

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor Prof. Dr. Frank Dombrowski)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

## **Die FOXM1-abhängige Regulation der Helikase HELLS im hepatozellulären Karzinom**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

Greifswald

2025

vorgelegt von:

Stefanie Tania Schuller  
geboren am 27.09.1995  
in Hamburg

Dekan: Herr Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Stephan Singer

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Carolin Mogler

Ort, Raum: Hörsaal des Institutes für Pathologie, Universitätsmedizin Greifswald

Tag der Disputation: 17. Oktober 2025

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	4
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 DAS TUMORSUPPRESSOR-PROTEIN P53 UND SEINE ROLLE IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM .....	7
1.2 DIE HELIKASE HELLS IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM .....	9
1.3 DAS FORKHEAD BOX PROTEIN M1 .....	10
1.4 ZIELSETZUNG .....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1 ZELLKULTUR UND ARZNEIMITTELBEHANDLUNG.....	13
2.2 TRANSFEKTION VON SIRNA UND PLASMIDEN .....	13
2.3 GELELEKTROPHORESE UND WESTERNBLOT .....	14
2.4 RNA ISOLIERUNG, cDNA-SYNTHESE UND QUANTITATIVE REAL-TIME-PCR .....	15
2.5 IDENTIFIZIERUNG EINER NICHT-KANONISCHEN FOXM1 BINDUNGSSTELLE IM <i>HELLS</i> GEN .....	16
2.6 FOXM1 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION.....	16
2.7 STATISTISCHE ANALYSEN UND SOFTWARE .....	18
3 ERGEBNISSE.....	19
4.1 DIE P53-ABHÄNGIGE REPRESSION VON <i>HELLS</i> IST P21-VERMITTELT .....	19
4.2 DIE P53/P21-ABHÄNGIGE <i>HELLS</i> REPRESSION BEINHÄLTET EINE HERUNTERREGULATION VON <i>FOXM1</i> .....	21
4.3 DAS <i>HELLS</i> GEN WEIST EINE BINDUNGSSTELLE FÜR FOXM1 AUF .....	24
4.4 <i>HELLS</i> UND <i>FOXM1</i> KORRELIEREN AUF MRNA EBENE IN HUMANEN HCC KOHORTEN .....	25
4.5 <i>HELLS</i> UND <i>FOXM1</i> EXPRESSION IN HUMANEN MAMMA- UND LUNGENKARZINOM KOHORTEN.....	27
4 DISKUSSION .....	29
5 ZUSAMMENFASSUNG .....	34
6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	35
7 LITERATURVERZEICHNIS .....	36
8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	46

## Abkürzungsverzeichnis

BRCA	Breast Cancer Gene
BRM	BRAHMA Protein
CARM1	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CDH1	Cadherin 1
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN	Cyclin dependent kinase Inhibitor
CHR	Cell cycle gene homology region
CKS1	CDC28 Proteinkinase Subunity 1
CREB3L3	CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 3
DEN/PB	Diethylnitrosamine/ Phenobarbital
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
DREAM	The dimerization Partner RB-like, E2F and multi-vulval class B
DUSP1	Dual specificity protein phosphatase 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBP1	Fructose Bisphosphatase 1
FOXM1	Forkhead box protein M1
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45
GCN5	General control non-derepressible 5
HAT	Histonacetyltransferase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HELLS	Lymphoid Specific Helicase
HTH	Helix turned Helix
H2A.Z	Histone variant H2A.Z
IGFBP3	Insuline like growth factor binding protein 3
LUAD	Lung Adenocarcinoma
MARCA2	SWI/SNF-related matri- associated actin-dependent regulator of chromatin Subfamily A, member 2

MDM2	Murin double minute 2
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMB	Myb/MuyB Komplex
mRNA	Messenger-RNA
pCAF	p300/CBP associated factor
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-L1	Programmed cell death ligand-1
PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1
P21	Protein 21
p300/CBP	p300 CREB-binding protein
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma virus
RE	Response Elements
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS/PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SKP2	S-phase kinase associated protein 2
SMARCAL1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1
SMARCA4/ BRG1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4
SMARCB1/INI1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1
SNF2	Saccharose-Nichtfermentierungsmutante
SWI2	Mating-Type Switching-Mutante
SWR1	SWI2/SNF2-Related 1 Chromatin Remodeling Complex
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20
TP53	Tumor Protein 53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp

