

Heiko Matthias Mundt

Dr. med.

Die Rolle des p53 Familienmitglieds p63 für die Apoptoseinduktion, das Therapieansprechen und die Prognose des Hepatozellulären Karzinoms (HCC)

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

Die p53 Familie spielt eine elementare Rolle in der modernen Krebsforschung und ist daher Gegenstand häufiger Untersuchungen. Nach und nach konnten p53 verschiedenste Funktionen zugeordnet werden, wie z.B. Zellzyklus- und Apoptoseinduktion, Zellentwicklung, Differenzierung, Genamplifizierung, DNA-Rekombination, chromosomale Segregation, DNA Reparatur und die zelluläre Seneszenz. Mit der Entdeckung der Mitglieder p63 und p73, die für Proteine mit p53-agonistischen (TAp63, TAp73) und für Proteine mit p53-antagonistischen (DNp63, DNp73) Effekten kodieren, gewann das Netzwerk an Komplexität. In vielen Tumoren sind die TA Isoformen von p63 inaktiviert (Blase, CML, Mamma) und die DN Isoformen überexprimiert (Mamma, Ovar, HNO-Tumore, Lunge), was darauf schließen lässt, dass das komplexe Zusammenspiel und die Balance der Isoformen einen bedeutenden Einfluss auf die Karzinogenese und Tumorentwicklung haben.

Wir untersuchten daher die Rolle von DNp63 α , die am häufigsten exprimierte Isoform in menschlichen Tumoren, auf seine Einflüsse und Interaktionen in der Signalkaskade der Apoptose und seine Rolle beim Ansprechen auf Chemotherapeutika. Ziel dieser Dissertation war unter anderem eine fundierte Analyse der Chemoresistenz beim HCC, um diese mit neuen Therapiestrategien zu überwinden und damit die Therapie und die Prognose für Patienten mit HCC zu verbessern.

Unsere Ergebnisse etablieren DNp63 α als Onkogen, da DNp63 α die TAp63 α - und Chemotherapie-vermittelte Apoptose hemmt. In molekularen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die TAp63 α -vermittelte Induktion des CD95 Todesrezeptors auf Gen- und Proteinebene durch DNp63 α gehemmt wird. Zudem antagonisiert DNp63 α die TAp63 α -induzierte mitochondriale Apoptose. Dies geschieht durch Interaktion mit den proapoptotischen Bcl-2 Proteinen Bax, Bim, Noxa, Perp und Puma. Somit inhibiert DNp63 α die zentralen Apoptose-Signalwege und induziert durch Interaktion mit dem extrinsischen und

intrinsischen Signalweg Apoptose- bzw. Chemoresistenz beim HCC. Unseren Ergebnissen zufolge kann eine Verstärkung der TAp63 Wirkung bzw. Hemmung von DNp63 oder die Beeinflussung des Gleichgewichts von TAp63 und DNp63 Isoformen eine neue Therapieoption für das HCC darstellen.

Wir prüften nun inwieweit diese Ergebnisse der TAp63 α -vermittelten Effekte in Hep3B Zellen auf den Menschen *in vivo* übertragbar sind. Zum Vergleich mit „*in vivo*“ verwendeten wir das Genexpressionsmuster von TAp63 α in Hep3B Zellen und verglichen es mit dem Microarraydatensatz von 141 humanen HCC Fällen von Lee et al, der anhand des Genexpressionsmusters zwei Subgruppen identifizierte, die signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert waren. Die Clusterung der 141 HCC Fälle mit den TAp63 α Zielgenen erbrachte ebenfalls eine Aufteilung in zwei prognostisch relevante Subgruppen. Demnach ist das Genexpressionsprofil von p63 für Patienten mit HCC prognostisch relevant. Dies verdeutlicht, dass p63 nicht nur ein bestimmender Faktor für die Apoptose und das Antwortverhalten auf Chemotherapie, sondern auch für das Überleben von Patienten mit HCC ist. Diese Ergebnisse auf Genexpressionsebene konnten wir in einem nächsten Schritt auf zellulärer Ebene validieren. Wir prüften dabei beispielhaft für eines der prognostisch relevanten Gene die Einflüsse von TA und DNp63 α auf Mcl-1, denn Mcl-1, anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, wird in mehr als der Hälfte aller HCC Gewebe überexprimiert und spielt daher eine bedeutende Rolle bei der Apoptose- und folglich Chemoresistenz. Wir konnten nun erstmals zeigen, dass p63 Mcl-1 transkriptionell reguliert. Während TAp63 α ein entscheidender Repressor des Mcl-1 Gens ist, agiert die Dominant Negative Isoform DNp63 α als dessen Transaktivator. Diese Regulation stellt einen Mechanismus dar, über den p63 mit seinen TA und DN Isoformen die Apoptose, das Chemotherapieansprechen und die Prognose beim HCC beeinflusst. Somit stellen sowohl die TA und DNp63 Isoformen, als auch Mcl-1 selbst, viel versprechende molekulare Zielstrukturen für zukünftige Therapiestrategien beim HCC dar.

Im Anschluss daran versuchten wir das prognostisch günstige Genexpressionsprofil der TAp63 α -regulierten Gene therapeutisch zu beeinflussen, um die Therapie des HCC entsprechend dem genetischen Profil zu verbessern. Wir identifizierten in einer computerbasierten Analyse mit der Datenbank Connectivity Map der Universität Harvard zahlreiche Wirkstoffe, die mit Ihren Eigenschaften das prognostisch günstige Genexpressionsprofil von p63 widerspiegeln. Viele dieser Wirkstoffe werden bereits auf Zell- und Tiermodellebene alleine oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zur Behandlung von Malignomen eingesetzt und kommen daher auch als potenzielle

Therapeutika beim HCC in Frage. Dieser Weg von der Genexpressionsebene zu einer therapeutischen Konsequenz eröffnet neue Wege zur Erweiterung und Verbesserung der Therapie beim HCC und vielleicht einen Ausgangspunkt für die genspezifische Therapie.