder (250)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiFast SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasyR Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.7 Bakterien

One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli	Thermo Scientific, Waltham, USA
--	---------------------------------

2.1.8 Zellkulturmedien

Hep3B	M 4655 Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (L-Glutamin und NaHCO ₃ bereits im Medium enthalten) + FCS (10 %)	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Huh7	D 6429 Dulbecco´s Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) (L-Glutamin und NaHCO ₃ bereits im Medium enthalten) + FCS (10 %)	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
	Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium	Opti-MEM® I Reduced- Serum Medium
	Fetal Bovine Serum (FCS)	Bio&Sell, Deutschland

2.1.9 Zelllinien

2.1.9.1 Hep3B-Zelllinie

Die Etablierung der Hep3B-Zelllinie erfolgte aus einer von einem achtjährigen Jungen entnommenen HCC-Biopsie im Jahr 1976. Hep3B-Zellen weisen eine Deletion von p53 auf (150), (151). Die Zelllinie enthält HBV-DNA. Es werden jedoch keine infektiösen Viruspartikel sezerniert (152).

2.1.9.2 Huh7-Zelllinie

Die Huh7-Zelllinie ist eine aus dem HCC eines 57-jährigen japanischen Mannes isolierte Lebertumorzelllinie, die seit 1982 etabliert ist (153), (154). Sie enthält eine Punktmutation im p53-Gen (C220T) (155). Huh7-Zellen sind HBV-negativ (156) und werden in die Sicherheitsstufe S1 eingestuft (157), (158).

2.1.9.3 HepG2-Zelllinie

HepG2 ist eine Zelllinie mit epithelähnlicher Morphologie, die aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen, weißen, männlichen Jugendlichen mit Leberkrebs isoliert wurde (159).

2.1.9.4 HCT116-Zelllinie

Die Zelllinie HCT116 wurde aus dem Dickdarm eines erwachsenen Mannes mit Dickdarmkrebs isoliert. Sie weist eine Mutation im Codon 13 des *ras*-Proto-Onkogens auf (160).

2.1.9.5 HT29-Zelllinie

HT29 ist eine Zelllinie mit epithelialer Morphologie, die 1964 aus einem Primärtumor isoliert wurde, der von einer 44-jährigen weißen Patientin mit kolorektalem Adenokarzinom stammt (161).

2.1.9.6 Caco-2-Zelllinie

Caco-2 sind Epithelzellen, die aus dem Dickdarmgewebe eines 72-jährigen weißen Mannes mit kolorektalem Adenokarzinom isoliert wurden (161).

2.1.9.7 SW480-Zelllinie

SW480-Zellen wurden aus dem Dickdarm eines Patienten mit Dukes-C-Kolorektalkarzinom isoliert (160).

2.1.10 Adenovirale Konstrukte

Die Transduktion von p53 in den verschiedenen Zelllinien erfolgte mittels adenoviraler Konstrukte. Die gewünschte DNA-Sequenz wurde nach der von He et al. beschriebenen Methode (162) in replikationsinkompetente, adenovirale Konstrukte (rAd) kloniert. Diese rekombinanten Vektoren tragen Transgene für p53-Wildtyp-DNA (rAd-p53-GFP), gekoppelt mit solchen für grün fluoreszierendes Protein (GFP), sowie für GFP allein (rAd-GFP). Das Protein GFP ermöglicht durch sein Signal den Nachweis der Transduktionseffizienz ohne vorherige immunologische Färbung oder

enzymatische Essays. Der Cytomegalievirus (CMV)-immediate early gene-Promotor ist in allen Konstrukten integriert.

2.1.11 Small interfering RNA (siRNA)

Die siRNA gehört zu einer Gruppe kleiner, nicht-kodierender RNAs bestehend aus 20 bis 30 Nukleotiden, die an der Genregulation in den bedeutendsten Ebenen der Genomfunktion beteiligt sind. Neben RNA-Stabilität und -Prozessierung beeinflussen sie auch Chromatinstruktur, Transkription oder Translation. Sie sind in der Lage eine große Zahl genetischer Targets dauerhaft und spezifisch zu inhibieren (163). In dieser Arbeit wurden zum Knock-down von *TP53* vier ON-TARGET plus siRNA *TP53* (Dharmacon) verwendet, die jeweils auf unterschiedliche Regionen der p53-mRNA abzielen. Als Kontrolle diente ein ON-TARGET plus siRNA Control Pool Non-Targeting pool (Dharmacon).

Tabelle 1: siRNA für p53-Silencing und Kontrolle

siRNA	Hersteller
Dharmacon ON-TARGET plus siRNA Human TP53, Cat#J003329-14	Dharmacon Inc., Lafayette, USA
Dharmacon ON-TARGET plus siRNA Human TP53, Cat#J003329-15	Dharmacon Inc., Lafayette, USA
Dharmacon ON-TARGET plus siRNA Human TP53, Cat#J003329-16	Dharmacon Inc., Lafayette, USA
Dharmacon ON-TARGET plus siRNA Human TP53, Cat#J003329-17	Dharmacon Inc., Lafayette, USA
Dharmacon ON-TARGET plus siRNA Control Pool Non-Targeting pool, Cat#D-001810-10-05	Dharmacon Inc., Lafayette, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die zwei verwendeten Zelllinien, Hep3B- und Huh7-Zellen, wurden in 175 cm²- oder 75 cm²- Zellkulturflaschen in DMEM-Medium (siehe 2.1.8) kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für Hep3B und bei 37 °C und 10 % CO₂ für Huh7-Zellen. Um sehr engen Zell-Zell-Kontakt im Zustand der Konfluenz und die damit verbundene Wachstumshemmung der Zellen zu vermeiden, wurden die Huh7-Zellen im Abstand von drei bis vier Tagen passagiert.

Für das Ablösen der adhärennten Zellen wurde eine mit 1x PBS 1:10 verdünnte Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. Die Zellen wurden anschließend zum Abstoppen der Trypsinierung in das DMEM-Medium aufgenommen und je nach zuvor beurteilter Zelldichte 1:3, 1:5 oder 1:7 verdünnt.

2.2.2 Zellen aussäen

Um für die adenovirale Transduktion, Messungen im FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting) und Mikroskopie eine definierte Anzahl an Zellen aussäen zu können, wurden zuvor 20 µl der Zellsuspension in eine Zählkammer gegeben und gezählt. Die Bedingungen der Zellaussaat sind in (Tabelle 2) dargestellt.

Tabelle 2: Bedingungen der Zellaussaat

Platte/Schale	Zellzahl pro Ansatz (Well/Schale)	Volumen pro Ansatz (ml)
24-Well-Platte	10 ⁵	1
Ø 6 cm-Schale	10 ⁶	4
Ø 10 cm-Schale	2x10 ⁶	8

2.2.3 Adenovirale Transduktion

Die adenovirale Transduktion der Zellen erfolgte 24 h nach Aussaat der Zellen. In allen Versuchen wurde eine MOI (Multiplicity of infection) von zehn verwendet. Dadurch wurde eine Infektionsrate von 80-90 % erreicht.

2.2.4 Transfektion mit siRNA

Zur Transfektion der Zellen mit siRNA wurde die jeweilige ON-TARGET plus siRNA p53 oder non-targeting siRNA mit Opti-MEM versetzt. Als Transfektionsreagenz diente das TransFectin Reagent (BioRad), das zusammen mit Opti-MEM dem siRNA-Ansatz zugefügt wurde. Die Transfektion erfolgte, indem das Medium aus den Zellkulturschalen abgesaugt und das siRNA-Transfektionsreagenz auf den Zellrasen gegeben wurde. Im Anschluss wurde die entsprechende Menge Zellkulturmedium (2.1.8) ergänzt. Die Effektivität des p53-Knock-downs wurde mithilfe von Western Blots bestätigt. Die p53-Proteinlevel nach Transfektion mit der auf TP53 abzielenden siRNA waren im Vergleich zur non-targeting oder Kontroll-siRNA deutlich reduziert.

2.2.5 Durchflusszytometrie zum Nachweis der Transduktionseffizienz

Zur Kontrolle der Transduktionseffizienz wurden die Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transduktion mit rAd-p53-GFP oder rAd-GFP (2.1.10). Am Folgetag wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst. Danach wurden die Zellen mit 500 µl Paraformaldehyd (4 % in PBS, Thermo Fisher Scientific) fixiert. Alle Messungen wurden im BD LSR Fortessa Cell Analyzer durchgeführt.

2.2.6 Induktion von oxidativem Stress und Zelltod durch Antimycin A

Antimycin A ist ein sekundärer Metabolit, der von Bakterien der Gattung Streptomyces produziert wird. Es inhibiert den Komplex III der Atmungskette. Folglich kollabiert das mitochondriale Membranpotential, wodurch es zur Freisetzung von ROS aus dem Mitochondrium kommt (164). Die Inhibition der Atmungskette führt nicht nur zur Freisetzung von ROS, sondern auch zur Depletion von ATP (Adenosintriphosphat). Dieser Zustand wird als energetische Krise bezeichnet. Sowohl ROS als auch die energetische Krise können zum Zelltod führen. Daher war es notwendig, eine Konzentration von Antimycin A zu finden, die nur einen geringen Zelltod (<20 %) verursacht, aber gleichzeitig zur Freisetzung von ROS führt. ROS und die Depletion von ATP treten unmittelbar nach der Blockade der Atmungskette auf. Die Schäden durch oxidativen Stress und einen gestörten Stoffwechsel akkumulieren jedoch im Laufe der Zeit. Daher wurde der Zelltod erst zu einem späteren Zeitpunkt gemessen, nämlich 24 h nach Zugabe von Antimycin A. Dieser Zeitpunkt ermöglichte die Beobachtung der Effekte der energetischen Krise und der oxidativen Schäden auf den Zelltod. Die Produktion von ROS wurde zu einem früheren Zeitpunkt, nämlich 12 h

nach Zugabe von Antimycin A, gemessen. Zu diesem Zeitpunkt waren die optimalen Bedingungen für Proteinanalysen und siRNA-Experimente gegeben. Außerdem war es sicher, dass zu diesem Zeitpunkt der Prozentsatz der abgestorbenen Zellen unter 20 % lag. Der Zeitunterschied zwischen der Bestimmung des Zelltodes (24 h) und der ROS-Messung (12 h) war notwendig, um sicherzustellen, dass keine massive Zellschädigung durch Antimycin A aufgetreten war. Die Tatsache, dass der Zelltod nach 24 h unter 20 % lag, deutet darauf hin, dass selbst nach 12 h noch keine schwerwiegenden oxidativen Schäden aufgetreten waren, die später zu Zelltod führen könnten. Dieser Zeitverlauf ermöglichte die genaue Beurteilung der Effekte von Antimycin A auf die Zellen.

Das verwendete Antimycin A (Sigma Aldrich, 100 mg) wurde in 1,82 ml Ethanol (Carl Roth GmbH, 70 %) zu einer Stammlösung von 50 mM gelöst. Die Vorverdünnung wurde aus 1 µl Stammlösung (50 mM) und 499 µl Medium angesetzt. Sie hatte somit eine Konzentration von 100 µM. Nach Absaugen des Mediums aus den Zellkulturschalen wurden 40 µl der Vorverdünnung auf den Zellrasen gegeben und kurz geschwenkt. Danach wurden 4 ml frisches Medium zugegeben. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) nach 24 h bestimmt. Die Konzentration von 1 µM Antimycin A erwies sich in Bezug auf den Zelltod als tolerierbar. Diese Konzentration konnte nun für die ROS-Messungen verwendet werden. Die ROS-Messungen wurden nach 12 h durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt konnte sicher davon ausgegangen werden, dass weniger als 20 % der Zellen abgestorben sind. Dabei wurden die Redox-sensitiven Farbstoffe CellROX und MitoSOX verwendet, deren Anwendung in den folgenden Kapiteln erläutert wird.

2.2.7 Nachweis von oxidativem Stress

2.2.7.1 CellROX Färbung

CellROX Deep Red Reagent (Invitrogen) wird verwendet, um den Gehalt an intrazellulärer ROS zu bestimmen. Es handelt sich um ein zellpermeables Molekül, welches oxidiert werden kann. Nach Oxidation von CellROX durch intrazelluläres ROS weist dieses eine deutliche Fluoreszenz bei Absorptions-/Emissionsmaxima von 644/665 nm auf (165). Es wurden 300000 Zellen mit 5 µM CellROX gefärbt. Die anschließende Analyse fand durchflusszytometrisch oder lichtmikroskopisch nach 12 h statt.

2.2.7.2 MitoSOX Färbung

MitoSOX Red (Invitrogen) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der hochselektiv Superoxide in der Mitochondrialen Matrix anfärbt. Die Absorptions-/Emissionsmaxima betragen 510/580 nm (166), (167). Zu dieser Messung wurden eine Millionen Zellen mit 1 M MitoSOX für 12 h gefärbt und durchflusszytometrisch oder mikroskopisch analysiert.

2.2.8 Zellen ernten

Im ersten Schritt wurde der Zellkulturüberstand sowie die mit einem Cell Scraper von dem Boden der Zellkulturschale abgelösten Zellen in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 1300 Upm für 5 min wurde der Überstand abgenommen, das Pellet gelockert und in 900 µl PBS unsteril aufgenommen. Anschließend wurde die eine Hälfte des Volumens zur RNA-Isolierung und die andere Hälfte zur Proteingewinnung in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden bei 1800 Upm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden ist, wurden 300 µl RLT für die RNA-Isolierung bzw. - je nach Größe des Zellpellets - 80 bis 150 µl RIPA zugegeben und die Pellets darin gelöst. Die RNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert. Die Proben zur Proteingewinnung inkubierten zunächst 20 min auf Eis und wurden dann für die gleiche Dauer bei 12000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Nachdem die Proteine im Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wurden, wurden sie ebenfalls bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Proteinnachweis

Nach adenoviraler Transduktion wurde das intrazellulär lokalisierte SOD1 mithilfe von Western Blot analysiert.

2.2.9.1 Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Proben wurde das Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Als Referenz wurde eine BCA-Stammlösung (2000 µg/ml) eingesetzt. Zudem wurden daraus Verdünnungen mit den Proteinkonzentrationen 1200, 1000, 800, 600, 400 und 200 µg/ml für die Standardkurve hergestellt. Diese wurden zusammen mit 10 µl RIPA als Blank und den 1:3 verdünnten Proben mit dem Protein des Zelllysats auf eine 96-Well Platte in Dreifachbestimmung aufgetragen. Anschließend wurden 200 µl der BCA-Lösung pro Well hinzugefügt. Diese setzte sich aus einer 1:50 Verdünnung von Kupfer(II)-Sulfat-Lösung und Bicinchoninsäure-Lösung zusammen. Nach 30 s auf dem Tischschüttler und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 492 nm im ELISA-Reader. Vor der Auswertung wurde kontrolliert, dass die Standardkurve einen linearen Verlauf und die Dreifachbestimmungen der Proben übereinstimmende Werte aufweisen. Um die Proben im sich anschließenden Western Blot quantitativ vergleichen zu können wurde das Volumen berechnet, das pro Probe aufgetragen werden muss damit in jede Spur die gleiche Proteinmenge eingebracht wird.

2.2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine hochauflösende, analytische Methode, bei der ein elektrisches Feld zur Auftrennung von Stoffgemischen nach Molekülgröße dient (168). Für die ersten Versuchsreihen wurden dafür zunächst 15 %ige Acrylamidgele von Hand gegossen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidgele für SDS-PAGE

Substanz	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Millipore-H ₂ O	5,7	5,5
30 % Acrylamid-Mix	12,5	1,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	6,3	1,0
10 % SDS	0,25	0,08
10 % APS	0,25	0,08
TEMED	0,01	0,008
Gesamtvolumen	25	8

Das Trenngel wurde zuerst gegossen und während des Polymerisationsvorgangs mit 750 µl n-Butanol überschichtet. Dieses wurde nach Abschluss der Polymerisation entfernt, das Sammelgel zugegeben und ein 12er-Kamm eingebracht.

Die Proteinmenge pro Spur betrug 10 µg. Je Gesamtvolumen wurde 2x oder 6x Lämmli-Puffer zu den Proben gegeben. Anschließend wurden diese bei 95 °C für 8 min zur Denaturierung aufgeköcht.

Das Einsetzen der Gele erfolgte nach dem Befüllen der Gelkammern mit SDS-Page-Puffer. Neben den Proben wurde zur Verifizierung der Proteingröße 5 µl des Page Ruler Plus als Größenmarker eingesetzt. Die Stromstärke während der Elektrophorese lag in den ersten 20 min bei 25 mA und in den folgenden 40 min bei 40 mA pro Gel. Die späteren Versuchsreihen wurden mit 4-20 % Mini-PROTEAN TGX Protein Gels (BioRad) durchgeführt. In der Probenvorbereitung gab es keinen Unterschied zu den von Hand gegossenen Gelen. Lediglich das Programm für die Elektrophorese unterschied sich. Die SDS-PAGE lief hier für eine Stunde bei 500 mA.

2.2.9.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Trägermembran übertragen werden. Der Nachweis von Proteinen ist im Anschluss durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern möglich (169).

Für den Aufbau des Western Blots im Semidry-Verfahren wurden sechs Whatman-Filterpapiere pro Gel benötigt. Zunächst wurden ein in Anodenpuffer A, danach zwei in Anodenpuffer B getränkte Filterpapiere geschichtet. Vor dem Auflegen des Gels folgte zuerst die in Methanol aktivierte PVDF Membran. Zum Abschluss wurden drei mit Kathodenpuffer C durchfeuchtete Filterpapiere aufgelegt.

Für den Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran wurde pro Gel eine Stromstärke von 80 mA für 60 min im Semidry-System angelegt. Anschließend wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 60 min in 5 %iges Milchpulver gelegt. Die Verdünnung des Milchpulvers wurde mit ELISA-Waschpuffer hergestellt. Der in Milchpulver verdünnte Primärantikörper inkubierte über Nacht bei 4 °C (2.1.4).

Nach drei Waschschritten von je 5 min in TBST wurde der 1:10000 in Milchpulver verdünnte Sekundärantikörper für 1 h auf die Membranen gegeben. Es erfolgten erneut drei Waschschrritte von je 5 min. Die Arbeitslösung zur Entwicklung setzte sich aus 10 ml ECL-Mix und 3,05 µl 30 % H₂O₂ zusammen. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die Messung im UV-Transilluminator durchgeführt. Die Bearbeitung erfolgte mit der Image Lab Software.