XAF1

5-FU

XIAP associated factor 1

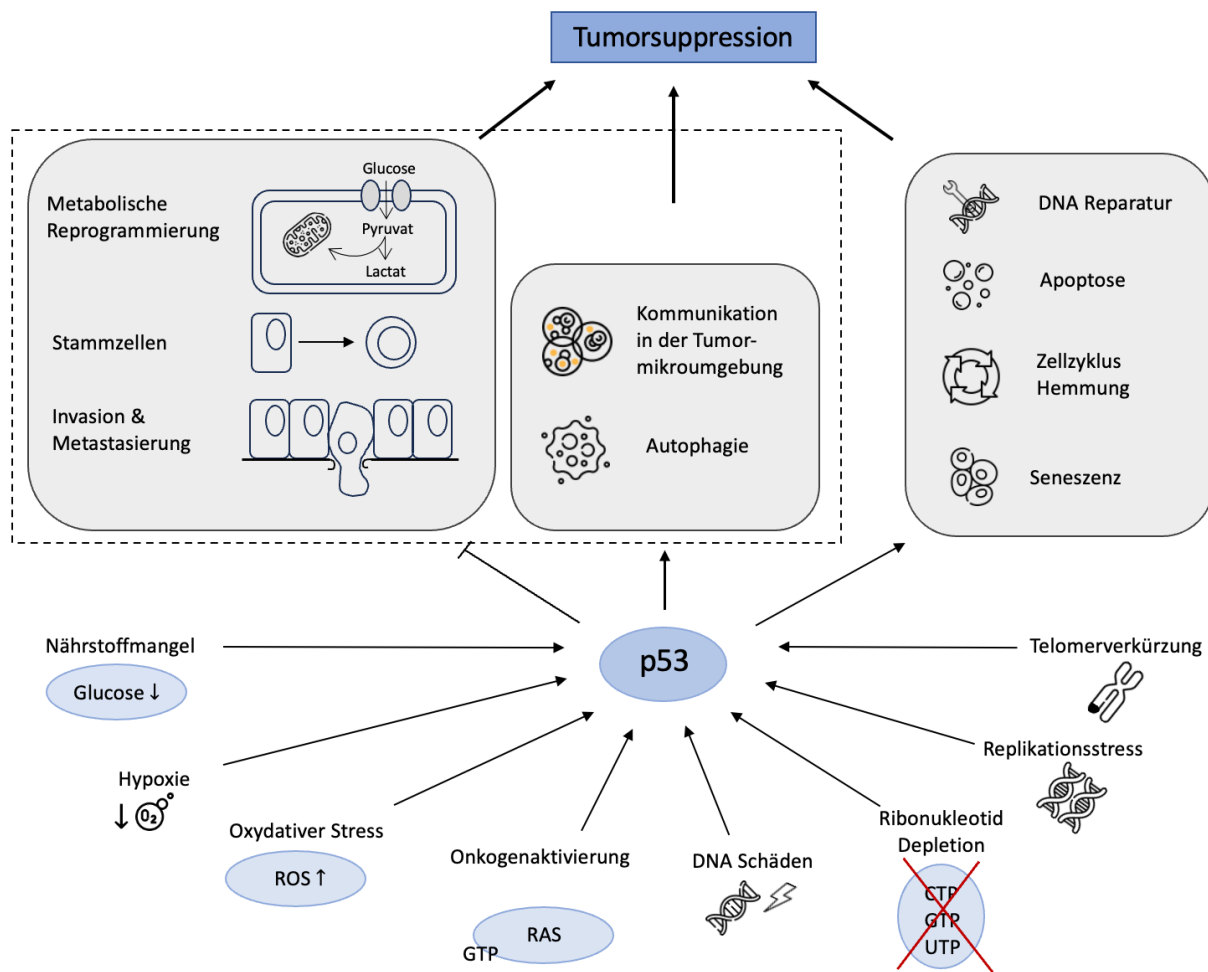
5-Fluorouracil

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Tumorsuppressor-Protein P53 und seine Rolle im hepatozellulären Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit einem Anteil von etwa 75% der häufigste Typ des primären Leberkrebses [1]. Weltweit stellt das HCC die dritthäufigste krebisbedingte Todesursache [2, 3] dar und ist gekennzeichnet durch eine schlechte Prognose [3, 4], deutlich begrenzte Therapiemöglichkeiten [5] und hohe Rezidivraten bei einer durchschnittlichen 5 Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von < 20% [3, 6]. Geschätzt erkrankten weltweit über 900.000 Menschen im Jahr 2020 an primärem Leberkrebs [7] und bis 2025 beträgt die geschätzte Inzidenz des primären Leberkrebses > 1 Millionen Fälle [8]. Einer der wesentlichen molekularbiologischen Schlüsselregulatoren in malignen hepatischen Neoplasien und generell das am häufigsten mutierte Gen im Krebsgenom stellt das Tumorsuppressor-Protein/Gen *TP53* dar [9, 10, 11]. Es fungiert als multifunktionaler Transkriptionsfaktor mit der zentralen Aufgabe, die Sicherung und Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität zu überwachen [12] und wirkt somit als eine wesentliche Barriere gegen maligne Transformation und Progression [13, 14]. In 10 – 50% der hepatozellulären Karzinome lassen sich *TP53* – Mutationen (abhängig von Ätiologie, Risikofaktoren, Infektionsstatus mit HBV- und HCV, sowie Exposition gegenüber Aflatoxin) nachweisen, die typischerweise mit einer schlechteren Prognose sowie einem verringerten Therapieansprechen im Vergleich zum Wildtyp (WT) *TP53* Status assoziiert sind [13, 15]. Dies verdeutlicht die zentrale Bedeutung von *TP53/P53* in der (Hepato-) Karzinogenese. Über verschiedene Stressoren wie u.a. DNA-Schäden, Hypoxie, Onkogenaktivierung und metabolische Dysfunktionen wird P53 induziert und bewirkt im Rahmen eines hochkomplexen Netzwerks die Expression und Repression bestimmter Zielgene, welche wiederum (je nach Schweregrad und Art des Stresses) verschiedenen P53 Antworten wie bspw. den Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Seneszens, Apoptose oder Stoffwechseladaptationen der Zelle vermitteln (s. Abb. 