

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

Die Bedeutung der p53-IGF-Achse für Homöostase und Metabolismus von humanen
Leberzellen

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Frederik Paul Kolligs

2024

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

Die Bedeutung der p53-IGF-Achse für Homöostase und Metabolismus von humanen
Leberzellen

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Frederik Paul Kolligs

2024

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jirka Grosse

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2024

1. Einleitung	6
1.1. Die Leber	6
1.1.1. Anatomie	6
1.1.2. Funktion	8
1.2. Leberzirrhose	8
1.2.1. Epidemiologie, Ätiologie und Klassifizierung der Leberzirrhose	8
1.2.2. Pathogenese der Leberzirrhose und Leberfibrose	10
1.3. Das HCC	11
1.3.1. Epidemiologie und Ätiologie des HCC	11
1.3.2. Diagnostik und Prognose des HCC	11
1.3.3. Therapie des HCC	12
1.4. Die p53-Familie	15
1.4.1. Einleitung	15
1.4.2. Struktureller Aufbau und Funktionen der p53- Familienmitglieder	16
1.4.3. p63	18
1.4.4. p73	19
1.4.5. Die Rolle der p53-Familie bei Fettlebererkrankungen	20
1.4.6. Die Rolle der p53 Familie im HCC	20
1.5. IGF-Familie	22
1.5.1. Einleitung	22
1.5.2. Das IGF-System	23
1.5.3. IGF-I und -II	24
1.5.4. IGF-IR und -IIR	25
1.5.5. IGFBPs	25
1.5.6. IGFBP-related Proteins und -Proteasen	26

1.6.	TIGAR	26
1.7.	Zielsetzung.....	29
2.	Material und Methoden	31
2.1.	Material.....	31
2.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	31
2.1.2.	Chemikalien und Reagenzien.....	34
2.1.3.	Antikörper	35
2.1.4.	RTq-PCR Primer	36
2.1.5.	Plasmide	37
2.1.6.	Software	38
2.1.7.	siRNAs	38
2.1.8.	Adenovirale Konstrukte	39
2.2.	Methoden.....	40
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden	40
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.3.	Zellkultur und zellbiologische Methoden	43
2.2.4.	Proteinbiochemische Methoden	45
2.3.	Statistische Analysen.....	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Proteine der p53-Familie induzieren Genexpression, Proteinsynthese und Sekretion von IGFBP2 in Hepatomzellen	48
3.1.1.	Die Induktion von p53 und p73 steigert die Expression von <i>IGFBP2</i> in Hep3B-Zellen	48
3.1.2.	p53 und p73 steigern die Proteinsynthese von IGFBP2 in Hep3B-Zellen.....	49
3.1.3.	p73 induziert die Sekretion von IGFBP2	51
3.2.	p53 induziert die Expression und Proteinproduktion von TIGAR in Hep3B-Zellen	52

3.2.1.	Die Induktion von p53 führt zu vermehrter Expression von <i>TIGAR</i> in Hep3B-Zellen	52
3.2.2.	Die Expression von p53 erhöht die TIGAR-Proteinspiegel in Hep3B-Zellen...	53
3.3.	IGFBP2 und TIGAR werden unabhängig voneinander exprimiert.....	54
3.3.1.	Die Expression von IGFBP2 und der TIGAR-Proteinlevel sind unabhängig voneinander	55
3.3.2.	Bei einer Induktion von IGFBP2 bleiben die intrazellulären Mengen an TIGAR stabil	57
3.4.	Ein Einfluss eines <i>TIGAR</i> oder <i>IGFBP2</i> -Knock-downs auf den Zelltod kann ausgeschlossen werden.....	59
3.5.	Ein Einfluss der Induktion der Proteinsynthese von TIGAR und IGFBP2 auf den Zelltod kann ausgeschlossen werden	61
3.6.	Durch Therapeutika, die die p53 Familie aktivieren, wie Bleomycin und Doxorubicin, kann die Expression von TIGAR und IGFBP2 induziert werden	64
4.	Diskussion	66
5.	Zusammenfassung	75
6.	Anhang	76
6.1.	Abbildungsverzeichnis	76
6.2.	Tabellenverzeichnis	78
7.	Literaturverzeichnis.....	79
8.	Abkürzungsverzeichnis	95
9.	Aus dieser Arbeit entstandene Prämierungen und Kongressbeiträge	98
10.	Danksagung	
11.	Lebenslauf	
	Eidesstaatliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1. Die Leber

1.1.1. Anatomie

Die Leber ist eines der größten Organe des menschlichen Körpers und macht bis zu 3 % des Körpergewichts aus (Arjun Kalra et al. 2021). Normalerweise liegt sie im rechten Oberbauch und wird hauptsächlich durch die unteren Rippen geschützt. In ihrer Position wird sie von zahlreichen Bändern fixiert. Sie besteht in der Regel aus zwei Lappen und wird überdurchschnittlich stark durchblutet, mit einem Anteil von ca. 25 % des Herzminutenvolumens (Abdel-Misih und Bloomston 2010). Durchblutet wird sie durch ein duales System: Zum einen stammt das sauerstoffreiche Blut aus der Leberarterie, zum anderen das sauerstoffarme Blut aus den Portalvenen (Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas 2007).

Die funktionelle Struktureinheit der Leber ist der sogenannte „Lobulus“, auch „Läppchen“ genannt. Jeder dieser sechseckigen Lobuli ist an allen Ecken von einer sogenannten „portalen Trias“ eingefasst und um eine Zentralvene herum gruppiert. Die Trias besteht aus Portalvene, Lebervene und Gallengang (Abbildung 1).

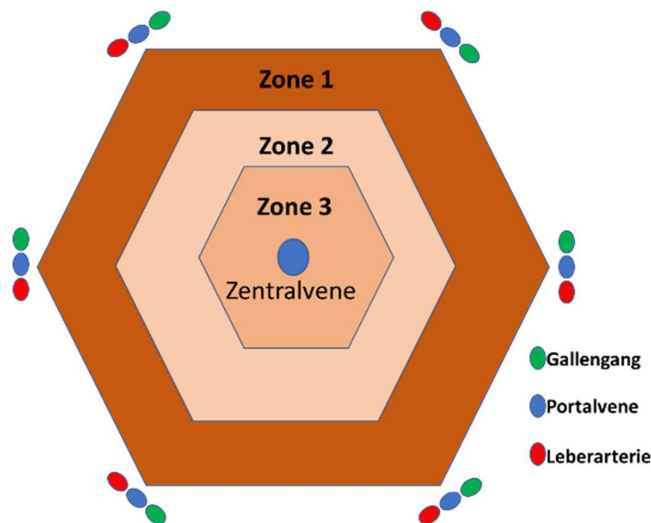


Abbildung 1: Leberläppchen mit dem typischen sechseckigen Aufbau mit Zentralvene und Gefäßtrias aus Gallengang, Portalvene und Leberarterie.

Im „Sinusoid“ (Abbildung 2) vermischt sich das Blut aus der Portalvene (nährstoffreich, sauerstoffarm) mit dem aus der Leberarterie (nährstoffreich, sauerstoffarm) und fließt an den

Hepatozyten entlang in die Zentralvene, von wo aus es drainiert wird. Somit entsteht ein Gradient, welcher die Grundlage der Einteilung des Läppchens in drei Zonen ist. So haben diese Zonen verschiedene Konzentrationen an Sauerstoff, Nährstoffen, abgegebenen Abfallprodukten etc. (Trefts et al. 2017).

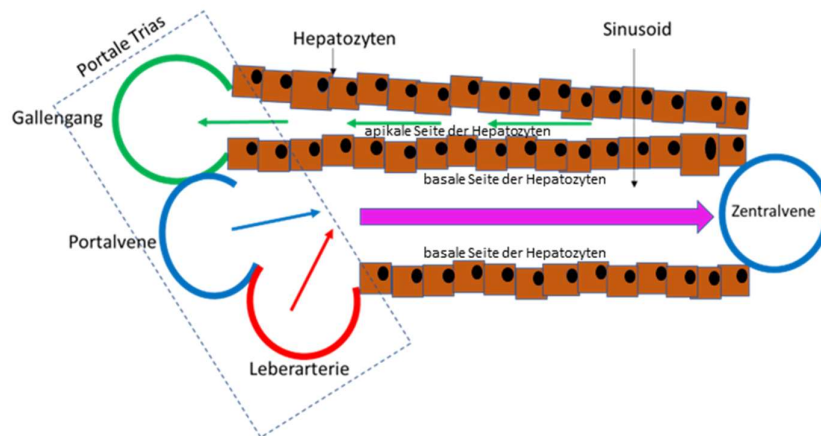


Abbildung 2: Sinusoid mit Gefäßtrias und Mündung in die Zentralvene

Die Leber besteht aus unterschiedlichen Zelltypen: den Hepatozyten, den Gallenepithelzellen, Sternzellen, Kupffer-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen, die in einem komplexen System miteinander arbeiten. Die vorherrschende Zellart in der Leber sind die Hepatozyten, welche mehrere Funktionen ausüben und eine wichtige Differenzierung aufweisen. Ihre basale Seite ist immer Richtung Lebersinusoid gerichtet (Abbildung 2). Die apikale Seite hingegen bildet selbst die Wand der Gallenkanälchen. Die Hepatozyten produzieren und sezernieren die Galle von hier direkt in den Gallenkanal, dessen Wände sie bilden. Die Aufrechterhaltung dieser Polarisierung benötigt Energie, sie ist jedoch essenziell für die Funktionsfähigkeit der Leber. Bei vielen Lebererkrankungen verliert die Leber ihre polarisierte Struktur (Gissen und Arias 2015). Dies ist auch bei vielen Lebertumorentitäten zu beobachten. Hier spielt das Protein β -Catenin eine wichtige Rolle, das im gesunden Organismus zur Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität unabdingbar ist. Mutationen im *CTNBI* Gen, welches für sein Zielprotein β -Catenin kodiert, wurden in 20 % der Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) entdeckt (Vilarinho et al. 2014). Mutationen, welche zu einer Akkumulation des Proteins führen, wurden bei über 50 % der Patienten mit sporadischem Hepatoblastom gefunden (Taniguchi et al. 2002; Gissen und Arias 2015).

1.1.2. Funktion

Die Leber erfüllt eine Vielzahl von Funktionen, darunter ihre Beteiligung am Kohlenhydratstoffwechsel. Dies beinhaltet die Speicherung, Synthese und Metabolisierung von Glukose, wobei Glukose in Form von Glykogen gespeichert wird. Während der Nahrungsaufnahme steigt der Insulinspiegel physiologisch an, während gleichzeitig der Glukagonspiegel sinkt. Dies führt zu einer Einlagerung der Glukose hauptsächlich in die Leber und weitere Gewebe. Folgt eine Fastenphase, kehren sich die Hormonspiegel um und die Leber gibt die Glukose wieder an den Körper ab. Bei Überernährung kommt es zu einer Insulinresistenz der Leber. Diese kann dann die Glukose zunehmend schlechter aufnehmen, was zu einem höheren Blutzuckerspiegel führt. Hierdurch werden eine Reihe von Folgeerkrankungen ausgelöst, die zum Beispiel Augen, Nervensystem und Gefäße betreffen können. Die Lipogenese (=Synthese von Fettsäuren) wird jedoch weiterhin durch das Insulin stimuliert, wodurch es zu Fettablagerungen in der Leber kommt (sogenannte „Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung“= NAFLD) (Byrne und Targher 2015; Trefts et al. 2017).

Des Weiteren ist die Leber zuständig für Verdau und Verarbeitung von Lipiden und Lipoproteinen, Vitaminspeicherung und Cholesterinhomöostase. Sie kann Fettsäuren als Energiequelle nutzen, ist aber auch in der Lage, über Ketose Fette in Ketonkörper umzuwandeln, welche von extrahepatischen Organen als Energiequelle genutzt werden können. Eine weitere Hauptaufgabe ist die Synthese von Proteinen. Sie ist für jegliche Funktion sowohl auf Zell- als auch auf Organebene essenziell. Die Leber produziert 85-90 % der Proteine des Körpers, auch viele Wachstumsfaktoren, unter anderem die Insulin-like growth factors I und II (IGF-I und -II). Über den Harnstoffzyklus ist die Leber auch für die Entsorgung von schädlichem Stickstoff verantwortlich (Trefts et al. 2017).

1.2. Leberzirrhose

1.2.1. Epidemiologie, Ätiologie und Klassifizierung der Leberzirrhose

Jährlich sterben etwa 1,2 Millionen Menschen an den Folgen einer Leberzirrhose. Diese ist somit die zehnthäufigste Todesursache in Industrienationen. In Zentraleuropa ist sie mit 170.000 Todesopfern pro Jahr sogar die vierthäufigste Todesursache (Wilde und Katsounas 2019; Tsochatzis et al. 2014). Typischerweise verläuft eine Leberzirrhose lange asymptomatisch, die Diagnosestellung ist hierdurch enorm erschwert. Erst im Spätstadium treten Symptome wie erhöhte Leberwerte, Ikterus, Aszites, Bauchschmerzen oder

Gefäßpathologien wie ein „Caput Medusae“ auf (Schuppan und Afdhal 2008). Spezifischere Symptome sind eine spontan bakterielle Peritonitis (SBP), hepatische Enzephalopathie, hepatorenales und pulmonales Syndrom (Nusrat et al. 2014). Mit einem Wert, welcher sich aus Serumalbumin, Bilirubin, INR-Wert, Aszitesmenge und Grad der Enzephalopathie errechnet, erfolgt eine Einteilung der Zirrhose in unterschiedliche Schweregrade. Dieser Wert wird Child-Pugh-Score genannt. Bei Child-Pugh A entspricht die Sterbewahrscheinlichkeit noch derjenigen der altersgleichen Normalbevölkerung, bei Child-Pugh B liegt die Ein-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 80 % und bei Child-Pugh C bei 45 %. Zur Erstellung einer Rangfolge bei Listung zur Lebertransplantation nutzt man den MELD-Score. Zu dessen Berechnung werden Kreatinin, Bilirubin und der INR-Wert herangezogen (Schuppan und Afdhal 2008).

Die Leberzirrhose entsteht immer auf dem Boden einer fortgeschrittenen Leberfibrose. Zur Fibrosierung kommt es durch einen chronischen Parenchymschaden unterschiedlicher Genese (siehe Kapitel 1.2.2) durch Überlastungen/Entzündungen der Leber. Auf die Schädigungen folgt eine Regeneration, welche jedoch nicht ausschließlich funktionstüchtiges Lebergewebe hinterlässt. Es wird auch funktionsloses Bindegewebe in die Leber eingebaut, so dass es zur überschießenden Fibrogenese kommt. Hierbei stellt die Aktivierung der Sternzellen den zentralen Motor dar, da diese Zellen nach hepatischer Schädigung aktiv werden. Sie sind die Produzenten der extrazellulären Matrix (Hernandez-Gea und Friedman 2011; Inagaki et al. 2012). Die immer weiter fortschreitende Fibrosierung reduziert die Elastizität des Lebergewebes.

Auch Veränderungen im Gefäßsystem der Leber begleiten alle pathogenetischen Prozesse bei der Entstehung einer manifesten Zirrhose. Im Spätstadium der Fibrose führt die mangelnde Elastizität der Leber oftmals zu einem Shunt der portalen und arteriellen Blutversorgung, welcher zu Austauschproblemen zwischen Sinusoiden und Hepatozyten führt (siehe Kapitel 1.2.2). Diese hämodynamische Pathologie ist ursächlich für die folgende portale Hypertonie, das früheste Erkennungszeichen einer Zirrhose und bildet die Grundlage für die meisten klinischen Komplikationen, darunter die Vasodilatation im Bauchraum (splanchnische Vasodilatation), die verminderte Durchblutung der Nieren und die Ansammlung von Wasser und Salz im Körper (Wasser- und Salzretention) (Schuppan und Afdhal 2008).

1.2.2. Pathogenese der Leberzirrhose und Leberfibrose

Eine Leberzirrhose kann Folge verschiedenster Ursachen sein. Hierzu zählen hauptsächlich Fettleibigkeit, Nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD), Alkoholkonsum (Alkoholische Fettleber = AFLD), Hepatitiden und Autoimmunkrankheiten (Ginès et al. 2021). Sie entsteht nach langer Dauer auf dem Boden einer zugrundeliegenden Entzündung, während der das gesunde Lebergewebe durch fibrotisches, funktionsloses Gewebe ersetzt wird (siehe Kapitel 1.2.1).

Die beiden Hauptformen der Fibrose sind die septale und die perisinusoidale Fibrose: Bei der septalen Fibrose kommt es zur Ausbildung von vaskularisierten Bindegewebsschichten, welche sich aus Portal- oder Zentralvenen entwickeln und Anastomosen zwischen Gefäßen bilden können. Somit entstehen Verbindungen (Shunts) zwischen afferenten (Pfortader) und efferenten (Zentralvenen) Gefäßen. Damit umgeht ein Teil des Blutes das stoffwechselaktive Parenchym (Desmet und Roskams 2004). Bei der perisinusoidalen Fibrose hingegen liegt das Problem in der Entwicklung von neuem Gewebe im perisinusoidalen Raum, was zu einer Kapillarisation und Behinderung des metabolischen Austauschs zwischen Blut und Hepatozyten führt. Die zirrhotische Leber verliert daher einen erheblichen Anteil ihrer Funktion und ihrer funktionellen Reserve (Schaffner und Popper 1963; Abraldes et al. 2023).

Diese fibrotischen Umbauten sind noch reversibel. Die Regressgeschwindigkeit ist hierbei abhängig von mehreren Variablen, wie der bereits bestehenden Dauer der Fibrose und den involvierten Matrixkomponenten (Friedman 2002). Die Fibrose ist kein linearer Vorgang, sondern ein dynamischer Prozess, der sowohl aus Fibrogenese als auch aus Fibrolyse bestehen kann. Nach bisherigem Forschungsstand ist eine völlige Reversibilität der Endform der Leberfibrose, der Leberzirrhose, jedoch nicht möglich (Khan und Saxena 2021).

Dieser ständige, mit latenter Entzündung und Belastung einhergehende Umbau der Leber, die permanente Regeneration und der stetige Auf- und Abbau von Parenchym und Bindegewebe stellen eine ideale Grundlage für Neoplasien wie das HCC dar. In den letzten Jahrzehnten haben sich die Behandlungsmöglichkeiten der anderen, durch die Zirrhose verursachten Komplikationen, deutlich verbessert. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für das HCC selbst liegt jedoch immer noch bei 10-20 % (Shahini et al. 2023).

1.3. Das HCC

1.3.1. Epidemiologie und Ätiologie des HCC

Über eine halbe Million Menschen weltweit erkrankt jedes Jahr an einem HCC. Es macht 80 % aller Lebermalignome aus (Rumgay et al. 2022). Das HCC ist damit die fünfthäufigste Krebserkrankung und bei Männern die zweithäufigste Krebstodesursache (Asafo-Agyei und Samant 2023). Diese Erkrankung tritt selten vor dem 40. Lebensjahr auf und ist bei Männern im Alter von 60 bis 64 Jahren und bei Frauen zwischen dem 65. und 69. Lebensjahr am häufigsten zu beobachten. Bei 90 % der Patienten liegt eine Leberzirrhose vor (El-Serag 2011). Hauptrisikofaktoren hierfür sind Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (HBV; liegt 50 % aller Fälle zugrunde) und dem Hepatitis C Virus (HCV; 15 bis 20-fach erhöhtes Risiko, eine Leberzirrhose zu entwickeln). Weitere mögliche Ursachen sind Hämochromatose, Autoimmunhepatitiden, Porphyrinen und Alpha₁-Antitrypsin Mangel. In den letzten Jahren haben zusätzlich die alkoholische und nichtalkoholische Fettlebererkrankung als Risikofaktoren an Bedeutung gewonnen (McGlynn et al. 2021).

Bei diesen beiden Fettlebererkrankungen handelt es sich um eine unphysiologisch erhöhte Einlagerung von Fett in die Hepatozyten, welche für die Leber konstanten Stress und somit auch Entzündung und Gewebsumbau bedeutet. Aufgrund der Ätiologie erfolgt eine Differenzierung zwischen der alkoholischen Fettlebererkrankung (AFLD) und der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) mit daraus resultierender alkoholischer und nicht-alkoholischer Steatohepatitis ((N)ASH) (Huang et al. 2020). Besonders eine fettreiche und zuckerhaltige Ernährung mit oftmals folgendem metabolischem Syndrom und Insulinresistenz sind ursächlich bei der Entstehung einer Fettleber (Tripathi et al. 2018; Huang et al. 2020).

Es wird angenommen, dass 25 % der Weltbevölkerung an einer NAFLD leidet (Younossi et al. 2019). Die Prävalenz in Europa liegt bei 24 %. Die NAFLD ist noch reversibel, auf Dauer entwickeln jedoch 20-30 % der Patienten eine Fibrose, welche wiederum in 10-20 % der Fälle zur Zirrhose führen kann, welche nicht mehr reversibel ist (Tripathi et al. 2018).

1.3.2. Diagnostik und Prognose des HCC

Bei der Diagnose des HCC spielen nichtinvasive, bildgebende Verfahren, auch unter Einsatz von Kontrastmitteln, eine immer größere Rolle. So sind in Tumorerkrankungen < 2 cm eine schnelle Kontrastmittelanflutung in der arteriellen Phase (Hypervaskularisation des Tumors), ein

verzögertes „Washout“ Phänomen in der venösen Phase und ein schwarzer Randsaum typisch (Kulik und El-Serag 2019). Bei diesen kleinen Läsionen hat auch das α -Fetoprotein (AFP) als Tumormarker einen hohen prädikativen Stellenwert (Galle et al. 2019; Schlosser et al. 2022). Atypische Bilder sollten mit einer Biopsie abgeklärt werden. Bei negativen Biopsieergebnissen sollte alle 3-6 Monate nachkontrolliert werden, bis die Läsion von selbst verschwindet oder eindeutige Malignitätskriterien aufweist (Silva et al. 2008).

Die Behandlung des HCC hängt von mehreren Faktoren, unter anderem der Tumorlast, dem Grad der Lebereinschränkung, der Größe des Tumors, aber auch dem Therapieziel (kurativ oder palliativ), ab. Das Staging-System der Barcelona-Clinic for Liver Cancer (BCLC, Abbildung 3) bezieht alle diese Faktoren mit ein und gibt die entsprechenden Therapieempfehlungen. Das mittlere Überleben unter der jeweiligen Therapie gibt sowohl Patienten als auch Behandlern eine realistische Einschätzung der Therapieeffektivität und Sinnhaftigkeit (Reig et al. 2022).

1.3.3. Therapie des HCC

Das HCC entwickelt sich in bis zu 90 % der Fälle auf dem Boden einer Leberzirrhose. Aufgrund des bereits eingeschränkten Gesundheitsstatus vieler Patienten sind die Therapieoptionen oftmals eingeschränkt (Llovet et al. 2021b). Die Behandlung orientiert sich am Tumorstadium und am Barcelona Liver Clinic Staging System (Abbildung 3), einem Stufenschema zur Behandlung des HCC abhängig vom Stadium und dem Child-Pugh-Score (Divella et al. 2015).

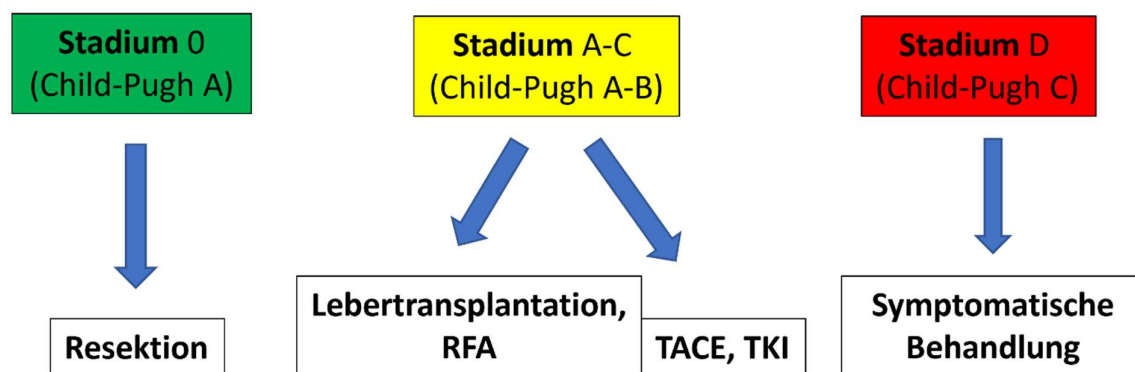


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des BCLC-Algorithmus zur Behandlung des HCC

Generell sind HCC-Patienten in den frühen Stadien Kandidaten für eine potenziell kurative Leberresektion, -transplantation oder lokale Ablation der HCC-Herde. Die Resektion ist Mittel der Wahl bei Patienten mit HCC ohne zusätzliche Leberzirrhose (EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma 2018). Sie ist auf Patienten beschränkt,

die nur einen singulären Tumor aufweisen, einen Child-Pugh A Score und keine klinisch symptomatische portale Hypertension.

Patienten, die zusätzlich eine Leberzirrhose aufweisen, sind mögliche Kandidaten für eine Transplantation. Hierfür muss die Tumorlast gemäß den Milan-Kriterien gering genug sein (einzelner Tumor < 5 cm oder 2-3 Tumoren < 3 cm ohne vaskuläre Invasion). Das 5-Jahres-Überleben liegt hier bei 70 % (Llovet et al. 2021b). Die Hauptprobleme bei der Transplantation sind der Mangel an Spenderorganen und die langen Wartezeiten. Viele Patienten verschlechtern sich in diesem Zeitraum derart, dass sie die erforderlichen Kriterien nicht mehr erfüllen und dadurch ihren Listenplatz verlieren (Cucchetti et al. 2020).

Nicht zuletzt stehen in den frühen Stadien der Leberzirrhose verschiedene ablativ Verfahren zur Verfügung. Die am häufigsten angewendeten Methoden sind die Radiofrequenzablation (RFA) und Mikrowellenablation (MWA) (Llovet et al. 2021a). Es gibt zwei Hauptindikationen für dieses Verfahren: So sind sie Mittel der Wahl bei einzelnen Tumoren < 2 cm. Bei Tumoren < 4 cm oder 2-3 Tumoren < 3 cm stehen sie als Alternative zur Operation zur Verfügung (Heimbach et al. 2018).

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) stellt eine weitere Therapieoption dar (Llovet et al. 2021b). Hierbei wird ein Chemotherapeutikum direkt in den Tumor appliziert. Zusätzlich werden die zuführenden Arterien gezielt embolisiert, um die lokale Wirkung des Chemotherapeutikums zu steigern. Bei einer kompensierten Zirrhose ohne tumorassoziierte Symptome und vaskuläre Invasion, bei der Läsionen > 5 cm oder multifokal vorliegen, zeigt die TACE bei Patienten mit erhaltener Leberfunktion, ohne extrahepatische Metastasen und einer Einordnung in Child-Pugh A eine um 20-25 % erhöhte 2-Jahres-Überlebensrate (El-Serag 2011). Die TACE zählt deshalb zu den häufigsten Therapieoptionen bei inoperablem HCC. Dieses Verfahren wird auch neoadjuvant vor Transplantationen angewendet. Ein sogenanntes postembolisches Syndrom mit Fieber und abdominellen Schmerzen tritt bei ca. 37 % der Patienten auf, ist die häufigste Nebenwirkung des TACE-Verfahrens und ein ungünstiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben des Patienten (Mason et al. 2015). Als Wirkstoffe stehen für die TACE unter anderem Doxorubicin und Bleomycin zur Verfügung (Fu et al. 2021; Wang et al. 2018). Die genaue Wirkweise von Doxorubicin ist noch nicht vollständig geklärt. Es handelt sich um ein Antibiotikum, welches in die DNA interkaliert, biosynthetische Prozesse verhindert und somit Zellwachstum hemmt. Es trägt zur Entstehung von freien Radikalen bei und induziert somit DNA- und Zellschäden. Am besten kann es seine Wirkung entfalten, wenn es liposomal verpackt wird. So kann es im Tumor akkumulieren, mit

minimalen Nebenwirkungen für den Restorganismus (Rivankar 2014). Bei Bleomycin handelt es sich um ein Glykopeptid-Antibiotikum, welches an die DNA bindet und über die Produktion von freien Radikalen zu Einzelstrangbrüchen führt (Dorr 1992).

In fortgeschrittenen Stadien des HCC ist oftmals eine systemische Therapie indiziert. Seit mehr als einem Jahrzehnt war der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib das einzige zugelassene Medikament, und viele randomisierte Studien zur Erforschung der Wirksamkeit anderer Tyrosinkinase-Inhibitoren und verschiedener Kombinationen mit Sorafenib konnten keine signifikante Verbesserung des Überlebens nachweisen (Vogel et al. 2022). Im Jahr 2018 zeigte der Multikinase-Inhibitor Lenvatinib in der REFLECT-Studie, dass er gegenüber Sorafenib nicht unterlegen war, und wurde als alternative Option für die Erstlinientherapie zugelassen (Kudo et al. 2018). Es muss darauf hingewiesen werden, dass in den Kontrollgruppen der aktuellen Phase-III-Studien zum HCC mit Sorafenib und Lenvatinib die mittlere Überlebenszeit die in den jeweiligen Schlüsselstudien berichtete mittlere Überlebensdauer um bis zu 6 Monate übertraf. Dieser Umstand ist vermutlich auf eine verbesserte Patientenbetreuung und den Zugang zu wirksameren Zweitlinientherapien zurückzuführen (Raoul et al. 2019; Llovet et al. 2023).

Die Einführung von immuntherapiebasierten Strategien markierte den nächsten Durchbruch in der Behandlung des fortgeschrittenen HCC. Trotz vielversprechender Phase-I/II-Daten scheiterten die ersten Phase-III-Studien mit Immuntherapie, die auf Einzelwirkstoffen beruhten, in der Erst- und Zweitlinie (Yau et al. 2022; Qin et al. 2023). Kombinationen von Immun-Checkpoint-Inhibitoren mit anti-vascular endothelial growth factor (VEGF)-gerichteten Therapien führen zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate im Vergleich zu einer Behandlung mit Sorafenib. Die IMbrave150-Studie berichtete von signifikant längerem mittlerem Gesamtüberleben mit der Kombination von Anti-PD-L1 Atezolizumab und Anti-VEGF Bevacizumab im Vergleich zu Sorafenib (19,2 Monate vs. 13,4 Monate) (Cheng et al. 2022) und wurde anschließend von nationalen und internationalen Leitlinien als neue Standardbehandlung in der Erstlinienbehandlung des HCC empfohlen (Vogel et al. 2018). Neueste Untersuchungen zeigen, dass auch die Kombination von Camrelizumab, einem Antikörper, der PDL-1 neutralisiert, und Rivoceranib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor mit spezifischer Aktivität gegen VEGFR-2, zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens im Vergleich zu einer Behandlung mit Sorafenib alleine führt, was das Konzept der Kombination von Immun-Checkpoint-Inhibitoren mit VEGF-gerichteten Therapien im HCC unterstützt (Qin et al. 2023).