Damit ein weiterer Antikörper auf die Membran aufgebracht werden konnte, wurden die Membranen 20 min in je 10 ml 1:10 verdünnter Reblot Plus Strong inkubiert. Dadurch wurde der gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Vor dem Auftragen des neuen Antikörpers wurden unspezifische Bindestellen mit in ELISA-Waschpuffer verdünntem Milchpulver (5 %) blockiert. Ein direkt an β-Actin gekoppelter Antikörper diente zur Ladekontrolle (2.1.4.2).

2.2.9.4 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Zur Quantifizierung der Bandenintensitäten wurde die Image Studio Light Software (LICOR Biosciences) angewandt. Dabei wurde die Summe der Pixel-Intensitäten innerhalb eines manuell festgelegten Bereichs als Zahlenwert angegeben. Der endgültige Messwert für jede Bande ergab sich nach Abzug der Pixel-Intensität des Hintergrunds (170). Im Folgenden wurde zunächst eine Ratio aus dem Messwert für SOD1 und β-Actin gebildet um eine Normierung auf die Proteinladung zu erreichen. Anschließend wurden die GFP-transfizierten bzw. -transduzierten Proben gleich eins

gesetzt. Bei den Proben mit p53-Transduktion wurde eine Ratio zur zugehörigen GFP-Probe gebildet um die Transduktionsartefakte zu eliminieren. Die gewonnenen Daten konnten auf diese Weise quantifiziert und graphisch dargestellt werden.

2.2.10 Bindestellenanalyse

Zur Analyse putativer Bindestellen des Transkriptionsfaktors p53 im Promotor, sowie in den Introns von *SOD1* wurde die frei zugängliche Datenbank JASPAR 2022 herangezogen. Die Grundlage der Bindestellenanalyse bildet die sequenzspezifische Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren mit bestimmten Bindestellen, wodurch im Rahmen der Genexpression die Transkription gehemmt oder gefördert wird.

Die DNA-Bindestelle für Regulationsproteine wird auch DNA-Motiv genannt. Es handelt sich dabei meist um hoch konservierte, statistisch überrepräsentierte, sich wiederholende Sequenzen bzw. strukturierte Muster. Die experimentelle Analyse von Transkriptionsfaktorbindestellen an der DNA ist schwierig, weshalb sich die Forschung auf computergestützte Berechnungsmethoden und Wahrscheinlichkeitsmodelle zur Vorhersage dieser Bindestellen stützt. Die potentiellen Bindestellen werden aus zuvor durchgeführten Experimenten wie ChiP-seq/-exo oder Proteinbindungsmicroarrays abgeleitet. Positions-Gewichts-Matrizen sind die am häufigsten verwendeten mathematischen Modelle. Prinzipiell haben Transkriptionsfaktoren innerhalb eines Satzes von Bindungsmotiven unterschiedliche Affinitäten zu einzelnen Sequenzen. Die Positions-Gewichts-Matrizen enthalten die positionsabhängigen Wahrscheinlichkeiten jedes Nukleotids im Motiv, woraus sich ein Bindungsaffinitätsscore ergibt. Durch Cut-offs der Matrix-Übereinstimmung werden falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse reduziert. Es wurden nur putative Bindestellen mit einem „Relative score“ von >80 % (= Schwellenwert) einbezogen. Die primär experimentell identifizierte Score-Matrix kann zur übersichtlichen Darstellung in ein Sequenzlogo übersetzt werden (Abbildung 10) (171), (172), (173).

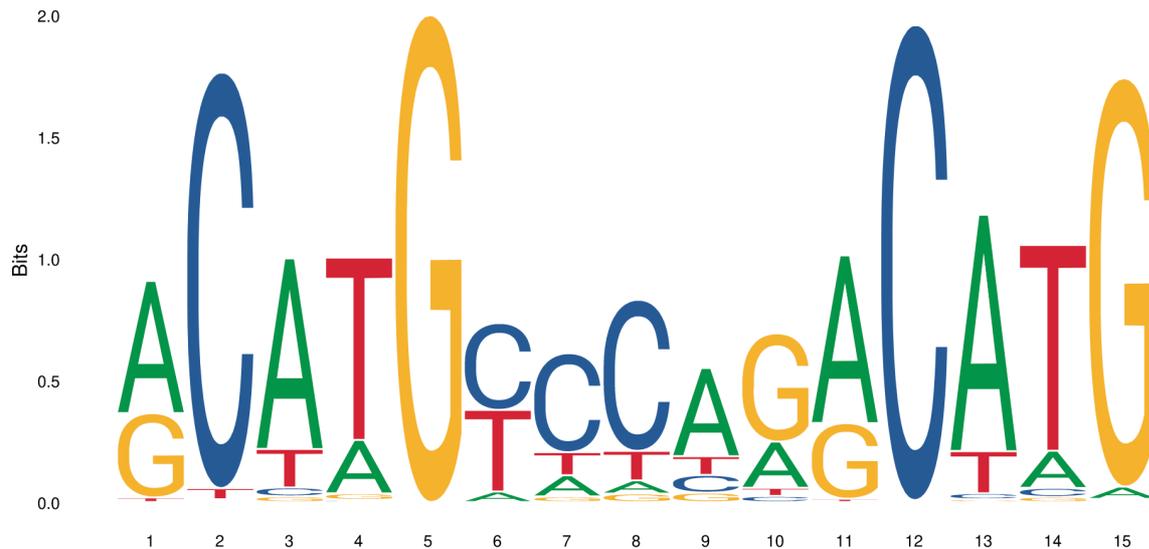


Abbildung 10: Sequenzmatrix

p53-Matrix MA0106.2, MA0106.2.TP53 aus JASPAR

2.3 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten wurde mithilfe von Microsoft Excel 2013 und SigmaPlot 14.0 durchgeführt. Als Test zur statistischen Auswertung wurde der Welch´s t-test verwendet. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $\leq 0,001$. Die angegebenen p-Werte beziehen sich immer auf die unbehandelten Zellen, GFP oder die non-targeting siRNA.

3 Ergebnisse

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden über Microarraydatenanalysen Zielgenexpressionsprofile der p53-Familienmitglieder im HCC erstellt. Die daraus generierte HCC-Signatur besteht aus 28 gemeinsamen Zielgenen der p53-Familie mit prognostischer Relevanz im HCC. *SOD1* befindet sich unter den 15 Zielgenen dieser Gruppe, die signifikant mit dem Überleben von Patienten assoziiert sind (148). *SOD1* ist somit eines der 15 Gene der 28 Gene umfassenden Gen-Signatur, die für sich allein genommen statistisch signifikant mit dem Überleben der Patient:innen korrelieren. In dieser hier vorliegenden Arbeit untersuchen wir mögliche Regulationen von *SOD1* durch p53 auf Proteinebene und auf transkriptioneller Ebene.

3.1 Die HCC-Zelllinien Huh7 und Hep3B weisen eine mittlere *SOD1*-Proteinexpression auf

Um eine mögliche Wechselwirkung von p53 und *SOD1* auf Proteinebene zu untersuchen, haben wir zunächst ein optimales *in vitro* Modell etabliert. Dieses Modellsystem musste (1) eine mittlere endogene *SOD1*-Expression aufweisen um Hoch- bzw. Runterregulationen des Proteins detektieren zu können, (2) die Zellen mussten transduzierbar sein um exogenes p53 in die Zellen einbringen zu können, und (3) endogenes p53 sollte deletiert bzw. mutiert sein um spezifisch die Effekte des transduzierten, exogenen Wildtyp p53 analysieren zu können.

Zunächst wurden Proteinlysate verschiedener humaner Zelllinien gewonnen und mittels Western Blots analysiert. Durch Verwendung eines spezifischen, polyklonalen *SOD1*-Antikörpers erfolgte die Detektion der intrazellulär vorhandenen *SOD1*-Proteinmenge (Abbildung 11a). Bei den verwendeten HCC-Zelllinien handelte es sich um Huh7- (p53 mutiert), Hep3B- (p53 deletiert) und HepG2 (p53 wt). Diese wurden mit Kolonkarzinomzellen (HT29) und Zellen des kolorektalen Adenokarzinoms (Caco-2, SW480) in Bezug auf die *SOD1*-Expression verglichen.

Des Weiteren waren HCT116-Zellen des kolorektalen Karzinoms mit p53-Knock-out- (p53^{-/-}) und mit p53-Wildtyp-(wt p53)-Status Gegenstand der Untersuchung. Zur Evaluierung wurden die auf die β -Actin-Ladekontrolle genormten absoluten Werte der densitometrischen Auswertung herangezogen (Abbildung 11b). Da SW480 und HCT116 vergleichsweise hohe *SOD1*-Spiegel aufwiesen, wurden diese für die

weiteren Untersuchungen als Grundlage für ein *in vitro* Modell ausgeschlossen. In der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie Caco-2, die defizient für p53 ist, wurde die geringste Menge SOD1 nachgewiesen. Die HCC-Zelllinien HepG2, Huh7 und Hep3B befanden sich bezüglich ihrer SOD1-Spiegel in etwa im Bereich der Kolonkarzinomzelllinie HT29 und der HCT116 p53(-/-)-Zellen des kolorektalen Karzinoms und wiesen somit eine mittlere SOD1-Proteinexpression auf.

Hep3B (p53 deletiert), Huh7 (p53 mutiert) und HCT116 p53(-/-)-Zellen erfüllten zwei der optimalen Voraussetzungen als *in vitro* Modell zur Untersuchung der p53 vermittelten SOD1-Regulation. Bei der HCT116 p53(-/-) Zelllinie handelt es sich um einen chemischen, durch genomweite Mutagenese induzierten Knock-out von p53. Hierbei können Mutationen in weiteren Signalwegen nicht ausgeschlossen werden, daher entschieden wir uns gegen die Verwendung dieser Zelllinie. Hep3B und Huh7 rückten daher in den Mittelpunkt unserer Auswahl. Da Huh7-Zellen endogenes, mutiertes p53 exprimierten, waren die Zellen für uns besonders interessant. In diesen Zellen konnten wir nicht nur die Effekte, die durch die Induktion von funktionalem, exogenem p53 vermittelt werden untersuchen, sondern auch mögliche Effekte von mutiertem, endogenem p53 auf die SOD1-Expression. Somit fokussierten wir unsere Untersuchungen neben der Zelllinie Hep3B vor allem auf Huh7-Zellen.

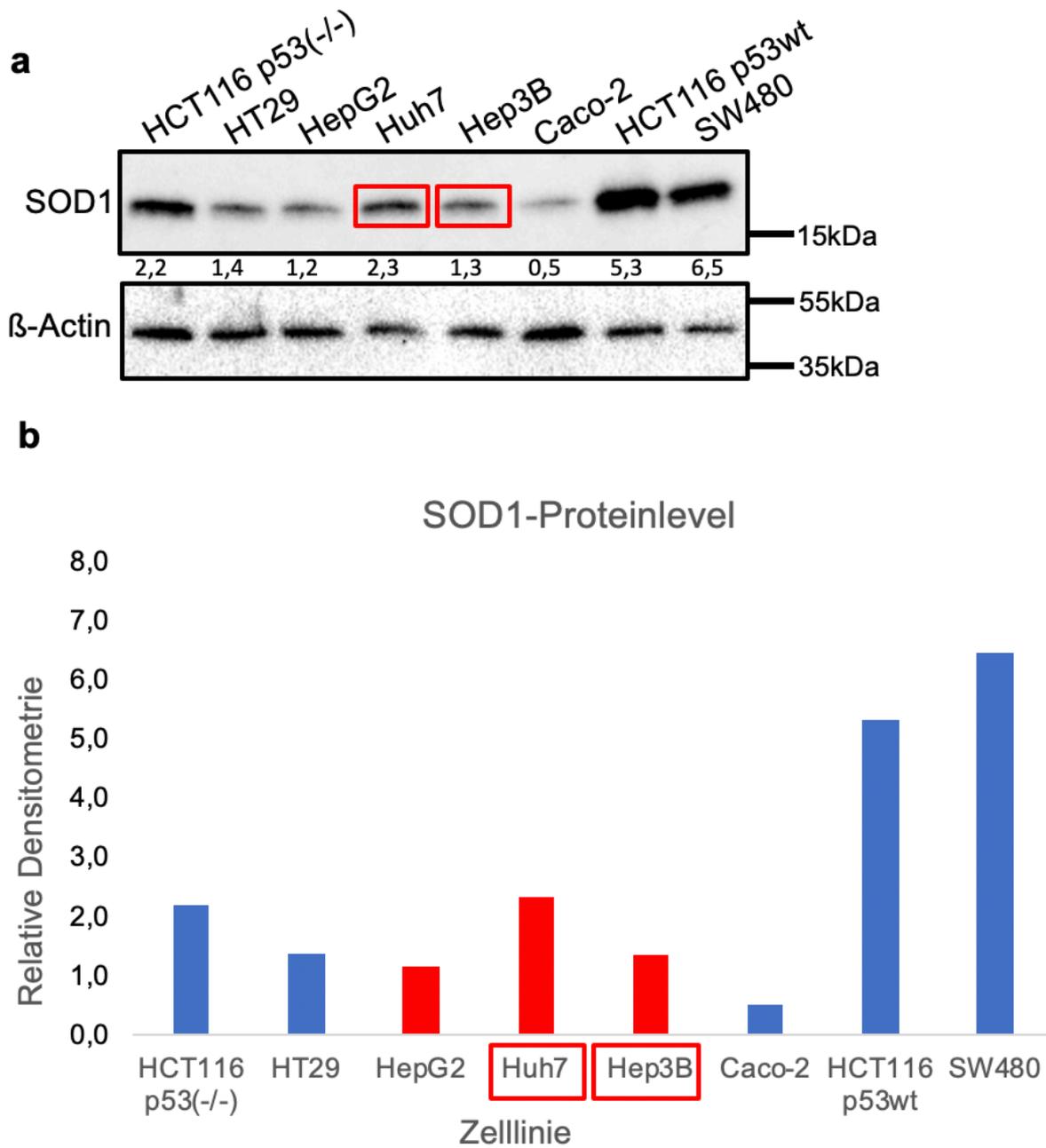


Abbildung 11: SOD1-Proteinspiegel in verschiedenen Zelllinien

Die SOD1-Proteinspiegel wurden in verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot ermittelt. **a** Von zwei Replikaten ist ein repräsentativer Western Blot gezeigt (n=2). **b** Die absoluten Werte der densitometrischen Auswertung sind nach Normierung auf β -Actin graphisch dargestellt.

3.2 Nachweis der Transduktionseffizienz bei adenoviralen Vektoren

Um zu überprüfen, ob Hep3B- bzw. Huh7-Zellen auch optimal transduzierbar und somit geeignet sind, exogenes p53 in ausreichender Menge zu exprimieren, wurde die Transduktionseffizienz bestimmt. Adenovirale Vektoren gehören zu den gängigsten Ansätzen für die Transduktion von Zellen. Sie sind in der Lage die replizierenden und nicht-replizierenden Zellen der meisten menschlichen Gewebe effizient zu infizieren und die Transgene erfolgreich in diese Zellen einzubringen. Für HCC-Zelllinien sind erfolgreiche Transduktionsergebnisse nachgewiesen worden. Die Effizienz der Transduktion wird durch zahlreiche Faktoren wie z.B. die Proliferation der Wirtszelle beeinflusst (174). Aus diesem Grund war es als Basis für die weiteren Untersuchungen von entscheidender Bedeutung, zunächst die Transduktionseffizienz der verwendeten adenoviralen Konstrukte rAd-GFP und rAd-p53-GFP für Hep3B- bzw. Huh7- Zellen zu ermitteln.

Der Nachweis von GFP in der Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Mittel zur Überprüfung der Effektivität adenoviraler Transduktion (175). Mit der Probenvorbereitung für die FACS-Messung wurde 24 h nach der Transduktion begonnen. Die Bestimmung des GFP-Signals erfolgte durch FACS-Messung im FITC-A-Kanal. Als Kontrolle für die beiden GFP-gekoppelten adenoviralen Konstrukte rAd-GFP und rAd-p53-GFP dienten nicht-transduzierte Zellen. Von rAd-GFP, rAd-p53-GFP und der Kontrolle wurden jeweils voneinander unabhängige Triplikate gemessen. Für die Zellen lag die Transduktionseffizienz des Kontrollvektors rAd-GFP bei mehr als 73 %. Die Messung ergab für den p53-Expressionsvektor rAd-p53-GFP eine Transduktionseffizienz von 88 % (Abbildung 12). Die Transduktionseffizienz der beiden verwendeten adenoviralen Vektoren ist folglich sehr gut.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Transduktion der adenoviralen Vektoren in Hep3B- und Huh7-Zellen mit sehr guter Effizienz erfolgt. Somit erfüllen diese beiden Zelllinien die optimalen Bedingungen als *in vitro* Modell für die Untersuchung der p53 vermittelten SOD1-Regulation.

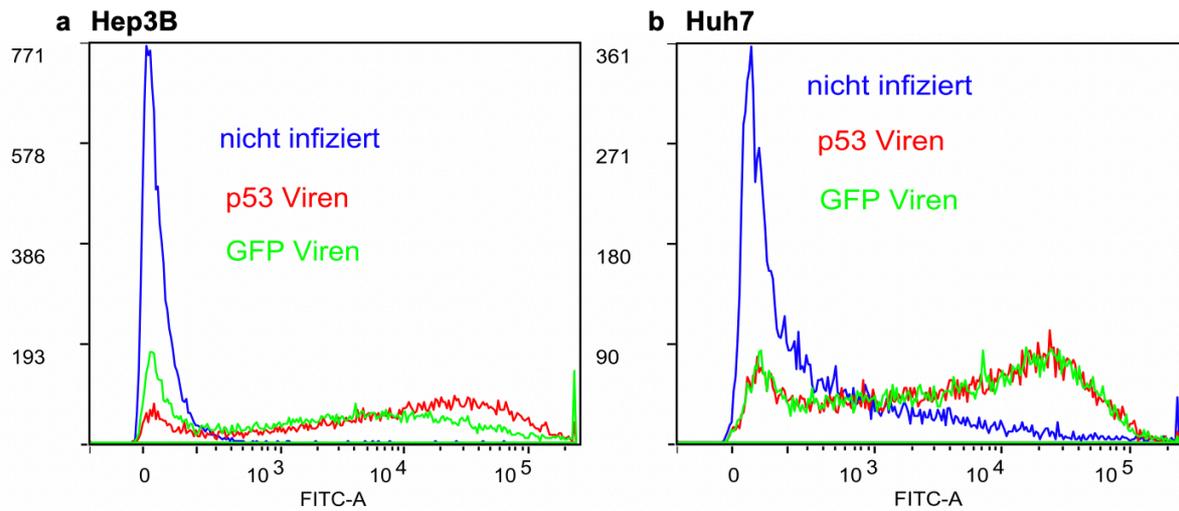


Abbildung 12: Bestimmung der Transduktionseffizienz im FACS

Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurden die adenoviral transduzierten Hep3B und Huh7-Zellen im FACS analysiert. Die Transduktion erfolgte mit rAd-GFP bzw. rAd-p53-GFP. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Hep3B- und Huh7-Zellen. Die drei gemessenen Ansätze wurden im Overlay-Histogramm dargestellt. Das GFP-Signal wurde im FITC-A-Kanal gemessen. Das Histogramm steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente (n=3).