1) [13, 14, 16]. Eines der wichtigsten P53 Zielgene stellt der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor *P21/CDKN1A* dar [14]. P53 agiert als direkter Transkriptionsfaktor von *CDKN1A* und führt zu dessen verstärkter Expression [17, 18]. *P21/CDKN1A* gehört zu der Familie der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs), welche die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (CKs) hemmen. Die

CDKs (gemeinsam mit den Cyclinen) sind wiederum wesentliche Faktoren für die Progression der Zelle durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2) und die Mitose (M) [19, 20]. Somit ist *P21/CDKN1A* ein wichtiger Mediator des P53-induzierten Zellzyklusarrestes, kann aber auch an anderen der zuvor genannten P53 Antworten beteiligt sein [13, 21, 22]. Darüber hinaus ist P21 wesentlich in den Mechanismus der indirekten P53-abhängigen Transkriptionsrepression von Zielgenen involviert, welcher meist mit einer Repression durch den DREAM-Komplex verbunden ist und bereits für über 200 Gene beschrieben wurde [17, 18, 23, 24, 25]. Des Weiteren existiert ein komplexes Zusammenspiel zwischen dem P53-Netzwerk und Chromatin-Remodeling-Faktoren. Beispielsweise werden Histonacetyltransferasen (HATs) wie p300/CBP, pCAF, GCN5 oder TIP60 in P53-abhängiger Weise für die Histonacetylierung in der Nähe von P53-Response Elements (REs) rekrutiert, um den Zugriff der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie zu ermöglichen [14]. Ferner wird, um die Transkription von *P21/CDKN1A* nach einer DNA-Schädigung zu aktivieren, die Histonvariante H2A.Z P53-abhängig rekrutiert. Zudem interagieren PRMT1 und CARM1 über P53 mit p300/CBP, um die Transkription von *GADD45* nach UV-Bestrahlung zu ermöglichen [23]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bestimmte *TP53/P53* Mutanten die Chromatinarchitektur regulieren, indem sie eine Veränderung der Nukleosomen Besetzung durch Kooperation mit dem SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplex vermitteln [26]. Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *TP53* Gen und in Genen von Bestandteilen des SWI/SNF Komplex sich weitgehend gegenseitig ausschließen, was auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus hindeutet [27].