In einer aktuellen Untersuchung, der sogenannten HIMALAYA-Studie, wurde kürzlich nachgewiesen, dass Durvalumab, ein monoklonaler Antikörper, der gegen PD-L1 gerichtet ist, und Tremelimumab, ein Antikörper, der auf CTLA-4 neutralisiert, Sorafenib in der Wirksamkeit überlegen sind. Dies eröffnet eine weitere neuartige Option für die Erstlinientherapie (Rimassa et al. 2023).

Basierend auf diesen Studien schlägt die aktuelle S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome“, Juni 2023, als Erstlinien-Therapie die Kombination Atezolizumab und Bevacizumab oder mit Durvalumab und Tremelimumab bei HCC-Patienten im Child-Pugh-Stadium A und BCLC B oder C, mit Fernmetastasen oder einer Tumorlokalisation, die lokoregionär nicht kontrolliert oder reseziert werden kann, vor. Patienten mit Kontraindikationen für diese Therapien soll eine Erstlinientherapie mit einem der beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Lenvatinib oder Sorafenib angeboten werden (S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome“, Juni 2021).

1.4. Die p53-Familie

1.4.1. Einleitung

Das Tumorsuppressorprotein p53 wurde im Jahre 1979 erstbeschrieben (DeLeo et al. 1979). Seither war es Gegenstand intensiver Forschung und ihm wird mittlerweile eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben. p53 ist beteiligt an Zellzyklusarrest, Einleitung von Zelltod und Seneszenz, DNA-Reparaturmechanismen und Pathogenabwehr (Pflaum et al. 2014; Müller et al. 2006; Müller et al. 1998; Schilling et al. 2009; Levine und Oren 2009; Sethi et al. 2015; Pitolli et al. 2019; Friedel und Loewer 2022). Hierbei agiert p53 einerseits als Transkriptionsfaktor und induziert spezifische Zielgene. Zugleich kann p53 transkriptionsunabhängig auch direkt agieren, indem es beispielsweise zusammen mit Bcl-2 zur Destabilisierung der mitochondrialen Membran führt (Mihara et al. 2003).

Einige Jahre später wurden neben p53 die Sequenzhomologen p63 (Yang et al. 1998) und p73 (Kaghad et al. 1997) identifiziert. Diese weisen eine große Homologie zu p53 auf und unterstützen es in seiner Funktion als Tumorsuppressorprotein (Müller et al. 2006), können jedoch auch spezifische zusätzliche, eigene Funktionen ausüben (Pflaum et al. 2014; Müller et al. 2006; Müller et al. 2005). Zusammen bilden p53, p63 und p73 sowie deren Isoformen die p53-Familie. Die Aktivität der p53-Familie wird u.a. stimuliert durch Hypoxie, Karzinogene,

ionisierende Strahlung und oxidativen Stress (Chen et al. 2017; Levine und Oren 2009; Pflaum et al. 2014; Müller et al. 2006). Das für p53 codierende Gen *TP53* spielt bei der Pathogenese des HCC eine große Rolle. So konnte gezeigt werden, dass in bis zu 50 % aller HCCs *TP53* mutiert vorliegt. Diese Mutationen tragen zur Entwicklung und Progression eines HCC maßgeblich bei (Staib et al. 2003; Hussain et al. 2007; Chen et al. 2003; Müller et al. 2006). Bei der häufigsten Mutation handelt es sich um eine Missense-Mutation von AGG zu AGT im Codon 249 von Exon 7 (Katiyar et al. 2000). Mutationen im *TP53*-Gen sind assoziiert mit Invasivität, Metastasierung und Rezidiv des HCC (Jeng et al. 2000; Hsu et al. 1993; Sugo et al. 1999). Auch die anderen Familienmitglieder spielen beim HCC eine Rolle:

TP63 und *TP73* kooperieren beispielsweise mit *TP53*, um Apoptose zu induzieren. Konträr dazu sind verkürzte Isoformen von p63 und p73 Inhibitoren der p53-Familie, indem sie deren Transaktivierungsaktivität und damit die Apoptoseinduktion verhindern können.

p63 und p73 spielen somit auch bei dem Behandlungserfolg des HCC eine Rolle (Müller et al. 2006). Die Aktivierung der p53-Familie spielt eine große Rolle in der DNA-Reparatur und der Prognose des HCC. Die durch die p53-Familie vermittelte Apoptose wird im HCC auf mehreren Ebenen beeinflusst. Die Mutation von p53 und ein verändertes Verhältnis der p63- und p73-Isoformen können zu Therapieresistenz und zu einer schlechten Prognose führen (Kunst et al. 2016; Müller et al. 2006; Sethi et al. 2015; Yang et al. 1998; Kaghad et al. 1997; Fisher et al. 2020; Mundt et al. 2010). Dies zeigt, welche zentrale Rolle p53 in der Pathogenese des HCC einnimmt.

1.4.2. Struktureller Aufbau und Funktionen der p53- Familienmitglieder

Die Genstruktur aller Mitglieder der p53-Familie zeigt einen modularen Aufbau (Kunst et al. 2016) (Abbildung 4). Durch alternatives Spleißen und die Verwendung alternativer Promotoren kann so aus jedem der drei Gene eine Vielzahl von Proteinisoformen entstehen, die sich in ihren Funktionen unterscheiden (Pflaum et al. 2014; Kunst et al. 2016; Surget et al. 2013; Bourdon 2007; Vieler und Sanyal 2018; Ferraiuolo et al. 2016; Woodstock et al. 2021; Murray-Zmijewski et al. 2006). Je nach Isoformen-Expressionsprofil kann somit ein variierendes Netzwerk an p53-Proteinen entstehen. Alle Mitglieder der p53-Familie weisen eine N-terminale Transkriptions-Aktivierungsdomäne (TAD) auf. Dies ist die Bindungsstelle für positive und negative Regulatoren wie MDM2 oder p300 (Mavinahalli et al. 2010). Weiterhin weisen alle 3 Familienmitglieder die prolin-reiche Erkennungs-Sequenz (PRD) auf. Diese ist unabdingbar für ihre Funktion als Transkriptionsfaktor. Eine Deletion dieser Domäne führt zum Verlust der

p53-Familien-abhängigen Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose (Baran et al. 2017). Die meisten Isoformen weisen auch eine zentrale DNA-Bindungs-Domäne (DBD) auf, welche an das Response-Element (RE) der jeweiligen Zielgene bindet und die häufig Gegenstand von Mutationen ist (Muller und Vousden 2014; Meng et al. 2014). Die sogenannte Oligomerisierungs-Domäne (OD) ist oftmals das Ziel von alternativem Spleißen und posttranslationalen Modifikationen. Sie erlaubt den Familienmitgliedern in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren das Wandern entlang der DNA und die Suche nach Bindungsstellen, kann jedoch die Stabilität des Protein-DNA Komplexes auch verringern, möglicherweise um in Stresssituationen ein schnelleres Umschalten der regulatorischen Funktionen zu ermöglichen (Sauer et al. 2008). Des Weiteren gibt es bei manchen p63 und p73 Isoformen eine inhibitorische Einheit (TID) und eine steril-alpha-motif (SAM) Domäne, die für die Protein-Protein-Wechselwirkungen und Aktivitätsregulation wichtig sind (Candi et al. 2014). Die basische Domäne (BR), welche nur bei p53 vorkommt, spielt eine Rolle bei apoptotischer Aktivität und als regulatorische Domäne (Zhu et al. 2000).

Es werden Volllängenformen (sogenannte TA-Form) von weiteren Isoformen unterschieden. Durch alternatives Spleißen und posttranskriptionelle Modifikationen können β - und γ -Isoformen ohne OD- und die dominant-negativen (ΔN)-Isoformen, denen die aminoterminal TAD Sequenz fehlt, gebildet werden (Kunst et al. 2016; Müller et al. 2006; Ferraiuolo et al. 2016) (Abbildung 4). Die vom stromaufwärts liegenden Promotor kodierten Isoformen enthalten dabei jeweils die konservierte TAD, die für die apoptotischen und zellzyklusregulierenden Eigenschaften wichtig sind. Den von den stromabwärts liegenden Promotoren kodierten Isoformen fehlt diese TAD, wodurch die dominant-negativen ΔN -Isoformen erzeugt werden, die den jeweiligen TA-Isoformen entgegenwirken können (Müller et al. 2006; Mundt et al. 2010; Müller et al. 2005).

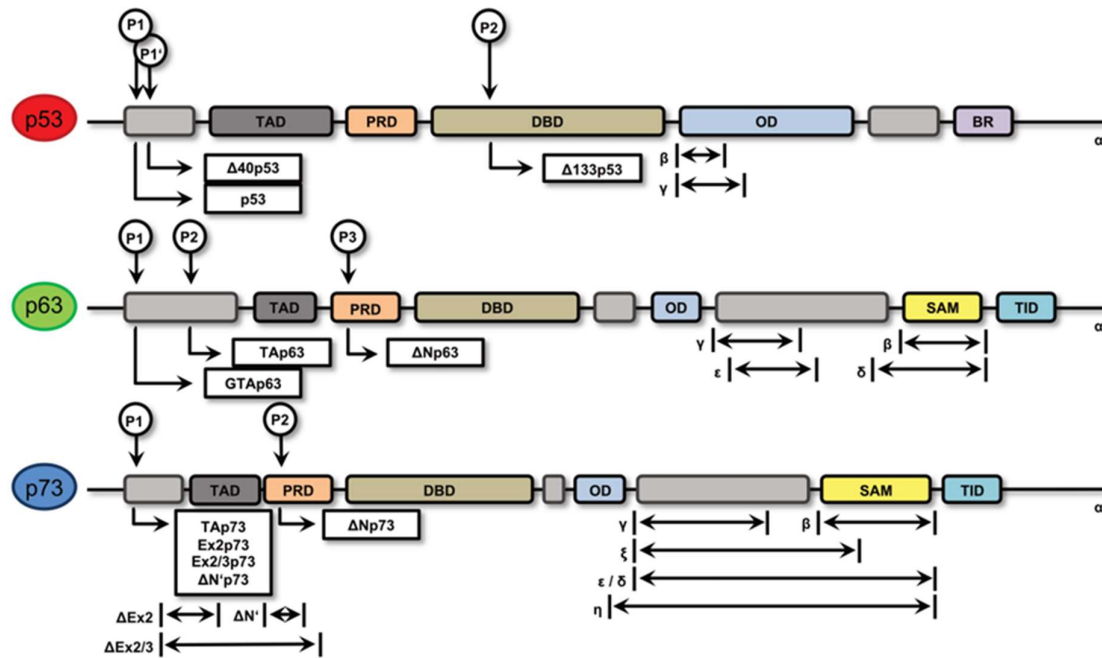


Abbildung 4: Genstruktur der p53-Familie (Kunst et al. 2016). Die Diversität der Isoformen entsteht durch alternatives Spleißen und die Verwendung alternativer Promotoren.

Die Regulation der p53-Aktivität erfolgt in erster Linie über die E3 Ubiquitin Ligase MDM2. Diese blockiert die Transkriptionsaktivität von p53 und initiiert dessen proteosomale Degradation. MDM2 wird durch p53 positiv reguliert, wodurch die beiden in einer Autoregulationsschleife miteinander stehen. Bei zellulärem Stress wird MDM2 gehemmt, sodass p53 akkumulieren kann. In der DBD von p53 kann zudem eine Vielzahl von Mutationen auftreten. Diese beeinflussen die Bindungsaffinität zu den REs und verringern somit die Expression von Zielgenen, unter anderem von MDM2, mit dem eine Feedbackschleife besteht. Folglich treten erhöhte Spiegel von mutiertem p53 auf (Meng et al. 2014). Ein weiterer wichtiger Regulator ist p14ARF. Dieses Protein verhindert den MDM2-vermittelten Abbau von p53 (Robertson und Jones 1998; Weber et al. 1999). In einer negativen Feedbackschleife führt p14ARF zu einer Degradation seines Aktivators E2F-1. Umgekehrt unterdrückt p53 die Expression von ARF ebenfalls (Haupt et al. 1997; Momand et al. 1992; Perry 2010).

1.4.3. p63

Das *TP63* Gen besteht aus 15 Exons, hat eine Länge von 270.000 bp und liegt auf Chromosom 3 (Müller et al. 2006). Es besitzt 3 Promotoren und führt zur Bildung von bisher sechs bekannten Protein-Isoformen (Murray-Zmijewski et al. 2006). Wichtig ist es, zwischen den Funktionen der TAp63 Isoform und der Δ Np63 Isoform zu differenzieren. Während die TA-Isoformen pro-apoptotisch wirken, üben die Δ N-Isoformen antiapoptotische Effekte aus und

hemmen die Aktivierung von p53-Zielgenen, was somit auch HCC-Therapien im Wege stehen kann (Mundt et al. 2010). TAp63 wirkt als Transkriptionsfaktor und ist an der Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest beteiligt. Es verursacht einen G1-Arrest durch Induktion von p21 und p57/Kip2 (Guo et al. 2009). Durch die transkriptionelle Aktivierung von u. a. Bax, DAP3, APAF-1, CD95 oder TRAIL-R-Todesrezeptoren induziert es Apoptose sowohl auf dem extrinsischen als auch auf dem intrinsischen Weg (Gressner et al. 2005). Das p63-spezifische regulatorische Element unterscheidet sich geringfügig von dem von p53, sodass p63 auch eigene Wirkungen vermitteln kann (Osada et al. 2005). p63-knock-out-Mäuse sterben kurz nach der Geburt. Sie leiden an epithelialen Anomalien an Haut, Drüsen und Zähnen, was zeigt, dass p63 für die Epithelentwicklung essenziell ist (Vanbokhoven et al. 2011).

Reguliert wird p63 über posttranslationale, die Proteinstabilität beeinflussende Modifikationen. E3-Ligasen wie Pirh2 führen zu Degradation, RNA-bindende Proteine wie RNPC1 hingegen sind wichtig für dessen Stabilität (Jung et al. 2013; Cho et al. 2013).

1.4.4. p73

Das *TP73* Gen besteht aus 15 Exons, hat eine Länge von 80.000 bp und liegt auf Chromosom 1 (Müller et al. 2006). Es besitzt zwei Promotoren und kann theoretisch bis zu 29 verschiedene Isoformen kodieren; bisher wurden aber erst 14 beschrieben (Murray-Zmijewski et al. 2006). Es hat ähnliche Funktionen wie seine Familienmitglieder und ist ebenfalls an Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligt (Terrinoni et al. 2004; Balint et al. 2002). Auch von p73 existieren, wie in 1.4.2 beschrieben, verschiedene Isoformen. Während die TA-Isoformen pro-apoptotisch wirken, haben die Δ N-Isoformen überwiegend gegensätzliche Effekte. So stehen hochregulierte Δ Np73 Mengen im HCC mit einer geringeren Überlebenserwartung in Verbindung (Müller et al. 2005). Δ Np73- Isoformen können mit den TA-Formen der p53-Familie interagieren und diese hemmen. Somit unterdrücken sie die Aktivierung von apoptotischen Genen und wirken antiapoptotisch (Schuster et al. 2010).

Zusätzlich hat p73 eine zentrale Rolle in der neuronalen Differenzierung. Knock-out Mäuse zeigen eine Hippocampus-Dysgenese, eine reduzierte neuronale Dichte im motorischen Kortex und sterben bald nach der Geburt. Heterozygote Mäuse entwickeln Alzheimer-ähnliche Symptome und zeigen atrophische Neurone (Yang et al. 2000; Wetzel et al. 2008; Tissir et al. 2009). TAp73 ist zudem ein Aktivator des p75 Neutrophinrezeptors, welcher für eine regelrechte Neurogenese von Bedeutung ist (Niklison-Chirou et al. 2013).

p73 wird auf transkriptionaler, posttranslatiionaler und Proteinebene reguliert. p300 und E2F-1 führen zu einer verstärkten Transkription von *TP73*, während MDM2 die transkriptionelle Aktivität selbst hemmt (Burge et al. 2009; Ozaki et al. 2009; Bálint et al. 1999). Auf posttranslatiionaler Ebene wird die p73-Aktivität durch Modifikationen wie Phosphorylierung und Deacetylierung reduziert oder aktiviert, je nachdem, durch welches Enzym und an welcher Stelle die Modifikation stattfindet. Deacetylierung durch SIRT und Phosphorylierung durch CDK2 reduzieren die Aktivität, Phosphorylierung durch c-Abl und Acetylierung durch p300 führen zu einer p73-Aktivitätserhöhung. ASPP-Proteine sind in der Lage, p73 über die POLY-C-Bindungsdomäne zu regulieren (Bisso et al. 2011).

1.4.5. Die Rolle der p53-Familie bei Fettlebererkrankungen

Die Rolle der p53 Familie bei Fettlebererkrankungen wird kontrovers diskutiert. So konnte zum einen gezeigt werden, dass ein p53 Knockdown zu vermehrten Lipidablagerungen und beeinträchtigtem Glykogenstoffwechsel mit nachfolgender Steatose führt (Krstic et al. 2018; Prokesch et al. 2017; Wang et al. 2013). Andererseits wird p53 auch als Komponente bei Verfettung der Leber beschrieben. So wurde bei Patienten mit einer NAFLD eine positive Korrelation zwischen p53 und Lebersteatose beobachtet. In einer Studie zeigte sich, dass bei Lebersteatose die Expression von p53 erhöht war, während die antagonistischen Proteine Bcl-2 und Bax vermindert exprimiert wurden (Panasiuk et al. 2006). Auch TAp63 führt bei Überexpression zu Steatose: In Mäusen induzierte die Aktivierung von p63 eine Lipidakkumulation, während eine Herunterregulierung die Lebersteatose abschwächte. Die p63/IKK β /ER-Achse scheint hier eine Rolle zu spielen (Porteiro et al. 2017). Es konnte auch gezeigt werden, dass auf abnorm gesteigerte p53 Spiegel eine Induktion der microRNA-34a folgt. MicroRNA-34a führt in der Folge zu einer Reduktion von Sirt1, das normalerweise der Bildung von Fettsäuren und der Verfettung entgegensteht (Charni et al. 2014). Somit fungiert die p53-Familie nicht ausschließlich als Tumorsuppressor, sondern kann auch selbst über Leberverfettung zur Entstehung eines HCC beitragen.

1.4.6. Die Rolle der p53 Familie im HCC

In vielen Tumoren ist der Funktionsverlust von p53 ein zentraler Schritt der Pathogenese. Die Bedeutung von p53 wird durch die Tatsache betont, dass p53 das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren ist, nämlich in 50 % der Fälle. In 20 % der Fälle ist es funktionell inaktiv (Kunst et al. 2016). So verwundert es nicht, dass auch im HCC Mutationen in der p53-Familie und darauffolgende Funktionsverluste für die Entstehung und Entwicklung

entscheidend sind. Mit verminderten Spiegeln an funktionellem p53 sinkt zusätzlich das Ansprechen der HCC-Zelllinien auf Chemotherapeutika, wie beispielsweise auf Bleomycin (Müller et al. 1997). p53 ist in über 50 % der Aflatoxin B₁ induzierten und in 45 % der HBV assoziierten HCCs mutiert, wobei sich bei ersterem die häufigste Mutation findet, eine Punktmutation in Codon 249 (Shiraha et al. 2013). Diese Mutation kann bereits in frühen Tumorstadien detektiert werden und gilt als treibende Kraft der p53-induzierten HCC-Genese (Charni et al. 2014). Zu 95 % sind die Mutationen in der DBD lokalisiert, wodurch die Bindungsaffinität herabgesetzt und damit die Expression von Zielgenen reduziert wird. In 93,6% der Fälle handelt es sich dabei um Punktmutationen (Meng et al. 2014; Vousden und Lu 2002). Sechs *TP53* Codons zeigen eine enorm gesteigerte Mutationsrate: Allein 28 % der Mutationen findet man in den Codons 175, 245, 248, 249, 273 und 282. Da bei Punktmutationen nur eine einzige Aminosäure verändert wird und es nicht, wie häufig bei anderen Tumorsuppressorgenen, zu Frameshift-Mutationen oder Deletionen kommt, behalten die Tumorzellen meistens die Fähigkeit bei, das mutierte p53-Protein zu exprimieren. Dies ist oft stabiler als der Wildtyp (WT) und liegt in Tumorzellen in sehr hohen Mengen vor (Vousden und Lu 2002). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Mutante als dominant-negativer Inhibitor der WT-Form agiert (DiGiammarino et al. 2002). Viele Tumoren mit Punktmutationen in p53 zeigen zusätzlich einen Verlust der Heterozygotie und löschen somit das WT-Allel effektiv aus (Greenblatt et al. 1994). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die dominant negative Inhibition nicht ausreichend ist und die malignen Zellen einen zusätzlichen Kompensationsmechanismus benutzen.

Mutationen können nicht nur p53 selbst betreffen, sondern auch seine Aktivatoren und seine Zielgene. Diese Mutationen treten besonders in frühen Phasen der Tumorentwicklung auf und/oder in Tumoren, die noch das p53-WT-Allel exprimieren. So findet man hier Störungen der MDM2-p53 Regulationsschleife und des MDM2 Inhibitors ARF (Vousden 2002; Damalas et al. 2001). In manchen Tumoren sind auch Komponenten der Caspase-Kaskade wie Caspase-9 oder APAF-1 betroffen, welche für die p53-vermittelte Apoptose wichtig sind (Vousden und Lu 2002).

Die funktionelle Beeinflussung von p63 und p73 erfolgt weniger über Mutationen, sondern vermehrt über die Expression von Δ N-Isoformen (Rozenberg et al. 2021). Die erhöhte Produktion transkriptionell inaktiver Δ N-Isoformen ist im HCC mit einer reduzierten Apoptose, Chemosensitivität, sowie einer schlechten Prognose assoziiert (Müller et al. 2005; González et al. 2017). In genetisch modifizierten Mäusen führte eine erhöhte Δ Np73-Induktion zur

Entwicklung eines HCC, im Gewebe von HCC Patienten konnten erhöhte Mengen der Δ Np73-Isoform nachgewiesen werden. Zusätzlich sank mit zunehmender Δ Np73-Expression die Überlebensrate, möglicherweise durch erhöhte Chemoresistenzen, welche auf einer Inhibition von pro-apoptotischen Signalen beruhen (González et al. 2017; Tannapfel et al. 2008). Für Δ Np63 ist eine gleichartige Funktion bekannt (Mundt et al. 2010). Volllängen-p63 hingegen sensibilisiert Tumorzellen für Apoptose durch die Induktion sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptose-Signalwegs (Gressner et al. 2005).

Ein entscheidendes Ziel bei der Entwicklung neuer Ansätze zur Therapie des HCC muss daher die Wiederherstellung der WT-Funktionen von p53 sein. So konnte bereits gezeigt werden, dass die gleichzeitige Injektion von p53-kodierendem rekombinantem Adenovirus mit einer TACE zu verbessertem Gesamtüberleben führte (Shen et al. 2015). Auch die p53/MDM2-Achse ist Ziel von Therapien. So führen Nutlins, eine Familie von cis-Imidazolin-Analoga, zur Inhibition von MDM2 und somit zu einer Akkumulation und Stabilisierung von p53 (Vassilev et al. 2004). Diese Moleküle sind zudem in der Lage, eine Apoptosereaktion über p73 zu vermitteln (Lau et al. 2008). Auch das Enzym RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis) bindet an p53 und löst somit Konformationsänderungen aus, was die MDM2-Interaktion erschwert. Es ist auch möglich, über HLI98-Moleküle die E2-Ligase-Aktivität von MDM2 direkt zu blockieren (Yang et al. 2005).

Ein weiterer wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt sind die sogenannten „small molecules“. Einige von ihnen sind in der Lage, die WT-p53-Funktion wiederherzustellen (Pflaum et al. 2014). So sind PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) und MIRA-1 (mutant p53 reactivation and induction of rapid apoptosis) in der Lage, die ursprüngliche, mutierte DBD wiederherzustellen, mutiertes p53 neu zu falten und die Expression von Zielgenen zu verstärken (Kunst et al. 2016).

1.5. IGF-Familie

1.5.1. Einleitung

Der Einfluss von p53 auf Apoptose, Chemosensitivität und Prognose im HCC wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits detailliert beschrieben (Müller et al. 2006; Seitz et al. 2010; Mundt et al. 2010). Die Erstellung von p53-Zielgenexpressionsprofilen führte dazu, dass wir in unserer Arbeitsgruppe eine umfassende HCC-Gensignatur erstellen konnten (A. Pelc 2015). Anhand dieser Gensignatur ist es möglich, zwei primär heterogene HCC-Kohorten mit

beispielsweise unterschiedlichen Prognosen zu differenzieren. Für 7 dieser identifizierten Gene konnte durch eine weitere Arbeit eine Regulation auf qPCR-Ebene bestätigt werden (Kerkeni SS 2013). Zu diesen sieben Genen zählt unter anderem *IGFBP2*. Weiterführend konnte anhand der Riley-Kriterien (Riley et al. 2008) von unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt werden, dass *IGFBP2* ein neues Zielgen der p53-Familie und insbesondere von p73 ist (Gschwind 2021). *IGFBP2* gehört zur sogenannten Insulin-like growth factor- (IGF)-Familie. Das IGF-System spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung von Homöostase und Metabolismus, Proliferation und Apoptose. Es besteht aus mehreren Komponenten, welche in einem steten Wechselspiel miteinander stehen (Abbildung 5).

1957 wurde von Salmon und Daughaday ein Serumfaktor entdeckt, welcher das Knorpelwachstum bei Ratten beeinflusst (Salmon und Daughaday 1957). Zunächst bekam dieser den Namen Sulfatfaktor, dann Somatomedin C und letztlich seinen heutigen Namen IGF-1 (van den Brande 1999; Daughaday et al. 1972). Zu Beginn der 70er Jahre konnte in Zellkulturen mit Material aus Hühnerembryos eine autogene Stimulation der Zellen zur Teilung beschrieben werden (Pierson und Temin 1972). So folgte 1986 der Begriff „insulin-like-growth factor“ (IGF), um seine proliferativen Eigenschaften und seine Verbindungen zu Insulin zu betonen.

1.5.2. Das IGF-System

Das IGF-System hat nicht nur Einfluss auf Wachstum und Differenzierung von Zellen, metabolische Prozesse und Proliferation, sondern spielt auch eine Rolle bei der Entwicklung von Organen wie den Nieren (Bach und Hale 2015). Es besteht aus mehreren Komponenten: IGF-I und -II, den beiden membranständigen Rezeptoren IGF-IR und IGF-IIR, den IGF-Bindeproteinen (IGFBP 1-6), den IGFBP-Proteasen (IGFBP-Pr) und den IGFBP-verwandten Proteinen (IGFBP-rP). Für einen generellen Überblick über das IGF-System siehe Abbildung 5.

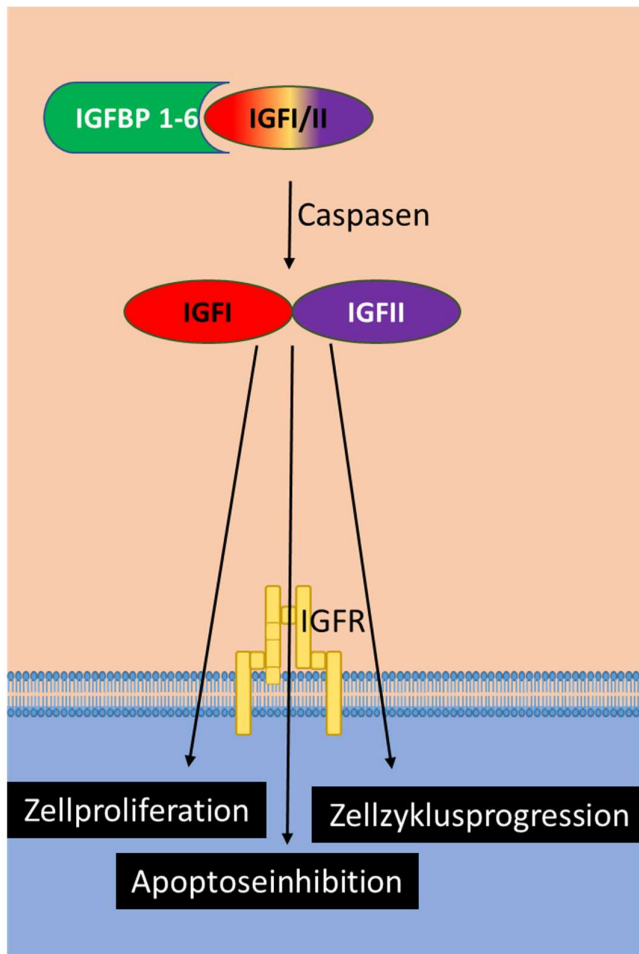


Abbildung 5: Überblick über die Komponenten des IGF-Systems. Die IGFBPs 1-6 stabilisieren die IGFs und transportieren sie im Blutkreislauf. Durch Caspasen werden sie von den IGFs -I und -II abgespalten. Die IGFs selbst vermitteln ihre Funktionen vor allem über die membranständigen Rezeptoren, die IGF-Rezeptoren (IGF-R).

1.5.3. IGF-I und -II

IGF-I und -II sind proinsulin-ähnliche Peptidhormone mit einer Länge von 70 bzw. 67 Aminosäuren, die endokrin, parakrin und autokrin sezerniert werden und zu den Wachstumshormonen zählen (Stewart und Rotwein 1996). Sie sind zu ca. 80 % identisch, ihre A- und B-Domänen sind zu 50 % identisch mit denen des Insulins (Rinderknecht und Humbel 1978). Sie werden in den meisten Geweben produziert, die Einflüsse auf das Wachstum werden jedoch hauptsächlich über die Produktion von IGF-I in der Leber vermittelt. Während IGF-I *in utero* eine große Rolle spielt, wird IGF-II erst postnatal in großen Mengen exprimiert. Beide Hormone besitzen eine wachstumsfördernde Wirkung und dienen den Zellen zusätzlich zur Kommunikation. Ihre spezifische Wirkung hängt von der Verfügbarkeit an freiem IGF ab, welche wiederum von Produktion, Abbau sowie Kopplung an die IGFBPs beeinflusst wird.

Letztere regulieren die Bioverfügbarkeit der IGFs (siehe Kapitel 1.5.5). Während das Growth-Hormon (GH) IGF-I stark beeinflusst, zeigt sich IGF-II davon unabhängig (Russo et al. 2015).

1.5.4. IGF-IR und -IIR

Bisher wurden drei Insulinrezeptoren identifiziert: Die klassischen Insulinrezeptoren, IGF-IR und IGF-IIR. Die Wirkungen von IGF-I und IGF-II werden hauptsächlich durch den IGF-IR vermittelt. Der IGF-IR ist ein $\alpha 2\beta 2$ -Transmembran-Glykoprotein und eine heterotetramere Tyrosinkinase, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Insulinrezeptor aufweist. IGF-I zeigt eine etwa zehnmal höhere Bindungsaffinität zum IGF-IR im Vergleich zu IGF II und eine etwa 500-fach höhere Affinität im Vergleich zu Insulin. IGF-II vermittelt seine insulinähnlichen Effekte über den IGF-IR und den Insulinrezeptor. Der IGF-IIR hingegen besteht nur aus einer Einheit und ist auch unter dem Namen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bekannt. Die Funktion des IGF-IIR bei Wachstumsaktivitäten ist bisher unklar (Russo et al. 2015; (Kornfeld 1992). Er ist besonders zu Beginn der Nephrogenese hochreguliert (van Duong Huyen et al. 2003).