3.3 SOD1 ist ein essentielles Protein in der oxidativen Abwehr

Nachdem somit das *in vitro* System etabliert war, haben wir uns auf die optimalen Versuchsbedingungen konzentriert um die SOD1-Regulation zu untersuchen. SOD1 katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Durch ihre Aktivität kontrolliert SOD1 die Konzentration einer Vielzahl an ROS und begrenzt damit die potenzielle Toxizität dieser Moleküle (176). Die Proteinkonzentration der SOD1 ist unter normalen Bedingungen konstant. Bei zellulärem, vor allem oxidativem Stress erhöht sich sowohl die Aktivität als auch die Proteinmenge an SOD1 (177). Um untersuchen zu können, ob p53 als Regulator von SOD1 fungiert oder ob p53 im Zusammenhang mit oxidativem Stress SOD1 reguliert, wollten wir einen Versuchsaufbau entwickeln, der eine geregelte Induktion von oxidativem Stress erlaubt. Dabei war es besonders wichtig, dass die Akkumulation der ROS und somit der oxidative Stress im Zytosol lokalisiert war. Superoxidanionen haben nur eine sehr geringe Halbwertszeit und sind nicht membrangängig (178). Aus diesem Grund müssen sie im gleichen Kompartiment wie SOD1, also in dem Zytosol, generiert werden.

Antimycin A ist ein sekundärer Metabolit, produziert durch Bakterien der Gattung *Streptomyces*. Durch Inhibition des Komplex III der Atmungskette kollabiert das mitochondriale Membranpotential. Dies resultiert in einer Freisetzung von Superoxidanionen aus dem Mitochondrium in das Zytosol und die mitochondriale Matrix (164). Die Freisetzung dieser kurzlebigen ROS ins Zytosol kann damit direkt auf SOD1 wirken (179).

3.3.1 Bestimmung der optimalen Bedingungen um oxidativen Stress zu induzieren

Durch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und die dadurch verursachte energetische Krise sowie die Produktion von ROS, die oxidative Schäden verursachen, kann Antimycin A Zelltod auslösen. Aus diesem Grund haben wir zunächst die optimale Konzentration von Antimycin A ermittelt, die nur eine minimale Zellsterblichkeit (<20 %) verursacht. Um den durch Antimycin A induzierten Zelltod präzise zu quantifizieren, haben wir einen späten Zeitpunkt (24 h) gewählt. Zu diesem Zeitpunkt ist anzunehmen, dass die energetische Krise und die Anhäufung oxidativer Schäden bereits Zelltod ausgelöst haben.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine genaue, quantitative Analyse großer Zellpopulationen in Bezug auf Zelltod und weitere biologische Prozesse.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS) beruht darauf, dass Zellen einen Laserstrahl durchqueren und in dessen Fokus das Licht streuen. Die Analyse des gestreuten Lichts gibt Auskunft über Größe und Struktur der Zelle. Die Intensität des in Vorwärtsrichtung gestreuten Lichts korreliert mit der Zellgröße (Forward scatter; FSC). Die Intensität des im rechten Winkel zum Laserstrahl gemessenen Streulichts (Side Scatter: SSC) steht im Zusammenhang mit der Granularität, dem Brechungsvermögen sowie intrazellulären Strukturen, die das Licht reflektieren können (180), (181). Zur durchflusszytometrischen Beurteilung des Zelltods gibt es verschiedene Möglichkeiten. So kann man anhand von Veränderungen der Lichtstreuungseigenschaften Zelltod messen. Die Veränderung der Lichtstreuung während des Zelltods ist das Ergebnis von Anschwellen bzw. Schrumpfen der Zelle oder Zerreißen der Plasmamembran. Für verschiedene Arten des Zelltods existieren dabei unterschiedliche Muster. Bei der Nekrose nimmt die Fähigkeit der Zelle gleichzeitig in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung Licht zu streuen, initial zu und dann schnell ab. Dies bedeutet, dass es zuerst zu einer initialen Zellschwellung gefolgt von der Ruptur der Plasmamembran kommt. Ein spezifisches Muster wurde auch für die Apoptose beobachtet. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung nimmt zunächst ab, was das Ergebnis der Zellschrumpfung ist. In manchen Zelllinien nimmt die Seitwärtsstreuung durch die Kondensation des Chromatins und fragmentierte Zellkerne zu. Entscheidend in Bezug auf die Apoptose ist, dass in späteren Stadien die Intensität des gestreuten Lichts in beide Richtungen abnimmt (180), (181).

Diese spezifische Abnahme wurde durch Walczak und Sprick et al. (182) beschrieben. Der Zelltod wurde durch eine Abnahme des FSC/SSC-Streuungsprofils im Vergleich zu lebenden Zellen detektiert (Abbildung 13a) (183), (184).

In unserem Versuch zur Messung des Zelltods in Hep3B- und Huh7-Zellen nach Behandlung mit Antimycin A wurden diese 24 h mit Antimycin A inkubiert und anschließend im FACS analysiert. Der Zelltod in Prozent wurde nach folgender Formel berechnet (183), (184), (185).

$$\text{cell death \%} = \frac{(\% \text{ experimental cell death} - \% \text{ spontaneous cell death})}{100 \% - \% \text{ spontaneous cell death}} \times 100$$

Der *spontaneous cell death* beschreibt den spontanen Zelltod, der in der unbehandelten Kontrolle ohne den Einfluss von Antimycin A aufgetreten ist. Beim *experimental cell death* handelt es sich um den Zelltod, der nach der Behandlung mit Antimycin A gemessen werden konnte. Um zu ermitteln wie viel Zelltod Antimycin A hervorruft, muss der *experimental cell death* um den *spontaneous cell death* bereinigt werden (Abbildung 13b).

In unserem Experiment verwendeten wir 1 μM Antimycin A zur Inhibition der Atmungskette und inkubierten die Zellen für 24 h. In der FACS-Analyse ergab sich im Mittel ein spezifischer Zelltod von 18,89 % für Huh7-Zellen.

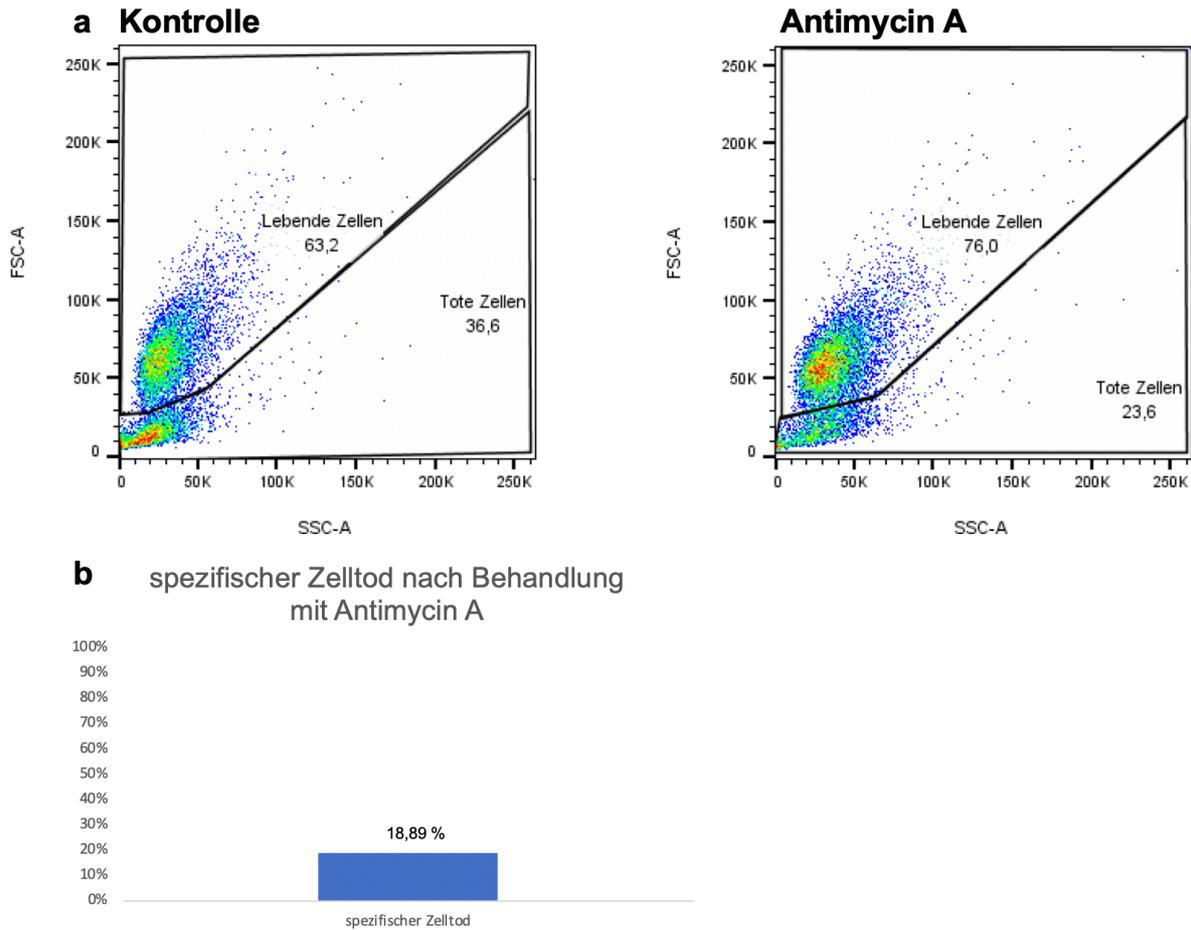


Abbildung 13: FACS-Analyse des spezifischen Zelltods

Gezeigt ist ein exemplarischer Versuch ($n=2$) der Analyse des Zelltods von Huh7-Zellen im FACS. Die Zellen wurden definiert durch ihre Streulichtparameter. Es erfolgte eine Analyse der FSC/SSC-Streuungsprofils. **a:** Der FSC ist auf der y-, der SSC auf der x-Achse abgebildet. Die Kontrolle entspricht unbehandelten Zellen. Im rechten Diagramm erfolgte eine Inkubation der Huh7-Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Antimycin A für 24 h; **b:** Die Berechnung des spezifischen Zelltods erfolgte durch Bereinigung des Zelltods durch Antimycin A um den spontanen Zelltod in der Kontrolle (s. Formel).

Dieses Experiment wurde zur Definition der adäquaten Antimycin A-Konzentration für die folgenden Versuche durchgeführt. Auf Grundlage unserer Ergebnisse legten wir die Antimycin A-Konzentration auf $1 \mu\text{M}$ fest. Die ausgewählte Konzentration von Antimycin A erzeugt zweifelsfrei einen nachweisbaren Effekt, ohne dabei eine signifikant hohe Zellsterblichkeit in den Huh7-Zellen zu verursachen.

3.3.2 Antimycin A induziert oxidativen Stress im Zytosol

Nachdem wir gezeigt haben, dass eine Konzentration von 1 μM Antimycin A nach 24 h Zelltod von unter 20 % induziert, überprüften wir, ob diese Konzentration ausreicht um ROS freizusetzen. Die Produktion von ROS sollte unmittelbar nach der Hemmung der Atmungskette durch Antimycin A auftreten. Daher haben wir für die Messung einen Zeitpunkt gewählt, bei dem wir sicherstellen konnten, dass die Zellsterblichkeit unter 20 % liegt. Wir haben uns für einen Zeitpunkt von 12 h entschieden, da dieser Zeitpunkt auch für die nachfolgenden Versuche, bei denen p53 induziert oder durch siRNA herunterreguliert wurde, optimal ist. Dazu wurde zunächst CellROX Deep Red Reagent für die spezifische Detektion von ROS im Zytosol verwendet. Zum Nachweis von ROS im Mitochondrium diente MitoSOXTM Red. CellROX Deep Red Reagent ist in der Lage intrazelluläre Superoxidanionen, Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und verschiedene reaktive Stickstoffspezies zu detektieren. Auch Veränderungen der Menge sind messbar (186), (187). CellROX Deep Red besitzt Absorptions-/Emissionsmaxima von 644/665 nm. Die Detektion des Farbstoffs erfolgte mittels Lichtmikroskop bzw. FACS.

Die mit Antimycin A behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine deutliche Fluoreszenz im Lichtmikroskop (Abbildung 14). Durch das Anfärben der ROS mittels CellROX Deep Red konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung der Huh7-Zellen mit Antimycin A intrazellulär zur Anreicherung von ROS kommt. In den Zellkernen war keine verstärkte Rotfärbung und somit auch kein ROS nachweisbar.

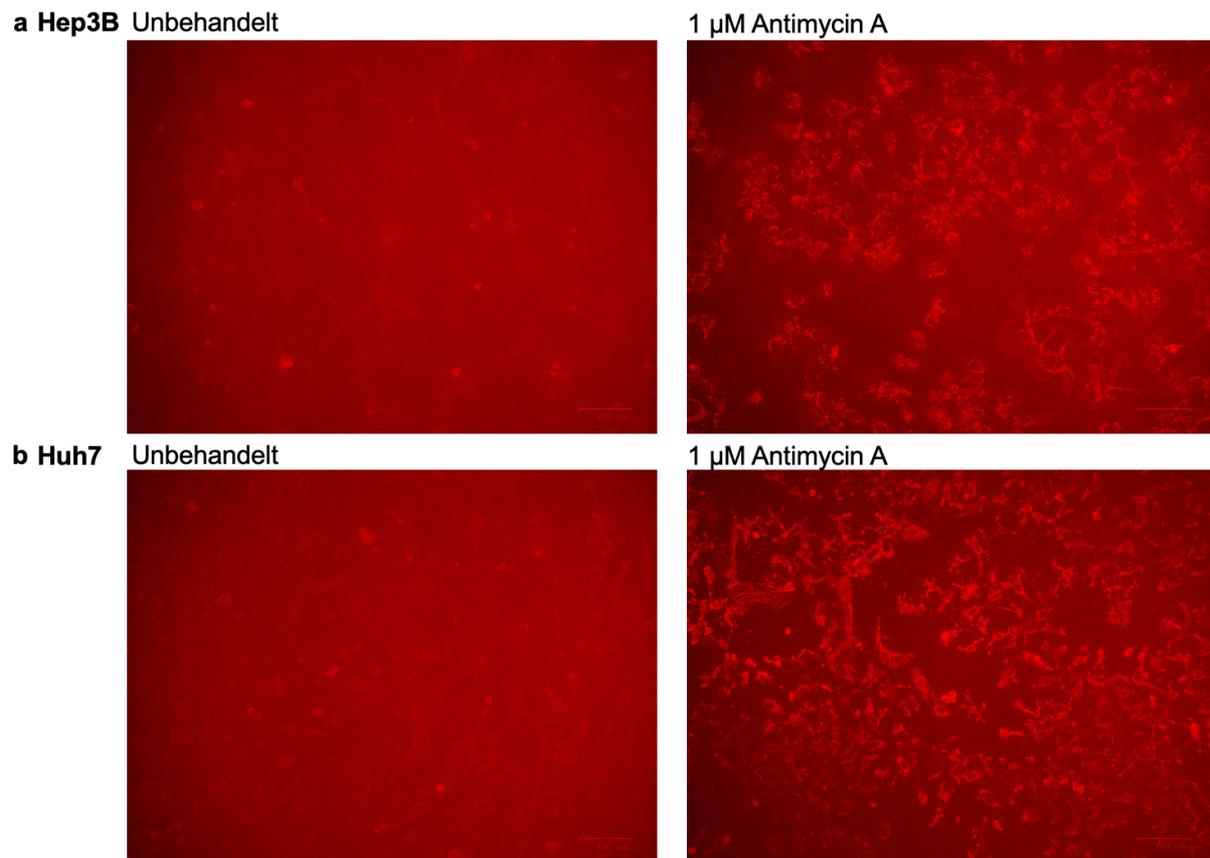


Abbildung 14: Antimycin A induziert nach 12 h oxidativen Stress im Zytosol

Die Bilder zeigen Hep3B- (oben) und Huh7-Zellen (unten). Die Zugabe von Antimycin A erfolgte in der vorher festgelegten Konzentration (1 µM); Die Inkubationszeit von Antimycin A betrug 12 h; Die Zellen wurden mit CellROX gefärbt und im Durchlichtmikroskop analysiert. Als Kontrolle dienten mit CellROX gefärbte, aber unbehandelte (ohne Antimycin A) Zellen. Von drei unabhängigen Replikaten ist repräsentativ jeweils ein Bild gezeigt (n=3).

3.3.3 Detektion von intrazellulärem ROS mit CellROX Deep Red in der Durchflusszytometrie

Im nächsten Schritt wurde mit CellROX Deep Red-Färbung eine Untersuchung der mit Antimycin A behandelten bzw. unbehandelten Zellen im FACS durchgeführt. Auch hier wurde wieder 12 h als Zeitpunkt für die Messung gewählt. Der Ansatz „ungefärbt“ wurde weder mit Antimycin A behandelt, noch mit CellROX gefärbt. Er wies nur ein marginales Fluoreszenzsignal auf. Eine Behandlung mit Antimycin A führte bei den Zellen zu einem deutlichen Anstieg in der Fluoreszenz, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die Fluoreszenz nahm bei Behandlung mit Antimycin A um 12 % bei Hep3B-Zellen und um 38 % bei Huh7-Zellen zu (Abbildung 15).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Huh7-Zellen mit Antimycin A tendenziell zu verstärktem oxidativem Stress im Zytosol führt.