1.5.5. IGFBPs

Die Plasmalevel der IGFs hängen nicht nur von der Bindung an Rezeptoren ab, sondern werden hauptsächlich über die Expression von IGFBPs reguliert. IGFBPs sind eine Proteinfamilie, die in vielen Geweben gebildet wird. Diese Proteine binden an IGFs und verlängern dadurch deren Halbwertszeit, was bedeutet, dass sie die IGFs länger im Blutkreislauf zirkulieren lassen und so eine Art Speicherfunktion erfüllen. Die Bindung von IGFs an IGFBPs kann durch posttranskriptionelle Modifikationen, wie Phosphorylierung oder Proteolyse, beeinflusst werden. Durch die Steuerung der IGF-I/II Level kann somit sowohl eine stimulierende als auch eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation ausgeübt werden (Baxter 2000). Mehr als 95 % der IGFs liegen an IGFBPs gebunden vor (Beattie et al. 2006), davon alleine 75 % an IGFBP3 und 10 % an IGFBP5. Sie bilden hauptsächlich trimere Komplexe mit der Säurelabile-Subunit (ALS) und einem IGF, können aber auch als Dimere oder in freier Form vorliegen. Dennoch sind 90 % des IGFBP3 und 55 % des IGFBP5 an IGFs gebunden (Firth und Baxter 2002; Twigg und Baxter 1998). Es gibt die These, dass freies und in Zweifachkomplexen vorliegendes IGFBP die Blutbahn gut verlassen kann, wohingegen Dreifachkomplexe das Blut nicht verlassen können. Alle IGFBPs weisen eine hochkonservierte Struktur auf, bestehend aus drei Domänen, einer konservierten aminoterminalen Domäne mit sechs und einer konservierten carboxyterminalen Domäne mit drei Disulfidbrücken. Sie weisen Homologien von 50 % bis 80 % auf. Die beiden terminalen Domänen werden durch eine zentrale Domäne miteinander

verbunden, die für Modifikationen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung verantwortlich ist und den funktionellen Unterschied zwischen den jeweiligen IGFBPs ausmacht. Während IGFBP1, 3 und 4 an die beiden Rezeptoren IGF-IR und -2R mit ähnlicher Affinität binden, haben IGFBP2, 5 und 6 eine höhere Affinität zum Rezeptor IGFII-R (Shimasaki und Ling 1991; Russo et al. 2015). Abseits der IGF Regulation vermitteln IGFBPs und ihre proteolytischen Fragmente auch über eigene Rezeptoren direkte Effekte und werden selbst über Proteasen reguliert (siehe 1.5.6). So hat IGFBP3 beispielsweise Einfluss auf die Apoptose und IGFBP5 auf die Mitose in Osteoblasten (Firth und Baxter 2002; Andress und Birnbaum 1992).

Voruntersuchungen unserer Forschungsgruppe deuten darauf hin, dass der Status von IGFBP2 und IGFBP4 im HCC von allen drei Mitgliedern der p53-Familie beeinflusst wird, insbesondere aber durch Tap73 (Gschwind 2021).

1.5.6. IGFBP-related Proteins und Proteasen

Bisher wurden mehrere Proteasen entdeckt, welche IGFBPs modifizieren können (IGFBP-Pr). Sie wurden erstmals in Schwangerschaftsserum entdeckt und weisen proteolytische Aktivitäten gegenüber IGFBP3 auf. Man findet sie in verschiedenen Körperflüssigkeiten. Sie regulieren die Spiegel der IGFBPs und somit auch der IGFs. Es handelt sich dabei um Proteasen aus den Familien der Kallikreine, Cathepsine sowie Matrix-Metalloproteinasen (Rajah et al. 1995). Im Serum führt die Proteolyse von IGFBP3, an das am häufigsten IGF gebunden ist, zur Freisetzung von IGF-I und ermöglicht somit den Transport in den extravaskulären Raum (P. Collett-Solberg und P. Cohen 1996).

Die IGFBP-related Proteins (IGFBP-rP) weisen Ähnlichkeiten in ihrer N-terminalen Domäne mit den IGFBPs auf. Ihre Affinität zu den IGFs ist jedoch um ein Vielfaches geringer. Es wurden bisher 10 Proteine beschrieben. Sie werden auch als IGFBP-Superfamilie bezeichnet (Bailes und Soloviev 2021).

1.6. TIGAR

Je nach Art der Zellschädigung muss p53 unterscheiden können, ob die Induktion eines Zellzyklusarrests ausreichend ist, oder ob Apoptose eingeleitet wird. Damit diese Mechanismen unabhängig voneinander reguliert werden können, liegt es nahe, dass verschiedene Zielgene auf verschiedenen Wegen aktiviert werden. So wurde entdeckt, dass p53 bei dieser

Unterscheidung möglicherweise auch die Level von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reguliert (Macip et al. 2003). P53 kann in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor viele Gene aktivieren, die in einer ROS-Steigerung resultieren und somit zu Apoptose führen (Johnson et al. 1996) oder sogar durch ROS in einer Feedbackschleife selbst aktiviert werden (Martindale und Holbrook 2002). Es wurde gezeigt, dass die p53-Aktivität auch in die andere Richtung wirken kann: Bei geringen Stressdosen kann p53 Zielgene aktivieren, die die ROS-Level senken und somit die Zelle vor DANN-Schäden schützen (Sablina et al. 2005).

Über diesen Mechanismus identifizierten Bensaad et al. 2006 TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator), ein Protein, das die Glykolyse in der Zelle beeinflusst und somit die ROS-Level verringern kann. TIGAR kann auch die Sensitivität von p53 auf ROS-Signale reduzieren. Das *TIGAR*-Gen liegt auf Chromosom 12 und besitzt sechs Exons sowie zwei Bindestellen für p53. TIGAR zeigt funktionelle Ähnlichkeiten zur Bisphosphataseregion des bifunktionellen Enzyms 6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2). Dieses Enzym katalysiert die Synthese und den Abbau von Fruktose-2,6-Bisphosphat, einem Produkt der Glykolyse (Bensaad et al. 2006). Dadurch kommt es zu einer Hochregulation der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), einer Hemmung der Glykolyse und einem Shift in Richtung Pentosephosphatzyklus. Dies führt zur Produktion von Ribose-5-Phosphat (R5P) und NADPH, die für die DANN-Reparatur entscheidend sind (Abbildung 6). Somit stellt TIGAR wichtige Bausteine für Reparaturmechanismen zur Verfügung (Yu et al. 2015).

TIGAR findet sich normalerweise im Zytoplasma. Unter hypoxischen Stoffwechselsituationen wird TIGAR abhängig vom hypoxia-inducible-factor 1a in die äußere Mitochondrienmembran verlagert. Dort bindet es an die Hexokinase 2 (HK2) und steigert deren Aktivität, wodurch es zu Änderungen am mitochondrialen Membranpotential und somit verringerten Leveln an ROS kommt (Abbildung 6). Diese Funktion war auch bei mutierten Isoformen der HK2 möglich, was zeigt, dass diese Funktion von der Bisphosphatase-Funktion unabhängig ist (Cheung et al. 2012). Über die Unterdrückung des ROS-Signalwegs kann TIGAR auch die Autophagie, eine besondere Form des Zelltodes, beeinflussen und unterdrücken (Bensaad et al. 2009). In Zellen, die noch nicht irreparabel geschädigt sind, wird TIGAR p53-abhängig induziert und führt zu einer Dephosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (RB), wodurch der RB-E2F1-Komplex inhibiert wird und die Zelle in der G1-Phase arretiert wird. Dies gibt der Zelle zusätzliche Zeit, Reparaturen durchzuführen, beziehungsweise kann die Proliferation von Tumorzellen erschweren (Madan et al. 2012).

Abgesehen von p53 gibt es weitere Faktoren, die zu einer Induktion von TIGAR führen können. Unter anderem können das CRE-binding (CREB) Protein und der Transkriptionsfaktor SP1 an den Promotoren von TIGAR binden und dessen Expression regulieren (Zou et al. 2012; Zou et al. 2013).

Ein umfassendes molekulares Verständnis dieser Prozesse bietet die Möglichkeit, neue Therapeutika zu entwickeln, die das Fortschreiten von Tumorerkrankungen beeinflussen können.

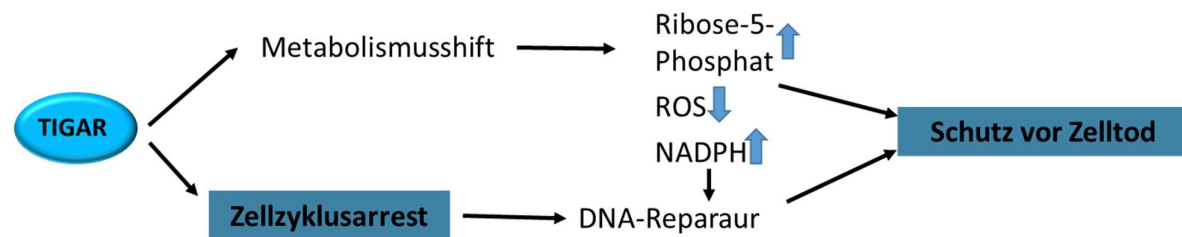


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionen von TIGAR

1.7. Zielsetzung

Unsere Forschungsgruppe hat den Zusammenhang zwischen dem Status der p53-Familie, dem Zelltod sowie dem Therapieansprechen beim HCC beschrieben (Müller et al. 2006; Seitz et al. 2010; Mundt et al. 2010; Kunst et al. 2016). Die p53-Familie hat ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den Stoffwechsel von Tumorzellen. Diese zeigen häufig eine veränderte Stoffwechselaktivität, die sich in einer Verschiebung vom aeroben Stoffwechsel zur Glykolyse und einer gesteigerten Zellproliferation äußert. Ein Signalweg, der für die verstärkte Zellproliferation und die Regulation des Stoffwechsels verantwortlich ist, ist der IGF-Signalweg, der durch IGFBPs reguliert wird.

Der IGF-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Zellproliferation und Apoptoseresistenz. Er wird durch die Bindung von IGFs an die IGF-Rezeptoren aktiviert, was wiederum eine Signalkaskade auslöst, die unter anderem die PI3K/AKT- und die MAPK/ERK-Signalwege aktiviert. Diese Signalwege fördern das Zellwachstum und die Zellproliferation und hemmen gleichzeitig die Apoptose. Der AKT/PI3K-Signalweg aktiviert dabei mTOR, was zu einer Anpassung des Zellmetabolismus führt, durch den die Glykolyse reduziert und die Synthese von Fettsäuren gesteigert wird (Okuyama et al. 2021; Gülow et al. 2023; Haidurov und Budanov 2020). IGFBP2 spielt in diesem Kontext eine wichtige Rolle als Regulator des IGF-Signalwegs, da es das IGF-Signaling inhibieren kann. Unsere bisherigen Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass IGFBP2 ein potenzielles Zielgen der p53-Familie ist.

Ein weiterer wesentlicher Regulator des Stoffwechsels und der Zellproliferation, TIGAR (*TP53*-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator), ist ebenfalls ein Zielgen von p53 (Bensaad et al. 2006; Madan et al. 2012). TIGAR reduziert den Fruktose-2,6-bisphosphat-Spiegel in der Zelle, was zu einer Hemmung der Glykolyse und einer Förderung des Pentosephosphatzyklus führt. Dadurch werden antioxidative Kapazitäten der Zelle erhöht, was zu einer Verringerung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und einem Schutz vor oxidativem Stress führt (Bensaad et al. 2006; Madan et al. 2012). Nach der Aktivierung von TIGAR kommt es zu einer Umstellung des Stoffwechsels, wodurch die Zellproliferation verlangsamt und Zeit für essenzielle Reparaturprozesse, wie die DANN-Reparatur, gewonnen wird, um eine Anhäufung von Mutationen zu verhindern.

Eine fehlerhafte Regulation der IGF- und TIGAR-Signalwege führt zu einer gesteigerten Zellzyklusprogression und hemmt die Apoptose, was eine wichtige Rolle bei der Förderung von Tumorwachstum und Tumorentstehung spielt. Dies hat aus klinischer Sicht eine große Bedeutung, da ein besseres Verständnis der molekularen Regulation von TIGAR und IGFBP2 die Möglichkeit bietet, in diese Signalwege einzugreifen und neue Therapeutika zu entwickeln und somit Einfluss auf das Entstehen und Fortschreiten einer Tumorerkrankung zu nehmen.

Um die regulatorischen Mechanismen, die IGFBP2 und TIGAR beeinflussen, besser zu verstehen, sollten folgende Aufgabenstellungen untersucht werden:

1. Untersuchungen zum Einfluss der p53-Familie auf die Regulation von IGFBP2 in HCC-Zellen:

- Analyse der Mechanismen, durch die die p53-Familie die mRNA-Expression von *IGFBP2* reguliert.
- Untersuchungen des Einflusses der p53-Familie auf die IGFBP2 Proteinsynthese.
- Analyse des Einflusses der p53-Familie auf die Sekretion von IGFBP2.

2. Analysen zum Einfluss der p53-Familie auf die Regulation von TIGAR in HCC-Zellen:

- Analyse der Mechanismen, durch die die p53-Familie die mRNA-Expression von *TIGAR* reguliert.
- Untersuchungen des Einflusses der p53-Familie auf die TIGAR Proteinsynthese.

3. Überprüfung, ob IGFBP2 und TIGAR abhängig/unabhängig voneinander reguliert werden:

- Untersuchungen zu den Effekten einer *IGFBP2*-Induktion auf die TIGAR-Proteinsynthese.
- Analysen, inwieweit eine *TIGAR*-Induktion die IGFBP2-Proteinexpression beeinflusst.

4. Analyse des Einflusses von TIGAR und IGFBP2 auf Zelltod und Apoptose:

- Untersuchungen, ob TIGAR und IGFBP2 die Apoptosesensitivität der Zellen beeinflussen.

5. Untersuchung der Wirkung von p53-induzierenden Chemotherapeutika auf die Expression von IGFBP2 und TIGAR

- Analyse verschiedener Chemotherapeutika, die die p53-Familie aktivieren, und deren Einfluss auf die Expression von IGFBP2 und TIGAR.

Die Untersuchung dieser Hypothesen wird dazu beitragen, unser Verständnis für die Rolle der p53-Familie und ihrer Zielgene im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel und der Proliferation von Tumorzellen zu vertiefen, um potenzielle neue therapeutische Ansätze zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Beschreibung	Hersteller
Analysenwaage Excellence XA 105 Dual Range	Mettler Toledo, Deutschland
BB6220 Inkubator	Heraeus, Deutschland
Inkubator	Heraeus, Deutschland
Inkubator	BINDER GmbH
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Costar® Stripette 5 ml, 10 ml, 50 ml	Corning, USA
Durchflusszytometer BD LSR Fortessa	BD Bioscience, USA
Elektrophorese Netzgerät EV261	Consort bvba, Belgien
Elektroporation Küvetten	peQlab, Deutschland
EMax plus Mikrotiterplatten Lesegerät	Molecular Devices, USA
EM-dispenser	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland
Eppendorf Easypet®	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Gefäße 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Deutschland
Erlenmeyerkolben 250 ml	Corning, USA
Falcon® Filter 40µm, 70µm	Corning, USA
Falcon® Gefäße 15 ml, 50 ml	Corning, USA
Gene Pulser® II	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Gene Pulser® II RF Module	Bio-Rad Laboratories Inc, USA

Grade Whatman 3MM Chr Blottingpapier	GE Healthcare, USA
Kanülen (20G)	BD Microlance™, Deutschland
Laborwaage	Satorius Laboratory, Deutschland
Light Cycler® 480 384 well Platte	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Light Cycler® 480 Siegelfolie	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Light Cycler® 480 System	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Magnetrührgerät, IKA RH Basic 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikroskop CK2	Olympus Deutschland GmbH, Deutschland
Magnetrührgerät MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Multigel Elektrophoresekammer	Biometra GmbH, Deutschland
Nanophotometer Implen	Implen GmbH, Deutschland
PARAFILM "M"®	Pechiney Plastic Packaging Inc., USA
PCR Gefäße	Kisker Biotech, Deutschland
Pipetman	Gilson, USA
Pulse Controller Plus	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, USA
Wasseraufbereitungsanlage MILLI-Q Q-Pod	Merck Millipore, USA
Schüttelgerät MTS2/4 digital	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Schüttelgerät IKAR KS 260 Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Sterilbank Laminair HB2448	Heraeus, Deutschland
T3 Thermoblock	Biometra GmbH, Deutschland
TC20™ Zählkammer	Bio-Rad Laboratories Inc, USA

TE77XP Semi-Dry Transfer Unit	Hoefer Inc., USA
Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf AG, Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Deutschland
Tischzentrifuge myFUGE™ Mini	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Vortexer Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland
Zählkammern für TC20TM	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Corning, USA
Zellkulturschalen	Sarstedt AG und Co., Deutschland
Zellschaber 2-Posit. Klinge 25	Sarstedt AG und Co., Deutschland
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5425	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5430R	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 16 R	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Pico 17	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Sorvall RC 6 Plus	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Beschreibung	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	BioLegend, USA
Annexin-V	BioLegend, USA
Annexin binding buffer	BD Biosciences, Heidelberg
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma-Aldrich, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	PanReac AppliChem, Deutschland
cOmplete™ Ultra, Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
DNase	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's PBS + MgCl ₂ + CaCl ₂	Sigma-Aldrich, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio&Sell, Deutschland
Gradientengel (4-20 %)	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Luria Broth (LB) Agar	Carl Roth GmbH +Co. KG, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH +Co. KG, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH +Co. KG, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH +Co. KG, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH +Co. KG, Deutschland
Opti-MEM Medium	Thermo Fisher Scientific, USA
p-Coumarin-Säure	Sigma-Aldrich, USA
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA

QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Niederlande
QuantiTect Reverse Transkription (RT) Kit	Qiagen, Niederlande
ReBlot Plus Strong Stripping Lösung (10x)	Merck Millipore, USA
RLT Lysepuffer	Qiagen, Niederlande
RNase	Sigma-Aldrich, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Niederlande
Tris	Carl Roth GmbH +Co. KG, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich, USA
Regorafenib	Selleckchem, USA
Panobinostat	Selleckchem, USA
Doxorubicin	Selleckchem, USA
Bleomycin	Target Mol, USA
Sorafenib	Target Mol, USA
zVAD-fmk	Selleckchem, USA

2.1.3. Antikörper

Blockier-Lösung:

5 % Milch oder 5 % BSA in PBS (=phosphate buffered saline)

Die Western Blot Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern in Blockierlösung inkubiert (siehe Tabelle 1). Die Verdünnung des jeweiligen Sekundärantikörpers erfolgte in der gleichen Blockierlösung wie die des Primärantikörpers.

Antigen	ID	Verdünnung	Hersteller	Blocklösung	Stamm
TP53	sc126	1/1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Milch	Kaninchen
TP73	ab40658	1/1000	Cell Signaling Technology	BSA	Kaninchen
TIGAR	14751	1/1000	Cell Signaling Technology	Milch	Kaninchen
IGFBP2	ab109284	1/1000	abcam	BSA	Kaninchen
β-Aktin	A3854	1/1000	Sigma Aldrich	Milch	
Caspase 3	9662S	1/1000	Cell Signaling Technology	Milch	Kaninchen
Caspase 8	9746	1/1000	Cell Signaling Technology	BSA	Maus
Caspase 9	9508	1/1000	Cell Signaling Technology	Milch	Maus
PARP	95422	1/1000	Cell Signaling Technology	Milch	Kaninchen
Maus	A9044	1/10000	Sigma Aldrich	entsprechend Primär-AK	
Kaninchen	A0545	1/10000	Sigma Aldrich	entsprechend Primär-AK	

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für Proteindetektion

2.1.4. RTq-PCR Primer

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden Primer der Firma Metabion (Metabion International AG, Deutschland) verwendet (siehe Tabelle 2). Es wurde eine Endkonzentration von 1µM eingesetzt.

Antigen	Spezies	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
TP53	Mensch	AGGCCTTGGAACCTCAAGGAT	TTATGGCGGGAGGTAGACTG
TP73	Mensch	CAGACAGCACCTACTTCGACCT	CCGCCCACCACCTCATTATTCC
TIGAR	Mensch	TTCGCTCTGACTGTTGTCCG	CAGCTCACTTAGCGCTTTGC
IGFBP2	Mensch	GGCGAGGGCACTTGTGAGAA	CAGTGACCTTCTCCCGGAAC
GAPDH	Mensch	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	GCTGGTCCAGGGGTCTTACT
β2M	Mensch	CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT	CCAATCCAAATGCGGCATCTTCA

Tabelle 2: Verwendete Primer für die RTqPCR

2.1.5. Plasmide

Zur Elektrottransformation der *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterien wurden pcDNA3. 1⁺/C-(K)DYK Plasmide mit CMV Promotor verwendet (siehe Tabelle 3 und Abbildung 7).

Plasmid	Beschreibung	Hersteller	ID
pcDNA3. 1 ⁺ /C-(K)DYK	Expressionsvektor für <i>TIGAR</i> , mit Neomycin (G418) Resistenz	GenScript, USA	Ohu19289D
pcDNA3. 1 ⁺ /C-(K)DYK	Expressionsvektor für <i>IGFBP2</i> , mit Neomycin (G418) Resistenz	GenScript, USA	Ohu15703D
pcDNA3. 1 ⁺ /C-(K)DYK	Kontrollexpressionvektor mit Neomycin (G418) Resistenz	GenScript, USA	ID fehlt

Tabelle 3: Expressionsplasmide zur Elektrottransformation

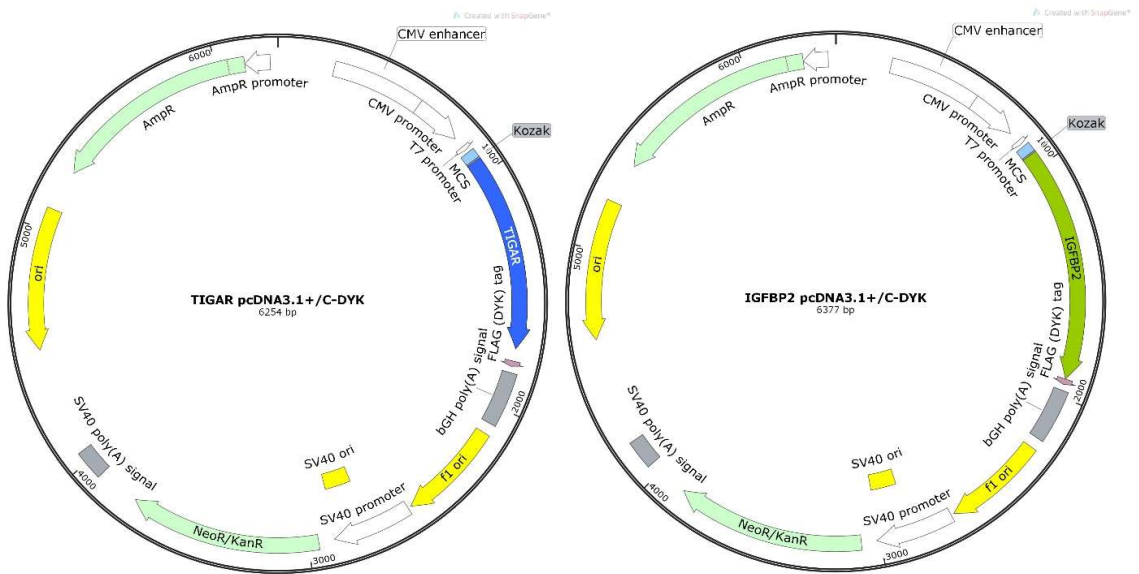


Abbildung 7: Expressionsvektoren für *TIGAR* (links) und *IGFBP2* (rechts)

2.1.6. Software

Name	Entwickler
Flowlogic™	Flowlogic™, Australia
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
LightCycler® 480 Version 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Microsoft Excel 2016, Power Point, Word	Microsoft, USA
SoftMax Pro 7	Molecular Devices, USA

2.1.7. siRNAs

Einflüsse von TIGAR und IGFBP2 wurden unter anderem anhand eines siRNA-vermittelten knock-downs untersucht. Die verwendeten siRNAs sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Reagenz	Hersteller	ID	Endkonzentration
ON-TARGETplus siRNA Non-Targeting Pool	Dharmacon™	D-001810-10-05	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human C12orf5 (1)	Dharmacon™	Cat#J-020597-09-0020	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human C12orf5 (2)	Dharmacon™	Cat#J-020597-10-0020	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human C12orf5 (3)	Dharmacon™	Cat#J-020597-11-0020	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human C12orf5 (4)	Dharmacon™	Cat#J-020597-12-0020	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human IGFBP2 (1)	Dharmacon™	Cat#J-010896-10-0020	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human IGFBP2 (2)	Dharmacon™	Cat#J-010896-11-0020	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human IGFBP2 (3)	Dharmacon™	Cat#J-010896-12-0020	10µM
ON-TARGETplus siRNA Human IGFBP2 (4)	Dharmacon™	Cat#J-010896-13-0020	10µM

Tabelle 4: Verwendete siRNAs

2.1.8. Adenovirale Konstrukte

Zur Induktion von p53-Proteinen wurden rekombinante adenovirale (rAd) Vektoren verwendet, die von der Arbeitsgruppe von Frau Professor Müller-Schilling in Heidelberg hergestellt wurden. Die Vektoren kodieren für mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) gekoppeltes humanes p53-Wildtyp (rAd-p53-GFP), p73 Wildtyp (rAd-p73-GFP) oder für GFP alleine. Die GFP-Transduktion diente als Kontrolle. Allen Konstrukten gemein ist der Cytomegalievirus (CMV)-immediate early gene-Promotor.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Herstellen einer *E. coli* Übernachtskultur

Zur Herstellung einer *E. coli* Übernachtskultur wurden Glycerin-Stammkulturen 1/1000 in LB-Medium verdünnt und unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.2. Bestimmung der Bakterienzahl mittels optischer Dichte (OD)₆₀₀

Zur Etablierung einer Wachstumskurve und der Bestimmung der Bakterienzahl wurde die OD₆₀₀ der Bakterienkultur mit einer 1/8 – 1/16 Verdünnung in LB-Medium gemessen.

2.2.1.3. Herstellung elektrokompenter *E.coli* Bakterien

Zur Elektrotransformation der *E. coli* Stämme mit den Plasmiden wurden elektrokompente Bakterien hergestellt. LB-Medium wurde mit einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und unter konstantem Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 300 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in Wasser resuspendiert und erneut bei 300 xg für 15 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 15 % Glycerin resuspendiert und erneut bei 300 xg für 15 min abzentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 1,5-fachem Volumen Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.4. Elektrotransformation von *E.coli* Bakterien

Elektrokompente Bakterien wurden in einer Elektroporationskuvette mit der jeweiligen Plasmid-DANN (0,012 µg) vermischt. Bei 2,5 µF und 2,5 kV erfolgte die Elektrotransformation. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h in LB-Medium kultiviert. Ein Teil der Bakterien wurde zusätzlich auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

2.2.1.5. Gewinnung von Plasmiden aus *E.coli* Bakterien

Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Cat. No. 12263) von Qiagen entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.1.6. Entwicklung eines Expressionsmodells für *IGFBP2* und *TIGAR*

Zur Entwicklung eines Expressionsmodells wurden HepG2-Zellen in 3 Gruppen aufgeteilt und mit Expressionsvektoren für *IGFBP2* und *TIGAR*, die eine Neomycinresistenz tragen, transduziert. Ein Kontrollexpressionsvektor mit Neomycinresistenz diente als Vergleich. Die Zellen wurden für 6 Wochen unter Selektionsdruck kultiviert, um eine Population von ausschließlich transduzierten Zellen zu erhalten.

2.2.1.7. Virale Transduktion mittels Adenoviren

Zur Induktion von GFP, p53 und p73 erfolgte eine Transduktion mit Adenoviren. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und ein frisches, mit adenoviralen Konstrukten angereichertes Medium hinzugegeben. Die Multiplizität der Infektion (= MOI) betrug 10. Die Zellen wurden mit den Viren für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe von 50 µg Gentamycin pro ml Medium. Mit diesem Protokoll wurden Transduktionsraten von ca. 90 % erreicht.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Isolierung von RNA

Nach den Herstellerangaben des Rneasy-Mini-Kits von Qiagen wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Zunächst wurde das Zellpellet in 600 µl eines β -Mercaptoethanol-haltigen Lysepuffers aufgenommen und resuspendiert. Daraufhin wurde das Lysat durch eine Silicagel-Säule zentrifugiert und in mehreren Waschschritten aufgereinigt. Zuletzt wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Der Reinheitsgrad des Eluats wurde anhand des Verhältnisses der Absorptionskoeffizienten A_{260}/A_{280} ermittelt.

2.2.2.2. Gewinnung von cDNA

Um aus dem RNA-Eluat cDNA zu gewinnen, wurde das Quanti-Tect RT-Kit der Firma Qiagen verwendet. Pro Probe wurden 1500 ng RNA für einen DNase-Verdau bei 42°C eingesetzt. Nach 2 min wurde die reverse Transkriptase mit dem zugehörigen Puffer und Primer-Mix hinzugegeben und für weitere 15 min bei 42°C inkubiert. Im vorletzten Schritt folgte eine 3-minütige Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95°C. Zuletzt wurde eine 3-fache

Verdünnung mit RNase-freiem Wasser durchgeführt und die erhaltene cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.2.3. Amplifikation der cDNA

Um die cDNA zu amplifizieren, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Der Pipettieransatz ist in Tabelle 5 aufgeführt. Gemessen wurde in technischen Triplikaten, dem Amplifikationsschema in Tabelle 6 folgend.

Komponenten	Volumen (Endkonzentration)
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5 µl (Stocklösung)
cDNA	1 µl (50 ng)
forward+reverse Primer (siehe Tabelle 2)	1 µl (1 µM)
RNase freies Wasser	Auf 10 µl aufgefüllt

Tabelle 5: Pipettieransatz zur Amplifikation von cDNA

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	8 min		
Amplifikation	95°C 62°C 72°C	1 s 15 s 22 s	40 Zyklen
Abkühlen		40°C	

Tabelle 6: PCR-Einstellungen zur Amplifikation von cDNA

2.2.2.4. ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Waschpuffer

1*PBS mit 0,05 % Tween-20

Stopplösung

1 M H₂SO₄

Um die ELISA-Analysen durchzuführen, wurde der Zellüberstand von Hep3B-Zellen geerntet. Die Analyse von sezerniertem IGFBP2 erfolgte entsprechend der Anweisungen des Herstellers mit dem BD DuoSet ELISA-Kit.

Beim ELISA Verfahren handelt es sich um ein Nachweisverfahren, das auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht. Die finale Detektion erfolgt durch eine enzymatisch gekoppelte Farbreaktion. Die Antigenkonzentration im Untersuchungsmaterial (Zellüberstand) wird anhand einer Standardkurve errechnet, welche durch die Messung definierter Konzentrationen des Zielgens erstellt wird (Abbildung 8).

Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm im Emax Plus Microplate Reader.

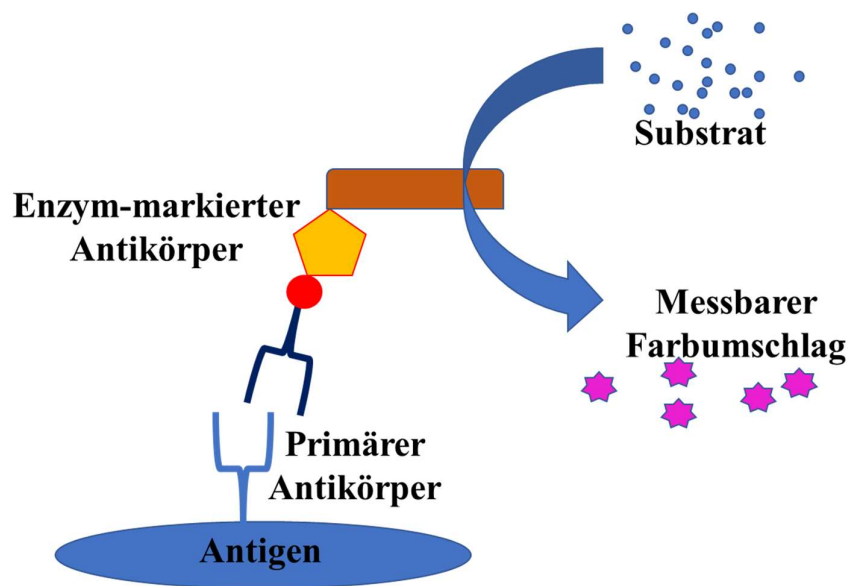


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des enzymgekoppelten ELISA-Nachweisverfahrens

2.2.3. Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.2.3.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Aufgetaut wurden die Zellen in einem 37°C temperierten Wasserbad. Die Zellen wurden daraufhin mit frischem Medium überschichtet und anschließend bei 300 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in frischem Medium (siehe 2.2.3.2) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Zum Wegfrieren wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und im entsprechenden Medium suspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei 300 xg zentrifugiert, ein Zellpellet entsprechend 1 Mio. Zellen in Einfriermedium (20 % FCS, 5 % DMSO mit dem entsprechenden Medium) suspendiert und in Stickstoff bei -196°C gelagert.

2.2.3.2. Kulturbedingungen

Hep3B-Zellen wurden in DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem (h.i.) fetalem Kälberserum (FCS) bei 37°C, 5 % Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. HepG2 Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS h.-i. unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden 2-mal die Woche passagiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem TC20™ Automated Cell counter.

2.2.3.3. siRNA Transfektion

Die siRNA Transfektionen wurden 3, 4 und 5 Tage nach Aussaat der Zellen in 10 cm² Schalen durchgeführt. Zunächst wurde die siRNA in siRNA-Puffer auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt. Dafür wurden 2,5 ml 5*siRNA Buffer mit 9,5 ml RNase freiem Wasser verdünnt, 1 ml auf die siRNA gegeben und 30 min vorsichtig geschüttelt. Für den knock-down von *IGFBP2* und *TIGAR* wurden jeweils 4 verschiedene siRNAs verwendet (Tabelle 4).

Je siRNA wurden 20 µl der Stocklösung mit 800 µl Opti-MEM und 14 µl Transfectin verdünnt. Dies ergab eine Endkonzentration der siRNA von 40 nM.

2.2.3.4. Zelltodanalysen mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Zelltodraten im FACS wurden die Zellen in 6-Well-Platten in einer Dichte von 100.000/Well ausgesät. Der Überstand der Zellen und die mit 1 ml Accutase abgelösten Zellen wurden in die entsprechenden auf Eis stehenden 15 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 4°C und 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen und daraufhin in 500 µl Annexin Binding Buffer gelöst. Die Zellen wurden nach Zugabe von 10 µl Annexin V und 5 µl DAPI (3 µM) für 10 min im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Filtrieren vereinzelt und am LSR Fortessa gemessen.

Annexin V ist ein Protein, das an Phosphatidylserin bindet. In lebenden Zellen ist Phosphatidylserin auf der inneren Seite der Zellmembran lokalisiert und daher für Annexin V nicht zugänglich. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin nach außen verlagert und kann dann von Annexin V gebunden werden. Daher ist Annexin V ein guter Marker für apoptotische Vorgänge. Im Gegensatz dazu ist DAPI ein Farbstoff, der an doppelsträngige DANN bindet. Dieser Farbstoff kann die Zellmembran nicht durchdringen. Daher dient DAPI als Marker für Nekrose und fortgeschrittene Stadien der Apoptose, da die Zellmembran in diesen Fällen bereits erhebliche Integritätsverluste aufweist. Das Messfeld am FACS wird in vier Quadranten (q1-4)

aufgeteilt. Q1 DAPI positiv, q2 DAPI und Annexin V doppelpositiv, q3 Annexin positiv, q4 doppelnegative Zellen (vitale Zellen).

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Herstellung von Proteinlysaten

Nach Ernte der Zellen wurden 30 % der Zellpellets in 350 µl RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 0,25 % Deoxycholsäure, 50 mM Tris pH 7,4, 1 % BP-40, 1 mM EDTA mit Phosphatase- und Proteaseinhibitoren) lysiert. Daraufhin wurde das Lysat 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 4°C bei 16000 xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Gesamtmenge des Proteins in der Probe zu ermitteln, wurde ein BCA Protein Assay durchgeführt (BCA Reagenz mit Kupfer(II)-Sulfat in einem 50:1 Verhältnis). Dieses Verfahren basiert auf einer photometrischen Messung. In wässriger, basischer Lösung kommt es zu einer Umsetzung von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch vorliegende Proteine. Dieses einwertige Kupfer bildet mit 2 Molekülen des BCA einen bei 562 nm detektierbaren Komplex. Die Proben wurden in einer 1/5 bis 1/20 Verdünnung in Duplikaten mit 200 µl BCA Reagenz vermischt und 3 min inkubiert. Die entstandenen Komplexe wurden im Absorptionsspektrometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen durch Vergleich mit der Standardreihe (BSA-Konzentrationen von 2000-200 ng/ml) bestimmt.

2.2.4.3. Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Der im BCA-Test gemessenen Proteinkonzentrationen entsprechend wurden die Proben mit RIPA-Puffer auf 20 µg/Probe verdünnt und mit 6* Laemmli Puffer versetzt. Daraufhin wurden die Proben bei 95°C unter leichtem Schütteln für 10 min denaturiert und anschließend auf Gradientengele (4-20 %) aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. In 1* SDS Laufpuffer (25 mM Tris Base, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS) wurden die Proben für 50 min bei 150 Volt und 500 mA aufgetrennt.

2.2.4.4. Western Blot

Detektionslösung:

2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarin-Säure in DMSO, 0,1M Tris-HCl pH 8,5

Western Blot Waschpuffer:

1x PBS mit 0,05 % Tween-20 (PBST) Blockierlösung 5 % Milch oder 5 % BSA in PBST

Strippinglösung:

1x Re-Blot Plus Strong

Anodenpuffer

A: 300 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4

B: 25 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4

Kathodenpuffer C:

25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das sogenannte Semi-dry-Verfahren verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert. Es wurden je 1 Filterpapier in Anodenpuffer A, 2 Filterpapiere in Anodenpuffer B und 3 Filterpapiere in Kathodenpuffer C getaucht. Das Gel wurde in Kathodenpuffer C getränkt. Der Transfer wurde bei 80 V für 50 min durchgeführt (Abbildung 9). Die PVDF-Membran wurde daraufhin für eine Stunde (h) bei Raumtemperatur in einer Blockierlösung inkubiert. Daraufhin wurde die Membran im Primärantikörper über die Nacht bei 4°C und unter ständigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 5 min bei Raumtemperatur erwärmt und anschließend 3-mal 5 min in Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde die Membran 1 h mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (1/10000) inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten zu je 5 min erfolgte die Detektion mit der Detektionslösung plus 0,03 % H₂O₂. Um dieselbe Membran mehrfach verwenden zu können, wurde diese anschließend für 10 min in Strippinglösung inkubiert, anschließend 3-mal 1 min im Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h in der Blockierlösung geschwenkt. Danach konnte über Nacht die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper erfolgen.

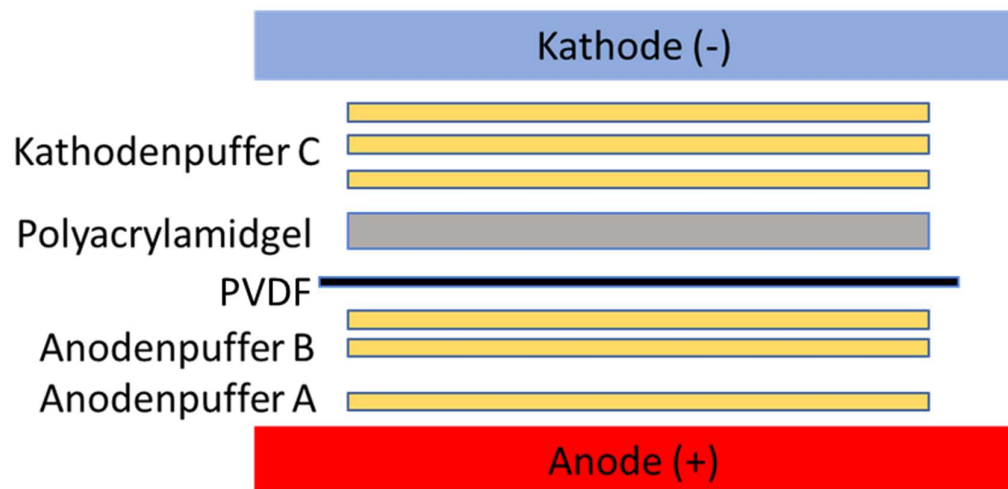


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Transfers beim Western Blot

2.3. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 8. Messwerte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem (Welch's) student t-test oder einem Anova-Test durchgeführt. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant betrachtet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. Proteine der p53-Familie induzieren Genexpression, Proteinsynthese und Sekretion von IGFBP2 in Hepatomzellen

3.1.1. Die Induktion von p53 und p73 steigert die Expression von *IGFBP2* in Hep3B-Zellen

Unsere Arbeitsgruppe identifizierte *IGFBP2* als ein neues Zielgen der p53-Familie, das die Verbindung der p53-Familie mit der IGF-Achse herstellt (Gschwind 2021).

In der hier vorliegenden Studie validierten wir zunächst unser verwendetes Modellsystem, das auf Hep3B-Zellen basiert. Zu diesem Zweck wurden Hep3B-Zellen adenoviral mit p53, p73 oder GFP als Kontrolle transduziert. Die Induktion der Transkription von *IGFBP2* wurde nach 24, 48 und 72 Stunden analysiert. Es wurde beobachtet, dass die Expression von p53 und p73 unterschiedlich stark die *IGFBP2*-Transkription induziert.

Die *IGFBP2*-Induktion nach der Expression von p53 zeigte nur geringfügige Veränderungen zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu führte die Expression von p73 zu einer 1,6-fachen Induktion der *IGFBP2*-mRNA-Menge nach 24 Stunden, einer 2,6-fachen Induktion nach 48 Stunden und einem Anstieg auf das 4-fache des Ausgangsniveaus nach 72 Stunden (Abbildung 10). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Befunden und belegen, dass sowohl p53 als auch p73 die Transkription des *IGFBP2*-Gens induzieren, wobei p73 eine stärkere Hochregulierung von *IGFBP2* im Vergleich zu p53 auslöst.

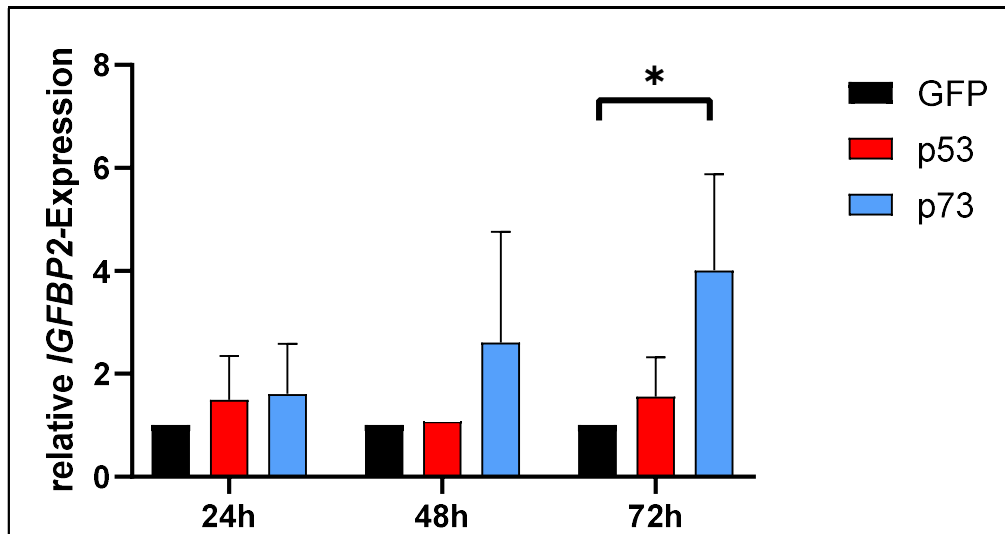


Abbildung 10: p53- und p73-abhängige Induktion der *IGFBP2*-Genexpression in Hep3B-Zellen. Relative *IGFBP2*-Expression in Hep3B-Zellen nach Induktion von p53, p73 oder dem GFP-Kontrollvektor zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach adenoviraler Transduktion. Die GFP-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt, die p53- und p73-transduzierten Proben wurden auf die Kontrolle normiert. Angegeben sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA (*= $p < 0,05$).

3.1.2. p53 und p73 steigern die Proteinsynthese von IGFBP2 in Hep3B-Zellen

Der Einfluss einer gesteigerten Induktion von p53 und p73 auf die *IGFBP2*-Expression wurde in einem weiteren Schritt auf Proteinebene untersucht. Hierbei wurden die Zellen 72 Stunden nach der adenoviralen Transduktion mit GFP, p53 und p73 geerntet, da zu diesem Zeitpunkt die höchsten mRNA-Spiegel von p53 und p73 gemessen wurden (Abbildung 10). Die Expression von p53 führte zu einer 3,5-fachen Erhöhung der Menge des IGFBP2-Proteins (Abbildungen 11 und 12). Nach der Transduktion mit adenoviralem p73 stieg die IGFBP2-Proteinmenge deutlich an und erreichte das 30,5-fache des Ausgangsniveaus. Diese Ergebnisse zeigen, dass p73 auch auf Proteinebene eine starke Induktion von IGFBP2 bewirkt.

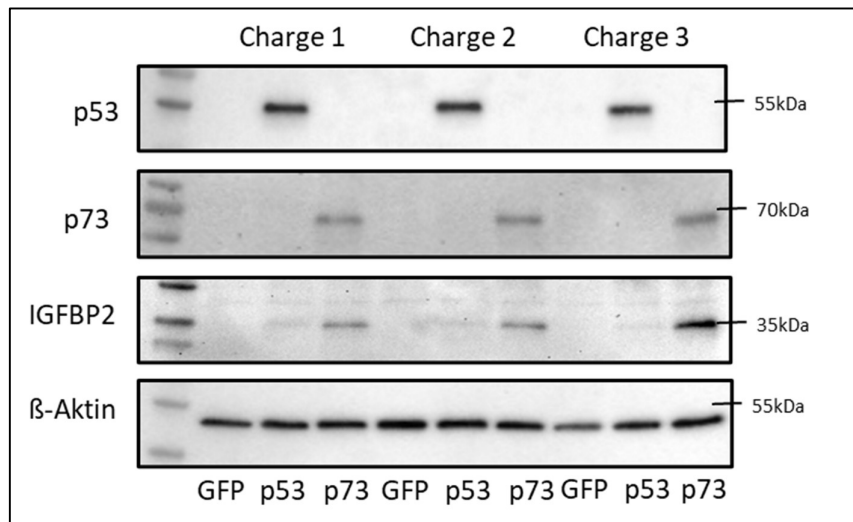


Abbildung 11: IGFBP2-Proteinmengen in Hep3B-Zellen nach adenoviraler Transduktion mit p53 und p73. Zur Kontrolle dienten Zellen nach adenoviraler Transduktion mit GFP. Die Ernte der Zellen erfolgte 72 h nach Transduktion. Als Ladekontrolle diente β -Actin. Die Expression von p73 führte zu einer gesteigerten Produktion von IGFBP2. Gezeigt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten.

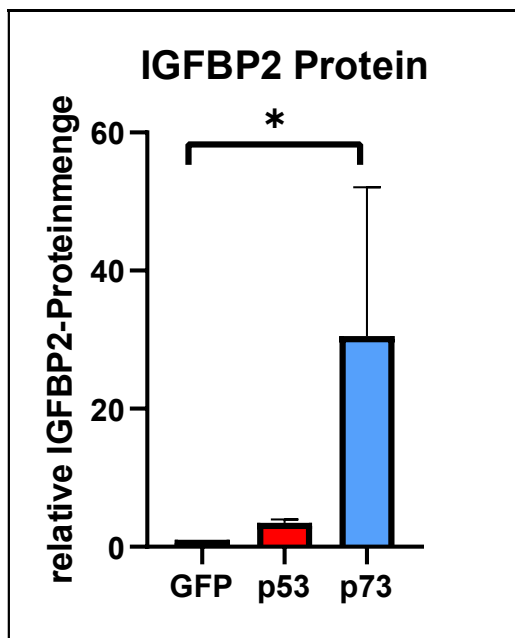


Abbildung 12: Densitometrische Auswertung der IGFBP2-Proteinmengen in Hep3B-Zellen nach adenoviraler Transduktion mit p53 und p73. Zur Kontrolle dienten Zellen nach adenoviraler Transduktion mit GFP. Die Ernte der Zellen erfolgte 72 h nach Transduktion. Als Ladekontrolle diente β -Actin. Die Expression von p73 führte zu einer gesteigerten Produktion von IGFBP2. Die densitometrische Auswertung erfolgte auf Grundlage von 3 unabhängigen Experimenten, beispielhaft dargestellt in Abbildung 11. Die GFP-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt, die Proben der p53- und p73-transduzierten Zellen wurden auf die Kontrolle normiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA (*= $p < 0,05$).

3.1.3. p73 induziert die Sekretion von IGFBP2

Um die physiologische Funktion von IGFBP2 – die Bindung von IGF – auszuüben, muss IGFBP2 sezerniert werden (1.5.5). Daher analysierten wir im nächsten Schritt die Menge an sezerniertem IGFBP2 im Zellüberstand. Die extrazellulären Mengen an IGFBP2 wurden nach Induktion von p53 bzw. p73 mittels ELISA in den Zellkulturüberständen zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach viraler Transduktion) gemessen. Es zeigte sich, dass p73 zu jedem Zeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg der IGFBP2-Sekretion führte. Der größte Anstieg wurde 96 Stunden nach Induktion von p73 beobachtet, wobei die Menge an extrazellulärem IGFBP2 im Vergleich zur Kontrolle um das 2,6-Fache erhöht war (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu hatte die Expression von p53 keinen Einfluss auf die IGFBP2-Sekretion.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine erhöhte Expression von p53 und p73 zur Induktion der IGFBP2-Proteinproduktion führt. Im Vergleich zu p53 zeigt p73 deutlich stärkere induktive Effekte und steigert zudem die IGFBP2-Sekretion signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die Anwendbarkeit unseres Hep3B-Modellsystems und bekräftigen die Daten aus unseren Vorarbeiten, dass Mitglieder der p53-Familie regulatorisch mit der IGF-Achse verbunden sind.

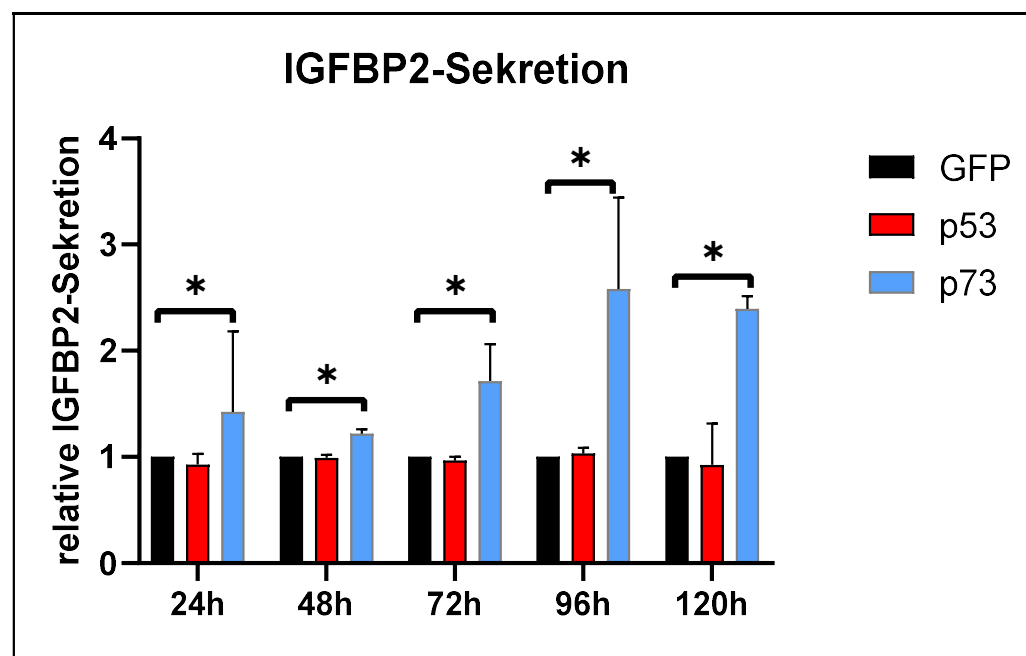


Abbildung 13: p73 induziert die Sekretion von IGFBP2. Die Analyse der IGFBP2 Mengen im Überstand der transduzierten Hep3B-Zellen erfolgte mittels ELISA. Die GFP-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt, die Proben der p53- und p73-Transduktion wurden auf die Kontrolle normiert. Auswertung von 2 unabhängigen Experimenten. Angegeben sind die Werte zwei unabhängiger Experimente. Die statistische Auswertung erfolgte mittels unpaired t-test (*= $p < 0,05$).

3.2. p53 induziert die Expression und Proteinproduktion von TIGAR in Hep3B-Zellen

3.2.1. Die Induktion von p53 führt zu vermehrter Expression von *TIGAR* in Hep3B-Zellen

Durch p53 wird auch ein weiteres Protein namens TIGAR reguliert. TIGAR spielt eine entscheidende Rolle im zellulären Metabolismus, indem es die Glykolyse hemmt und die Aktivität des Pentosephosphatwegs erhöht. Diese Funktionen von TIGAR tragen zur Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress bei (Bensaad et al. 2006). Um die Regulation von TIGAR durch die p53 Familie in unserem in vitro-Modell ebenfalls zu verifizieren, wurde untersucht, ob die verwendeten Hep3B-Zellen p53- bzw. p73-abhängig *TIGAR* exprimieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen adenoviral mit Expressionsvektoren für p53 und p73 transduziert und die *TIGAR*-Expression zu drei Zeitpunkten gemessen.

Die Expression von p53 führte zu einem über alle Messzeitpunkte erkennbaren, signifikanten Anstieg der *TIGAR*-Expression auf mRNA-Ebene (Abbildung 14). Die Menge an *TIGAR* nahm dabei über die drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h, 72 h) hinweg stetig zu. Es kam nach 24 Stunden zu einem Anstieg auf das 2,4-fache, nach 48 Stunden auf das 5-fache und nach 72 Stunden auf das 5,3-fache im Vergleich zur GFP-Kontrolle. In Zellen, die mit einem p73-Vektor transduziert wurden, konnte nach 24 Stunden kein Anstieg der *TIGAR*-mRNA-Menge detektiert werden. Nach 48 Stunden wurde eine sehr moderate Steigerung um den Faktor 1,3 beobachtet, während nach 72 Stunden eine Steigerung auf das 1,4-fache verzeichnet wurde. Der Einfluss von p73 auf die Induktion von *TIGAR* war statistisch nicht signifikant, wohingegen der Einfluss von p53 signifikant die *TIGAR*-Transkription induzierte (Abbildung 14). Es zeigte sich somit, dass die Transkription von *TIGAR* in Hep3B-Zellen p53-abhängig reguliert wird.

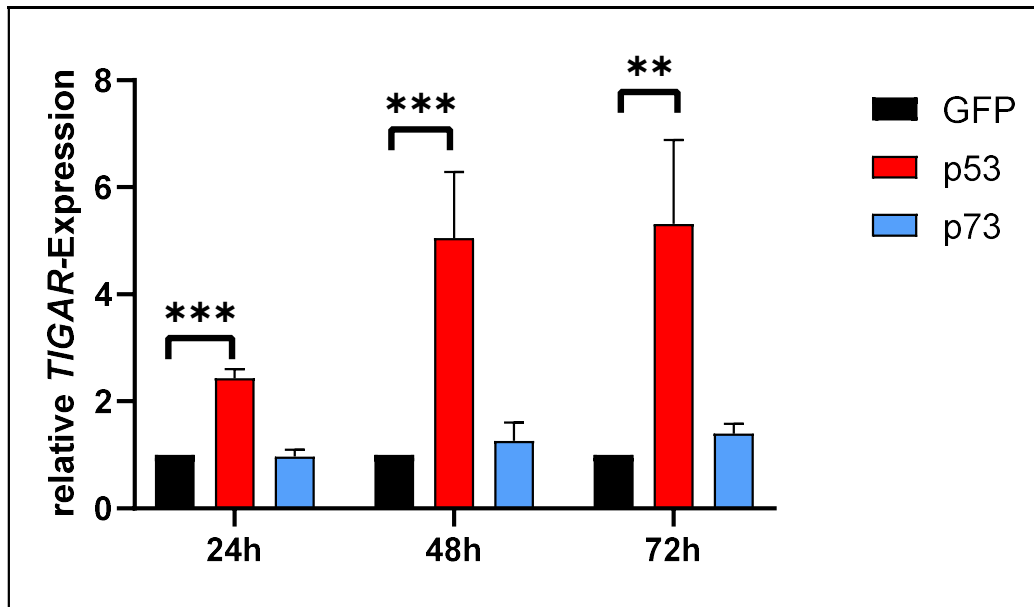


Abbildung 14: p53-abhängige Induktion von *TIGAR* in Hep3B-Zellen. Relative *TIGAR* Expression in Hep3B-Zellen nach Induktion der Expression von p53, p73 oder dem GFP (Kontrolle) durch adenovirale Expressionsvektoren zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach Transduktion. Angegeben sind die Werte dreier unabhängiger Experimente. Die GFP-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt, die p53- und p73-Transduktionen wurden auf die Kontrolle normiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA (**= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

3.2.2. Die Expression von p53 erhöht die TIGAR-Proteinspiegel in Hep3B-Zellen

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die p53-abhängige Regulation von *TIGAR* auch auf Proteinebene nachweisbar ist. Für diesen Versuch wurden die Zellen 72 Stunden nach der adenoviralen Transduktion geerntet, da zu diesem Zeitpunkt die qRT-PCR die höchste *TIGAR*-Transkription zeigte (Abbildung 14). Die Expression von p53 in Hep3B-Zellen führte zu einem Anstieg der TIGAR-Proteinkonzentration um das 2,1-fache (Abbildungen 15 und 16). Im Gegensatz dazu wurde in Zellen, die p73 exprimierten, kein Anstieg der TIGAR-Proteinkonzentration beobachtet, was mit den mRNA-Daten übereinstimmt (Abbildungen 14 und 16). Diese Ergebnisse bestätigen die p53-abhängige Induktion von TIGAR in Hep3B-Zellen auch auf Proteinebene.

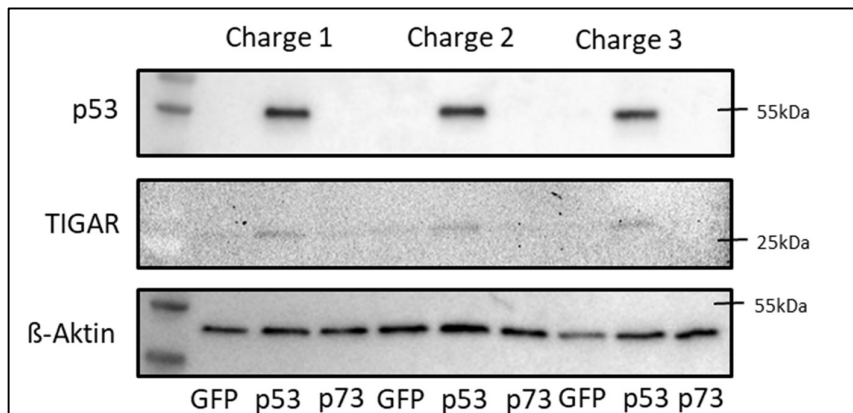


Abbildung 15: TIGAR-Synthese in Hep3B-Zellen nach p53- und p73-Expression durch adenovirale Transduktion. Zellen nach adenoviraler Transduktion mit GFP dienten als Kontrolle. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. In p53-exprimierenden Zellen erfolgte eine Induktion der TIGAR-Proteinproduktion. Die gezeigten Daten stellen repräsentativ 3 unabhängige Experimente dar.

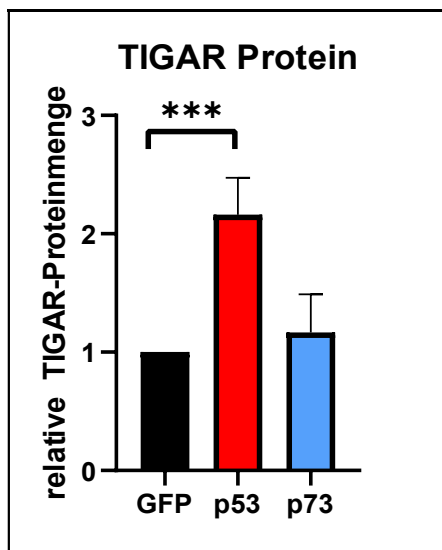


Abbildung 16: Densitometrische Auswertung der TIGAR-Proteinmengen nach p53 und p73-Induktion in Hep3B-Zellen. Die GFP-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt, die TIGAR-Proteinmengen nach p53- und p73-Transduktion wurden auf die Kontrolle normiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA ($n=5$; ***= $p<0,001$).

3.3. IGFBP2 und TIGAR werden unabhängig voneinander exprimiert

Nach der Untersuchung der Regulation von *IGFBP2*/IGFBP2 und *TIGAR*/TIGAR durch p53 und p73 auf RNA- bzw. Proteinebene sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob diese beiden Proteine sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen. Sowohl TIGAR als auch IGFBP2

spielen eine bedeutende Rolle im Zellwachstum und werden, wie in Abschnitt 3.1 und 3.2 dargestellt, beide durch Mitglieder der p53-Familie stimuliert.