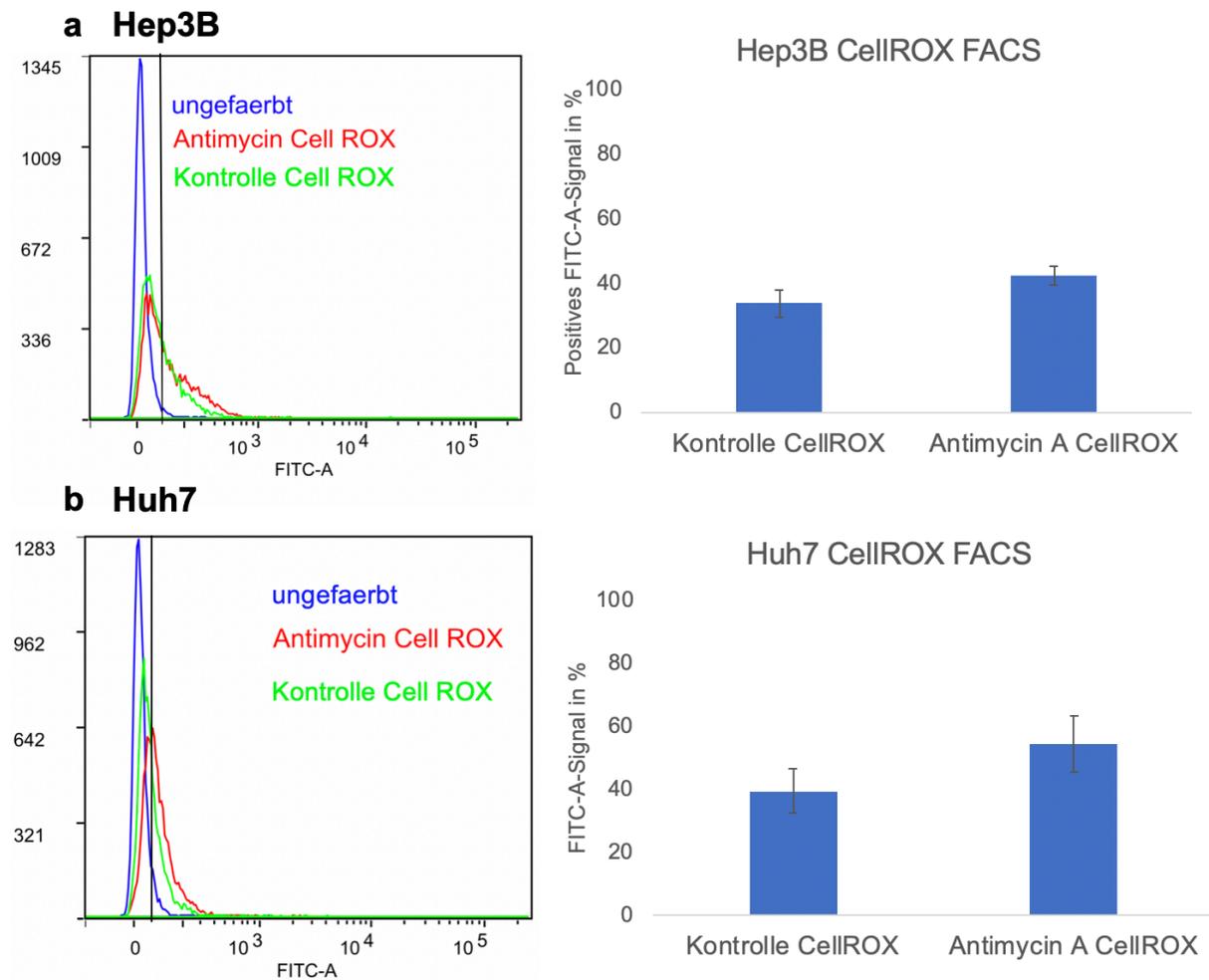


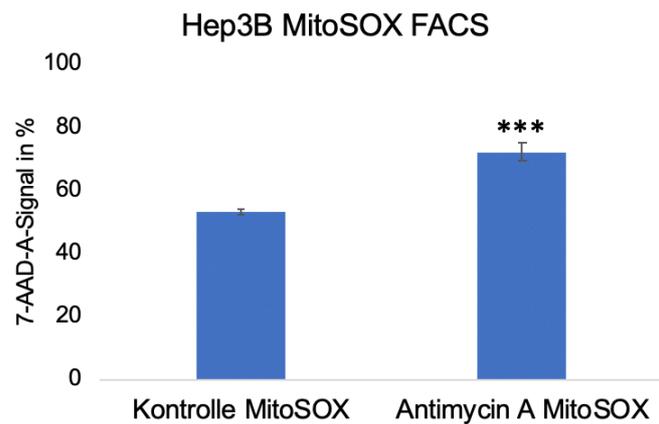
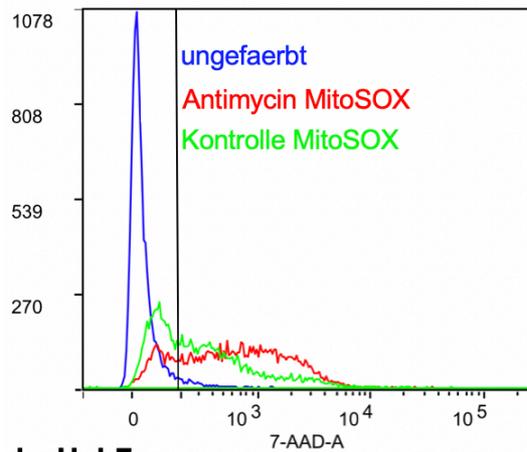
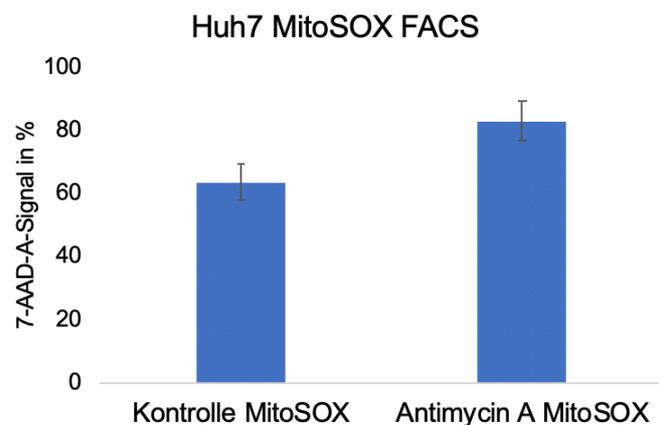
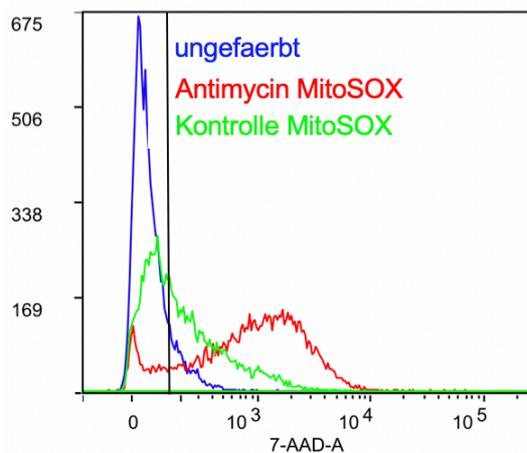
Abbildung 15: Leberzelllinien Hep3B- und Huh7-Zellen im FACS nach Färbung mit CellROX zum Nachweis von zytosolischem ROS

Gezeigt sind die Ergebnisse der Detektion von intrazellulärem ROS in Hep3B-Zellen und Huh7-Zellen im FACS nach 12 h Inkubation mit 1 μ M Antimycin A. Im Anschluss wurden die Zellen mit CellROX gefärbt. Unbehandelte Zellen (ohne Antimycin A) mit (Kontrolle CellROX) bzw. ohne CellROX-Färbung (ungefärbt) dienten als Kontrolle; Es ist repräsentativ eines von zwei Replikaten dargestellt (n=2). Die drei Ansätze wurden im Overlay-Histogramm zusammengefasst. Die Mittelwerte und Standardabweichungen des positiven FITC-A-Signales der zwei unabhängigen Replikate von „Kontrolle CellROX“ und „Antimycin A CellROX“ wurden im Balkendiagramm zusammengefasst.

3.3.4 Antimycin A induziert auch oxidativen Stress in der mitochondrialen Matrix

Nachdem im Zytosol ein Anstieg der ROS-Menge nach Behandlung der Zellen mit Antimycin A zu verzeichnen war, untersuchten wir im nächsten Schritt den Effekt von Antimycin A auf die ROS-Produktion in Mitochondrien. Im Folgenden verwendeten wir MitoSOX™ Red als Fluoreszenzfarbstoff. Der Versuchsaufbau aus der Färbung mit CellROX wurde beibehalten (3.3.3). Der fluorogene Farbstoff ist auf die hochspezifische Färbung von ROS im Mitochondrium ausgerichtet. Sein Absorptions- bzw. Emissionsmaximum liegt bei 510/580 nm (188). Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie im 7-AAD-A-Kanal. Bei unbehandelten und ungefärbten Zellen wurde auch hier nur ein marginales Signal detektiert. Die Fluoreszenz nahm nach Behandlung mit Antimycin A um 28 % bei Hep3B und 30 % bei Huh7-Zellen zu. (Abbildung 16).

Somit konnten wir zeigen, dass die Behandlung von Hep3B- und Huh7-Zellen mit Antimycin A auch zu einem Anstieg der ROS-Menge in Mitochondrien führt. Da wir somit sowohl im Mitochondrium als auch im Zytosol oxidativen Stress erzeugen konnten, konnten wir Antimycin A für unsere Versuche verwenden. Gerade die Produktion von ROS im Zytosol ist besonders wichtig, da hier auch die SOD1 lokalisiert ist.

a Hep3B**b Huh7****Abbildung 16: Hep3B- und Huh7-Zellen im FACS nach Färbung mit MitoSOX**

Dargestellt ist die Induktion von mitochondrialer ROS in Hep3B- bzw. Huh7-Zellen durch Antimycin A. Die Zellen wurden mit 1 μ M Antimycin A für 12 h inkubiert, anschließend mit MitoSOX gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Unbehandelte Zellen (ohne Antimycin A) mit (Kontrolle MitoSOX) bzw. ohne MitoSOX-Färbung (ungefärbt) dienten als Kontrolle. Es ist repräsentativ eines von drei unabhängigen Replikaten dargestellt (n=3). Gezeigt ist jeweils eines von drei repräsentativen Experimenten als Overlay-Histogramm sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen des positiven 7-AAD-A-Signales im Balkendiagramm (*p \leq 0,05, **p \leq 0,01, *** \leq 0,001).

3.4 Untersuchung der relativen *SOD1*-RNA-Expression und der *SOD1*-Proteinsynthese in Huh7-Zellen nach Behandlung mit Antimycin A

3.4.1 Versuchsaufbau

Nachdem wir das geeignete *in vitro* Modell etabliert und die entsprechenden Versuchsbedingungen festgelegt hatten, bei denen ROS-Produktion stattfindet (12 h nach der Inkubation mit Antimycin A), haben wir den Einfluss einer Behandlung mit Antimycin A auf die Genexpression von *SOD1* untersucht, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von p53-Transduktion. Für diese Untersuchung verwendeten wir Huh7-Zellen (Abbildung 17).

SOD1 ist einer der wichtigsten zellulären Redox-Regulatoren. Es setzt die hochreaktiven Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid um (178), (189). Eine Veränderung der Protein-Expression von *SOD1* hat daher Auswirkungen auf das Zellüberleben, die Resistenz gegenüber oxidativem Stress und die intrazelluläre Signalweiterleitung (177). Um immer eine konstante *SOD1*-Expression zu gewährleisten, wird diese auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene streng kontrolliert (121), (177), (190). Aus diesem Grund haben wir den Einfluss von p53 auf die *SOD1*-Transkription sowohl unter normal Bedingungen als auch unter oxidativem Stress untersucht. Da solche Regulationsmechanismen auf Proteinebene für *SOD1* bekannt sind (177), haben wir auch das mutierte, endogene p53 in den Huh7-Zellen mittels siRNA herunterreguliert und die Effekte auf die *SOD1*-Protein-Expression analysiert.

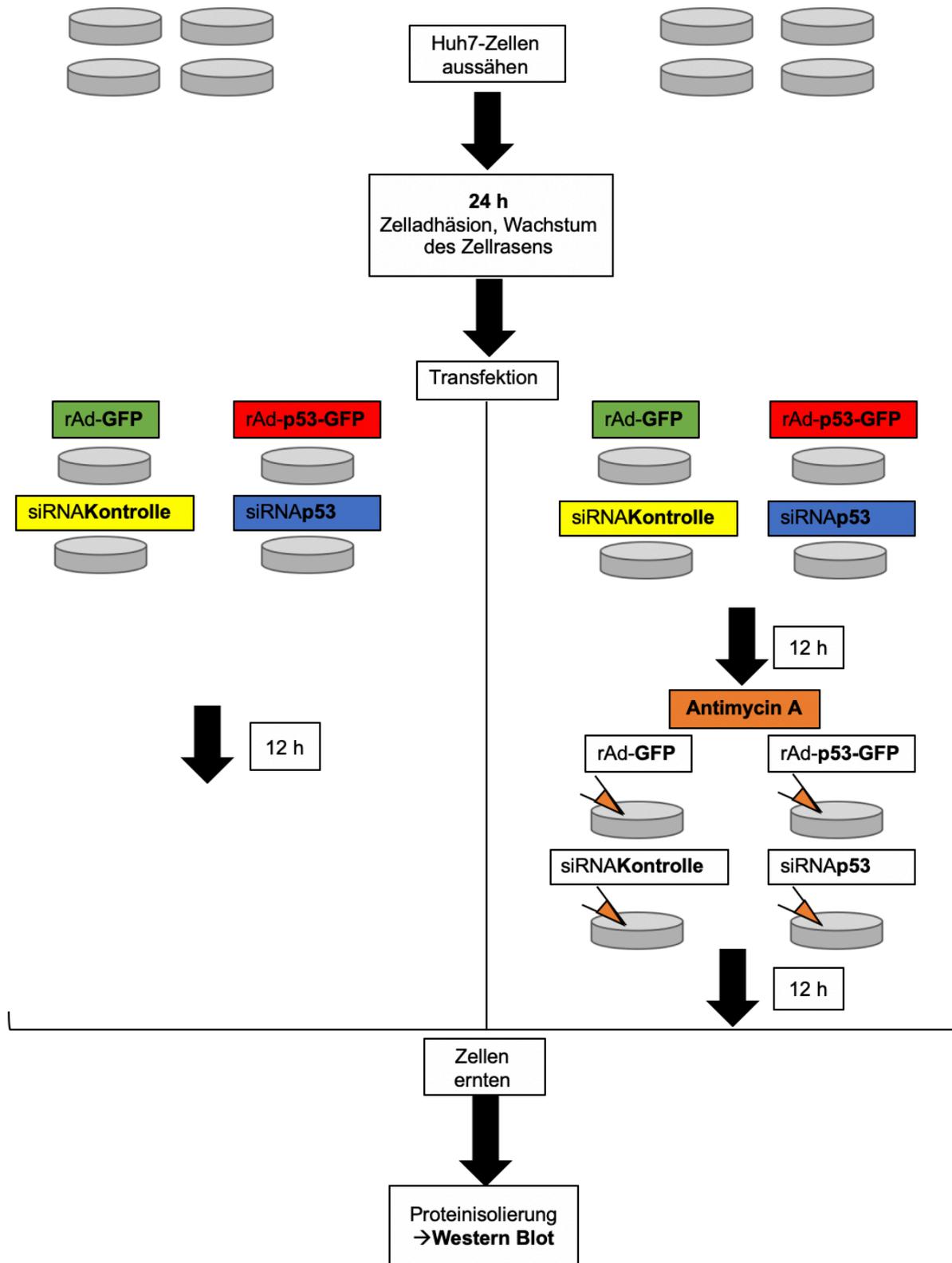


Abbildung 17: Schematischer Versuchsaufbau der p53-Induktion bzw. des p53-Silencings in Huh7-Zellen

Schematischer Versuchsaufbau der Induktion von oxidativem Stress in Huh7-Zellen nach p53-Induktion bzw. p53-Silencing

Zur Induktion wurden die adenoviralen Vektoren kodierend für GFP (rAd-GFP) bzw. für p53 und GFP (rAd-p53-GFP) unserer Arbeitsgruppe verwendet (2.1.10). Wir verwendeten Huh7-Zellen und führten neben der p53-Induktion auch ein p53-Silencing mithilfe von siRNA durch. Es handelt sich bei siRNAs um einsträngige, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 20-30 Nukleotiden, die in der Lage sind die Genexpression des Zielgens zu blockieren und einen Knock-down herbeizuführen. Im Anschluss an das p53-Silencing bzw. die adenovirale Transfektion wurden die Zellen für 12 h mit 1 μ M Antimycin A inkubiert. Nachfolgend wurden Protein-Lysate gewonnen.

3.4.2 Die Induktion von p53 führt mit und ohne Antimycin A- Behandlung zu erhöhter SOD1-Proteinproduktion in Huh7-Zellen

SOD1 unterliegt einer komplexen Regulation und wird auch oft über post-transkriptionale Mechanismen reguliert. Um die genaue Rolle der p53 vermittelten SOD1-Regulation zu bestimmen, untersuchten wir die Proteinmenge mittels Western Blot.

Im Western Blot konnte die erfolgreiche p53-Induktion nachgewiesen werden. Auch das Silencing von p53 mittels siRNA war erfolgreich (Abbildung 18). Für die densitometrische Auswertung wurden die Signale auf die Ladekontrolle β -Actin normiert. Die Ergebnisse der relativen Densitometrie wurden durch Normierung der Werte der p53-Induktion auf die GFP-Kontrolle bzw. der siRNA p53 auf die siRNA Kontrolle generiert.

Bei p53-Induktion konnte eine signifikante Erhöhung der SOD1-Proteinproduktion verglichen mit der GFP-Kontrolle detektiert werden. Auch bei zusätzlicher Inkubation mit Antimycin A war ein Anstieg der SOD1-Menge zu verzeichnen, welcher durch Induktion von p53 nochmals verstärkt werden konnte. Das p53-Silencing führte zu einer geringen Abnahme der SOD1-Proteinproduktion im Vergleich zu der als Kontrolle verwendeten Control Pool Non-Targeting siRNA (siRNA Kontrolle).