Beide Proteine beeinflussen die Glykolyse: IGFBP2 durch die Blockierung des IGF-Signalwegs, was zu einem Wechsel was zu einer Reduktion des Transports von Glukose und Aminosäuren in die Zellen führt, und TIGAR, indem es die Verlagerung von der Glykolyse zum Pentosephosphatzyklus unterstützt. Es bleibt die Frage, ob diese regulatorischen Mechanismen, die beide durch die p53-Familie gesteuert werden, kooperativ oder unabhängig voneinander arbeiten. Um dies zu untersuchen, haben wir die Expression von TIGAR und IGFBP2 in Hep3B-Zellen nach der adenoviralen Transduktion mit p53 und p73 zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

3.3.1. Die Expression von IGFBP2 und der TIGAR-Proteinlevel sind unabhängig voneinander

Zunächst wurde getestet, inwieweit ein Knock-down des *IGFBP2*-Gens die intrazellulären Mengen an TIGAR beeinflusst. Hierzu erfolgten insgesamt neun Ansätze, bei denen die Zellen nach Transduktion mit GFP, p53 oder p73 jeweils in Kombination mit siRNA gegen TIGAR, *IGFBP2* oder Non-targeting silencing RNA (NTsiRNA) behandelt wurden. Letztere diente als Kontrolle, um Nebeneffekte der siRNA auszuschließen. 96 Stunden nach dieser Kombinationsbehandlung wurden in den Zellen die TIGAR-Proteinlevel untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Knock-down von *TIGAR* keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von IGFBP2 hatte. Es konnte keine Veränderung zu der NTsiRNA-Kontrolle detektiert werden (Abbildung 17).

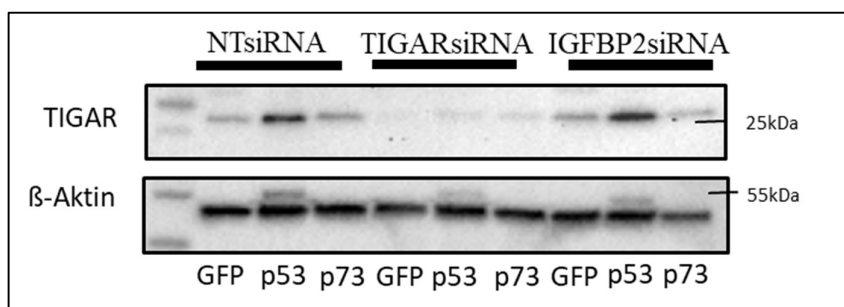


Abbildung 17: TIGAR-Protein in Hep3B-Zellen nach p53 und p73 Expression durch adenovirale Transduktion in Kombination mit siRNA-Knock-down von *TIGAR* bzw. *IGFBP2*. Als Kontrolle dienten Hep3B-Zellen nach adenoviraler GFP-Transduktion. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

Auch ein Knock-down von *IGFBP2* hatte keinen Einfluss auf die *TIGAR* Expression (Abbildung 18).

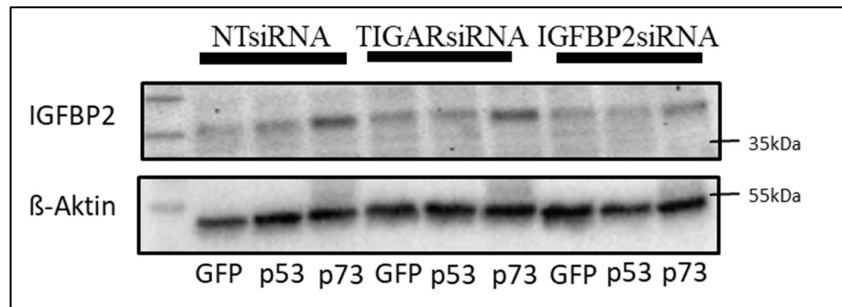


Abbildung 18: IGFBP2-Protein in Hep3B-Zellen nach p53 und p73 Expression durch adenovirale Transduktion in Kombination mit siRNA-Knock-down von *TIGAR* bzw. *IGFBP2*. Als Kontrolle dienten Hep3B-Zellen nach adenoviraler GFP-Transduktion. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

Nachdem wir zeigen konnten, dass der Knock-down – und somit ein niedriger Spiegel – von *TIGAR* und *IGFBP2* sich nicht auf die Synthese des jeweils anderen Proteins auswirkt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich ein hoher Spiegel eines dieser Proteine auf die Menge des jeweils anderen Proteins auswirkt.

Für diese Experimente wurde die HepG2 Zelllinie verwendet, da sich in Vorarbeiten keine stabilen Expressionsmodelle an Hep3B-Zellen, sondern nur an HepG2 etablieren ließen. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Hepatomzelllinien besteht darin, dass HepG2-Zellen WT-p53 exprimieren. Zur Entwicklung eines Induktionsmodells wurden die HepG2-Zellen mit Expressionsplasmiden für *TIGAR* oder *IGFBP2* transduziert.

3.3.2. Bei einer Induktion von IGFBP2 bleiben die intrazellulären Mengen an TIGAR stabil

Zunächst musste gezeigt werden, dass die Induktion erfolgreich war. Bei den Zellen, die mit dem IGFBP2-Plasmid transduziert wurden, zeigte sich eine deutlich gesteigerte Produktion von IGFBP2 (Abbildung 19).

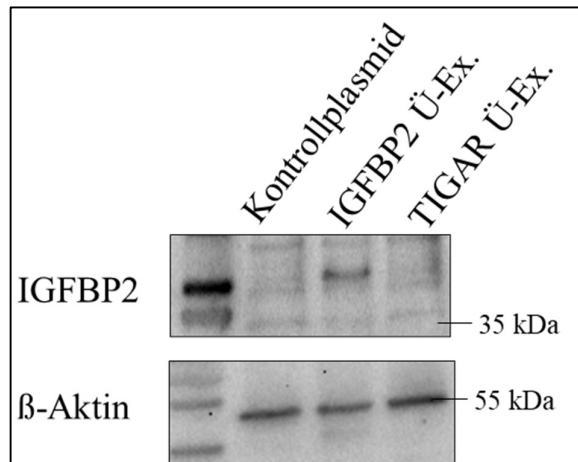


Abbildung 19: IGFBP2-Produktion nach Induktion von *TIGAR* bzw. *IGFBP2* in HepG2-Zellen mittels Transduktion mit Plasmiden mit Neomycinresistenz und 6 wöchigem Selektionsdruck. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen mit Leervektor-Plasmid. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Analog wurde bei den mit *TIGAR* transduzierten Zellen zunächst die erfolgreiche Proteinexpression verifiziert. Auch hier zeigte sich bei den Zellen, welche das *TIGAR*-Plasmid trugen, eine deutlich gesteigerte Produktion von TIGAR (Abbildung 20).

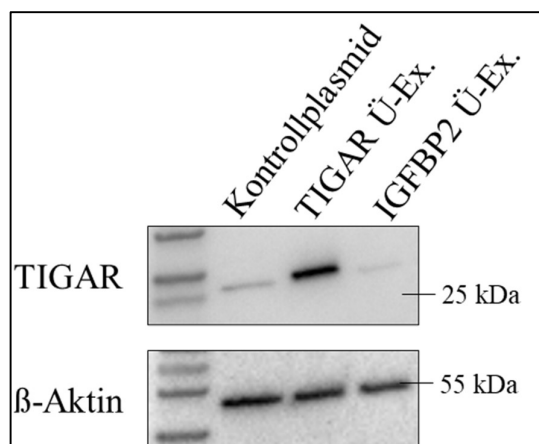


Abbildung 20: TIGAR-Produktion nach Induktion von *TIGAR* bzw. *IGFBP2* in HepG2-Zellen mittels Transduktion mit Plasmiden mit Neomycinresistenz und 6-wöchigem Selektionsdruck. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen mit Leervektor-Plasmid. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Nach Bestätigung der jeweiligen Expression wurde densitometrisch quantifiziert, ob Zellen, die eine erhöhte IGFBP2-Proteinexpression zeigen, andere Mengen an TIGAR translatieren als die Kontrollpopulation (Abbildung 21). Hierbei zeigte sich, dass die *IGFBP2*-Expression zu keiner signifikanten Veränderung des TIGAR-Proteinspiegels führt (Abbildung 21, roter Balken).

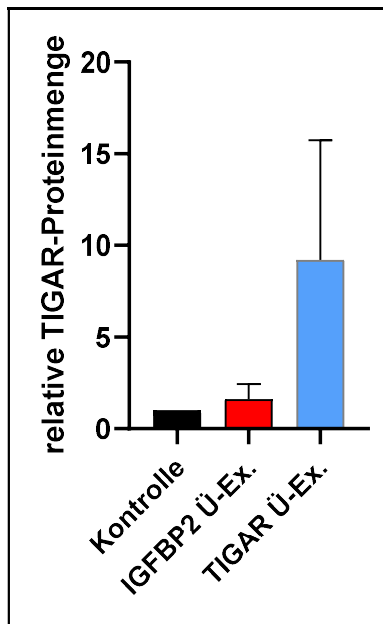


Abbildung 21: TIGAR-Produktion nach Induktion von *TIGAR* bzw. *IGFBP2* in HepG2-Zellen mittels Transduktion mit Plasmiden mit Neomycinresistenz und 6- wöchigem Selektionsdruck. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen mit Leervektor-Plasmid. Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten. Normiert wurde auf die Zellen mit Leervektorplasmid.

Anschließend wurde in einem vergleichbaren Ansatz untersucht, ob Zellen, die das *TIGAR*-Expressionsplasmid tragen, veränderte Mengen an IGFBP2 im Vergleich zur Kontrollpopulation aufweisen. Es zeigte sich auch hier, dass die IGFBP2-Expression unabhängig von der *TIGAR*-Expression ist (Abbildung 22, roter Balken).

Dies zeigt, dass bei einer Induktion von *TIGAR* oder *IGFBP2* die Produktion des jeweils anderen Proteins in seiner Menge nicht beeinflusst wird, obwohl beide Proteine über die p53-Familie reguliert werden.

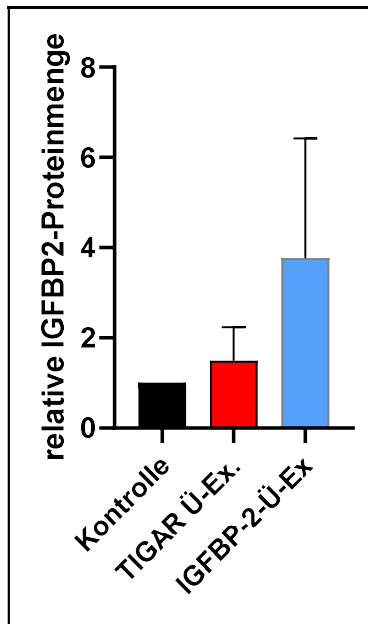


Abbildung 22: IGFBP2-Produktion nach Induktion von *TIGAR* bzw. *IGFBP2* in HepG2-Zellen mittels Transduktion mit Plasmiden mit Neomycinresistenz und 6- wöchigem Selektionsdruck. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen mit Leervektor-Plasmid. Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten. Normiert wurde auf die Zellen mit Leervektorplasmid.

3.4. Ein Einfluss eines *TIGAR* oder *IGFBP2*-Knock-downs auf den Zelltod kann ausgeschlossen werden

Unsere Daten zeigen, dass die Proteine IGFBP2 und TIGAR keine direkte Wechselwirkung miteinander aufweisen. Gleichzeitig beobachten wir aber eine direkte Regulation von *IGFBP2* durch p73 und von *TIGAR* durch p53. Da beide p53-Proteine wichtige Regulatoren der Zellhomöostase und des Zelltods sind, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob unterschiedliche Level an TIGAR und IGFBP2 das Zelltodverhalten und somit die Homöostase von Hep3B-Zellen beeinflussen. Dafür wurde zunächst untersucht, ob der Knock-down von *TIGAR* bzw. *IGFBP2* einen Einfluss auf Zelltod von Hep3B-Zellen hat, bei denen p53 bzw. p73 induziert wurde.

Analog zu den vorhergehenden Experimenten wurden Hep3B-Zellen hierzu mit adenoviralen Konstrukten für GFP, p53 oder p73 transduziert und anschließend mit siRNA gegen *TIGAR*, *IGFBP2* oder NT-si-Kontroll-RNA behandelt. Nach 120 Stunden wurde durchflusszytometrisch der Zelltod bestimmt (Abbildung 23).

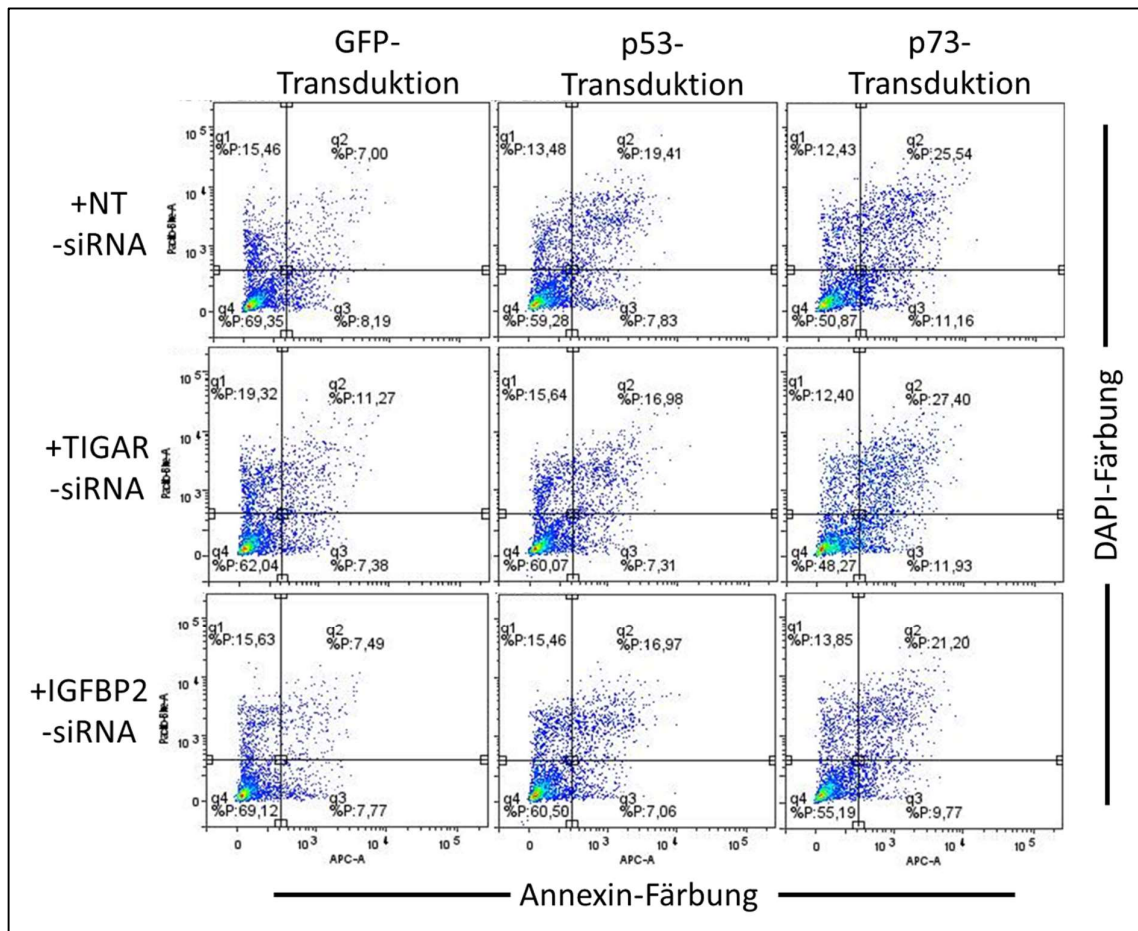


Abbildung 23: Zelltodverhalten von Hep3B-Zellen nach Transduktion mit p53 bzw. p73 und Knock-down von TIGAR bzw. IGFBP2. Die Zellen wurden insgesamt 120 h inkubiert und anschließend mit Annexin V und DAPI gefärbt. Als Kontrolle dienten GFP-transduzierte Zellen mit NT-siRNA. In q4 findet sich der Anteil lebender Zellen, in q3 der Anteil frühapoptotischer Zellen, in q2 der Anteil spätapoptotischer oder nekrotischer Zellen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

In den mit GFP transduzierten Zellen zeigten sich nach Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten keine signifikanten Unterschiede im Zelltodverhalten zwischen Kontrolle (+NT-siRNA) und den Proben, bei denen *IGFBP2* und *TIGAR* mittels siRNA herunterreguliert wurden (Abbildung 24, linkes Diagramm).

Nach p53- und p73-Transduktion stieg jeweils der Anteil der spät-apoptotischen Zellen (oberer rechter Quadrant) im Vergleich zur GFP-Kontrolle an. Dies zeigt, dass p53 und p73 Zelltod induzieren (Abbildung 23). Durch den Knock-down von *TIGAR* und *IGFBP2* wurden diese Zelltodraten jedoch nicht weiter beeinflusst, so dass das Zelltodverhalten im Vergleich zur jeweiligen NT-siRNA-behandelten Kontrolle unverändert war (Abbildung 24, mittleres und rechtes Diagramm). Ein Verlust der Proteinexpression von IGFBP2 bzw. TIGAR hat somit keinen Einfluss auf das Zelltodverhalten von Hep3B-Zellen.

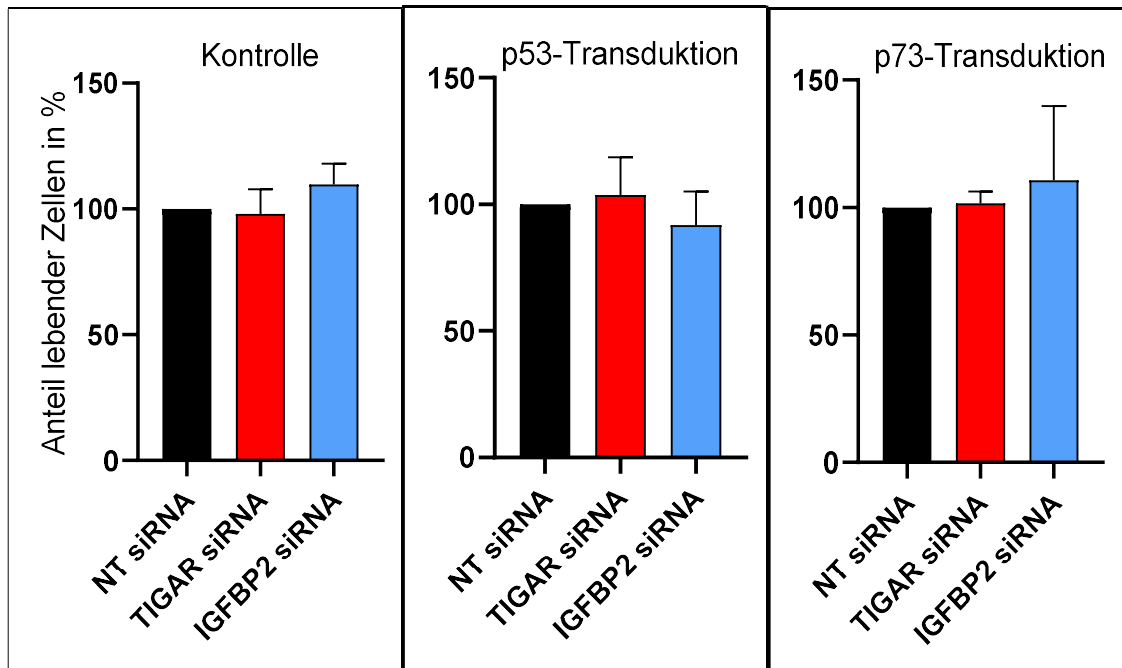


Abbildung 24: Einfluss von p53-/p73-Induktion und Knock-down von *TIGAR* und *IGFBP2* auf das Zelltodverhalten von Hep3B-Zellen. Die NT-siRNA Kontrolle wurde für jede Transduktionsreihe auf 100 % gesetzt, um die Effekte der Knock-downs darzustellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels unpaired t-test, n=3.

3.5. Ein Einfluss der Induktion der Proteinsynthese von *TIGAR* und *IGFBP2* auf den Zelltod kann ausgeschlossen werden

Nachdem sich gezeigt hatte, dass der Knock-down von *TIGAR* und *IGFBP2* den durch Induktion von p53 bzw. p73 induzierten Zelltod nicht beeinflusst (Abbildungen 24 und 25), wurde im entgegengesetzten Ansatz das Überexpressionsmodell verwendet, um den Einfluss einer Hochregulation von *TIGAR* und *IGFBP2* auf das Zelltodverhalten zu untersuchen (Abbildungen 25 und 26).

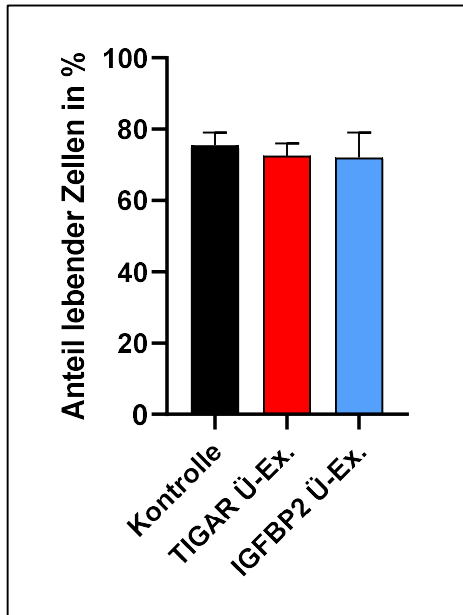


Abbildung 25: Einfluss der Induktion von *TIGAR* und *IGFBP2* auf das Zelltodverhalten von HepG2-Zellen. Anteilige Darstellung der DAPI-Exklusion von HepG2-Zellen nach Induktion von *TIGAR* bzw. *IGFBP2*, gemessen im Pacific Blue Kanal. Die Induktion beider Gene hatte keinen Effekt auf das Zelltodverhalten im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist die Auswertung von 2 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA.

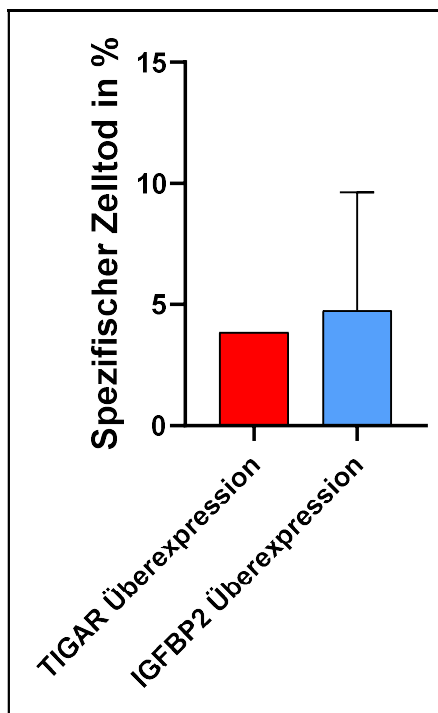


Abbildung 26: Einfluss der Induktion von *TIGAR* und *IGFBP2* auf das Zelltodverhalten von HepG2-Zellen. Dargestellt wird der berechnete spezifische Zelltod $\left(\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen in der Kontrollprobe} - \text{Anzahl der lebenden Zellen in der behandelten Probe}}{\text{Anzahl der lebenden Zellen in der Kontrollprobe}} \right) \times 100$. Die Induktion beider Gene hatte keinen Effekt auf das Zelltodverhalten im Vergleich zur Kontrolle, welche auf 0 % gesetzt wurde. Dargestellt ist die Auswertung von 2 unabhängigen Experimenten.

Auch nach Induktion von *TIGAR* und *IGFBP2* zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl lebender Zellen im Vergleich zu Kontrolle (Abbildungen 25 und 26). Somit haben die Proteinspiegel von *TIGAR* und *IGFBP2* keinen direkten Einfluss auf das Zelltodverhalten von Hep3B- und HepG2-Zellen.

Zur Überprüfung der oben beschriebenen Ergebnisse wurde die Caspasen-Spaltung analysiert, ein entscheidender Prozess für die Initiation und Durchführung der Apoptose. Insbesondere betrachtet wurden die Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie die Effektor-Caspase 3, die die Apoptose irreversibel einleitet (Krammer et al. 2007). Die Untersuchung ergab, dass die Induktion von *TIGAR* und *IGFBP2* keine Spaltung der inaktiven Vorformen der Caspasen (Procaspasen) bewirkte. Als Kontrolle diente der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk in einer Konzentration von 50 μ M (Abbildung 27). Diese Ergebnisse bestätigten, dass weder *TIGAR* noch *IGFBP2* alleine den Zelltod auslösen können.

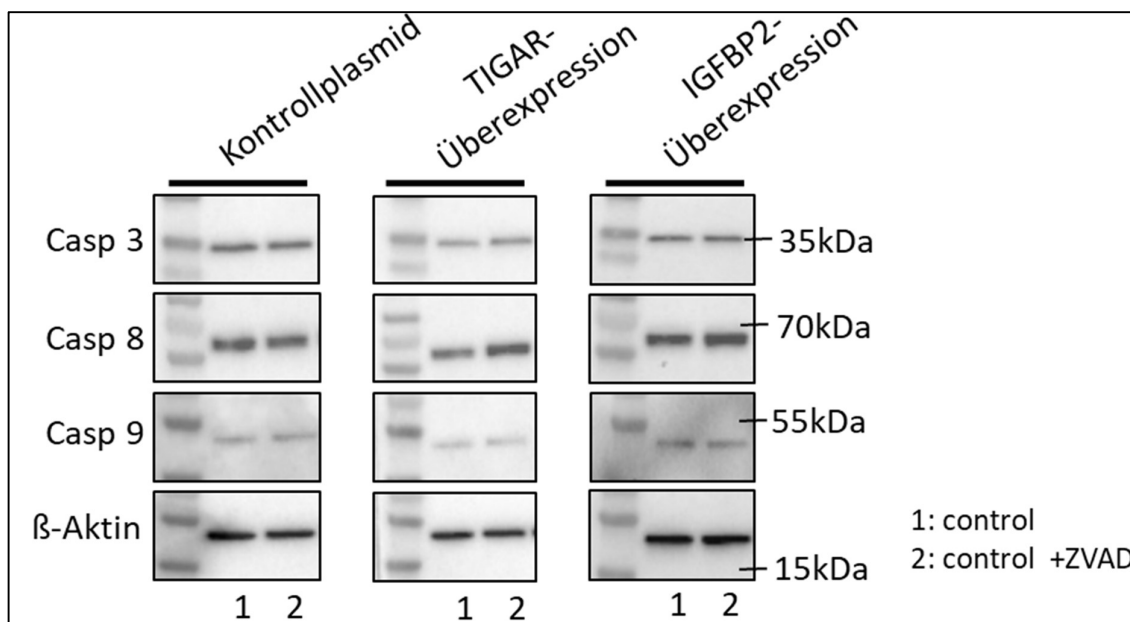


Abbildung 27: Keine Spaltung (Aktivierung) von Caspasen in HepG2-Zellen durch erhöhte Mengen an *TIGAR* und *IGFBP2*. Als Kontrolle dienten HepG2-Zellen, die mit dem Leervektor-Plasmid transduziert wurden. Untersucht wurden die Caspasen 3,8 und 9. Die Daten stehen repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Die Antikörper sind sensibel für die Vollängen und die gespaltene Form der Caspasen.

3.6. Durch Therapeutika, die die p53 Familie aktivieren, wie Bleomycin und Doxorubicin, kann die Expression von TIGAR und IGFBP2 induziert werden

Bleomycin und Doxorubicin sind therapeutische Wirkstoffe, die die Expression der Mitglieder der p53-Proteinfamilie induzieren können. In unserer Studie haben wir daher untersucht, ob diese Chemotherapeutika ebenfalls die Expression von TIGAR und IGFBP2 beeinflussen, welche, wie gezeigt, durch die p53-Familie reguliert werden könnten.

Hierfür verwendeten wir HepG2-Zellen. Diese wurden daraufhin jeweils mit Bleomycin und Doxorubicin behandelt und die exprimierten Mengen an TIGAR und IGFBP2 gemessen (Abbildung 28). Es zeigte sich, dass beide Wirkstoffe einen Anstieg der Proteinmengen von TIGAR und IGFBP2 bewirkten (Abbildungen 28 und 29).

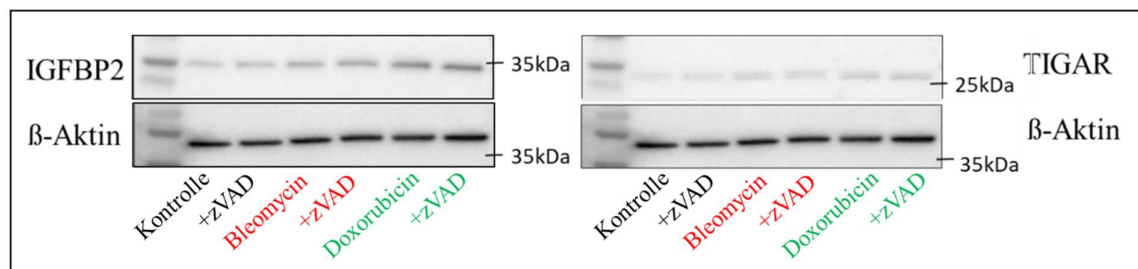


Abbildung 28: Doxorubicin und Bleomycin induzieren TIGAR und IGFBP2 in HepG2 Zellen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Nach Doxorubicin-Anwendung zeigten die Zellen eine signifikant gesteigerte Produktion von IGFBP2-Protein um das 2,2-fache (Abbildung 29, linke Seite).

Die Mengen an TIGAR waren nach Behandlung mit Bleomycin bzw. Doxorubicin tendenziell auch erhöht (Abbildung 29, rechte Seite).

Daraus ergibt sich, dass beide Chemotherapeutika IGFBP2 und TIGAR induzieren können.

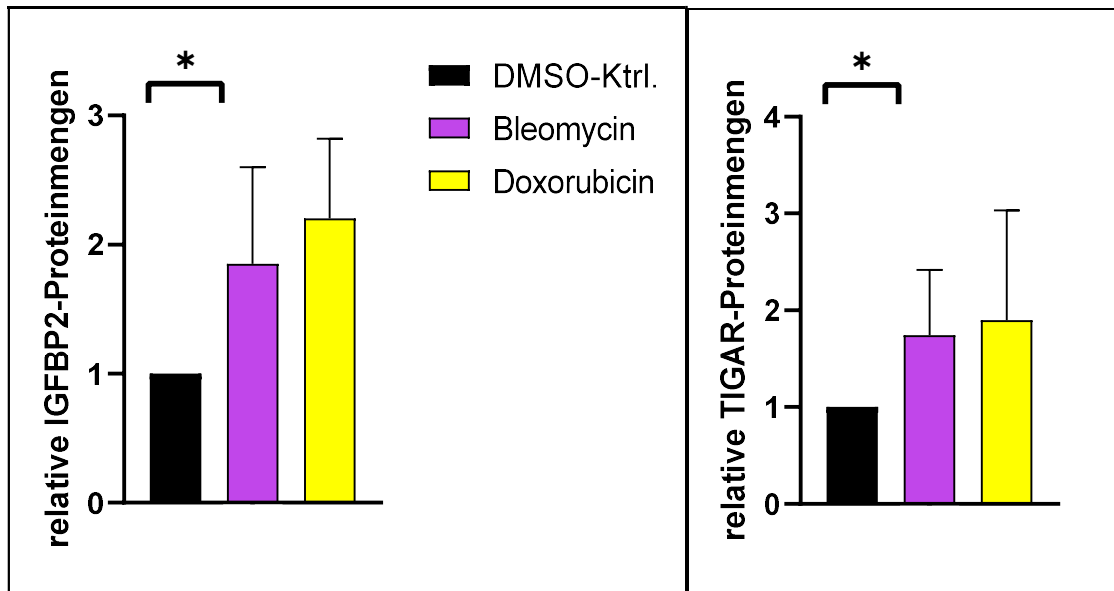


Abbildung 29: Bleomycin und Doxorubicin steigern die Proteinproduktion von TIGAR und IGFBP2. Densitometrische Auswertung der TIGAR- und IGFBP2-Proteinmengen, die in Western Blots bestimmt wurden. Die Zellen wurden 72h nach Aussaat mit Bleomycin (5 μ M) bzw. Doxorubicin (100nM) stimuliert. Normiert wurde auf die HepG2-Zellen mit DMSO-Behandlung, deren Wert wurde als 1 definiert. Nach Applikation der Therapeutika zeigte sich ein Anstieg der Mengen an TIGAR- und IGFBP2-Protein. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA (n=3, *= p<0,05).

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass die Mitglieder der p53-Familie, insbesondere p53 und p73, durch die Regulation der Gene *TIGAR* und *IGFBP2* unterschiedliche Rollen in den metabolischen Prozessen der Zelle spielen. Unsere Daten zeigen, dass Chemotherapeutika durch die Induktion dieser p53-Familienmitglieder die intrazellulären Spiegel von TIGAR und IGFBP2 beeinflussen und dadurch signifikante Auswirkungen auf den zellulären Metabolismus sowie auf IGF-vermittelte Signalwege haben. Diese Erkenntnisse erweitern unser Verständnis dafür, wie p53-Familienproteine durch externe therapeutische Interventionen in zelluläre Funktionen eingreifen.

4. Diskussion

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste maligne Primärtumor der Leber. Das HCC ist für etwa 90 % aller Leberkrebsfälle verantwortlich. Im Jahr 2020 erreichte Leberkrebs mit 905.677 neu diagnostizierten Fällen die sechsthöchste Inzidenzrate unter allen Krebserkrankungen. Trotz bedeutender Fortschritte in der Diagnose und Behandlung bleibt die Mortalitätsrate bei Leberkrebs besorgniserregend hoch. Mit 830.180 Todesfällen jährlich ist Leberkrebs nach dem Pankreaskrebs das zweithäufigste tödliche Malignom (McGlynn et al. 2021; Sung et al. 2021). Die frühzeitige Diagnose des HCC ist entscheidend für die Prognose der Patienten. Während im Frühstadium kurative Behandlungen eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 70 % ermöglichen, reduziert sich das mediane Überleben in fortgeschrittenen Stadien auf lediglich 1 bis 1,5 Jahre. Aufgrund der engen Korrelation zwischen Inzidenz und Mortalität spielen Screeningprogramme eine zentrale Rolle in der Früherkennung des HCC. Für Risikopatienten wird ein halbjährliches Screening empfohlen, wobei der Ultraschall und die Bestimmung der α -Fetoprotein (AFP)-Spiegel als bewährter Maßstab (Goldstandard) gelten (Llovet et al. 2021). Die systemische Therapie ist limitiert. Bis vor kurzem standen als Erstlinien-Therapie lediglich Sorafenib und Lenvatinib zur Verfügung. Nach erfolgreicher positiver Phase-III-Studie mit deutlicher Überlegenheit von Atezolizumab/Bevacizumab gegenüber Sorafenib (Finn et al. 2020) erfolgte deren Zulassung für die Erstlinientherapie des HCC in Deutschland und die Aufnahme in die Leitlinienbehandlung. Mit Durvalumab-Tremelimumab (HIMALAYA-Studie, NCT03298451) gibt es neuesten Daten zufolge nun eine weitere Erstlinienoption, die in die aktuellen Leitlinien aufgenommen wurde (siehe S3 Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Version 4.0, Juli 2023).

Bei 90 % der Patienten mit HCC ist dieses auf dem Boden einer Leberzirrhose entstanden, was die Therapieoptionen weiter einschränkt, da einige Medikamente weitere Leberschäden verursachen können. Die Nebenwirkungen erfordern oft eine Reduzierung der Medikamentendosis oder machen eine Behandlung unmöglich. Vor Therapiebeginn sollte die Schwere der Leberzirrhose genau bewertet werden (Pinter et al. 2016; Tümen et al. 2022). Komorbiditäten wie ein hohes kardiovaskuläres Risiko, das bei 10-15 % der HCC-Patienten vorliegt, schränken die Verwendung bestimmter Therapeutika weiter ein. Die Prognose im fortgeschrittenen Stadium beträgt oft nicht mehr als 6 Monate, was die Notwendigkeit unterstreicht, die Effektivität bestehender Therapien zu verbessern und neue Ansätze zu entwickeln (Pascale et al. 2019; Tümen et al. 2022).

Gerade die limitierte Kenntnis über pathogenetische Prozesse steht der Entwicklung neuer Therapien im Wege (Llovet und Hernandez-Gea 2014). Es ist entscheidend, Signalwege zu identifizieren und zu charakterisieren, die für den Metabolismus und die Homöostase von Tumoren wesentlich sind, um neue therapeutische Ansätze für das HCC zu entwickeln.

Der Effekt und die Wirkung von p53 auf Apoptose und Chemosensitivität im HCC wurden von unserer Arbeitsgruppe detailliert untersucht (Müller et al. 2006; Seitz et al. 2010; Mundt et al. 2010). In unserer Arbeitsgruppe führten die Analysen von p53-Zielgenexpressionsprofilen zur Identifikation einer umfassenden Gensignatur des HCC. Wir identifizierten 28 Zielgene der p53-Familie, die alle mit dem Patientenüberleben bei HCC assoziiert waren. Unsere weiterführende Analyse dieser Gene zeigte, dass sie hauptsächlich an der Regulierung von Zellwachstum und -proliferation beteiligt sind und zudem wichtige Rollen in den Bereichen Krebsprogression, Zelltod, Zellmigration und Zellentwicklung spielen (A. Pelc 2015). Hierbei wurde *IGFBP2* als potentiell Zielgen der p53-Familie identifiziert (Gschwind 2021). *IGFBP2* bindet mit hoher Affinität an IGF-1 und IGF-2. Diese Bindung moduliert die biologische Verfügbarkeit der IGFs, indem sie die Konzentration der frei zirkulierenden IGFs reduziert. Dies blockiert deren Interaktion mit IGF-Rezeptoren und beeinflusst so das durch den IGF-Signalweg induzierte Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (Hakuno und Takahashi 2018; Morrione et al. 1997; Tao et al. 2007).

Auch *TIGAR* ist als Zielgen der p53-Familie beschrieben (Bensaad et al. 2006). Es wird von p53 in Reaktion auf zellulären Stress, wie DNA-Schäden oder oxidative Belastungen, induziert. Die Aktivierung von *TIGAR* durch p53 ist ein Mechanismus, der dazu dient, die Zelle vor weiteren Schäden zu schützen. *TIGAR* hat eine wichtige Funktion in der Regulierung des Glukosestoffwechsels, indem es die Glykolyse hemmt. Es senkt die Konzentration von Fruktose-2,6-bisphosphat, einem wichtigen Molekül, das die Glykolyse fördert. Dadurch fördert *TIGAR* die Umleitung von Glukosemetaboliten in den Pentosephosphatweg, der für die Produktion von NADPH wichtig ist, welches wiederum für die Reduktion von oxidativem Stress in den Zellen verwendet wird (Green und Chipuk 2006; Tang et al. 2021).

In der vorliegenden Dissertation wurde detailliert untersucht und gezeigt (Abbildung 30):

(1) Sowohl *IGFBP2* als auch *TIGAR* sind Zielgene der p53-Familie. Insbesondere konnten wir zeigen, dass *IGFBP2* sowohl von p53, aber mehr noch durch p73 reguliert wird, welches in der Lage ist, die Transkription, Translation und Sekretion dieses Proteins zu induzieren. Die Transkription und Translation von *TIGAR* wird vorwiegend durch p53 kontrolliert. Diese

Ergebnisse verdeutlichen die Verbindung zwischen der p53-Familie und dem Zellmetabolismus, was auf eine umfassende regulatorische Rolle dieser Proteinfamilie in Bezug auf den Zell- und Tumormetabolismus hinweist.

(2) Weiterführende Analysen der Signalwege in dieser hier vorliegenden Arbeit haben belegt, dass die Regulation der Expression von IGFBP2 durch p53/p73 und die Regulation der Expression von TIGAR durch p53 unabhängig voneinander erfolgen. Dies impliziert, dass die beiden Signalwege getrennt voneinander moduliert werden können, was wiederum eine umfassendere Palette von potenziellen Therapieoptionen zur Tumorbehandlung eröffnet. Diese Unabhängigkeit der Signalwege ermöglicht es, gezielte und spezifische therapeutische Ansätze zu entwickeln, die auf die individuellen Bedürfnisse der Patienten abgestimmt sind.

(3) Zudem wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass Chemotherapeutika, die die p53-Familie aktivieren, ebenfalls die Expression von IGFBP2 und TIGAR steigern. Dies ist von hoher klinischer Relevanz, da es nicht nur ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise von Chemotherapeutika ermöglicht, sondern auch dabei hilft, optimale Kombinationen von Wirkstoffen zu identifizieren. Diese Erkenntnisse sind von entscheidender Bedeutung für die zukünftige Patientenversorgung, da sie dazu beitragen können, die Wirksamkeit und Effizienz von Krebstherapien zu verbessern und somit die Prognose der Patienten zu verbessern.

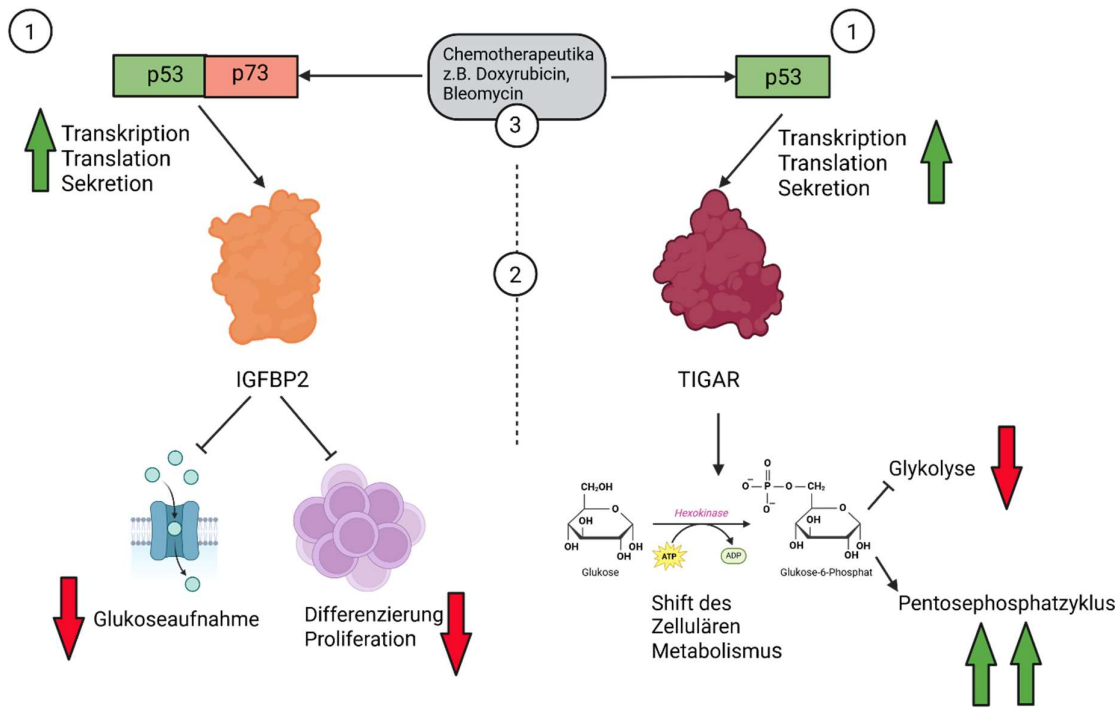


Abbildung 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Doktorarbeit: (1) Die p53 Familie induziert *IGFBP2* und *TIGAR*. *IGFBP2* blockiert die Glukoseaufnahme in die Zelle sowie Differenzierung und Proliferation. *TIGAR* leitet einen Wechsel des Metabolismus hin zum Pentosephosphatzyklus ein. Dieser Wechsel verlangsamt ebenfalls das Tumorwachstum. (2) Beide Signalwege sind unabhängig voneinander und können somit auch gezielt therapeutisch angegriffen werden. (3) p53-induzierende Chemotherapeutika können sowohl die Expression von *IGFBP2* als auch *TIGAR* induzieren.

Zahlreiche Studien unterstreichen diese weitergehende, metabolische Funktion der p53-Proteinfamilie (Green und Chipuk 2006). p53 koordiniert, wie Zellen Nährstoffe verarbeiten und nutzen, insbesondere unter Stressbedingungen. Diese Fähigkeit von p53, sowohl genetische Stabilität als auch metabolische Anpassungen zu steuern, ist von grundlegender Bedeutung für das Überleben der Zellen (Abbildung 31) unter verschiedenen Stressbedingungen und trägt zur Tumorunterdrückung bei (Green und Chipuk 2006).

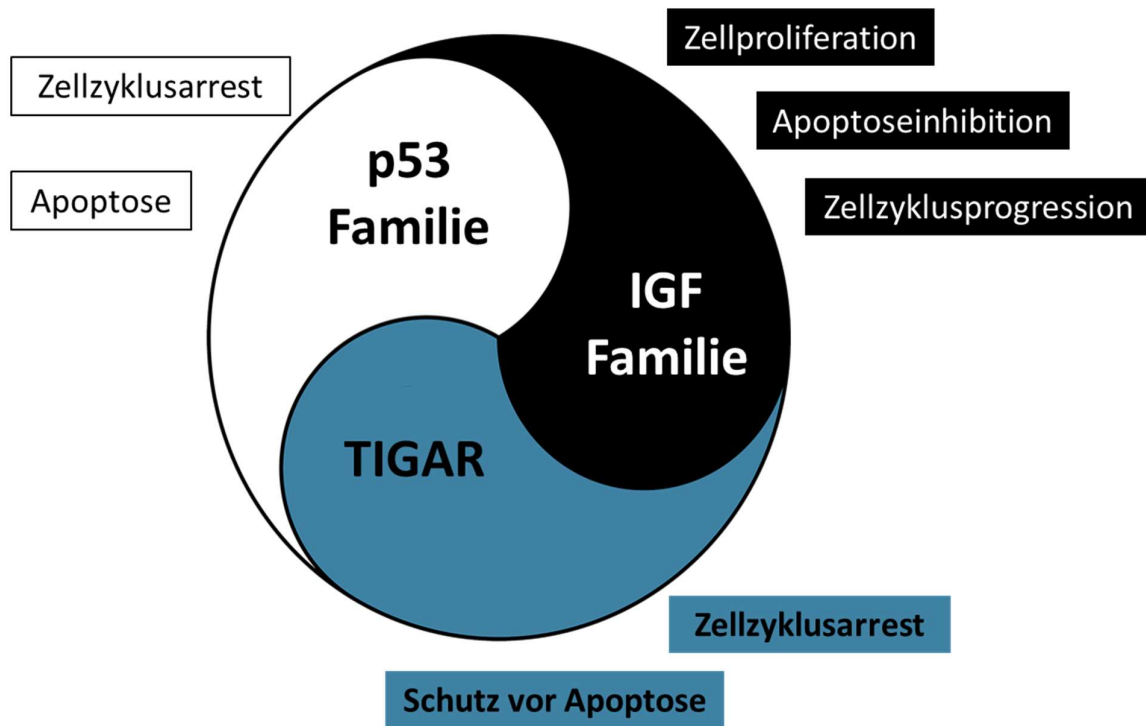


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Verzahnung von p53-Familie, IGF-Familie und TIGAR

In vielen Zelltypen wurde nachgewiesen, dass IGFs (IGF-1 und IGF-2) eine Reihe von wichtigen Funktionen erfüllen. Sie fördern das Wachstum und die Differenzierung von Zielzellen, unterstützen das Überleben der Zellen und helfen, ihre Funktionen aufrechtzuerhalten (Abbildung 31). Darüber hinaus beeinflussen IGFs auch den Stoffwechsel, indem sie beispielsweise den Transport von Glukose und Aminosäuren in die Zellen erhöhen und die Bildung von Glykogen, Lipiden und Proteinen anregen. Gleichzeitig hemmen sie Prozesse wie die Glukoneogenese, die Lipolyse und den Abbau von Proteinen (Hakuno und Takahashi 2018). IGFBPs binden freies IGF-I und -II (Chen et al. 2013), regulieren deren Funktion herunter und wirken somit proliferationshemmend (Kim et al. 2010; Wu et al. 2013).

Im Gegensatz dazu zeigen andere Daten, dass bei Patienten mit kolorektalem Karzinom IGFBP2 ein negativer prognostischer Marker ist. Bei diesen Patienten gehen erhöhte IGFBP2-Konzentrationen mit einer gesteigerten Mortalität einher (Liou et al. 2010). Auch im HCC spielt IGFBP2 eine Rolle. Bei HCC-Patienten finden sich häufig erhöhte IGFBP2-Plasmaspiegel, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden. Es wird angenommen, dass IGFBP2 einerseits IGFs neutralisiert, andererseits aber auch deren Abbau verhindert und sie langsam wieder freisetzt. Dies führt zu einer milden, aber verlängerten Stimulation der IGF-Rezeptoren (IGF-IR und IGF-IIR) (Han et al. 2014). Interessanterweise führte im Zellkulturmodell

rekombinantes, extern zugeführtes IGFBP2 zu Zellproliferation, während die Induktion von endogenem IGFBP2 keinen Effekt zeigte. Dies verdeutlicht, dass sowohl die Lokalisation als auch die Menge und Sekretion von IGFBP2 entscheidend für die Funktion und Aktivität der IGFs sind (Russo et al. 2015) (Ranke et al. 2003; Ma et al. 2020).

Somit kommt der p53-Familie, insbesondere p73, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine wichtige Rolle als Regulator von IGFBP2 zu. In dieser Dissertationsschrift konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von p73 die Transkription und damit die Menge an IGFBP2 bestimmt. Um dies weiterführend zu untersuchen, können nun basierend auf diesen Ergebnissen Experimente folgen, in denen die Feinregulation der p73-gesteuerten IGFBP2-Synthese untersucht wird. Hierfür wären induzierbare Expressionssysteme wie das Tet-On/Tet-Off-System besonders geeignet (Das et al. 2016; Gossen et al. 1995).

Durch die Regulation von TIGAR kann p53 den Zellmetabolismus sogar noch weiter anpassen. TIGAR wirkt als Regulator des Zellstoffwechsels, indem es die Fruktose-2,6-bisphosphatase-Aktivität erhöht. Dies führt zur Senkung der Glykolyse-Rate und zur Umleitung des Glukosemetabolismus in den Pentosephosphatweg, wodurch mehr NADPH produziert wird. NADPH ist wichtig für die Abwehr gegen oxidativen Stress. Durch die Umleitung des Metabolismus in den Pentosephosphatweg wird verhindert, dass ROS akkumuliert, es zur Oxidation von Makromolekülen kommt und so Mutationen entstehen. Dieser Shift im zellulären Metabolismus hilft dadurch, die Entstehung von Tumoren zu verhindern (Abbildung 31) (Gülow et al. 2023; Green und Chipuk 2006).

Auf der anderen Seite bietet die Reduktion von ROS auch Überlebensvorteile für die Zelle. Maligne Zellen haben aufgrund ihres beschleunigten Stoffwechsels oft erhöhte ROS-Level, was zu schädlichen Oxidationen führen kann. Diese können Zelltod, Nekrose oder Apoptose in Krebszellen auslösen. Eine gestärkte oxidative Abwehr, wie sie durch TIGAR induziert wird, kann diese schädlichen Effekte verhindern und die Krebszellen am Leben erhalten. Zusätzlich stellt der Pentosephosphatweg metabolische Bausteine bereit, die für Zellwachstum nötig sind, wie z. B. Ribose-5-Phosphat (Ye et al. 2013). Daher ist die Induktion von TIGAR ein zweischneidiges Schwert: Einerseits kann sie die Entstehung von Tumoren verhindern, andererseits bietet sie bereits bestehenden Tumoren einen Überlebensvorteil (Green und Chipuk 2006; Gülow et al. 2023).

Es gibt Daten, die zeigen, dass die TIGAR-Proteinspiegel in Tumoren des Gastrointestinaltraktes, bei Gliomen und Brustkrebs erhöht sein können (Wanka et al. 2012; Won et al. 2012; Liu et al. 2019). Die erhöhte TIGAR-Expression geht hier mit einem

schlechteren Therapieansprechen und schnellerer Proliferation einher. Im Maus-Tumormodell wurde nach Anwendung von *TIGAR*-siRNA ein verringertes Tumorgewicht und -volumen festgestellt (Mao et al. 2019). Bei der Behandlung von HCC-Zellen mit dem Zytostatikum Epirubicin stieg der TIGAR-Spiegel zeit- und konzentrationsabhängig an, was mit einer erhöhten Resistenz der Zellen korrelierte. Durch ein silencing von *TIGAR* in den behandelten Zellen konnten wiederum auch hier die Apoptoseraten gesteigert werden (Xie et al. 2014).

Beide Proteine, sowohl IGFBP2 als auch TIGAR, greifen in den zellulären Metabolismus ein und verlangsamen die Zellproliferation. IGFBP2, indem es IGFs inhibiert, dadurch die Glukoseaufnahme reduziert und den zellulären Stoffwechsel somit herunterfährt (Hakuno und Takahashi 2018; Morrione et al. 1997; Tao et al. 2007; Mukama et al. 2023). TIGAR hingegen, indem es einen Wechsel von der Glykolyse zum Pentosephosphatweg einleitet (Ye et al. 2013 (Green und Chipuk 2006). Neben den tumorhemmenden Eigenschaften sind auch tumorfördernde Eigenschaften beschrieben worden. Sowohl IGFBP2 (durch dosisabhängige, verlängerte Stimulation der IGF-Rezeptoren) als auch TIGAR (durch Schutz vor Zelltod) können das Tumorwachstum/-überleben unterstützen (Green und Chipuk 2006; Wei et al. 2021) (Abbildung 32).

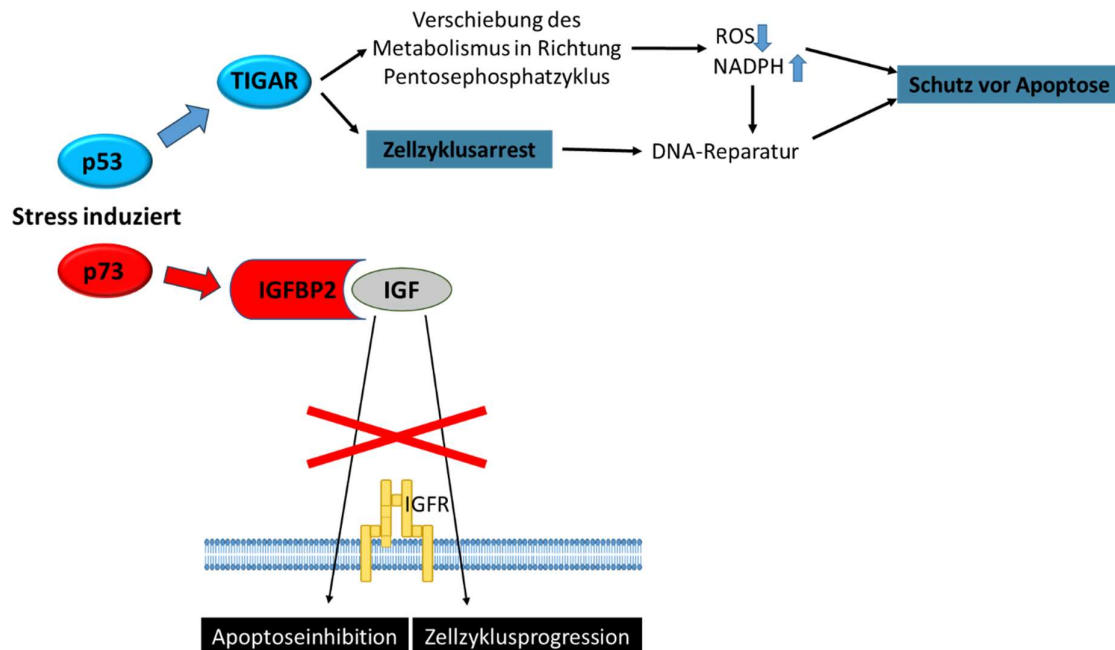


Abbildung 32: Schematische Darstellung der komplexen Funktionen des IGF-Signalwegs und der p53-Familie. Während p53 vor allem über *TIGAR* Einfluss auf das Apoptoseverhalten nimmt und für die Zellen protektiv wirkt, wirkt p73 mehr über sein Zielgen *IGFBP2*.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, agieren IGFBP2 und TIGAR unabhängig voneinander. Zudem konnten wir zeigen, dass beiden gemeinsam ist, dass ihre Expression von Mitgliedern der p53-Familie gesteuert wird (Abbildung 33). Dabei wird IGFBP2 von p73 und TIGAR von p53 reguliert.

Doch wie lassen sich die vielfältigen Funktionen von p53 und der p53-Familie erklären? Was entscheidet darüber, ob p53 den Zelltod in entarteten Zellen induziert oder ob p53 die Zelle vor Stress schützt und Überlebenssignalwege aktiviert, um die Entstehung neuer Tumoren zu verhindern, aber gleichzeitig bestehende Tumore vor Zelltod schützt?

Mögliche Erklärungen sind die Menge an p53 oder den anderen Familienmitgliedern sowie deren Verhältnis zueinander. Auch die Tatsache, dass die p53-Familienmitglieder in verschiedenen Isoformen exprimiert werden können, spielt eine Rolle. Für p53 sind 13 Isoformen beschrieben, für p73 14 Isoformen und auch für p63 gibt es mehrere Isoformen (Murray-Zmijewski et al. 2006). Diese Isoformen können unterschiedliche Funktionen haben und unterschiedlich auf zellulären Stress reagieren, was zur Vielfalt der Funktionen der p53-Familie beiträgt. Das Verhältnis und die spezifische Kombination der Isoformen könnten bestimmen, ob die Mitglieder der p53-Familie Überlebens- oder Todeswege aktivieren (Murray-Zmijewski et al. 2006).

Inwieweit die Protein-Konzentration der p53-Familienmitglieder eine Rolle spielt, wie es für IGFBP2 vermutet wird, kann mit induzierbaren Expressionssystemen wie dem Tet-On/Tet-Off-System untersucht werden. Mit diesen Systemen kann die Menge an p73 oder IGFBP2 genau moduliert und die Auswirkungen der Proteinkonzentration auf die Wirkweise von IGFBP2 untersucht werden. Durch die Modulation von IGFBP2 mit einem solchen System kann man herausfinden, welche Proteinkonzentration IGF hemmt und welche Konzentration IGF vor Abbau schützt, es aber in seiner aktiven Form belässt. Ähnlich kann man durch die Modulation der p73-Menge ermitteln, in welchem Umfang p73 induziert werden muss, um bestimmte Mengen an IGFBP2-Protein zu erzeugen.

Die differenzielle Expression der Isoformen der p53-Familie ist kaum untersucht, was vor allem daran liegt, dass es nur wenige geeignete Methoden gibt. In unserem Labor haben wir eine solche Methode entwickelt und verbessern sie kontinuierlich. Es handelt sich um ein „Exon-Specific Isoform Expression Reporter System“ (EXSISERS), das wir so weiterentwickelt haben, dass wir die Expression der drei Hauptgruppen der p53-Isoformen in Echtzeit in lebenden Zellen nachverfolgen können (Truong et al. 2021). Bei diesem System werden über

CRISPR/Cas9 in für die Isoformen spezifischen Exons Luciferasen eingefügt, die von Split-Inteinen flankiert sind. Während der Translation spalten sich die Luciferasen mittels der Split-Inteine aus dem p53-Protein heraus. Dadurch entstehen ein unverändertes p53-Protein sowie äquimolare Mengen der entsprechenden Luciferasen. Die Funktion von p53 bleibt erhalten, und die translatierten Mengen an den verschiedenen p53-Isoformen können über die Luciferasen gemessen werden. Mit diesem neuen Expressionssystem sind wir in der Lage zu ermitteln, welche Isoformen für die Expression von TIGAR verantwortlich sind.

Diese Untersuchungen sind von hoher klinischer Relevanz, da sie helfen, die Funktionsweise der p53-Familie und die von ihr gesteuerten Signalwege auf molekularer Ebene zu verstehen. Dies ist besonders wichtig im Hinblick darauf, dass viele Therapeutika die p53-Familie induzieren. Wie gezeigt wurde, induzieren Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Bleomycin über die p53-Familie auch IGFBP2 und TIGAR. Dies kann je nach Tumorsituation sowohl Vorteile als auch Nachteile mit sich bringen (Mao et al. 2019; Kim et al. 2010; Wu et al. 2013; Han et al. 2014; Green und Chipuk 2006). Die in dieser Doktorarbeit präsentierten Ergebnisse bilden die Basis für weitere Untersuchungen und sind ein erster Schritt, die komplexen Aufgaben der p53-Familie besser zu verstehen. Dies kann zur Entwicklung neuer Ansätze für die Tumorthherapie führen.

.

5. Zusammenfassung

Trotz kontinuierlicher Fortschritte in der Therapie und verbesserten Screeningverfahren zählt das hepatozelluläre Karzinom (HCC) weiterhin zu den tödlichsten Tumorerkrankungen weltweit und bleibt das häufigste Malignom der Leber. Neue Therapieoptionen wie Atezolizumab und Bevacizumab sowie die Kombination von Durvalumab und Tremelimumab zeigen die Potenziale der sogenannten targeted Therapies und der Immuntherapie. In dieser Dissertationsschrift wurden die Signalwege des Tumormetabolismus als weitere relevante Zielstrukturen für neue therapeutische Optionen des HCC untersucht.