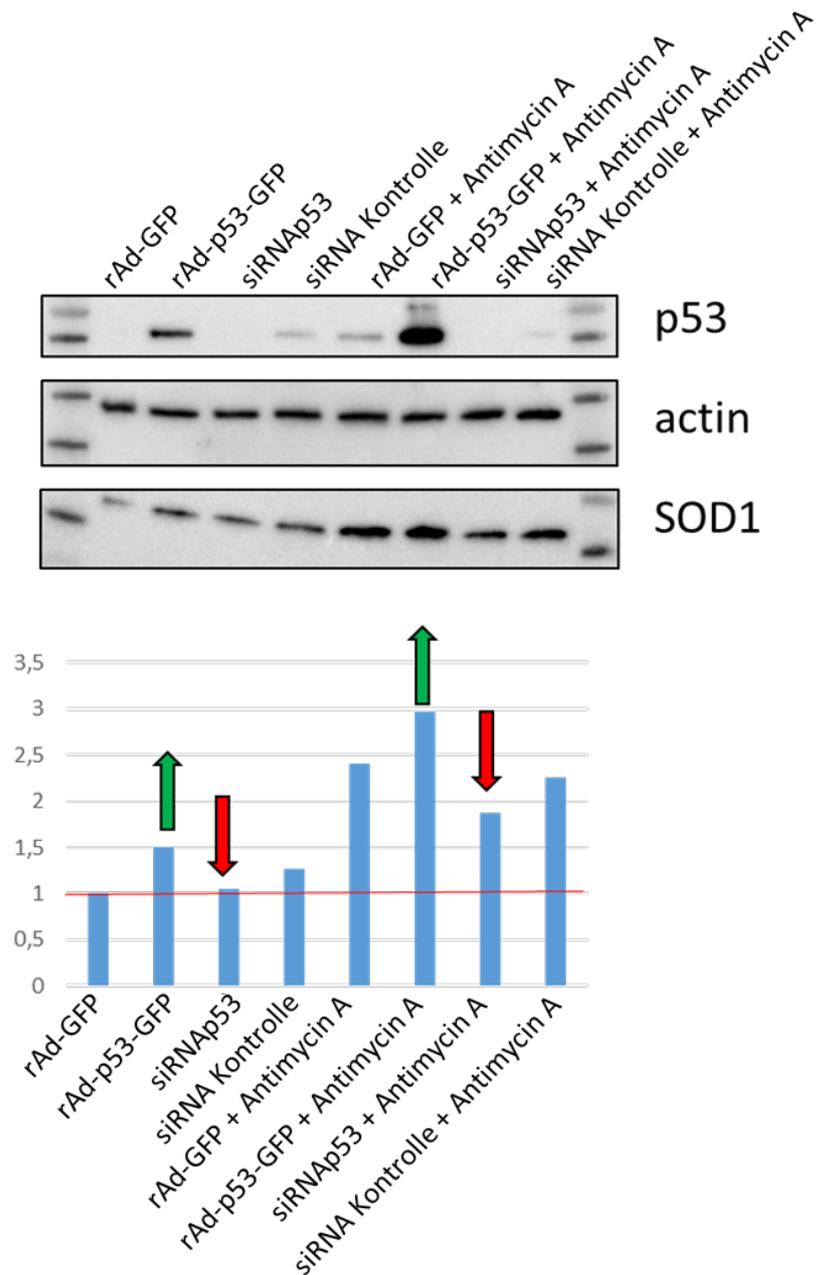


Abbildung 18: Die SOD1-Proteinspiegel in Huh7-Zellen in Abhängigkeit von der p53-Expression bzw. der Behandlung mit Antimycin A

a Im Western Blot ist die SOD1-Produktion in Huh7-Zellen nach p53-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-p53-GFP) bzw. nach p53-Silencing durch siRNA (On-TARGET plus siRNA Human TP53) dargestellt. Als Kontrolle dienten Huh7-Zellen nach adenoviraler Transduktion ohne p53-Induktion (rAd-GFP) bzw. Zellen, die mit einer siRNA Kontrolle (ON-TARGET plus siRNA Control Pool Non-Targeting pool) transfiziert wurden. Die Bestätigung der Induktion erfolgte durch Detektion von p53. Der Nachweis von β -Actin diente als Ladekontrolle. **b** Die densitometrische Auswertung der SOD1-Protein-Expression des in a gezeigten Western Blots (Daten bei p53-Induktion wurden auf die GFP-Transfektion normiert.) ist in einem Balkendiagramm dargestellt. Pfeile (grün) zeigen eine Heraufregulation von SOD1 durch eine p53-Induktion an. Pfeile (rot) deuten auf eine Herunterregulation der SOD1-Proteinmenge durch siRNA vermitteltes p53-Silencing hin. Die Daten stehen repräsentativ für vier unabhängige Experimente (n=4).

Die Induktion von p53 führt zu einer Hochregulation von SOD1, sowohl unter normalen Bedingungen, als auch unter oxidativem Stress. Somit zeigen wir zum ersten Mal, dass p53 auf post-translationaler Ebene SOD1 reguliert.

3.5 Identifikation von mehreren neuen putativen p53-Bindestellen im *SOD1*-Gen

Die wichtigste Funktion des Tumorsuppressors p53 ist die Transkriptionskontrolle von Zielgenen, die zahlreiche zelluläre Prozesse regulieren, darunter den Zellzyklus, die Reaktion auf Zellstress und die Apoptose (70), (191). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde im Vergleich aus *in vitro* generierten, p53-abhängigen Zielgenexpressionsprofilen mit humanen *in vivo* Genexpressionsdatensätzen eine Zielgensignatur der p53-Familie im HCC identifiziert. Darunter war auch das Gen für *SOD1*. Um diese wichtigen Daten zu bestätigen und weiter zu analysieren haben wir das *SOD1*-Gen auf putative Bindungsstellen für p53 untersucht. Wir verwendeten hierzu JASPAR 2022, eine frei zugängliche Datenbank, in der Bindungsprofile von Transkriptionsfaktoren als Positionshäufigkeitsmatrizen gespeichert werden. Keine der dort angegebenen, putativen Bindestellen von p53 in *SOD1* wurden bisher in der Literatur beschrieben.

3.5.1 Der Promotor von *SOD1* weist putative Bindestellen für p53 auf

Normalerweise bindet p53 an die Zielgene als ein Tetramer, das aus zwei Dimeren besteht, die jeweils eine dekamere Halbstelle mit der Konsensussequenz RRRCWWGYYY (R = A/G, W = A/T, Y = C/T) bindet (192), (193), (194), (195). Im Rahmen einer Bindestellenanalyse wurde im Promotor von *SOD1* nach diesen putative p53-Bindestellen gesucht. Der Bereich von -8793bp bis -5199bp vor Transkriptionsstart ist hierbei von Interesse. In diesem 3594bp umfassenden Abschnitt wurden durch einen Abgleich mit der Datenbank JASPAR 2022 drei sich nicht überlappende, mögliche Bindestellen im *SOD1*-Gen ermittelt. Der „Relative Score“ als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle lag hierbei bei mindestens 80 % (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ergebnisse der Bindestellenanalyse von p53 im SOD1-Promotor mit JASPAR; in der Darstellung enthalten sind Matrixmodell, TF= Transkriptionsfaktor, Start und Ende vor Transkriptionsstart in bp, der Relative Score (RS) als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle und die Sequenz.

Matrixmodell	TF	Start	Ende	Strang	RS	Sequenz
MA0106.2	p53	-8778	-8793	-	0,802	GCAAGAAGTACATT
MA0106.2	p53	-7647	-7632	+	0,820	CCATTTCCAAACATG
MA0106.2	p53	-5199	-5214	-	0,821	GGAGGCTCAGGCATG

3.5.2 Auch die Introns des SOD1-Gens wiesen putative Bindestellen für p53 auf

Auch außerhalb des Promotors, vor allem in den Introns, können regulatorische Elemente für die Genexpression lokalisiert sein. Daher wurden auch die Introns des SOD1-Gens mit JASPAR 2022 analysiert. So konnten in den Introns von SOD1 acht weitere potentielle Bindestellen identifiziert werden. Es befanden sich zwei im ersten Intron, jeweils eine im zweiten und dritten und vier im vierten Intron. Dabei lagen vier dieser acht Bindestellen in räumlicher Nähe zueinander am 5'-Ende und überlappten teilweise (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnisse der Bindestellenanalyse von p53 in den Introns des SOD1-Gens mit JASPAR; in der Darstellung enthalten sind Matrixmodell, TF= Transkriptionsfaktor, das jeweilige Intron, Start und Ende nach Transkriptionsstart in bp, der Relative Score (RS) als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle und die Sequenz.

Matrixmodell	TF	I	Start	Ende	Strang	RS	Sequenz
MA0106.2	p53	1	+531	+517	-	0,801	ACACGGCCAAGCAAG
MA0106.2	p53	1	+3683	+3698	+	0,817	ACATGTACAAATATA
MA0106.2	p53	2	+4408	+4393	-	0,834	ACGGGCCAAGGCATG
MA0106.2	p53	4	+8063	+8048	-	0,858	ACATGAATGAACATG
MA0106.3	p53	4	+8046	+8064	+	0,826	TTCATGTTTCATTCATGTT

MA0106.2	p53	4	+8047	+8062	+	0,816	TCATGTTTCATTCATG
MA0106.3	p53	4	+8064	+8064	-	0,814	AACATGAATGAACATGAA
MA0106.2	p53	3	+7571	+7556	-	0,810	ACATGCCTAATAATG

Zur besseren Darstellung wurden die putativen Bindestellen aus der *in silico* Analyse in einer Übersichtsdarstellung gezeigt (Abbildung 19). Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit unserer Microarraydatenanalysen (148) und weisen auf eine regulatorische Funktion von p53 bei der SOD1-Expression hin.

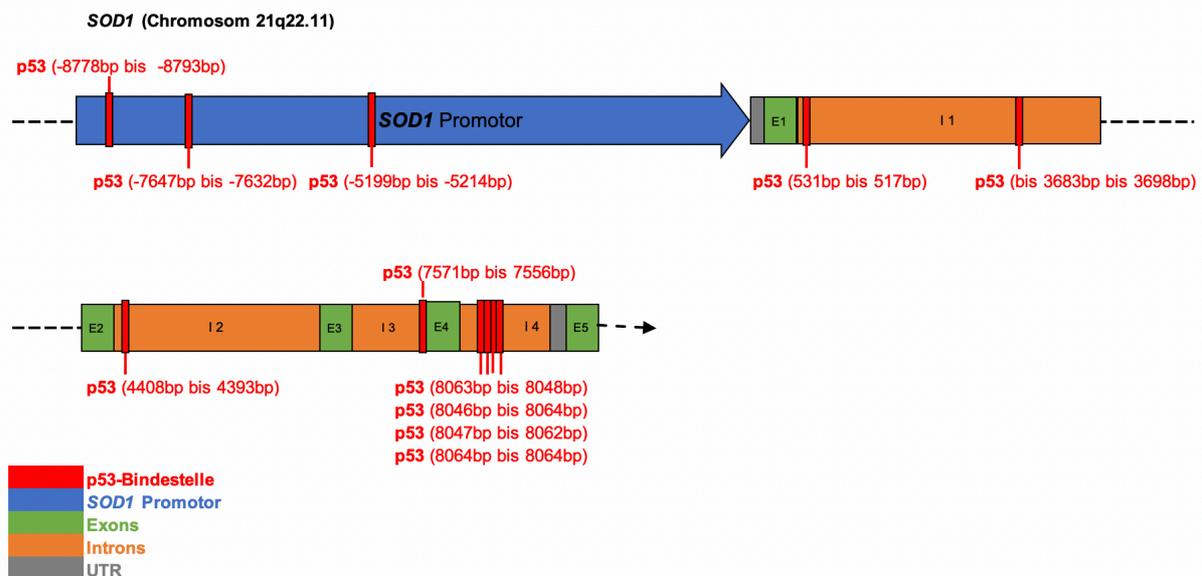


Abbildung 19: Schemazeichnung des *SOD1*-Gens mit putativen Bindestellen von p53 (rot). Es liegen drei putative p53-Bindestellen im *SOD1*-Promotor vor (blau). Nach Transkriptionsstart sind die fünf Exons (grün) im *SOD1*-Gen durch vier Introns voneinander getrennt. Im Bereich von Exon eins und fünf liegen jeweils untranslatierte Regionen (UTR; grau). Zwei weitere, putative Bindestellen von p53 liegen im Intron eins, eine im Intron zwei, eine im Intron drei und vier im Intron vier. Die Introns sind orange dargestellt. Hinter den p53-Bindestellen sind jeweils Start und Ende in Basenpaaren (bp) angegeben (177).

Somit konnten wir auch die Rolle von p53 als Regulator der *SOD1*-Genexpression bestätigen und insgesamt 11 neue putative Bindungsstellen für p53 im *SOD1*-Gen identifizieren.

Zusammenfassend konnten wir erstmals zeigen, dass p53 SOD1 auf transkriptioneller und post-translationaler Ebene reguliert. Die Identifikation von neuen, putativen p53-Bindestellen im *SOD1*-Gen bestätigen unsere Vorarbeiten, die mittels Mikroarrayanalysen zeigen konnten, dass p53 ein transkriptioneller Regulator von SOD1 ist. Darüber hinaus konnten wir diesen Befund erweitern und erstmals nachweisen, dass p53 auch auf post-translationaler Ebene SOD1 reguliert.

Die Akkumulation von ROS führt zu zellulärem Stress. Dieser Stress induziert p53. p53 verstärkt die SOD1-Expression, die den oxidativen Stress inhibiert. Dadurch wird das Entstehen von Mutationen und somit auch Malignomen unterdrückt.

4 Diskussion

Das HCC gehört zu den häufigsten Malignitäten weltweit. Trotz empfohlener Screening-Maßnahmen zur Frühdiagnostik, erfolgt die Diagnosestellung meist erst im fortgeschrittenen Stadium. Die Prognose ist in vielen Fällen limitiert und die Mortalitätsrate hoch (165). Durch die späte Diagnose können nur etwa 20 % der Patient:innen einer kurativen Therapie zugeführt werden. Hier wird die Bedeutung der Entwicklung neuer, effizienter therapeutischer Ansätze auf molekularer Ebene für das fortgeschrittene HCC deutlich. Nur auf diese Weise kann das Langzeitüberleben der Patient:innen verbessert werden (196), (143), (197). Für die systemische Therapie im fortgeschrittenen Stadium wird in der aktuellen S3-Leitlinie die Kombinationstherapie der beiden monoklonalen Antikörper Atezolizumab und Bevacizumab als HCC-Erstlinientherapie empfohlen. Eine neue Phase III Studie (NCT03298451; HIMALAYA), in der Durvalumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen PD-L1) und Tremelimumab (neutralisierender, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4) untersucht wurden, zeigt ein erhöhtes Gesamtüberleben in der Erstlinientherapie im Vergleich zu Sorafenib. Es ist davon auszugehen, dass dieser Behandlungsansatz Einzug in die Leitlinien erhält. Bis 2021 waren ausschließlich Sorafenib und Lenvatinib zur Erstlinientherapie zugelassen. Sie werden aktuell eingesetzt, wenn unter der Therapie mit Atezolizumab bzw. Bevacizumab Unverträglichkeiten, Kontraindikationen oder Progress auftreten (6).

Die Herausforderung bei der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten liegt in der komplexen Hepatokarzinogenese des HCC (143), (198), (199).

Das HCC ist ein sehr heterogener Tumor, bei dem definierte Veränderungen der Genexpression zur Initiation und Progression führen (197). Analysen molekularer Alterationen in menschlichen Malignomen haben durch die Identifikation molekularer Subgruppen eine Anpassung und Personalisierung der Therapie und damit einhergehend einen größeren Therapieerfolg ermöglicht (198). Dieses Vorgehen wird auch beim HCC als Ziel einer personalisierten Therapie verfolgt, indem durch das Erstellen von Genexpressionsprofilen potenzielle therapeutische Zielgene des HCC identifiziert werden (197). Ein breites Spektrum des Mutationsprofils im HCC wurde bereits charakterisiert. Unter den entscheidenden Mutationen für die Progression der Erkrankung befindet sich auch das Gen *TP53* (198).

TP53 gehört zu den am häufigsten mutierten Genen im HCC (143), (198). Die Schlüsselrolle seines Genprodukts, des Tumorsuppressors p53, in der Regulation des Zellzyklus und damit in der Tumorgenese, dem Therapieansprechen und der Prognose des HCC wurde unter anderem von unserer Arbeitsgruppe gezeigt (43), (44), (46), (47), (71), (111).

Unsere Arbeitsgruppe hat in Vorarbeiten durch Generierung von p53-Zielgenexpressionsprofilen eine 28 Gene umfassende, prognostisch relevante Gensignatur im HCC identifiziert. Das Ziel war hierbei, als Basis einer individualisierten HCC-Therapie, prognostisch relevante HCC-Subgruppen zu bestimmen. Die identifizierte Gensignatur umfasst 28 Gene, von denen 15 – für sich allein betrachtet – signifikant mit dem Überleben der Patient:innen assoziiert sind (127). *SOD1* ist eines dieser 15 Gene und wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit als potentiell Zielgen von p53 untersucht. In der Arbeit von Pelc et al. wurde auch die klinische Relevanz der Einteilung von HCC-Patient:innen anhand der p53-Zielgensignatur aufgezeigt (148). Die Definition von Subgruppen des HCC ermöglicht eine prognostische Einteilung und konsekutive Therapie-Adaption. Die Identifikation prognostisch relevanter Zielgene des HCC bildet außerdem die Basis für weitere Untersuchungen der Gene hinsichtlich ihrer Eignung als molekulare Diagnose- bzw. Prognosemarker sowie für die Entwicklung personalisierter HCC-Therapiestrategien in der Zukunft.

4.1 SOD1 im HCC: relative Proteinmenge und Bedeutung

SOD1 ist ein antioxidatives Enzym und einer der wichtigsten zellulären REDOX-Regulatoren, der ubiquitär in allen aeroben Zellen vorkommt und dort in erster Linie die Dismutation der physiologisch im Rahmen der Atmungskette anfallenden ROS katalysiert. Folglich wird die intrazelluläre Akkumulation großer Mengen von ROS verhindert, wodurch *SOD1* eine bedeutende zyto- und genomprotektive Funktion einnimmt (116), (119). Die Leber ist das Hauptorgan des xenobiotischen Stoffwechsels, bei dem besonders viele ROS entstehen. Daher sind in der Leber besonders hohe *SOD1*-Mengen vorhanden. Im Vergleich zu Herz oder Skelettmuskel sind die *SOD1*-Spiegel in der Leber in etwa verzehnfacht (125), (126), (141). Die Abbildung 20 zeigt die semiquantitative Evaluation der *SOD1*-Proteinmenge verschiedener Organe anhand der Farbtintensität in der Immunhistochemie.

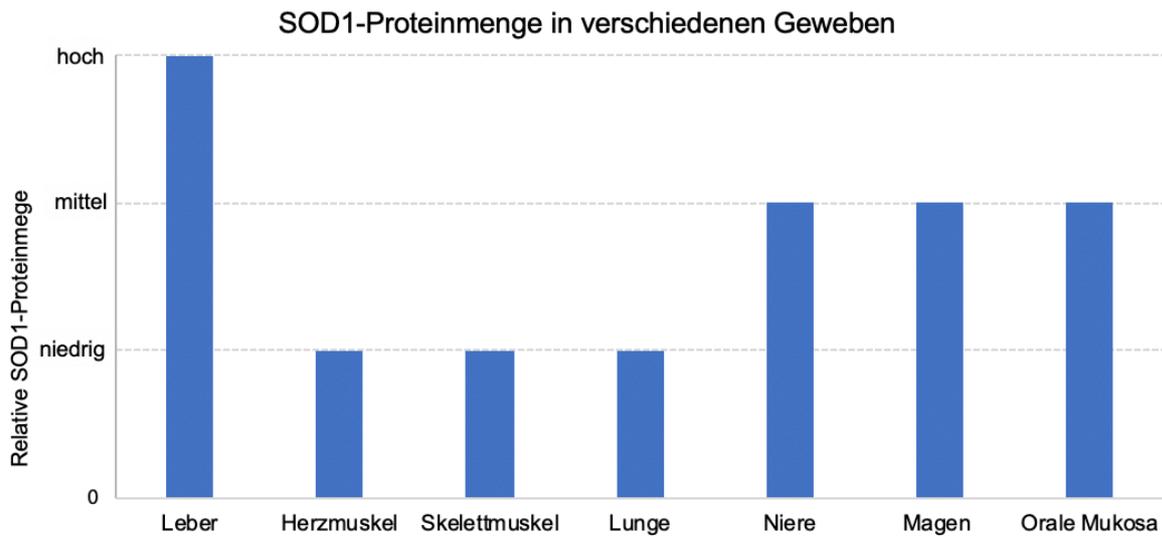


Abbildung 20: Die SOD1-Proteinmenge in verschiedenen Organen

(modifiziert nach dem „Human Protein Atlas“) (126); Der Nachweis von SOD1 in Gewebeproben erfolgte über Immunhistochemie und anschließende Evaluation der Färbungsintensität. Die gefärbten Gewebe wurden je nach Intensität der Färbung in niedrig (<25 % Intensität), mittel (25-75 % Intensität), hoch (>75 % Intensität) eingeteilt.

Die Balance zwischen Produktion und Elimination von ROS durch SODs ist entscheidend in die Pathophysiologie der Leberzirrhose involviert. Einzelnukleotid-Polymorphismen können die Gen- und Proteinfunktion von SOD1 verändern, wodurch die Elimination von ROS und damit die gesamte Balance in der Leber gestört wird. Die Folge sind Entzündung, die Ausbildung einer Fibrose bzw. einer Zirrhose sowie die Entstehung eines HCCs (138). Die Bedeutung von SOD1 für die Hepatokarzinogenese wird an SOD1 Knock-out Mäusen deutlich. Elchuri et al zeigten, dass bei fehlender SOD1 mehr als 70 % der Mäuse knotige Hyperplasien oder ein HCC entwickeln (56), (125), (140), (200).

Die Entzündung des hepatischen Gewebes stellt einen wichtigen Risikofaktor der HCC-Entwicklung dar. In entzündetem Gewebe liegen grundsätzlich erhöhte ROS-Mengen vor, was die Entstehung pro-mutagener DNA-Addukte begünstigt (13), (140) (149), (201). SOD1 ist ein essentieller Baustein der oxidativen Abwehr und fängt hochreaktive ROS ab. Somit werden Mutationen und maligne Transformationen verhindert (138).

Die im Hinblick auf andere Zelltypen vergleichsweise hohen SOD1-Spiegel in Leberzellen (126), sind für unsere Etablierung eines Zellkultur-Modells wichtig. Zuerst

musste im vorliegenden Dissertationsprojekt evaluiert werden, wie sich die SOD1-Spiegel in verschiedenen Zelltypen verhalten. Das Ziel war die Identifikation einer HCC-Zelllinie mit moderaten SOD1-Spiegeln, damit eine potenzielle Induktion aber auch eine Reduktion der Proteinlevel von SOD1 durch p53 bzw. der Effekt durch die zusätzliche Einwirkung von oxidativem Stress im Western Blot gezeigt werden können. Der Beweis, dass die Steigerung der Expression von SOD1 in HCC-Zellen grundsätzlich möglich ist, wurde durch Park et al. bereits erbracht. Unter Einsatz des Dioxins 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) wurde oxidativer Stress in HepG2-Zellen induziert, was zu einer gesteigerten SOD1-Proteinmenge führte (202). Unsere Versuche ergaben, dass sich die HCC-Zelllinie Huh7 bzgl. ihrer SOD1-Proteinmenge verglichen mit humanen Zelllinien anderer Organe in etwa im Mittel befindet. Dieses mittlere Expressionsniveau erlaubt es sowohl Induktion wie auch Reduktion von SOD1 untersuchen zu können.

4.2 Die Induktion von oxidativem Stress in Huh7-Zellen

Sowohl p53, als auch SOD1 sind an der zellulären Antwort auf oxidativen Stress beteiligt. Während p53 als transkriptioneller Aktivator antioxidativer Gene involviert ist, entfaltet SOD1 seine Wirkung direkt durch die Katalyse der Disproportionierungsreaktion von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid (113), (114), (119). Antimycin A verursacht durch Hemmung des Komplex III der Atmungskette eine Freisetzung von ROS aus der mitochondrialen Atmungskette in das Zytosol und die Matrix des Mitochondriums und wird daher zur Induktion von oxidativem Stress für experimentelle Zwecke verwendet. Es ist zu beachten, dass durch Antimycin A hohe ROS Mengen generiert werden können, die nicht von der antioxidativen Abwehr der Zelle abgefangen werden können. Diese ROS verursachen dann ausgedehnte Zellschäden, wie die Oxidation von Makromolekülen zu denen u.a. Lipide zählen. Gerade diese Oxidation von Lipiden und damit eine Schädigung der Plasmamembran induziert Apoptose (178), (203). Dies ist auch für Leberzellen nachgewiesen (204), (205). Die verwendeten Konzentrationen an Antimycin A um ROS zu generieren variieren, da dies abhängig ist von dem Elektronenfluss durch die Atmungskette. Daher muss für jeden Zelltyp die Konzentration genau titriert werden (206). Zur Untersuchung der Auswirkungen von Antimycin A auf die SOD1-Spiegel ist vor allem die Induktion von Apoptose der Zellen zu vermeiden. Als Anhaltspunkt für die Evaluation der adäquaten Antimycin A-Konzentration orientierten wir uns an Kastl et al. (149) und Bai et al. (207), da in den Arbeiten dieser Arbeitsgruppen mit Huh7 die gleichen HCC-Zelllinien verwendet wurden wie in der hier vorliegenden Studie.

Zur genaueren Evaluierung der intrazellulären Lokalisierung der ROS, führten wir daher durchflusszytometrische Analysen durch. Hierzu wurden zwei spezifische intrazelluläre Farbstoffe verwendet. Beide Farbstoffe haben gemeinsam, dass sie nach Oxidation eine Fluoreszenz emittieren und somit sensitiv das Auftreten von ROS anzeigen können. Einer der verwendeten Farbstoffe ist CellROX. Aufgrund seiner Ladung akkumuliert dieser REDOX-sensitive Farbstoff im Zytosol und erlaubt dadurch eine Bestimmung der Lokalisation der ROS in der Zelle. Der zweite von uns verwendete Farbstoff ist MitoSOX. Dieser akkumuliert aufgrund seiner Ladung in der mitochondrialen Matrix. Somit konnte auch in diesem Kompartiment das Auftreten von ROS überprüft werden (208). Unsere Arbeit zeigt in Übereinstimmung mit der Literatur (209), dass Antimycin A eine Freisetzung von ROS sowohl in das Zytosol als auch in

die mitochondriale Matrix induziert. Diese ROS induzieren eine antioxidative Antwort (184), (209), (210), (211). Durch die Antimycin A-abhängige Inhibition von Komplex III werden Superoxidanionen gebildet (209), die als Substrate für die verschiedenen SODs dienen. Dass Antimycin A eine Translokation von Superoxidanionen in das Zytosol verursacht (209), ist für uns von besonderer Bedeutung, da nur so auf SOD1 Einfluss genommen werden kann. Daher stellte Antimycin A für uns den optimalen Wirkstoff da, um eine p53-abhängige Regulation von SOD1 unter oxidativen Stressbedingungen zu untersuchen.

4.3 SOD1 wird auf transkriptionaler und post-translationaler Ebene von p53 reguliert

Die Regulation von SOD1 ist höchst komplex und erfolgt auf transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene (117), (177). SOD1 ist ein essentieller Bestandteil der zellulären REDOX-Regulation. Es verschiebt das Gleichgewicht von hochreaktiven Superoxidanionen in Richtung der weniger reaktiven Wasserstoffperoxide. Damit entfernt SOD1 kein ROS, sondern verschiebt das Gleichgewicht innerhalb der ROS. Eine niedrigere Superoxidanionen-Konzentration verhindert oxidative Schäden, aber eine zu hohe Wasserstoffperoxid-Konzentration behindert die Weiterleitung oxidativer Signale (117), (120), (177), (212). Die SOD1-Menge muss also so eingestellt sein, dass oxidative Schäden minimiert und zelluläre Signale ermöglicht werden. Posttranskriptionelle Prozesse wie mRNA Prozessierung und Kernexport, mRNA-Stabilität, Translationseffizienz, mikroRNA-abhängige Modulation und Protein-Protein-Interaktionen bilden ein komplexes intrazelluläres Netzwerk, das an der Kontrolle der SOD1-Expression beteiligt ist (213), (214), (215), (216), (217). In dieser Arbeit zeigen wir erstmals, dass p53 die SOD1 durch Protein-Protein-Interaktionen induziert. Auf Proteinebene führte die p53-Induktion zum Anstieg von SOD1, der durch die Induktion von oxidativem Stress noch zusätzlich verstärkt wurde. Das ist höchst bemerkenswert und unterstreicht nochmals die komplexen Regulationsmechanismen, die SOD1 kontrollieren.

p53 wird auch bei zellulärem Stress und DNA-Schäden induziert (70). Wir konnten in Vorarbeiten zeigen, dass SOD1 ein Zielgen von p53 ist (148). In dieser Arbeit werden acht neue putative Bindestellen im SOD1-Gen mittels eines *in silico* Ansatzes identifiziert. Dies bestätigt unsere Vorarbeiten und trägt wesentlich zu einem besseren

Verständnis der Regulation der SOD1-Expression auf Gen- und Proteinebene bei. Dies ist von höchster klinischer Relevanz, da es sich bei SOD1 um ein Protein handelt, das sowohl eine wichtige physiologische Funktion in zellulären Signalwegen ausübt, die Zellen vor oxidativen Schäden bewahrt, als auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren, insbesondere des HCC spielt.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir erstmals zeigen, dass p53 ein transkriptioneller Regulator der SOD1 ist. Diese Daten konnten wir in der hier vorliegenden Arbeit bestätigen und erweitern, indem wir neue putative p53-Bindestellen im Promotor und den intronischen Sequenzen des *SOD1*-Gens identifizierten. Darüber hinaus haben wir eine zweite Ebene der SOD1-Regulation durch p53 auf post-translationaler Ebene zeigen können. Eine Induktion von p53 induziert sowohl auf transkriptioneller als auch post-translationaler Ebene SOD1 und verhindert somit durch Oxidation vermittelte Mutationen und maligne Transformationen.

Damit beschreiben wir hier erstmals die Verknüpfung zweier für die Zellen essentieller Stresssignalwege: (1) der p53-Signalweg: p53 wird durch zellulären Stress wie z.B. DNA-Schäden aktiviert. Der p53-Signalweg induziert dann entweder einen Zellzyklusarrest um die Schäden zu beseitigen oder bei anhaltender Zellschädigung Zelltod. (2) der Signalweg der oxidativen Abwehr. Hier nehmen SODs als erste Schutzbarriere eine Schlüsselstellung ein. SODs konvertieren hochreaktive Superoxidanionen in weniger reaktives Wasserstoffperoxid und verhindern dadurch DNA-Oxidation und Mutationen.

5 Zusammenfassung

Das HCC ist das häufigste primäre Malignom der Leber mit weltweit steigender Inzidenz und meist limitierter Prognose. Zur Erstlinientherapie im fortgeschrittenen Stadium sind derzeit der neutralisierende PD-L1-Antikörper Atezolizumab und der ebenfalls neutralisierende VEGF-Antikörper Bevacizumab zugelassen. Aufgrund der immer noch herausfordernden Behandlungssituation ist das Hauptziel der HCC-Forschung die Neuentwicklung und Individualisierung von Therapieoptionen.

Die Bedeutung von p53 und seiner beiden Familienmitglieder p63 und p73 im HCC bzgl. der Induktion von Apoptose und des Therapieansprechens wurde u.a. von unserer Arbeitsgruppe gezeigt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir über Microarrayanalysen p53-Zielgenexpressionsprofile des HCC erstellen. Basierend auf diesen Daten wurde im Vergleich mit HCC-Patientendatensets eine 28 Gene umfassende p53-abhängige Gensignatur identifiziert, die von prognostischer Relevanz für Patient:innen mit HCC ist. Von den 28 Genen der p53-Gensignatur wurde bei 15 Genen eine signifikante Korrelation zum Überleben der Patient:innen festgestellt, wenn nur die Expression dieser Gene allein im Tumorgewebe von Patient:innen mit HCC untersucht wurde und nicht die komplette p53-abhängige 28-Gen Signatur. Zu diesen Genen, die einzeln prognostisch relevant für das HCC sind, gehört auch *SOD1*.

In seiner Funktion als Sensor von zellulärem Stress nimmt p53 eine bedeutende Rolle in der Zellantwort auf oxidativen Stress ein. Auch *SOD1* ist beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress von essentieller Bedeutung. Dies legt eine mögliche Regulation von *SOD1* durch p53 nahe, insbesondere da der oxidativen Zellschädigung, vor allem der Oxidation von DNA, in der Hepatokarzinogenese eine große Bedeutung zugeschrieben wird. In der hier vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass

- p53 ein essentieller posttranslationaler Regulator der *SOD1*-Proteinexpression ist. Dies konnten wir sowohl durch siRNA vermittelten Knock-down von p53, als auch durch Transduktion von exogenem p53 belegen
- das *SOD1*-Gen acht putative, bisher noch nicht beschriebene Bindungsstellen für p53 aufweist

und somit unsere Vorarbeiten zur transkriptionellen Regulation von *SOD1* durch p53 erweitern.

SOD1 ist eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme. Veränderungen im SOD1-Spiegel wirken sich auf inter- und intrazelluläre Signalprozesse aus, auf die Oxidation von Makromolekülen, wie auch DNA, und auf die Vitalität der Zellen. Daher ist es von höchster Relevanz die Regulationsmechanismen von SOD1 zu verstehen, um kanzerogene Mutationen zu verhindern oder um Zelltod in Tumorzellen über oxidativen Stress zu induzieren.

Hier identifizierten wir p53 als einen solchen transkriptionellen und post-translationalen Regulator der SOD1-Expression. Somit verknüpfen wir zwei der wichtigsten zellulären Schutzmechanismen: (1) den p53-Signalweg, der durch zellulären Stress induziert wird. Aktiviertes p53 induziert dann Schutzprogramme, die den Zellstress verhindern und Zellschäden reparieren. Bei anhaltendem Zellstress und irreparablen Schäden kann p53 auch Zelltod induzieren. (2) die oxidative Abwehr, bei der SOD1 eine Schlüsselrolle einnimmt und besonders aggressive ROS in weniger reaktive Sauerstoffspezies umwandelt. Daher ergibt sich folgendes Bild: Eine Akkumulation von ROS (z.B. durch eine inflammatorische Reaktion) erzeugt zellulären Stress durch die Oxidation von Makromolekülen. Dieser wiederum aktiviert p53. p53 induziert dann seinerseits SOD1, welche dann die Akkumulation von ROS verhindert und so das Entstehen von Mutationen und maligner Transformation inhibiert.