Unsere Arbeitsgruppe hat mithilfe von Microarray-Analysen und p53-Zielgenexpressionsprofilen eine prognoserelevante Gensignatur identifiziert, die aus 28 Genen besteht. Diese Gene, die von der p53-Familie im HCC reguliert werden, umfassen auch IGFBP2 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2). IGFBP2 ist Teil der IGF-Achse, die im HCC oft dereguliert ist. Ebenso ist die Expression des p53-Zielgens *TIGAR* (TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator) im HCC häufig pathologisch verändert.

Beide Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, des Zellstoffwechsels und des Tumormetabolismus. Ein verbessertes molekulares Verständnis ihrer Regulation ermöglicht die Nutzung p53-induzierender Therapeutika, um die Expression dieser Proteine gezielt zu modulieren. Dadurch könnte das Fortschreiten einer Tumorerkrankung verlangsamt oder sogar verhindert werden.

In dieser Studie wurden die Verbindungen zwischen der p53-Familie, IGFBP2 und *TIGAR* untersucht. Dabei konnten wir Folgendes zeigen:

- IGFBP2 kann sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene von p53 induziert werden.
- p73 induziert eine noch stärkere *IGFBP2*-Expression und ist der Hauptregulator der IGFBP2-Expression in HCC-Zellen.
- p53 ist der Hauptregulator der *TIGAR*-Expression.
- Die Expression von IGFBP2 und *TIGAR* wird unabhängig voneinander reguliert.
- Tumortheraeutika wie Doxorubicin und Bleomycin können die Expression von IGFBP2 und *TIGAR* über p53 induzieren.

Diese Untersuchungen sind von hoher klinischer Relevanz, da sie helfen, die Funktionsweise der p53-Familie und die von ihr gesteuerten Signalwege auf molekularer Ebene zu verstehen.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leberläppchen.....	6
Abbildung 2: Sinusoid.....	7
Abbildung 3: BCLC-Algorithmus.....	12
Abbildung 4: Genstruktur der p53-Familie.....	18
Abbildung 5: Überblick über die Komponenten des IGF-Systems.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionen von TIGAR	28
Abbildung 7: Expressionsvektoren für <i>TIGAR</i> und <i>IGFBP2</i>	37
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des enzymgekoppelten ELISA-Nachweisverfahrens....	43
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Transfers beim Western Blots	47
Abbildung 10: p53- und p73-abhängige Induktion der <i>IGFBP2</i> -Genexpression in Hep3B-Zellen.....	49
Abbildung 11: IGFBP2-Proteinmengen in Hep3B-Zellen.....	50
Abbildung 12: Densitometrische Auswertung der IGFBP2-Proteinmengen in Hep3B-Zellen	50
Abbildung 13: p73 induziert die Sekretion von IGFBP2	51
Abbildung 14: p53-abhängige Induktion von <i>TIGAR</i> in Hep3B-Zellen	53
Abbildung 15: TIGAR-Synthese in Hep3B-Zellen.....	54
Abbildung 16: Densitometrische Auswertung der TIGAR-Proteinmengen nach p53 und p73-Induktion in Hep3B-Zellen	54
Abbildung 17: TIGAR-Protein in Hep3B-Zellen nach p53 und p73 Expression	55
Abbildung 18: IGFBP2-Protein in Hep3B-Zellen nach p53 und p73 Expression	56
Abbildung 19: IGFBP2-Produktion nach Induktion von <i>TIGAR</i> bzw. <i>IGFBP2</i> in HepG2-Zellen	57
Abbildung 20: TIGAR-Produktion nach Induktion von <i>TIGAR</i> bzw. <i>IGFBP2</i> in HepG2-Zellen	57

Abbildung 21: TIGAR-Produktion nach Induktion von <i>TIGAR</i> bzw. <i>IGFBP2</i> in HepG2-Zellen	58
Abbildung 22: IGFBP2-Produktion nach Induktion von <i>TIGAR</i> bzw. <i>IGFBP2</i> in HepG2-Zellen	59
Abbildung 23: Zelltodverhalten von Hep3B-Zellen nach Transduktion mit p53 bzw. p73 und Knock-down von TIGAR bzw. IGFBP2.....	60
Abbildung 24: Einfluss von p53-/p73-Induktion und Knock-down von <i>TIGAR</i> und <i>IGFBP2</i> auf das Zelltodverhalten von Hep3B-Zellen.	61
Abbildung 25: Einfluss der Induktion von <i>TIGAR</i> und <i>IGFBP2</i> auf das Zelltodverhalten von HepG2-Zellen. Anteilige Darstellung der DAPI-Exklusion	62
Abbildung 26: Einfluss der Induktion von <i>TIGAR</i> und <i>IGFBP2</i> auf das Zelltodverhalten von HepG2-Zellen.....	62
Abbildung 27: Keine Spaltung (Aktivierung) von Caspasen in HepG2-Zellen durch erhöhte Mengen an <i>TIGAR</i> und <i>IGFBP2</i>	63
Abbildung 28: Doxorubicin und Bleomycin induzieren TIGAR und IGFBP2 in HepG2 Zellen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.	64
Abbildung 29: Bleomycin und Doxorubicin steigern die Proteinproduktion von TIGAR und IGFBP2. Densitometrische Auswertung.	65
Abbildung 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Doktorarbeit	69
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Verzahnung von p53-Familie, IGF-Familie und TIGAR.....	70
Abbildung 32: Schematische Darstellung der komplexen Funktionen des IGF-Signalwegs und der p53-Familie	72

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für Proteindetektion.....	36
Tabelle 2: Verwendete Primer für die RTqPCR	36
Tabelle 3: Expressionsplasmide zur Elektrotransformation.....	37
Tabelle 4: Verwendete siRNAs.....	38
Tabelle 5: Pippetieransatz zur Amplifikation von cDNA	42
Tabelle 6: PCR-Einstellungen zur Amplifikation von cDNA.....	42

7. Literaturverzeichnis

- Abdel-Misih, Sherif R. Z.; Bloomston, Mark (2010): Liver anatomy. In: *The Surgical clinics of North America* 90 (4), S. 643–653. DOI: 10.1016/j.suc.2010.04.017.
- Abraldes, Juan G.; Caraceni, Paolo; Ghabril, Marwan; Garcia-Tsao, Guadalupe (2023): Update in the Treatment of the Complications of Cirrhosis. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 21 (8), S. 2100–2109. DOI: 10.1016/j.cgh.2023.03.019.
- Andress, D. L.; Birnbaum, R. S. (1992): Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (31), S. 22467–22472. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1385400/>.
- Arjun Kalra; Ekrem Yetiskul; Chase J. Wehrle; Faiz Tuma (2021): Physiology, Liver. In: Arjun Kalra, Ekrem Yetiskul, Chase J. Wehrle und Faiz Tuma (Hg.): StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>.
- Asafo-Agyei, Kwabena O.; Samant, Hrishikesh (2023): StatPearls. Hepatocellular Carcinoma. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644603/>.
- Bach, Leon A.; Hale, Lorna J. (2015): Insulin-like growth factors and kidney disease. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 65 (2), S. 327–336. DOI: 10.1053/j.ajkd.2014.05.024.
- Bailes, Julian; Soloviev, Mikhail (2021): Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) and Its Monitoring in Medical Diagnostic and in Sports. In: *Biomolecules* 11 (2). DOI: 10.3390/biom11020217.
- Balint, Eva; Phillips, Andrew C.; Kozlov, Serguei; Stewart, Colin L.; Vousden, Karen H. (2002): Induction of p57(KIP2) expression by p73beta. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6), S. 3529–3534. DOI: 10.1073/pnas.062491899.
- Bálint, E.; Bates, S.; Vousden, K. H. (1999): Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. In: *Oncogene* 18 (27), S. 3923–3929. DOI: 10.1038/sj.onc.1202781.
- Baran, Katherine; Yang, Mao; Dillon, Christopher P.; Samson, Leona L.; Green, Douglas R. (2017): The proline rich domain of p53 is dispensable for MGMT-dependent DNA repair and cell survival following alkylation damage. In: *Cell death and differentiation* 24 (11), S. 1925–1936. DOI: 10.1038/cdd.2017.116.
- Baxter, R. C. (2000): Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 278 (6), E967–76. DOI: 10.1152/ajpendo.2000.278.6.E967.
- Beattie, James; Allan, Gordon J.; Lochrie, Jennifer D.; Flint, David J. (2006): Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis. In: *The Biochemical journal* 395 (1), S. 1–19. DOI: 10.1042/BJ20060086.

- Bensaad, Karim; Cheung, Eric C.; Vousden, Karen H. (2009): Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. In: *The EMBO journal* 28 (19), S. 3015–3026. DOI: 10.1038/emboj.2009.242.
- Bensaad, Karim; Tsuruta, Atsushi; Selak, Mary A.; Vidal, M. Nieves Calvo; Nakano, Katsunori; Bartrons, Ramon et al. (2006): TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. In: *Cell* 126 (1), S. 107–120. DOI: 10.1016/j.cell.2006.05.036.
- Bisso, Andrea; Collavin, Licio; Del Sal, Giannino (2011): p73 as a pharmaceutical target for cancer therapy. In: *Current pharmaceutical design* 17 (6), S. 578–590. DOI: 10.2174/138161211795222667.
- Bourdon, Jean-Christophe (2007): p53 Family isoforms. In: *Current pharmaceutical biotechnology* 8 (6), S. 332–336. DOI: 10.2174/138920107783018444.
- Burge, Sarah; Teufel, Daniel P.; Townsley, Fiona M.; Freund, Stefan M. V.; Bycroft, Mark; Fersht, Alan R. (2009): Molecular basis of the interactions between the p73 N terminus and p300: effects on transactivation and modulation by phosphorylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9), S. 3142–3147. DOI: 10.1073/pnas.0900383106.
- Byrne, Christopher D.; Targher, Giovanni (2015): NAFLD: a multisystem disease. In: *Journal of Hepatology* 62 (1 Suppl), S47–64. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.012.
- Candi, Eleonora; Agostini, Massimiliano; Melino, Gerry; Bernassola, Francesca (2014): How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. In: *Hum. Mutat.* 35 (6), S. 702–714. DOI: 10.1002/humu.22523.
- Charni, Meital; Rivlin, Noa; Molchadsky, Alina; Aloni-Grinstein, Ronit; Rotter, Varda (2014): p53 in liver pathologies-taking the good with the bad. In: *J Mol Med* 92 (12), S. 1229–1234. DOI: 10.1007/s00109-014-1223-5.
- Chen, George G.; Merchant, Juanita L.; Lai, Paul B.S.; Ho, Rocky L.K.; Hu, Xu; Okada, Morihiro et al. (2003): Mutation of p53 in Recurrent Hepatocellular Carcinoma and Its Association with the Expression of ZBP-89. In: *The American Journal of Pathology* 162 (6), S. 1823–1829. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64317-9.
- Chen, Jijun; Wang, Aiqin; Chen, Qingqi (2017): SirT3 and p53 Deacetylation in Aging and Cancer. In: *J. Cell. Physiol.* 232 (9), S. 2308–2311. DOI: 10.1002/jcp.25669.
- Chen, Xiaoli; Zheng, Junke; Zou, Yizhou; Song, Chun; Hu, Xuemei; Zhang, Cheng Cheng (2013): IGF binding protein 2 is a cell-autonomous factor supporting survival and migration of acute leukemia cells. In: *J Hematol Oncol* 6 (1), S. 72. DOI: 10.1186/1756-8722-6-72.
- Cheng, Ann-Lii; Qin, Shukui; Ikeda, Masafumi; Galle, Peter R.; Ducreux, Michel; Kim, Tae-You et al. (2022): Updated efficacy and safety data from IMbrave150: Atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma. In: *Journal of Hepatology* 76 (4), S. 862–873. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.11.030.
- Cheung, Eric C.; Ludwig, Robert L.; Vousden, Karen H. (2012): Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. In: *PNAS* 109 (50), S. 20491–20496. DOI: 10.1073/pnas.1206530109.

- Cho, Seong-Jun; Jung, Yong-Sam; Chen, Xinbin (2013): Poly (C)-binding protein 1 regulates p63 expression through mRNA stability. In: *PLoS ONE* 8 (8), e71724. DOI: 10.1371/journal.pone.0071724.
- Collett-Solberg, Paulo F.; Cohen, Pinchas (1996): The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. In: *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. Online verfügbar unter <https://www.semanticscholar.org/paper/The-role-of-the-insulin-like-growth-factor-binding-Collett-Solberg-Cohen/7cc09f05e36049b886674ddf3d625588a76d6fb1>.
- Cucchetti, Alessandro; Zhong, Jianhong; Berhane, Sarah; Toyoda, Hidenori; Shi, KeQing; Tada, Toshifumi et al. (2020): The chances of hepatic resection curing hepatocellular carcinoma. In: *Journal of Hepatology* 72 (4), S. 711–717. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.11.016.
- Damalas, A.; Kahan, S.; Shtutman, M.; Ben-Ze'ev, A.; Oren, M. (2001): Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. In: *The EMBO journal* 20 (17), S. 4912–4922. DOI: 10.1093/emboj/20.17.4912.
- Das, Atze T.; Tenenbaum, Liliane; Berkhout, Ben (2016): Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. In: *Current gene therapy* 16 (3), S. 156–167. DOI: 10.2174/1566523216666160524144041.
- Daughaday, W. H.; Hall, K.; Raben, M. S.; Salmon, W. D.; van den Brande, J. L.; van Wyk, J. J. (1972): Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. In: *Nature* 235 (5333), S. 107. DOI: 10.1038/235107a0.
- DeLeo, A. B.; Jay, G.; Appella, E.; Dubois, G. C.; Law, L. W.; Old, L. J. (1979): Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse 76 (5), S. 2420–2424. DOI: 10.1073/pnas.76.5.2420.
- Desmet, Valeer J.; Roskams, Tania (2004): Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. In: *Journal of Hepatology* 40 (5), S. 860–867. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.03.007.
- DiGiammarino, Enrico L.; Lee, Amanda S.; Cadwell, Craig; Zhang, Weixing; Bothner, Brian; Ribeiro, Raul C. et al. (2002): A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. In: *Nature structural biology* 9 (1), S. 12–16. DOI: 10.1038/nsb730.
- Divella, Rosa; Daniele, Antonella; Abbate, Ines; Savino, Eufemia; Casamassima, Porzia; Sciortino, Giancarlo et al. (2015): Circulating Levels of PAI-1 and SERPINE1 4G/4G Polymorphism Are Predictive of Poor Prognosis in HCC Patients Undergoing TACE. In: *Translational Oncology* 8 (4), S. 273–278. DOI: 10.1016/j.tranon.2015.05.002.
- Dorr, R. T. (1992): Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. In: *Seminars in oncology* 19 (2 Suppl 5), S. 3–8. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1384141/>.
- EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma (2018). In: *Journal of Hepatology* 69 (1), S. 182–236.
- El-Serag, Hashem B. (2011): Hepatocellular carcinoma. In: *N Engl J Med* 365 (12), S. 1118–1127. DOI: 10.1056/NEJMra1001683.

- Ferraiuolo, Maria; Di Agostino, Silvia; Blandino, Giovanni; Strano, Sabrina (2016): Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. In: *Frontiers in oncology* 6, S. 77. DOI: 10.3389/fonc.2016.00077.
- Finn, Richard S.; Qin, Shukui; Ikeda, Masafumi; Galle, Peter R.; Ducreux, Michel; Kim, Tae-You et al. (2020): Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 382 (20), S. 1894–1905. DOI: 10.1056/NEJMoa1915745.
- Firth, Sue M.; Baxter, Robert C. (2002): Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. In: *Endocrine reviews* 23 (6), S. 824–854. DOI: 10.1210/er.2001-0033.
- Fisher, Matthew L.; Balinth, Seamus; Mills, Alea A. (2020): p63-related signaling at a glance. In: *Journal of cell science* 133 (17). DOI: 10.1242/jcs.228015.
- Friedel, Laura; Loewer, Alexander (2022): The guardian's choice: how p53 enables context-specific decision-making in individual cells. In: *The FEBS journal* 289 (1), S. 40–52. DOI: 10.1111/febs.15767.
- Friedman, Scott. L. (2002): Reversing hepatic fibrosis. In: *Sci Med* 8, S. 194–205. Online verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012836450/>.
- Fu, J.; Wang, Y.; Zhang, J.; Yuan, K.; Yan, J.; Yuan, B. et al. (2021): The safety and efficacy of transarterial chemoembolisation with bleomycin for hepatocellular carcinoma unresponsive to doxorubicin: a prospective single-centre study. In: *Clinical Radiology* 76 (11), 864.e7–864.e12. DOI: 10.1016/j.crad.2021.07.013.
- Galle, Peter R.; Foerster, Friedrich; Kudo, Masatoshi; Chan, Stephen L.; Llovet, Josep M.; Qin, Shukui et al. (2019): Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. In: *Liver Int* 39 (12), S. 2214–2229. DOI: 10.1111/liv.14223.
- Ginès, Pere; Krag, Aleksander; Abraldes, Juan G.; Solà, Elsa; Fabrellas, Núria; Kamath, Patrick S. (2021): Liver cirrhosis. In: *The Lancet* 398 (10308), S. 1359–1376. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01374-X.
- Gissen, Paul; Arias, Irwin M. (2015): Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. In: *Journal of Hepatology* 63 (4), S. 1023–1037. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.06.015.
- González, Raúl; La Rosa, Ángel J. de; Rufini, Alessandro; Rodríguez-Hernández, María A.; Navarro-Villarán, Elena; Marchal, Trinidad et al. (2017): Role of p63 and p73 isoforms on the cell death in patients with hepatocellular carcinoma submitted to orthotopic liver transplantation. In: *PLoS ONE* 12 (3), e0174326. DOI: 10.1371/journal.pone.0174326.
- Gossen, M.; Freundlieb, S.; Bender, G.; Müller, G.; Hillen, W.; Bujard, H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5218), S. 1766–1769. DOI: 10.1126/science.7792603.
- Green, Douglas R.; Chipuk, Jerry E. (2006): p53 and metabolism: Inside the TIGAR. In: *Cell* 126 (1), S. 30–32. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.032.
- Greenblatt, M. S.; Bennett, W. P.; Hollstein, M.; Harris, C. C. (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. In: *Cancer research* 54 (18), S. 4855–4878. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8069852/>.

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

Gschwind, Dana (2021): Identifizierung von IGFBP-2 und IGFBP-4 als neue prognostisch relevante Zielgene der P53-Familie im hepatozellulären Karzinom. Universität Regensburg.

Gülow, Karsten; Tümen, Deniz; Kunst, Claudia (2023): The Important Role of Protein Kinases in the p53 Sestrin Signaling Pathway. In: *Cancers* 15 (22). DOI: 10.3390/cancers15225390.

Guo, Xuecui; Keyes, William M.; Papazoglu, Cristian; Zuber, Johannes; Li, Wangzhi; Lowe, Scott W. et al. (2009): TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. In: *Nature cell biology* 11 (12), S. 1451–1457. DOI: 10.1038/ncb1988.

Haidurov, Alexander; Budanov, Andrei V. (2020): Sestrin family - the stem controlling healthy ageing. In: *Mechanisms of ageing and development* 192, S. 111379. DOI: 10.1016/j.mad.2020.111379.

Hakuno, Fumihiko; Takahashi, Shin-Ichiro (2018): IGF1 receptor signaling pathways. In: *Journal of molecular endocrinology* 61 (1), T69-T86. DOI: 10.1530/JME-17-0311.

Han, S.; Li, Z.; Master, L. M.; Master, Z. W.; Wu, A. (2014): Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin β 1-ERK pathway. In: *British journal of cancer* 111 (7), S. 1400–1409. DOI: 10.1038/bjc.2014.435.

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

Heimbach, Julie K.; Kulik, Laura M.; Finn, Richard S.; Sirlin, Claude B.; Abecassis, Michael M.; Roberts, Lewis R. et al. (2018): AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67 (1), S. 358–380. DOI: 10.1002/hep.29086.

Hernandez-Gea, Virginia; Friedman, Scott L. (2011): Pathogenesis of liver fibrosis. In: *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6 (1), S. 425–456. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130246.

Hsu, H. C.; Tseng, H. J.; Lai, P. L.; Lee, P. H.; Peng, S. Y. (1993): Expression of p53 gene in 184 unifocal hepatocellular carcinomas: association with tumor growth and invasiveness. In: *Cancer Res* 53 (19), S. 4691–4694. Online verfügbar unter <https://cancerres.aacrjournals.org/content/53/19/4691.short>.

Huang, Tony Dazhong; Behary, Jason; Zekry, Amany (2020): Non-alcoholic fatty liver disease: a review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management. In: *Intern Med J* 50 (9), S. 1038–1047. DOI: 10.1111/imj.14709.

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

Inagaki, Yutaka; Higashiyama, Reiichi; Higashi, Kiyoshi (2012): Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27 Suppl 2, S. 85–88. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07006.x.

- Jeng, K. S.; Sheen, I. S.; Chen, B. F.; Wu, J. Y. (2000): Is the p53 gene mutation of prognostic value in hepatocellular carcinoma after resection? In: *Archives of Surgery* 135 (11), S. 1329–1333. DOI: 10.1001/archsurg.135.11.1329.
- Johnson, T. M.; Yu, Z. X.; Ferrans, V. J.; Lowenstein, R. A.; Finkel, T. (1996): Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (21), S. 11848–11852. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11848.
- Jung, Yong-Sam; Qian, Yingjuan; Yan, Wensheng; Chen, Xinbin (2013): Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through p63. In: *The Journal of investigative dermatology* 133 (5), S. 1178–1187. DOI: 10.1038/jid.2012.466.
- Kaghad, M.; Bonnet, H.; Yang, A.; Creancier, L.; Biscan, J. C.; Valent, A. et al. (1997): Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. In: *Cell* 90 (4), S. 809–819. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80540-1.
- Katiyar, Sanjay; Dash, Bipin C.; Thakur, Varsha; Guptan, Raj C.; Sarin, Shiv K.; Das, Bhudev C. (2000): P53 tumor suppressor gene mutations in hepatocellular carcinoma patients in India. In: *Cancer* 88 (7), S. 1565–1573. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(20000401)88:7<1565::AID-CNCR10>3.0.CO;2-9.
- Khan, Shahbaz; Saxena, Romil (2021): Regression of Hepatic Fibrosis and Evolution of Cirrhosis: A Concise Review. In: *Advances in anatomic pathology* 28 (6), S. 408–414. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000312.
- Kim, H-S; Lee, W. J.; Lee, S. W.; Chae, H-W; Kim, D. H.; Oh, Y. (2010): Insulin-like growth factor binding protein-3 induces G1 cell cycle arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase 2 and 4 in MCF-7 human breast cancer cells. In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 42 (3), S. 165–172. DOI: 10.1055/s-0029-1243190.
- Kornfeld, S. (1992): Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. In: *Annual review of biochemistry* 61, S. 307–330. DOI: 10.1146/annurev.bi.61.070192.001515.
- Krammer, Peter H.; Kamiński, Marcin; Kiessling, Michael; Gülow, Karsten (2007): No life without death. In: *Advances in cancer research* 97, S. 111–138. DOI: 10.1016/S0065-230X(06)97005-5.
- Krstic, Jelena; Reinisch, Isabel; Schupp, Michael; Schulz, Tim J.; Prokesch, Andreas (2018): p53 Functions in Adipose Tissue Metabolism and Homeostasis. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9), S. 2622. DOI: 10.3390/ijms19092622.
- Kudo, Masatoshi; Finn, Richard S.; Qin, Shukui; Han, Kwang-Hyub; Ikeda, Kenji; Piscaglia, Fabio et al. (2018): Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. In: *Lancet (London, England)* 391 (10126), S. 1163–1173. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
- Kulik, Laura; El-Serag, Hashem B. (2019): Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. In: *Gastroenterology* 156 (2), 477-491.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.08.065.

- Kunst, Claudia; Haderer, Marika; Heckel, Sebastian; Schlosser, Sophie; Müller, Martina (2016): The p53 family in hepatocellular carcinoma. In: *Transl. Cancer Res.* 5 (6), S. 632–638. DOI: 10.21037/tcr.2016.11.79.
- Lau, L. M. S.; Nugent, J. K.; Zhao, X.; Irwin, M. S. (2008): HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. In: *Oncogene* 27 (7), S. 997–1003. DOI: 10.1038/sj.onc.1210707.
- Levine, Arnold J.; Oren, Moshe (2009): The first 30 years of p53: growing ever more complex. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (10), S. 749–758. DOI: 10.1038/nrc2723.
- Liou, Jyh-Ming; Shun, Chia-Tung; Liang, Jin-Tung; Chiu, Han-Mo; Chen, Mei-Jyh; Chen, Chien-Chuan et al. (2010): Plasma insulin-like growth factor-binding protein-2 levels as diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95 (4), S. 1717–1725. DOI: 10.1210/jc.2009-2668.
- Liu, Zhenhua; Wu, Yue; Zhang, Yingqiu; Yuan, Menglang; Li, Xuelu; Gao, Jiyue et al. (2019): TIGAR Promotes Tumorigenesis and Protects Tumor Cells From Oxidative and Metabolic Stresses in Gastric Cancer. In: *Frontiers in oncology* 9, S. 1258. DOI: 10.3389/fonc.2019.01258.
- Llovet, Josep M.; Baere, Thierry de; Kulik, Laura; Haber, Philipp K.; Greten, Tim F.; Meyer, Tim; Lencioni, Riccardo (2021a): Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18 (5), S. 293–313. DOI: 10.1038/s41575-020-00395-0.
- Llovet, Josep M.; Hernandez-Gea, Virginia (2014): Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (8), S. 2072–2079. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0547.
- Llovet, Josep M.; Kelley, Robin Kate; Villanueva, Augusto; Singal, Amit G.; Pikarsky, Eli; Roayaie, Sasan et al. (2021b): Hepatocellular carcinoma. In: *Nature reviews. Disease primers* 7 (1), S. 6. DOI: 10.1038/s41572-020-00240-3.
- Llovet, Josep M.; Kudo, Masatoshi; Merle, Philippe; Meyer, Tim; Qin, Shukui; Ikeda, Masafumi et al. (2023): Lenvatinib plus pembrolizumab versus lenvatinib plus placebo for advanced hepatocellular carcinoma (LEAP-002): a randomised, double-blind, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 24 (12), S. 1399–1410. DOI: 10.1016/S1470-2045(23)00469-2.
- Ma, Yang; Cui, Dongqian; Zhang, Yu; Han, Chen-Chen; Wei, Wei (2020): Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Promotes Proliferation and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. In: *OncoTargets and therapy* 13, S. 5083–5092. DOI: 10.2147/OTT.S249527.
- Macip, Salvador; Igarashi, Makoto; Berggren, Petra; Yu, Jian; Lee, Sam W.; Aaronson, Stuart A. (2003): Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. In: *Molecular and cellular biology* 23 (23), S. 8576–8585. DOI: 10.1128/MCB.23.23.8576-8585.2003.
- Madan, E.; Gogna, R.; Kuppusamy, P.; Bhatt, M.; Pati, U.; Mahdi, A. A. (2012): TIGAR induces p53-mediated cell-cycle arrest by regulation of RB-E2F1 complex. In: *British journal of cancer* 107 (3), S. 516–526. DOI: 10.1038/bjc.2012.260.

- Mao, Zhang; Han, Xu; Chen, Dahong; Xu, Youwei; Xu, Lina; Yin, Lianhong et al. (2019): Potent effects of dioscin against hepatocellular carcinoma through regulating TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR)-mediated apoptosis, autophagy, and DNA damage. In: *British Journal of Pharmacology* 176 (7), S. 919–937. DOI: 10.1111/bph.14594.
- Martindale, Jennifer L.; Holbrook, Nikki J. (2002): Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. In: *Journal of Cellular Physiology* 192 (1), S. 1–15. DOI: 10.1002/jcp.10119.
- Mason, Meredith C.; Massarweh, Nader N.; Salami, Aitua; Sultenfuss, Mark A.; Anaya, Daniel A. (2015): Post-embolization syndrome as an early predictor of overall survival after transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 17 (12), S. 1137–1144. DOI: 10.1111/hpb.12487.
- Mavinahalli, Jagadeesh N.; Madhumalar, Arumugam; Beuerman, Roger W.; Lane, David P.; Verma, Chandra (2010): Differences in the transactivation domains of p53 family members: a computational study. In: *BMC genomics* 11 Suppl 1 (Suppl 1), S5. DOI: 10.1186/1471-2164-11-S1-S5.
- McGlynn, Katherine A.; Petrick, Jessica L.; El-Serag, Hashem B. (2021): Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 73 Suppl 1 (Suppl 1), S. 4–13. DOI: 10.1002/hep.31288.
- Meng, Xuan; Franklin, Derek A.; Dong, Jiahong; Zhang, Yanping (2014): MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. In: *Cancer Res* 74 (24), S. 7161–7167. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1446.
- Mihara, Motohiro; Erster, Susan; Zaika, Alexander; Petrenko, Oleksi; Chittenden, Thomas; Pancoska, Petr; Moll, Ute M. (2003): p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. In: *Molecular cell* 11 (3), S. 577–590. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00050-9.
- Momand, Jamil; Zambetti, Gerard P.; Olson, David C.; George, Donna; Levine, Arnold J. (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. In: *Cell* 69 (7), S. 1237–1245. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90644-R.
- Morrione, A.; Valentinis, B.; Xu, S. Q.; Yumet, G.; Louvi, A.; Efstratiadis, A.; Baserga, R. (1997): Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8), S. 3777–3782. DOI: 10.1073/pnas.94.8.3777.
- Mukama, Trasias; Srour, Bernard; Johnson, Theron; Katzke, Verena; Kaaks, Rudolf (2023): IGF-1 and Risk of Morbidity and Mortality From Cancer, Cardiovascular Diseases, and All Causes in EPIC-Heidelberg. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 108 (10), e1092–e1105. DOI: 10.1210/clinem/dgad212.
- Muller, Patricia A. J.; Vousden, Karen H. (2014): Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. In: *Cancer Cell* 25 (3), S. 304–317. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.021.
- Müller, M.; Schilling, T.; Sayan, A. E.; Kairat, A.; Lorenz, K.; Schulze-Bergkamen, H. et al. (2005): TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in

hepatocellular carcinoma. In: *Cell death and differentiation* 12 (12), S. 1564–1577. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401774.

Müller, M.; Strand, S.; Hug, H.; Heinemann, E. M.; Walczak, H.; Hofmann, W. J. et al. (1997): Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. In: *The Journal of clinical investigation* 99 (3), S. 403–413. DOI: 10.1172/JCI119174.

Müller, M.; Wilder, S.; Bannasch, D.; Israeli, D.; Lehlbach, K.; Li-Weber, M. et al. (1998): p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. In: *The Journal of experimental medicine* 188 (11), S. 2033–2045. DOI: 10.1084/jem.188.11.2033.

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

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

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

Niklison-Chirou, Maria Victoria; Steinert, Joern R.; Agostini, Massimiliano; Knight, Richard A.; Dinsdale, David; Cattaneo, Antonio et al. (2013): TAp73 knockout mice show morphological and functional nervous system defects associated with loss of p75 neurotrophin receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (47), S. 18952–18957. DOI: 10.1073/pnas.1221172110.