Kann man p53 beeinflussen, beeinflusst man auch die SOD1-Expression. Ziel muss es daher sein in die zellulären Stress-Signalwege (ggf. mit Antioxidantien oder p53-Modulatoren) frühzeitig einzugreifen um eine Tumorentstehung zu verhindern oder Tumorwachstum zu verlangsamen.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)	9
Abbildung 2: Modifiziertes BCLC Staging System und Behandlungsstrategie	10
Abbildung 3: Die HCC-Therapie.....	15
Abbildung 4: p53 Gen- bzw. Proteinstruktur.....	17
Abbildung 5: Die Regulation von p53	20
Abbildung 6: Die Funktionen von p53	20
Abbildung 7: Oxidativer Stress und p53.....	27
Abbildung 8: Die SOD1-Struktur	30
Abbildung 9: SOD1- Katalysierte Reaktion	31
Abbildung 10: Sequenzmatrix	59
Abbildung 11: SOD1-Proteinspiegel in verschiedenen Zelllinien	62
Abbildung 12: Bestimmung der Transduktionseffizienz im FACS	64
Abbildung 13: FACS-Analyse des spezifischen Zelltods.....	68
Abbildung 14: Antimycin A induziert nach 12 h oxidativen Stress im Zytosol.....	70
Abbildung 15: Leberzelllinien Hep3B- und Huh7-Zellen im FACS nach Färbung mit CellROX zum Nachweis von zytosolischem ROS.....	71
Abbildung 16: Hep3B- und Huh7-Zellen im FACS nach Färbung mit MitoSOX	73
Abbildung 17: Schematischer Versuchsaufbau der p53-Induktion bzw. des p53-Silencings in Huh7-Zellen	75
Abbildung 18: Die SOD1-Proteinspiegel in Huh7-Zellen in Abhängigkeit von der p53-Expression bzw. der Behandlung mit Antimycin A.....	77
Abbildung 19: Schemazeichnung des SOD1-Gens mit putativen Bindestellen von p53.....	80
Abbildung 20: Die SOD1-Proteinmenge in verschiedenen Organen.....	84

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: siRNA für p53-Silencing und Kontrolle.....	50
Tabelle 2: Bedingungen der Zellaussaat.....	51
Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidgele für SDS-PAGE	56
Tabelle 4: Ergebnisse der Bindestellenanalyse von p53 im SOD1-Promotor mit JASPAR.....	79
Tabelle 5: Ergebnisse der Bindestellenanalyse von p53 in den Introns des SOD1-Gens mit JASPAR.....	79

7 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, u. a. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–49.
2. Rawla P, Sunkara T, Muralidharan P, Raj JP. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018;22(3):141–50.
3. Singal AG, Lampertico P, Nahon P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *Journal of Hepatology*. 1. Februar 2020;72(2):250–61.
4. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, u. a. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol*. 1. Dezember 2017;3(12):1683–91.
5. Cai J, Zhang XJ, Li H. Progress and challenges in the prevention and control of nonalcoholic fatty liver disease. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(1):328–48.
6. Langer T. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome. 2022;
7. Affo S, Yu LX, Schwabe RF. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annu Rev Pathol*. 24. Januar 2017;12:153–86.
8. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. Mai 2012;142(6):1264-1273.e1.
9. Ogunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwagon O, Tan Y, u. a. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World J Gastroenterol*. 21. Mai 2019;25(19):2279–93.
10. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Oktober 2019;16(10):589–604.
11. Tsoulfas G. Hepatocellular carcinoma and metabolic syndrome: The times are changing and so should we. *World J Gastroenterol*. 7. August 2019;25(29):3842–8.
12. Sherif ZA. The Rise in the Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease - An Update [Internet]*. 11. September 2019 [zitiert 21. April 2020]; Verfügbar unter:

<https://www.intechopen.com/books/nonalcoholic-fatty-liver-disease-an-update/the-rise-in-the-prevalence-of-nonalcoholic-fatty-liver-disease-and-hepatocellular-carcinoma>

13. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. April 2021;18(4):223–38.
14. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Juni 2013;10(6):330–44.
15. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. Juli 2019;16(7):411–28.
16. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin CC, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, u. a. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 1. Februar 2012;482(7384):179–85.
17. Leung C, Yeoh SW, Patrick D, Ket S, Marion K, Gow P, u. a. Characteristics of hepatocellular carcinoma in cirrhotic and non-cirrhotic non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 28. Januar 2015;21(4):1189–96.
18. Hu Q, Lou GG, Liu YC, Qian L, Lv BD. The Tumor Necrosis Factor- α -308 and -238 Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma for Asian Populations: A Meta-Analysis. *Curr Ther Res Clin Exp*. 27. September 2014;76:70–5.
19. Ferreira GD, Fernandes GM de M, Penteado C, Cória VR, Galbiatti-Dias AL da S, Russo A, u. a. Polymorphisms in xenobiotic metabolism-related genes in patients with hepatocellular carcinoma: a case-control study. *Xenobiotica*. Juni 2021;51(6):737–44.
20. Bertot LC, Adams LA. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. Mai 2016 [zitiert 23. April 2020];17(5). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881593/>
21. Tümen D, Heumann P, Gülow K, Demirci CN, Cosma LS, Müller M, u. a. Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*. 9. Dezember 2022;10(12):3202.
22. Sidali S, Trépo E, Sutter O, Nault JC. New concepts in the treatment of hepatocellular carcinoma. *United European Gastroenterology Journal*.

2022;10(7):765–74.

23. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á, u. a. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol.* März 2022;76(3):681–93.
24. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul JL, u. a. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology.* Juli 2018;69(1):182–236.
25. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, u. a. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* Januar 2018;67(1):358.
26. Yoshikawa M, Saisho H, Ebara M, Iijima T, Iwama S, Endo F, u. a. A randomized trial of intrahepatic arterial infusion of 4'-epidoxorubicin with Lipiodol versus 4'-epidoxorubicin alone in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;33 Suppl:S149-152.
27. Takayasu K, Shima Y, Muramatsu Y, Moriyama N, Yamada T, Makuuchi M, u. a. Hepatocellular carcinoma: treatment with intraarterial iodized oil with and without chemotherapeutic agents. *Radiology.* Mai 1987;163(2):345–51.
28. Song JE, Kim DY. Conventional vs drug-eluting beads transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 28. Juni 2017;9(18):808–14.
29. Park CH, Suh JH, Yoo HS, Lee JT, Kim DI. Evaluation of intrahepatic I-131 ethiodol on a patient with hepatocellular carcinoma. Therapeutic feasibility study. *Clin Nucl Med.* Juli 1986;11(7):514–7.
30. Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, u. a. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2007;30(1):6–25.
31. Liver-directed therapy for hepatocellular carcinoma - O'Leary - Chinese Clinical Oncology [Internet]. [zitiert 7. Mai 2023]. Verfügbar unter: <https://cco.amegroups.com/article/view/43689/html>
32. Kudo M, Ueshima K, Ikeda M, Torimura T, Tanabe N, Aikata H, u. a. Randomised, multicentre prospective trial of transarterial chemoembolisation (TACE) plus sorafenib as compared with TACE alone in patients with hepatocellular carcinoma: TACTICS trial. *Gut.* August 2020;69(8):1492–501.

33. Duffy AG, Ulahannan SV, Makorova-Rusher O, Rahma O, Wedemeyer H, Pratt D, u. a. Tremelimumab in combination with ablation in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* März 2017;66(3):545–51.
34. Kloeckner R, Galle PR, Bruix J. Local and Regional Therapies for Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2021;73(S1):137–49.
35. Fulgenzi CAM, Cortellini A, D'Alessio A, Thomas R, Tait P, Ross PJ, u. a. A phase Ib study of pembrolizumab following trans-arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): PETAL. *JCO.* Juni 2022;40(16_suppl):e16195–e16195.
36. Viveiros P, Riaz A, Lewandowski RJ, Mahalingam D. Current State of Liver-Directed Therapies and Combinatory Approaches with Systemic Therapy in Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Cancers (Basel)* [Internet]. 31. Juli 2019 [zitiert 13. Mai 2020];11(8). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721343/>
37. Singal AG, Parikh ND, Rich NE, John BV, Pillai A. Hepatocellular Carcinoma Surveillance and Staging. In: Hoshida Y, Herausgeber. *Hepatocellular Carcinoma: Translational Precision Medicine Approaches* [Internet]. Cham (CH): Humana Press; 2019 [zitiert 3. Mai 2020]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553754/>
38. Mahipal A, Tella SH, Kommalapati A, Lim A, Kim R. Immunotherapy in Hepatocellular Carcinoma: Is There a Light at the End of the Tunnel? *Cancers (Basel)* [Internet]. 30. Juli 2019 [zitiert 15. Mai 2020];11(8). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721326/>
39. Zhou K, Fountzilas C. Outcomes and Quality of Life of Systemic Therapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 21. Juni 2019 [zitiert 15. Mai 2020];11(6). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627968/>
40. Bteich F, Di Bisceglie AM. Current and Future Systemic Therapies for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* Mai 2019;15(5):266–72.
41. Cheng H, Sun G, Chen H, Li Y, Han Z, Li Y, u. a. Trends in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: immune checkpoint blockade immunotherapy and related combination therapies. *Am J Cancer Res.* 1. August 2019;9(8):1536–45.
42. Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *J Mol Biol.* 2. Juni 2017;429(11):1595–

606.

43. Schuster A, Schilling T, De Laurenzi V, Koch AF, Seitz S, Staib F, u. a. Δ Np73 β is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle*. 1. Juli 2010;9(13):2629–39.
44. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, u. a. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *International Journal of Cancer*. 2010;126(9):2049–66.
45. Schilling T, Kairat A, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Oren M, u. a. Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 9. April 2010;394(3):817–23.
46. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat*. Dezember 2006;9(6):288–306.
47. Müller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, u. a. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ*. Dezember 2005;12(12):1564–77.
48. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, u. a. p53 Activates the CD95 (APO-1/Fas) Gene in Response to DNA Damage by Anticancer Drugs. *J Exp Med*. 7. Dezember 1998;188(11):2033–45.
49. Schilling T, Schleithoff ES, Kairat A, Melino G, Stremmel W, Oren M, u. a. Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. *Biochem Biophys Res Commun*. 18. September 2009;387(2):399–404.
50. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2009;9(10):749–58.
51. Sethi I, Romano RA, Gluck C, Smalley K, Vojtesek B, Buck MJ, u. a. A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. *BMC Genomics*. 7. August 2015;16(1):584.
52. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, u. a. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. September 1998;2(3):305–16.
53. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, u. a.

- Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers. *Cell*. 22. August 1997;90(4):809–19.
54. Pitolli C, Wang Y, Candi E, Shi Y, Melino G, Amelio I. p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers (Basel)* [Internet]. 9. Dezember 2019 [zitiert 25. Mai 2020];11(12). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6966539/>
55. Friedel L, Loewer A. The guardian's choice: how p53 enables context-specific decision-making in individual cells. *The FEBS Journal*. 2022;289(1):40–52.
56. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, u. a. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 19. März 1992;356(6366):215–21.
57. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 7. Februar 1997;88(3):323–31.
58. Boutelle AM, Attardi LD. p53 and tumor suppression: it takes a network. *Trends Cell Biol*. April 2021;31(4):298–310.
59. Shi Y, Norberg E, Vakifahmetoglu-Norberg H. Mutant p53 as a Regulator and Target of Autophagy. *Front Oncol*. 3. Februar 2021;10:607149.
60. Lahalle A, Lacroix M, De Blasio C, Cissé MY, Linares LK, Le Cam L. The p53 Pathway and Metabolism: The Tree That Hides the Forest. *Cancers (Basel)*. 4. Januar 2021;13(1):133.
61. Menendez D, Inga A, von MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2009;9(10):724–37.
62. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 1. Mai 2009;137(3):413–31.
63. Melino G. Molecular Mechanisms and Function of the p53 Protein Family Member - p73. *Biochemistry (Mosc)*. Oktober 2020;85(10):1202–9.
64. Candi E, Dinsdale D, Rufini A, Salomoni P, Knight RA, Mueller M, u. a. TAp63 and Δ Np63 in Cancer and Epidermal Development. *Cell Cycle*. Februar 2007;6(3):274–84.
65. Fisher ML, Balinth S, Mills AA. p63-related signaling at a glance. *J Cell Sci*. 11. September 2020;133(17):jcs228015.
66. Jacobs JJJ, de Lange T. p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway. *Cell Cycle*. Oktober 2005;4(10):1364–8.
67. Pozniak CD, Barnabé-Heider F, Rymar VV, Lee AF, Sadikot AF, Miller FD. p73

Is Required for Survival and Maintenance of CNS Neurons. *J Neurosci*. 15. November 2002;22(22):9800–9.

68. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the Ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. September 2010 [zitiert 11. April 2020];2(9). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2926756/>

69. Ramadan S, Terrinoni A, Catani MV, Sayan AE, Knight RA, Mueller M, u. a. p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 10. Juni 2005;331(3):713–7.

70. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 21. Oktober 2014 [zitiert 30. März 2020];4. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4204435/>

71. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, u. a. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J*. 6. Juli 2005;24(13):2458–71.

72. Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, Strano S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol* [Internet]. 31. März 2016 [zitiert 11. April 2020];6. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4814729/>

73. Woodstock DL, Sammons MA, Fischer M. p63 and p53: Collaborative Partners or Dueling Rivals? *Front Cell Dev Biol*. 5. Juli 2021;9:701986.

74. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death & Differentiation*. Juni 2006;13(6):962–72.

75. Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther*. 19. Dezember 2013;7:57–68.

76. Bourdon JC. p53 Family isoforms. *Curr Pharm Biotechnol*. Dezember 2007;8(6):332–6.

77. Marcel V, Perrier S, Aoubala M, Ageorges S, Groves MJ, Diot A, u. a. $\Delta 160$ p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by $\Delta 133$ p53 transcript. *FEBS Lett*. 5. November 2010;584(21):4463–8.

78. SauerMarkusDiss.pdf [Internet]. [zitiert 19. Mai 2020]. Verfügbar unter: <https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4->

wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/3998/file/SauerMarkusDiss.pdf

79. Vieler M, Sanyal S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers* (Basel) [Internet]. 25. August 2018 [zitiert 18. Mai 2020];10(9). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6162399/>
80. Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(4):259–65.
81. Little NA, Jochemsen AG. p63. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1. Januar 2002;34(1):6–9.
82. Bai L, Zhu W guo. p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Molecules.* 2006;2:141–153. 367TCTP in ovarian cancer cell lines ©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry *Folia Histochem Cytobiol.*
83. Eischen CM. Genome Stability Requires p53. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. Juni 2016 [zitiert 27. Mai 2020];6(6). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888814/>
84. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4. März 2011;144(5):646–74.
85. Rozenberg JM, Zvereva S, Dalina A, Blatov I, Zubarev I, Luppov D, u. a. The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response. *Biol Direct.* 8. November 2021;16:23.
86. Bao F, LoVerso PR, Fisk JN, Zhurkin VB, Cui F. p53 binding sites in normal and cancer cells are characterized by distinct chromatin context. *Cell Cycle.* 28. September 2017;16(21):2073–85.
87. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* Januar 2018;25(1):104–13.
88. Landré V, Rotblat B, Melino S, Bernassola F, Melino G. Screening for E3-Ubiquitin ligase inhibitors: challenges and opportunities. *Oncotarget.* 3. September 2014;5(18):7988–8013.
89. Müller M, Scaffidi CA, Galle PR, Stremmel W, Krammer PH. The role of p53 and the CD95 (APO-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis. *Eur Cytokine Netw.* Dezember 1998;9(4):685–6.
90. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, u. a. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 22. April 1999;398(6729):714–8.

91. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. März 2016 [zitiert 21. Mai 2020];6(3). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4772082/>
92. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science*. 15. Oktober 2003;116(20):4077–85.
93. Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. Juni 2006;13(6):994–1002.
94. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*. 15. Januar 2005;118(2):265–7.
95. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*. Oktober 2013;32(43):5129–43.
96. Qian Y, Chen X. Senescence Regulation by the p53 Protein Family. *Methods Mol Biol*. 2013;965:37–61.
97. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. Mai 2016 [zitiert 25. Mai 2020];6(5). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852800/>
98. Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. Tumor suppressor p53 and metabolism. *J Mol Cell Biol*. 30. November 2018;11(4):284–92.
99. Yokoo T, Patel AD, Lev-Cohain N, Singal AG, Yopp AC, Pedrosa I. Extrahepatic metastasis risk of hepatocellular carcinoma based on α -fetoprotein and tumor staging parameters at cross-sectional imaging. *Cancer Manag Res*. 16. Oktober 2017;9:503–11.
100. Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 24. Januar 2011;192(2):209–18.
101. Powell E, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. Contribution of p53 to Metastasis. *Cancer Discov*. 1. April 2014;4(4):405–14.
102. Molchadsky A, Rivlin N, Brosh R, Rotter V, Sarig R. p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis*. 1. September 2010;31(9):1501–8.
103. EBSCOhost | 135926163 | p53/p63/p73 PROTEIN NETWORK IN HUMAN TUMORS. [Internet]. [zitiert 30. Mai 2020]. Verfügbar unter: <https://web.a.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=13305301&AN=135926163&h=GDxNe8pG41e1y0oHb7fUhScDJgsMR216Jkw615%2fY4vle2MLAC9BLA2hi%2bzhSd9QI9ehMOk0WI6swU0fJk6%2bLEw>

%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrINotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d13305301%26AN%3d135926163

104. p53 and p73: Roles in Development and Tumor Formation11National Cancer Institute. | Molecular Cancer Research [Internet]. [zitiert 18. Mai 2020]. Verfügbar unter: <https://mcr.aacrjournals.org/content/2/7/371.long>

105. Guan YS, He Q, La Z. Roles of p53 in Carcinogenesis, Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. 2006;8.

106. Lübbe J, Kleihues P, Burg G. The p53 tumour suppressor gene and its significance for dermatology. *Hautarzt*. 1. November 1994;45(11):741–5.

107. Guo XE, Ngo B, Modrek AS, Lee WH. Targeting Tumor Suppressor Networks for Cancer Therapeutics. *Curr Drug Targets*. Januar 2014;15(1):2–16.

108. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Genes Cancer*. April 2011;2(4):466–74.

109. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell*. 17. März 2014;25(3):304–17.

110. Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*. Januar 2013;15(1):2–8.

111. 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*. 28. Mai 2010;396(2):335–41.

112. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 1. Dezember 2010;49(11):1603–16.

113. Liu D, Xu Y. p53, Oxidative Stress, and Aging. *Antioxid Redox Signal*. 15. September 2011;15(6):1669–78.

114. News-Medical.net [Internet]. 2019 [zitiert 4. Juni 2020]. Sensing Oxidative Stress: The ROS-p53 Pathway. Verfügbar unter: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Sensing-Oxidative-Stress-The-ROS-p53-Pathway.aspx>

115. Beyfuss K, Hood DA. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox Rep*. 3. Januar 2018;23(1):100–17.

116. Che M, Wang R, Wang HY, Zheng XFS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today*. Januar 2016;21(1):143–

9.

117. McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. November 1969;244(22):6049–55.

118. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*. Februar 2010;1804(2):245–62.

119. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 1. August 2002;33(3):337–49.

120. Kamiński MM, Röth D, Sass S, Sauer SW, Krammer PH, Gülow K. Manganese superoxide dismutase: a regulator of T cell activation-induced oxidative signaling and cell death. *Biochim Biophys Acta*. Mai 2012;1823(5):1041–52.

121. Miao L, St. Clair DK. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free Radic Biol Med*. 15. August 2009;47(4):344–56.

122. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS [Internet]. [zitiert 16. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/nri/2011/458427/>

123. Rakhit R, Chakrabartty A. Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. Dezember 2006;1762(11–12):1025–37.

124. Zhang Y, Liu Y, Walsh M, Bokov A, Ikeno Y, Jang YC, u. a. Liver specific expression of Cu/ZnSOD extends the lifespan of Sod1 null mice. *Mech Ageing Dev*. März 2016;154:1–8.

125. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, u. a. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. Januar 2005;24(3):367–80.

126. Tissue expression of SOD1 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [zitiert 9. Juni 2020]. Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142168-SOD1/tissue>

127. Nagao C, Kuroi K, Wakabayashi T, Nakabayashi T. Pro-Oxidant Activity of an ALS-Linked SOD1 Mutant in Zn-Deficient Form. *Molecules*. Januar 2020;25(16):3600.