Nusrat, Salman; Khan, Muhammad S.; Fazili, Javid; Madhoun, Mohammad F. (2014): Cirrhosis and its complications: evidence based treatment. In: *WJG* 20 (18), S. 5442–5460. DOI: 10.3748/wjg.v20.i18.5442.

Okuyama, Tomoko; Kyohara, Mayu; Terauchi, Yasuo; Shirakawa, Jun (2021): The Roles of the IGF Axis in the Regulation of the Metabolism: Interaction and Difference between Insulin Receptor Signaling and IGF-I Receptor Signaling. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (13). DOI: 10.3390/ijms22136817.

Osada, Motonobu; Park, Hannah Lui; Nagakawa, Yuichi; Yamashita, Keishi; Fomenkov, Alexey; Kim, Myoung Sook et al. (2005): Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. In: *Mol Cell Biol* 25 (14), S. 6077–6089. DOI: 10.1128/MCB.25.14.6077-6089.2005.

Ozaki, Toshinori; Okoshi, Rintaro; Ono, Sayaka; Kubo, Natsumi; Nakagawara, Akira (2009): Deregulated expression of E2F1 promotes proteolytic degradation of tumor suppressor p73 and inhibits its transcriptional activity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 387 (1), S. 143–148. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.06.141.

- Panasiuk, Anatol; Dzieciol, Janusz; Panasiuk, Bozena; Prokopowicz, Danuta (2006): Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. In: *World Journal of Gastroenterology : WJG* 12 (38), S. 6198–6202. DOI: 10.3748/wjg.v12.i38.6198.
- Pascale, Rosa M.; Peitta, Graziella; Simile, Maria M.; Feo, Francesco (2019): Alterations of Methionine Metabolism as Potential Targets for the Prevention and Therapy of Hepatocellular Carcinoma. In: *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 55 (6). DOI: 10.3390/medicina55060296.
- Pelc, Agnes P. (2015): Charakterisierung von Zielgenexpressionsprofilen der p53-Familie und ihrer prognostischen Relevanz beim hepatozellulären Karzinom (HCC). Online verfügbar unter <https://www.semanticscholar.org/paper/Charakterisierung-von-Zielgenexpressionsprofilen-Pelc/4dfef6cc650353abbcf16f51acab5bb140d1aacc>.
- Perry, Mary Ellen (2010): The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (1), a000968. DOI: 10.1101/cshperspect.a000968.
- Pflaum, Johanna; Schlosser, Sophie; Müller, Martina (2014): p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. In: *Frontiers in oncology* 4, S. 285. DOI: 10.3389/fonc.2014.00285.
- Pierson, R. W.; Temin, H. M. (1972): The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. In: *Journal of Cellular Physiology* 79 (3), S. 319–330. DOI: 10.1002/jcp.1040790302.
- Pitolli, Consuelo; Wang, Ying; Candi, Eleonora; Shi, Yufang; Melino, Gerry; Amelio, Ivano (2019): p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. In: *Cancers* 11 (12). DOI: 10.3390/cancers11121983.
- Porteiro, Begoña; Fondevila, Marcos F.; Delgado, Teresa C.; Iglesias, Cristina; Imbernon, Monica; Iruzubieta, Paula et al. (2017): Hepatic p63 regulates steatosis via IKK β /ER stress. In: *Nature communications* 8, S. 15111. DOI: 10.1038/ncomms15111.
- Prokesch, Andreas; Graef, Franziska A.; Madl, Tobias; Kahlhofer, Jennifer; Heidenreich, Steffi; Schumann, Anne et al. (2017): Liver p53 is stabilized upon starvation and required for amino acid catabolism and gluconeogenesis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31 (2), S. 732–742. DOI: 10.1096/fj.201600845R.
- Qin, Shukui; Chan, Stephen L.; Gu, Shanzhi; Bai, Yuxian; Ren, Zhenggang; Lin, Xiaoyan et al. (2023): Camrelizumab plus rivoceranib versus sorafenib as first-line therapy for unresectable hepatocellular carcinoma (CARES-310): a randomised, open-label, international phase 3 study. In: *Lancet (London, England)* 402 (10408), S. 1133–1146. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00961-3.
- Rajah, R.; Katz, L.; Nunn, S.; Solberg, P.; Beers, T.; Cohen, P. (1995): Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. In: *Progress in growth factor research* 6 (2-4), S. 273–284. DOI: 10.1016/0955-2235(95)00012-7.
- Ranke, Michael B.; Maier, Klaus-Peter; Schweizer, Roland; Stadler, Bernd; Schleicher, Sabine; Elmlinger, Martin W.; Flehmig, Bertram (2003): Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. In: *Hormone research* 60 (4), S. 174–180. DOI: 10.1159/000073229.

- Raoul, Jean-Luc; Adhoute, Xavier; Penaranda, Guillaume; Perrier, Hervé; Castellani, Paul; Oules, Valérie; Bourlière, Marc (2019): Sorafenib: Experience and Better Management of Side Effects Improve Overall Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients: A Real-Life Retrospective Analysis. In: *Liver cancer* 8 (6), S. 457–467. DOI: 10.1159/000497161.
- Reig, Maria; Forner, Alejandro; Rimola, Jordi; Ferrer-Fàbrega, Joana; Burrel, Marta; Garcia-Criado, Ángeles et al. (2022): BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. In: *Journal of Hepatology* 76 (3), S. 681–693. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.11.018.
- Riley, Todd; Sontag, Eduardo; Chen, Patricia; Levine, Arnold (2008): Transcriptional control of human p53-regulated genes. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (5), S. 402–412. DOI: 10.1038/nrm2395.
- Rimassa, Lorenza; Finn, Richard S.; Sangro, Bruno (2023): Combination immunotherapy for hepatocellular carcinoma. In: *Journal of Hepatology* 79 (2), S. 506–515. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.03.003.
- Rinderknecht, E.; Humbel, R. E. (1978): Primary structure of human insulin-like growth factor II. In: *FEBS letters* 89 (2), S. 283–286. DOI: 10.1016/0014-5793(78)80237-3.
- Rivankar, Sangeeta (2014): An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. In: *J Can Res Ther* 10 (4), S. 853–858. DOI: 10.4103/0973-1482.139267.
- Robertson, K. D.; Jones, P. A. (1998): The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. In: *Mol Cell Biol* 18 (11), S. 6457–6473. DOI: 10.1128/MCB.18.11.6457.
- Rozenberg, Julian M.; Zvereva, Svetlana; Dalina, Aleksandra; Blatov, Igor; Zubarev, Ilya; Luppov, Daniil et al. (2021): The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response. In: *Biol Direct* 16 (1). DOI: 10.1186/s13062-021-00307-5.
- Rumgay, Harriet; Ferlay, Jacques; Martel, Catherine de; Georges, Damien; Ibrahim, Amal Samy; Zheng, Rongshou et al. (2022): Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 161, S. 108–118. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.11.023.
- Russo, V. C.; Azar, W. J.; Yau, S. W.; Sabin, M. A.; Werther, G. A. (2015): IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer. In: *Cytokine & growth factor reviews* 26 (3), S. 329–346. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.12.001.
- Sablina, Anna A.; Budanov, Andrei V.; Ilyinskaya, Galina V.; Agapova, Larissa S.; Kravchenko, Julia E.; Chumakov, Peter M. (2005): The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. In: *Nature medicine* 11 (12), S. 1306–1313. DOI: 10.1038/nm1320.
- Salmon, W. D.; Daughaday, W. H. (1957): A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 49 (6), S. 825–836. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13429201/>.
- Sauer, Markus; Bretz, Anne Catherine; Beinoraviciute-Kellner, Rasa; Beitzinger, Michaela; Burek, Christof; Rosenwald, Andreas et al. (2008): C-terminal diversity within the p53 family accounts for differences in DNA binding and transcriptional activity. In: *Nucleic Acids Research* 36 (6), S. 1900–1912. DOI: 10.1093/nar/gkn044.

- Schaffner, Fenton; Popper, Hans (1963): Capillarization of Hepatic Sinusoids in Man. In: *Gastroenterology* 44 (3), S. 239–242. DOI: 10.1016/S0016-5085(63)80130-4.
- Schilling, Tobias; Schleithoff, Elisa Schulze; Kairat, Astrid; Melino, Gerry; Stremmel, Wolfgang; Oren, Moshe et al. (2009): Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. In: *Biochemical and biophysical research communications* 387 (2), S. 399–404. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.07.063.
- Schlosser, Sophie; Tümen, Deniz; Volz, Barbara; Neumeyer, Katja; Egler, Niklas; Kunst, Claudia et al. (2022): HCC biomarkers - state of the old and outlook to future promising biomarkers and their potential in everyday clinical practice. In: *Frontiers in oncology* 12, S. 1016952. DOI: 10.3389/fonc.2022.1016952.
- Schuppan, Detlef; Afdhal, Nezam H. (2008): Liver cirrhosis. In: *The Lancet* 371 (9615), S. 838–851. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9.
- Schuster, André; Schilling, Tobias; Laurenzi, Vincenzo de; Koch, Andreas F.; Seitz, Sarah; Staib, Frank et al. (2010): $\Delta Np73\beta$ is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (13), S. 2629–2639. DOI: 10.4161/cc.9.13.12110.
- Seitz, Sarah J.; Schleithoff, Elisa Schulze; Koch, Andreas; Schuster, André; Teufel, Andreas; Staib, Frank et al. (2010): Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. In: *International journal of cancer* 126 (9), S. 2049–2066. DOI: 10.1002/ijc.24861.
- Sethi, Isha; Romano, Rose-Anne; Gluck, Christian; Smalley, Kirsten; Vojtesek, Borivoj; Buck, Michael J.; Sinha, Satrajit (2015): A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. In: *BMC genomics* 16, S. 584. DOI: 10.1186/s12864-015-1793-9.
- Shahini, Endrit; Pasculli, Giuseppe; Solimando, Antonio Giovanni; Tiribelli, Claudio; Cozzolongo, Raffaele; Giannelli, Gianluigi (2023): Updating the Clinical Application of Blood Biomarkers and Their Algorithms in the Diagnosis and Surveillance of Hepatocellular Carcinoma: A Critical Review. In: *International Journal of Molecular Sciences* 24 (5). DOI: 10.3390/ijms24054286.
- Shen, Ai; Liu, Shihong; Yu, Weiqian; Deng, Hejun; Li, Qingdong (2015): p53 gene therapy-based transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: A prospective cohort study. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 30 (11), S. 1651–1656. DOI: 10.1111/jgh.13009.
- Shimasaki, S.; Ling, N. (1991): Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). In: *Progress in growth factor research* 3 (4), S. 243–266. DOI: 10.1016/0955-2235(91)90003-m.
- Shiraha, Hidenori; Yamamoto, Kazuhide; Namba, Masayoshi (2013): Human hepatocyte carcinogenesis (review). In: *International journal of oncology* 42 (4), S. 1133–1138. DOI: 10.3892/ijo.2013.1829.
- Silva, M. A.; Hegab, B.; Hyde, C.; Guo, B.; Buckels, J. A. C.; Mirza, D. F. (2008): Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. In: *Gut* 57 (11), S. 1592–1596. DOI: 10.1136/gut.2008.149062.

- Staib, Frank; Hussain, S. Perwez; Hofseth, Lorne J.; Wang, Xin W.; Harris, Curtis C. (2003): TP53 and liver carcinogenesis. In: *Hum. Mutat.* 21 (3), S. 201–216. DOI: 10.1002/humu.10176.
- Stewart, C. E.; Rotwein, P. (1996): Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. In: *Physiological reviews* 76 (4), S. 1005–1026. DOI: 10.1152/physrev.1996.76.4.1005.
- Sugo, H.; Takamori, S.; Kojima, K.; Beppu, T.; Futagawa, S. (1999): The significance of p53 mutations as an indicator of the biological behavior of recurrent hepatocellular carcinomas. In: *Surg Today* 29 (9), S. 849–855. DOI: 10.1007/BF02482774.
- Sung, Hyuna; Ferlay, Jacques; Siegel, Rebecca L.; Laversanne, Mathieu; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 71 (3), S. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas (2007). Online verfügbar unter <https://booksca.ca/wp-content/uploads/xpreview/surgery/4/blumgart's-surgery-of-the-liver-6th-edition-by-william-r-jarnagin.pdf>.
- Surget, Sylvanie; Khoury, Marie P.; Bourdon, Jean-Christophe (2013): Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. In: *OncoTargets and therapy* 7, S. 57–68. DOI: 10.2147/OTT.S53876.
- Tang, Jie; Chen, Lei; Qin, Zheng-Hong; Sheng, Rui (2021): Structure, regulation, and biological functions of TIGAR and its role in diseases. In: *Acta pharmacologica Sinica* 42 (10), S. 1547–1555. DOI: 10.1038/s41401-020-00588-y.
- Taniguchi, Ken; Roberts, Lewis R.; Aderca, Ileana N.; Dong, Xiangyang; Qian, Chiping; Murphy, Linda M. et al. (2002): Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. In: *Oncogene* 21 (31), S. 4863–4871. DOI: 10.1038/sj.onc.1205591.
- Tannapfel, Andrea; John, Katja; Mise, Nikica; Schmidt, Anke; Buhlmann, Sven; Ibrahim, Saleh M.; Pützer, Brigitte M. (2008): Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. In: *Carcinogenesis* 29 (1), S. 211–218. DOI: 10.1093/carcin/bgm236.
- Tao, Yungan; Pinzi, Valentina; Bourhis, Jean; Deutsch, Eric (2007): Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. In: *Nature clinical practice. Oncology* 4 (10), S. 591–602. DOI: 10.1038/ncponc0934.
- Terrinoni, Alessandro; Ranalli, Marco; Cadot, Bruno; Leta, Aida; Bagetta, Giacinto; Vousden, Karen H.; Melino, Gerry (2004): p73-alpha is capable of inducing scotin and ER stress. In: *Oncogene* 23 (20), S. 3721–3725. DOI: 10.1038/sj.onc.1207342.
- Tissir, Fadel; Ravni, Aurélia; Achouri, Younès; Riethmacher, Dieter; Meyer, Gundela; Goffinet, Andre M. (2009): DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (39), S. 16871–16876. DOI: 10.1073/pnas.0903191106.
- Trefts, Elijah; Gannon, Maureen; Wasserman, David H. (2017): The liver. In: *Current biology : CB* 27 (21), R1147-R1151. DOI: 10.1016/j.cub.2017.09.019.

- Tripathi, Anupriya; Debelius, Justine; Brenner, David A.; Karin, Michael; Loomba, Rohit; Schnabl, Bernd; Knight, Rob (2018): The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15 (7), S. 397–411. DOI: 10.1038/s41575-018-0011-z.
- Truong, Dong-Jiunn Jeffery; Phlairaharn, Teeradon; Eßwein, Bianca; Gruber, Christoph; Tümen, Deniz; Baligács, Enikő et al. (2021): Non-invasive and high-throughput interrogation of exon-specific isoform expression. In: *Nature cell biology* 23 (6), S. 652–663. DOI: 10.1038/s41556-021-00678-x.
- Tsochatzis, Emmanuel A.; Bosch, Jaime; Burroughs, Andrew K. (2014): Liver cirrhosis. In: *The Lancet* 383 (9930), S. 1749–1761. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5.
- Tümen, Deniz; Heumann, Philipp; Gülow, Karsten; Demirci, Cagla-Nur; Cosma, Lidia-Sabina; Müller, Martina; Kandulski, Arne (2022): Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. In: *Biomedicines* 10 (12). DOI: 10.3390/biomedicines10123202.
- Twigg, S. M.; Baxter, R. C. (1998): Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (11), S. 6074–6079. DOI: 10.1074/jbc.273.11.6074.
- van den Brande, J. L. (1999): A personal view on the early history of the insulin-like growth factors. In: *Hormone research* 51 Suppl 3, S. 149–175. DOI: 10.1159/000053178.
- van Duong Huyen, J-P; Amri, K.; Bélair, M-F; Vilar, J.; Merlet-Bénichou, C.; Bruneval, P.; Lelièvre-Pégorier, M. (2003): Spatiotemporal distribution of insulin-like growth factor receptors during nephrogenesis in fetuses from normal and diabetic rats. In: *Cell and tissue research* 314 (3), S. 367–379. DOI: 10.1007/s00441-003-0803-4.
- Vanbokhoven, Hans; Melino, Gerry; Candi, Eleonora; Declercq, Wim (2011): p63, a story of mice and men. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (6), S. 1196–1207. DOI: 10.1038/jid.2011.84.
- Vassilev, Lyubomir T.; Vu, Binh T.; Graves, Bradford; Carvajal, Daisy; Podlaski, Frank; Filipovic, Zoran et al. (2004): In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5659), S. 844–848. DOI: 10.1126/science.1092472.
- Vieler, Maximilian; Sanyal, Suparna (2018): p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. In: *Cancers* 10 (9). DOI: 10.3390/cancers10090288.
- Vilarinho, Silvia; Erson-Omay, E. Zeynep; Harmanci, Akdes Serin; Morotti, Raffaella; Carrion-Grant, Geneive; Baranoski, Jacob et al. (2014): Paediatric hepatocellular carcinoma due to somatic CTNNB1 and NFE2L2 mutations in the setting of inherited bi-allelic ABCB11 mutations. In: *Journal of Hepatology* 61 (5), S. 1178–1183. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.003.
- Vogel, A.; Cervantes, A.; Chau, I.; Daniele, B.; Llovet, J. M.; Meyer, T. et al. (2018): Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (Suppl 4), iv238–iv255. DOI: 10.1093/annonc/mdy308.

- Vogel, Arndt; Meyer, Tim; Sapisochin, Gonzalo; Salem, Riad; Saborowski, Anna (2022): Hepatocellular carcinoma. In: *Lancet (London, England)* 400 (10360), S. 1345–1362. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01200-4.
- Vousden, Karen H. (2002): Activation of the p53 tumor suppressor protein. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1602 (1), S. 47–59. DOI: 10.1016/S0304-419X(02)00035-5.
- Vousden, Karen H.; Lu, Xin (2002): Live or let die: the cell's response to p53. In: *Nat Rev Cancer* 2 (8), S. 594–604. DOI: 10.1038/nrc864.
- Wang, Xingwu; Zhao, Xiaocheng; Gao, Xiang; Mei, Yide; Wu, Mian (2013): A new role of p53 in regulating lipid metabolism. In: *Journal of molecular cell biology* 5 (2), S. 147–150. DOI: 10.1093/jmcb/mjs064.
- Wang, Y.; Fu, J. X.; Zhang, J. L.; Yuan, K.; Yuan, B.; Yuan, H. J. et al. (2018): Transarterial chemoembolization with bleomycin treatment for moderate-advanced hepatocellular carcinoma. In: *Zhonghua yi xue za zhi* 98 (39), S. 3166–3170. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.39.008.
- Wanka, Christina; Steinbach, Joachim P.; Rieger, Johannes (2012): Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (40), S. 33436–33446. DOI: 10.1074/jbc.M112.384578.
- Weber, J. D.; Taylor, L. J.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J.; Bar-Sagi, D. (1999): Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. In: *Nature cell biology* 1 (1), S. 20–26. DOI: 10.1038/8991.
- Wei, Lai-Feng; Weng, Xue-Fen; Huang, Xu-Chun; Peng, Yu-Hui; Guo, Hai-Peng; Xu, Yi-Wei (2021): IGFBP2 in cancer: Pathological role and clinical significance (Review). In: *Oncology reports* 45 (2), S. 427–438. DOI: 10.3892/or.2020.7892.
- Wetzel, Monica K.; Naska, Sibel; Laliberté, Christine L.; Rymar, Vladimir V.; Fujitani, Masashi; Biernaskie, Jeffrey A. et al. (2008): p73 regulates neurodegeneration and phospho-tau accumulation during aging and Alzheimer's disease. In: *Neuron* 59 (5), S. 708–721. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.07.021.
- Wilde, Benjamin; Katsounas, Antonios (2019): Immune Dysfunction and Albumin-Related Immunity in Liver Cirrhosis. In: *Mediators of Inflammation* 2019, S. 7537649. DOI: 10.1155/2019/7537649.
- Won, Kyu Yeoun; Lim, Sung-Jig; Kim, Gou Young; Kim, Youn Wha; Han, Sang-Ah; Song, Jeong Yoon; Lee, Dong-Ki (2012): Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. In: *Human pathology* 43 (2), S. 221–228. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.04.021.
- Woodstock, Dana L.; Sammons, Morgan A.; Fischer, Martin (2021): p63 and p53: Collaborative Partners or Dueling Rivals? In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 701986. DOI: 10.3389/fcell.2021.701986.
- Wu, Chen; Liu, Xiaobo; Wang, Yuanyuan; Tian, Huanna; Xie, Yuanyuan; Li, Qinjian et al. (2013): Insulin-like factor binding protein-3 promotes the G1 cell cycle arrest in several cancer cell lines. In: *Gene* 512 (1), S. 127–133. DOI: 10.1016/j.gene.2012.09.080.

- Xie, Jia-Ming; Li, Bin; Yu, Hong-Pei; Gao, Quan-Geng; Li, Wei; Wu, Hao-Rong; Qin, Zheng-Hong (2014): TIGAR has a dual role in cancer cell survival through regulating apoptosis and autophagy. In: *Cancer research* 74 (18), S. 5127–5138. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3517.
- Yang, A.; Kaghad, M.; Wang, Y.; Gillett, E.; Fleming, M. D.; Dötsch, V. et al. (1998): p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. In: *Molecular Cell* 2 (3), S. 305–316. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80275-0.
- Yang, A.; Walker, N.; Bronson, R.; Kaghad, M.; Oosterwegel, M.; Bonnin, J. et al. (2000): p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. In: *Nature* 404 (6773), S. 99–103. DOI: 10.1038/35003607.
- Yang, Yili; Ludwig, Robert L.; Jensen, Jane P.; Pierre, Shervon A.; Medaglia, Maxine V.; Davydov, Ilia V. et al. (2005): Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. In: *Cancer Cell* 7 (6), S. 547–559. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.04.029.
- Yau, Thomas; Park, Joong-Won; Finn, Richard S.; Cheng, Ann-Lii; Mathurin, Philippe; Edeline, Julien et al. (2022): Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 459): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 23 (1), S. 77–90. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00604-5.
- Younossi, Zobair; Tacke, Frank; Arrese, Marco; Chander Sharma, Barjesh; Mostafa, Ibrahim; Bugianesi, Elisabetta et al. (2019): Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. In: *Hepatology* 69 (6), S. 2672–2682. DOI: 10.1002/hep.30251.
- Yu, Hong-Pei; Xie, Jia-Ming; Li, Bin; Sun, Yi-Hui; Gao, Quan-Geng; Ding, Zhi-Hui et al. (2015): TIGAR regulates DNA damage and repair through pentosephosphate pathway and Cdk5-ATM pathway. In: *Scientific reports* 5, S. 9853. DOI: 10.1038/srep09853.
- Zhu, J.; Zhang, S.; Jiang, J.; Chen, X. (2000): Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (51), S. 39927–39934. DOI: 10.1074/jbc.M005676200.
- Zou, Shubiao; Gu, Zhidong; Ni, Peihua; Liu, Xiangfan; Wang, Jiayi; Fan, Qishi (2012): SP1 plays a pivotal role for basal activity of TIGAR promoter in liver cancer cell lines. In: *Molecular and cellular biochemistry* 359 (1-2), S. 17–23. DOI: 10.1007/s11010-011-0993-0.
- Zou, Shubiao; Wang, Xiaozhong; Deng, Linqiang; Wang, Yunchun; Huang, Bo; Zhang, Nan et al. (2013): CREB, another culprit for TIGAR promoter activity and expression. In: *Biochemical and biophysical research communications* 439 (4), S. 481–486. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.098.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AASLD	American Association for the study of Liver Diseases
AFLD	Alkoholische Fettlebererkrankung
AFP	alpha-Fetoprotein
Akt	Ak-thymoma= Proteinkinase B
ALS	acid-label-subunit
APAF-1	apoptotic protease activating factor 1
ASPP	Apoptosis-stimulating of p53 protein
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCLC	Barcelona Clinic Liver-Cancer Classification
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
bp	Basenpaare
BR	Basic Region
BS	Bindestelle
BS	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD95	cluster of differentiation 95
CDKI	Cycline dependent kinase Inhibitor
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
DAP3	death-associated protein 3
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
DBD	DNA-Bindedomäne
Diablo	direct inhibitor of apoptosis protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FCS	Fötales Kälberserum
G1-Phase	Gap-Phase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HK2	Hexokinase 2
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IGFR	Insulin-like growth receptor

IKK β	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
kDA	kilo Dalton
LB	Lysogeny Broth
M	Mitose
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MEM	Minimal-essenzielles Medium
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLKL	mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger-RNA
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OLD	Oligomerisierungsdomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
pcDNA	Plasmid-cDNA
PFK-2/FBPase-2	6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-bisphosphatase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRD	Prolin reiche Domäne
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PUMA	p53 up-regulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rAD	rekombinantes Adenovirus
RB	Retinomablastom
RE	Response Element
RFA	Radiofrequenzablation
RIP1 Kinase	receptor-interacting serine / threonine-protein kinase 1
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S	Synthese
SAM	sterile a-motif
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRT	Sirtuin
smac	second mitochondrial-derived activator of caspase
TA	Transaktivierung
TA	Volllängenform bei p53-Familienmitgliedern
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAD	Transaktivierungsdomäne

TID	inhibitorische Einheit
TIGAR	TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL-R	
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand-Rezeptor
wt	Wildtyp

9. Aus dieser Arbeit entstandene Prämierungen und Kongressbeiträge

- Kurzvortrag 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen 2021, Leipzig
„Dosisabhängige Effekte von IGFBP2 auf die Viabilität von Hepatomzellen“
- Posterpräsentation 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen 2021, Leipzig
„Dosisabhängige Effekte von IGFBP2 auf die Viabilität von Hepatomzellen“
- Posterpräsentation auf der American Association for the Study of Liver Diseases 2021, online
“Distinct effects of IGFBP2 on viability of hepatoma cells – a matter of dose”
- Posterpräsentation auf der UEG 2021, online
“Distinct effects of IGFBP2 on viability of hepatoma cells – a matter of dose”
- Kurzvortrag auf der German Association for the Study of Liver Diseases 2022, online
„Dosisabhängige Effekte von IGFBP2 auf die Viabilität von Hepatomzellen“
- Auswahl des Abstracts zur besonderen Vorstellung durch externen Referenten auf der German Association for the Study of Liver Diseases 2022, online
„Dosisabhängige Effekte von IGFBP2 auf die Viabilität von Hepatomzelle

10. Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mir während meiner gesamten Zeit im Labor und auch danach immer mit Rat und Tat zu Seite gestanden sind. Ohne diese tolle Hilfe wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen!

An erster Stelle gilt mein Dank vor allem Frau Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling. Nicht nur für die Überlassung dieses interessanten und hochspannenden Themas, auch für die stetige Unterstützung auf allen Ebenen möchte ich mich herzlich bedanken. Sowohl persönlich als auch fachlich werde ich in Zukunft von meiner Zeit in ihrer Arbeitsgruppe profitieren. Besonders für die Möglichkeit und die Motivation, meine Daten auf zahlreichen spannenden nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren und mit anderen Wissenschaftlern zu diskutieren, möchte ich Frau Professor Müller-Schilling danken. Vielen herzlichen Dank, dass Sie nicht nur maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sondern mir vor allem als Mentorin und Betreuerin unendlich wertvolle Erkenntnisse und Erfahrungen vermittelt haben, die mir in meiner künftigen Laufbahn eine großartige Hilfe sein werden!

Ein spezieller Dank gilt auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, PD Dr. rer. nat. Claudia Kunst, PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow und auch ganz besonders Elisabeth Aschenbrenner, die mir auch noch zum zehnten Mal alles seelenruhig und geduldig erklärte und mir ein Jahr lang treu zur Seite stand. Auch Kirstin Pollinger, Deniz Tümen, Marlen Michalski, Heidi Gschwendtner und Manuela Gunckel möchte ich für ihr jederzeit offenes Ohr herzlich danken. Durch dieses Team wurde die Zeit im Labor nicht nur fachlich, sondern auch menschlich eine ungemein bereichernde Zeit, die ich um nichts missen möchte und sehr vermissen werde.

Von ganzem Herzen danke ich auch der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg für das entgegengebrachte Vertrauen und die Förderung meiner Doktorarbeit mit einem Promotionsstipendium.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir in den letzten 25 Jahren bedingungslos zur Seite standen und mich immer unterstützt haben.

11. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Frederik Paul Kolligs

Geburtsdatum: 23.07.1997

Heimatort: München

Telefon: [REDACTED]

E-Mail: [REDACTED]



Akademischer [REDACTED]

09/2007-07/2015

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Gymnasium der Benediktiner Schäftlarn

09/2015-02/2016

Sprachschule

EF Language School Boston und Los Angeles, USA

Abschluss: Cambridge Certificate in English as a foreign Language, Grade A, entsprechend Sprachniveau C2

10/2016 – 11/2023

Studium der Humanmedizin

Universität Regensburg

3. Staatsexamen am 30.11.2023

02/2021-10/2021

Promotionsstipendium

Forschungsstipendium der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

02/2019	Famulatur Orthopädie/Unfallchirurgie Dominikus Krankenhaus Berlin-Hermsdorf
09/2019	Famulatur Innere Medizin und Gastroenterologie Dominikus Krankenhaus Berlin-Hermsdorf und Universitätsklinikum Regensburg
11/2020-11/2021	Mitarbeit mobiles Corona-Testzentrum 21Dx GmbH Durchführung von Probenentnahmen im Rahmen von Corona- Teststrecken in Bayern
03/2020	Famulatur Intensivstation Universitätsklinikum Regensburg
03/2020-02/2021	Pflegehelfer auf einer Corona-Intensivstation Universitätsklinikum Regensburg
03/2022	Famulatur Allgemeinmedizin Praxis Dr. Krekeler/ Dr. Kolligs, Hohen-Neuendorf
11/2022-03/2023	PJ Innere Medizin Klinikum München-Schwabing Abteilungen für Kardiologie und Endokrinologie
03/2023 – 07/2023	PJ Chirurgie King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand Korle Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana
07/2023 – 10/2023	PJ Urologie Vivantes Klinikum am Urban, Berlin
06/2024 - 10/2024	BSD Wiesentheid Honorararzt beim Blutspendedienst, BRK

08/2018 – heute

Doktorarbeit

„Die Bedeutung der p53-IGF-Achse für Homöostase und Metabolismus von humanen Leberzellen“

Klinik für Gastroenterologie der Universität Regensburg

Betreuerin: Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift, C2
Latein	Großes Latinum
Französisch	Fortgeschritten, B1
Japanisch	Anfänger, A1



Frederik Paul Kolligs

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die Anregung zur Durchführung dieser Dissertation erfolgte durch Prof. Dr. Martina Müller-Schilling, die auch die Ausarbeitung überwachte.

München, den 05.07.2024

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Kolligs', with a stylized, flowing script.

Frederik Paul Kolligs