128. He C, Murthy S, McCormick ML, Spitz DR, Ryan AJ, Carter AB. Mitochondrial Cu,Zn-Superoxide Dismutase Mediates Pulmonary Fibrosis by Augmenting H₂O₂ Generation. *J Biol Chem*. 29. April 2011;286(17):15597–607.

129. Gomez ML, Shah N, Kenny TC, Jenkins EC, Germain D. SOD1 is essential for oncogene-driven mammary tumor formation but dispensable for normal development and proliferation. *Oncogene*. Juli 2019;38(29):5751–65.
130. Xu J, Su X, Burley SK, Zheng XFS. Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants*. Februar 2022;11(2):427.
131. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, u. a. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. März 1993;362(6415):59–62.
132. Forsberg K, Graffmo K, Pakkenberg B, Weber M, Nielsen M, Marklund S, u. a. Misfolded SOD1 inclusions in patients with mutations in C9orf72 and other ALS/FTD-associated genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. August 2019;90(8):861–9.
133. Pansarasa O, Bordoni M, Diamanti L, Sproviero D, Gagliardi S, Cereda C. SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis: “Ambivalent” Behavior Connected to the Disease. *Int J Mol Sci [Internet]*. 3. Mai 2018 [zitiert 11. Juni 2020];19(5). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983710/>
134. Bastow EL, Peswani AR, Tarrant DSJ, Pentland DR, Chen X, Morgan A, u. a. New links between SOD1 and metabolic dysfunction from a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Sci*. 1. November 2016;129(21):4118–29.
135. Huai J, Zhang Z. Structural Properties and Interaction Partners of Familial ALS-Associated SOD1 Mutants. *Frontiers in Neurology [Internet]*. 2019 [zitiert 10. Juni 2020];10. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6536575/>
136. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci*. Januar 2014;17(1):17–23.
137. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, u. a. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 5. Oktober 2017;3(1):1–19.
138. Schwab S, Lehmann J, Lutz P, Jansen C, Appenrodt B, Lammert F, u. a. Influence of genetic variations in the SOD1 gene on the development of ascites and spontaneous bacterial peritonitis in decompensated liver cirrhosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. Juli 2017;29(7):800–4.
139. Wang R, Liang L, Matsumoto M, Iwata K, Umemura A, He F. Reactive Oxygen Species and NRF2 Signaling, Friends or Foes in Cancer? *Biomolecules*. Februar 2023;13(2):353.

140. Fu Y, Chung FL. Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. *Hepatoma Res* [Internet]. 2018 [zitiert 3. Juni 2020];4. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6370311/>
141. Marrogi AJ, Khan MA, van Gijssel HE, Welsh JA, Rahim H, Demetris AJ, u. a. Oxidative Stress and p53 Mutations in the Carcinogenesis of Iron Overload-Associated Hepatocellular Carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 7. November 2001;93(21):1652–5.
142. Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem.* Mai 2009;109 Suppl 1:133–8.
143. Kunst C, Haderer M, Heckel S, Schlosser S, Müller M. The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Translational Cancer Research.* 19. Dezember 2016;5(6):632-638–638.
144. Blander G, de Oliveira RM, Conboy CM, Haigis M, Guarente L. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 3. Oktober 2003;278(40):38966–9.
145. Zhang H, Zhang W, Jiang L, Chen Y. Recent advances in systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Biomark Res.* 9. Januar 2022;10:3.
146. Vyas M, Jain D. An update on subtypes of hepatocellular carcinoma: From morphology to molecular. *Indian Journal of Pathology and Microbiology.* 1. Januar 2021;64(5):112.
147. Loy LM, Low HM, Choi JY, Rhee H, Wong CF, Tan CH. Variant Hepatocellular Carcinoma Subtypes According to the 2019 WHO Classification: An Imaging-Focused Review. *American Journal of Roentgenology.* August 2022;219(2):212–23.
148. Pelc AP. Charakterisierung von Zielgenexpressionsprofilen der p53-Familie und ihrer prognostischen Relevanz beim hepatozellulären Karzinom (HCC) [Internet]. 2015 [zitiert 14. Juni 2020]. Verfügbar unter: <https://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/18807/>
149. Kastl L, Sauer SW, Ruppert T, Beissbarth T, Becker MS, Süss D, u. a. 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.
150. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details [Internet]. [zitiert 7. Juli 2020]. Verfügbar unter: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-93>
151. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of

- HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. 6. Dezember 1979;282(5739):615–6.
152. Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung des Hepatitis B Virus des Menschen (HBV) als Spender- oder Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 Gentechnik-Sicherheitsverordnung (Az. 6790-10-39a, März 2009). 6790.
153. HuH-7 Cell Line Origins and Characteristics [Internet]. [zitiert 28. März 2020]. Verfügbar unter: <https://huh7.com/>
154. Guariniello S, Di Bernardo G, Colonna G, Cammarota M, Castello G, Costantini S. Evaluation of the Selenotranscriptome Expression in Two Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Anal Cell Pathol (Amst)* [Internet]. 2015 [zitiert 28. März 2020];2015. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4493270/>
155. Bhardwaj B, Bhardwaj G, Lau JYN. Expression of p21 and p27 in hepatoma cell lines with different p53 gene profile. *Journal of Hepatology*. 1. August 1999;31(2):386.
156. Huang P, Zhuang B, Zhang H, Yan H, Xiao Z, Li W, u. a. Hepatitis B Virus X Protein (HBx) Is Responsible for Resistance to Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma: Ex Vivo Culture Evidence. *Clinical Cancer Research*. 1. Oktober 2015;21(19):4420–30.
157. TRBA 468 Liste der Zelllinien und Tätigkeiten mit Zellkulturen. :52.
158. -Detailed Information [JCRB0403]- [Internet]. [zitiert 7. Juli 2020]. Verfügbar unter: https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=385
159. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 25. Juli 1980;209(4455):497–9.
160. Li Z, Zhang B, Chan JJ, Tabatabaeian H, Tong QY, Chew XH, u. a. An isoform-resolution transcriptomic atlas of colorectal cancer from long-read single-cell sequencing [Internet]. *Cancer Biology*; 2023 Apr [zitiert 11. Mai 2023]. Verfügbar unter: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.04.21.536771>
161. Didier ES, Rogers LB, Orenstein JM, Baker MD, Vossbrinck CR, Van Gool T, u. a. Characterization of Encephalitozoon (Septata) intestinalis Isolates Cultured from Nasal Mucosa and Bronchoalveolar Lavage Fluids of Two AIDS Patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1996;43(1):34–43.
162. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 3. März

1998;95(5):2509–14.

163. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, u. a. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci.* Juni 2017;13(2):48–57.

164. Park WH, You BR. Antimycin A induces death of the human pulmonary fibroblast cells via ROS increase and GSH depletion. *International Journal of Oncology.* 1. Februar 2016;48(2):813–20.

165. Saidani C, Hammoudi-Triki D, Laraba-Djebari F, Taub M. In vitro studies with renal proximal tubule cells show direct cytotoxicity of *Androctonus australis* hector scorpion venom triggered by oxidative stress, caspase activation and apoptosis. *Toxicon.* 15. September 2016;120:29–37.

166. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Haskó G, Pacher P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 22. Juni 2007;358(1):203–8.

167. MitoSox Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging. :3.

168. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics.* Mai 2014;6(5):1068–78.

169. Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol.* 2017;1606:133–9.

170. Lo AWH, Van de Water K, Gane PJ, Chan AWE, Steadman D, Stevens K, u. a. Suppression of type 1 pilus assembly in uropathogenic *Escherichia coli* by chemical inhibition of subunit polymerization. *J Antimicrob Chemother.* April 2014;69(4):1017–26.

171. Castro-Mondragon JA, Riudavets-Puig R, Rauluseviciute I, Lemma RB, Turchi L, Blanc-Mathieu R, u. a. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 7. Januar 2022;50(D1):D165–73.

172. Das MK, Dai HK. A survey of DNA motif finding algorithms. *BMC Bioinformatics.* 1. November 2007;8(7):S21.

173. Boeva V. Analysis of Genomic Sequence Motifs for Deciphering Transcription Factor Binding and Transcriptional Regulation in Eukaryotic Cells. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 2016 [zitiert 16. Juni 2022];7. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2016.00024>

174. Wang YG, Huang PP, Zhang R, Ma BY, Zhou XM, Sun YF. Targeting adeno-

- associated virus and adenoviral gene therapy for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 7. Januar 2016;22(1):326–37.
175. de Martin R, Raidl M, Hofer E, Binder B. Adenovirus-mediated expression of green fluorescent protein. *Gene Ther.* Mai 1997;4(5):493–5.
176. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 4. Juni 2018;217(6):1915–28.
177. Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurol Res Int.* 2011;2011:458427.
178. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol.* Dezember 2002;3(12):1129–34.
179. Han. Antimycin A as a mitochondrial electron transport inhibitor prevents the growth of human lung cancer A549 cells. *Oncol Rep [Internet].* 1994 [zitiert 20. Juli 2020]; Verfügbar unter: http://www.spandidos-publications.com/or/article.jsp?article_id=or_20_3_689
180. Bertho ÁL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Juni 2000;95:429–33.
181. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1. Januar 1997;27(1):1–20.
182. Walczak H, Sprick MR. Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem Sci.* Juli 2001;26(7):452–3.
183. Gülow K, Kamiński M, Darvas K, Süß D, Li-Weber M, Krammer PH. HIV-1 Trans-Activator of Transcription Substitutes for Oxidative Signaling in Activation-Induced T Cell Death 1. *The Journal of Immunology.* 1. Mai 2005;174(9):5249–60.
184. Kamiński M, Kießling M, Süß D, Krammer PH, Gülow K. Novel Role for Mitochondria: Protein Kinase C θ -Dependent Oxidative Signaling Organelles in Activation-Induced T-Cell Death. *Molecular and Cellular Biology.* Mai 2007;27(10):3625.
185. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, u. a. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* Juni 2000;12(6):599–609.

186. Mandavilli BS, Aggeler RJ, Schwenger T, Yan M, Kang HC, Gee K, u. a. Cell-based Measurements of Oxidative Stress with a New Near Infrared Emitting Probe for Reactive Oxygen Species: Applications for Multiplexed Evaluation of Cell Health. *Free Radical Biology and Medicine*. Januar 2010;49:S97.
187. Bone BG, Seredick B. Reactive Oxygen Probes-A Broad Range of Colors with Easier Labeling: Novel CellROX® Reagents from Molecular Probes®. :1.
188. Molecular Probes™ MitoSOX™ Red Indikator für Mitochondrien-Superoxid für die Lebendzell-Bildgebung [Internet]. [zitiert 23. Juli 2020]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M36008>
189. Kamiński MM, Röth D, Krammer PH, Gülow K. Mitochondria as Oxidative Signaling Organelles in T-cell Activation: Physiological Role and Pathological Implications. *Arch Immunol Ther Exp*. 1. Oktober 2013;61(5):367–84.
190. Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15. Januar 2021;697:108701.
191. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mai 2008;9(5):402–12.
192. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. April 1992;1(1):45–9.
193. McLure KG, Lee PW. How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J*. 15. Juni 1998;17(12):3342–50.
194. Kitayner M, Rozenberg H, Kessler N, Rabinovich D, Shaulov L, Haran TE, u. a. Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. *Molecular Cell*. Juni 2006;22(6):741–53.
195. Veprintsev DB, Freund SMV, Andreeva A, Rutledge SE, Tidow H, Cañadillas JMP, u. a. Core domain interactions in full-length p53 in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14. Februar 2006;103(7):2115–9.
196. Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Liver Cancer*. November 2012;1(3–4):144–58.
197. Li C, Xu J. Identification of Potentially Therapeutic Target Genes of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. Februar 2020 [zitiert 11. August 2020];17(3). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7037431/>
198. Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III

- failure and novel perspectives on trial design. *Clin Cancer Res.* 15. April 2014;20(8):2072–9.
199. Pinato DJ, Guerra N, Fessas P, Murphy R, Mineo T, Mauri FA, u. a. Immune-based therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* April 2020;39(18):3620–37.
200. Halliwell B. elchu. *Biochem J.* 1. Januar 2007;401(1):1–11.
201. Refolo MG, Messa C, Guerra V, Carr BI, D'Alessandro R. Inflammatory Mechanisms of HCC Development. *Cancers (Basel).* 10. März 2020;12(3):641.
202. Park EY, Rho HM. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem.* November 2002;240(1–2):47–55.
203. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* Januar 2002;82(1):47–95.
204. Park JH, Elpers C, Reunert J, McCormick ML, Mohr J, Biskup S, u. a. SOD1 deficiency: a novel syndrome distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 1. August 2019;142(8):2230–7.
205. Guha G, Mandal T, Rajkumar V, Ashok Kumar R. Antimycin A-induced mitochondrial apoptotic cascade is mitigated by phenolic constituents of *Phyllanthus amarus* aqueous extract in Hep3B cells. *Food and Chemical Toxicology.* 1. Dezember 2010;48(12):3449–57.
206. Wang L, Duan Q, Wang T, Ahmed M, Zhang N, Li Y, u. a. Mitochondrial Respiratory Chain Inhibitors Involved in ROS Production Induced by Acute High Concentrations of Iodide and the Effects of SOD as a Protective Factor. *Oxid Med Cell Longev [Internet].* 2015 [zitiert 3. September 2020];2015. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4532905/>
207. Bai J, Liu Z, Liu J, Zhang S, Tian Y, Zhang Y, u. a. Mitochondrial metabolic study guided by proteomics analysis in hepatocellular carcinoma cells surviving long-term incubation with the highest dose of sorafenib. *Aging (Albany NY).* 26. Dezember 2019;11(24):12452–75.
208. Mattiasson G. Analysis of mitochondrial generation and release of reactive oxygen species. *Cytometry Part A.* 2004;62A(2):89–96.
209. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 19. September 2003;278(38):36027–31.

210. Matassa DS, Criscuolo D, Avolio R, Agliarulo I, Sarnataro D, Pacelli C, u. a. Regulation of mitochondrial complex III activity and assembly by TRAP1 in cancer cells. *Cancer Cell Int.* 12. Dezember 2022;22:402.
211. Kaminski MM, Sauer SW, Klemke CD, Süss D, Okun JG, Krammer PH, u. a. Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *J Immunol.* 1. Mai 2010;184(9):4827–41.
212. Fridovich I. Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry.* 1975;44(1):147–59.
213. Andreassi C, Riccio A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends in Cell Biology.* 1. September 2009;19(9):465–74.
214. Kilk A, Laan M, Torp A. Human CuZn superoxide dismutase enzymatic activity in cells is regulated by the length of the mRNA. *FEBS Letters.* 1995;362(3):323–7.
215. Pascale A, Amadio M, Quattrone A. Defining a neuron: neuronal ELAV proteins. *Cell Mol Life Sci.* 1. Januar 2008;65(1):128–40.
216. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology.* 1. März 2007;17(3):118–26.
217. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* Februar 2008;9(2):102–14.

8 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
%	Prozent
°C	Grad Celsius
AFB1	Aflatoxin B1
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP1	Activating Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASIR	age-standardized incidence rate
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen, medizinischen Fachgesellschaften
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCLC	Barcelona Clinic Liver-Cancer Classification
Bp	Basenpaare
BR	Basic Region
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cycline dependent kinase
cm	Zentimeter
cm ²	Kubikzentimeter
CMV	Cytomegalievirus
cTACE	konventionelle transarterielle Chemoembolisation
DBD	DNA-bindende Domäne
DEB-TACE	Drug-Eluting-Bead Transarterial Chemoembolisation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASL	European Association for the Study of the Liver
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr1	Early Growth Response Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EBP	Enhancer Binding Proteine
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
fALS	familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
FCS	Fötales Kälberserum
FLp53	full length p53
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HBe-Antigen	Hepatitis-B-Virus e-Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus

IARC	International Agency of Research on Cancer
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
MEM	Minimal-essenzielles Medium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger-RNA
mt p53	mutantes p53
mt SOD1	mutantes SOD1
MWA	Mikrowellenablation
NAFLD	nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	nichtalkoholische Steatosis hepatitis
NF- κ B	Nuclear factor kappaB
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OLD	Oligomerisierungsdomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD-1	Programmed cell death protein 1
PRD	Prolin-reiche Domäne
PUMA	p53 up-regulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rAD	rekombinantes Adenovirus
RFA	Radiofrequenzablation
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde(n)
sALS	sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SAMD	Sterile-Alpha-Motiv Domäne
SDI	socio-demographic index
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
SOD1	Superoxiddismutase 1
SOD2	Superoxiddismutase 2
SOD3	Superoxiddismutase 3
Sp1	Specifity Protein1

TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Transarterielle Embolisation
TARE	Transarterielle Radioembolisation
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TID	Transaktivierungsinhibierende Domäne
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
wt p53	Wildtyp-p53
wt SOD1	Wildtyp-SOD1
ΔN	Dominant-negativ

9 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Lena Großmann, geboren am 25.11.1994 in Amberg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 29.11.2023

Ort, Datum

Lena Großmann

Unterschrift

10 Danksagung

Allen voran gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling, die mich als zahnmedizinische Doktorandin sehr freundlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Vielen herzlichen Dank für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in dem interessanten Forschungsbereich der Inneren Medizin durchzuführen und für die Unterstützung sowohl auf fachlicher, als auch persönlicher Ebene. Ihr Zutun hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. In ihrer Funktion als Mentorin hat sie mir Wissen vermittelt, von dem ich in meinem zukünftigen Arbeitsleben profitieren werde.

Ich danke auch Frau Dr. Sophie Schlosser für die Vermittlung der Stelle als medizinische Doktorandin.

Zudem möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Müller-Schilling bedanken. Als erstes gilt mein Dank Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Kunst und PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow, die mir in ihrer Position als Forschungsleiter zu jedem Zeitpunkt behilflich waren.

Außerdem danke ich besonders Elisabeth Aschenbrenner, Kirstin Pollinger, Marika Harderer, Deniz Tuemen, Manuela Gunckel, Heidi Gschwendtner, Olga Wiesner und Martina Meisinger, die mir sowohl fachlich, als auch menschlich in jeder Situation zur Seite gestanden haben. Ihr habt dadurch nicht nur zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit beigetragen, sondern mich auch in schwierigen Situationen unterstützt und ermutigt. Dadurch habt ihr meine Zeit im Labor zu einer sehr bereichernden und unvergesslichen Erfahrung gemacht.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung in den letzten 29 Jahren. Ohne euch wäre ich auf meinem bisherigen Lebensweg nie so weit gekommen.

Herzlichen Dank!