In Anlehnung an Attardi et al. [28]

**Abbildung 1:** Übersicht der P53-aktivierenden Signale und P53 Antworten mit Relevanz für die Tumorsuppression. Die P53-Aktivierung durch diverse Signale (Nährstoffmangel, Hypoxie, oxidativer Stress, Onkogenaktivierung u.v.m.) oder teilweise auch eine „basale“ p53 Aktivität können verschiedene Antworten hervorrufen, die zur Tumorsuppression führen [28].

## 1.2 Die Helikase HELLS im hepatozellulären Karzinom

Die SNF2/SWI2 Enzyme regulieren die Hauptkomponenten der epigenetischen Regulation - die DNA-Methylierung, die Histonmodifikation sowie den Austausch von Histonvarianten und das Chromatin-Remodeling [29, 30, 31]. Durch diese Beeinflussung der Chromatinstruktur regulieren die SNF2/SWI2 Enzyme die DNA-Zugänglichkeit und nachfolgend die Transkription von Genen [30, 31]. Die Namensgebung rührt von der damaligen Entdeckung in Hefekulturen, wonach die Benennung anhand der Reaktion in ihrer Testumgebung erfolgte: Saccharose-Nichtfermentierungsmutante (SNF2) und Mating-Type Switching-Mutante (SWI2) [32, 33]. Die humane SNF2 Enzym-Familie umfasst insgesamt 30 Enzyme, welche

basierend auf der Struktur ihrer Helikase-Domäne in sechs weitere Untergruppen zusammengefasst werden: SNF2-ähnlich, SWR1-ähnlich, SSO1653-ähnlich, RAD54-ähnlich, RAD5/16-ähnlich und SMARCAL1 [34]. Aufgrund Ihrer zentralen regulatorischen Funktion zeigen sich Mutationen innerhalb dieser Enzymfamilie in verschiedenen malignen Neoplasien (z.B. *SMARCB1/INI1* im malignen Rhabdoidtumor und im epitheloiden Sarkom, *SMARCA4/BRG1* in Lungen- und Harnblasenkarzinomen, *MARCA2/BRM* in Mammakarzinomen [35, 36, 37]). Als Teil der SNF2-ähnlichen Helikasen wurde die „lymphoidspezifische“ Helikase (LSH, *HELLS/HELLS*) von Law et al. im hepatozellulären Karzinom als signifikant überexprimiert identifiziert. *HELLS* modifiziert und reguliert die Eu- und Heterochromatinstruktur in Eukaryoten, indem es unter anderem mit der DNA Methyltransferase DNMT1 interagiert sowie dessen Aktivität und Interaktion mit Chromatin-assoziierten Proteinen moduliert [34, 38]. Auf diese Weise beeinflusst *HELLS* das DNA-Methylierungsmuster [29, 39]. Law et al. zeigten ebenfalls, dass ein *HELLS* Knockout in WT MHCC-97L Zellen zu einer verringerten Nukleosom-Okkupation der DNA führt, woraus eine veränderte Expression diverser tumorrelevanter Gene resultiert (z.B. E-Cadherin/*CDH1*, *IGFBP3*, *XAF1*, *FBP1* und *CREB3L3*) [29]. Ebenso konnte die Arbeitsgruppe darlegen, dass eine Überexpression von *HELLS* deutlich mit einem aggressiveren HCC-Phänotyp im Hinblick auf Zellproliferation, Tumorentstehung, Migration und Prognose *in vivo* korreliert und dass besonders hohe *HELLS* Expressionswerte bei *TP53*-mutierten HCCs vorliegen [29, 40]. Diese Beobachtungen legen einen Zusammenhang zwischen *HELLS* und dem P53-Netzwerk nahe, welcher jedoch bislang nicht näher untersucht wurde.

### 1.3 Das Forkhead Box Protein M1

Der Transkriptionsfaktor Forkhead Box Protein M1 (FOXO1, ebenfalls bekannt als HNF-3/ HFH-11/ MPP2/ Win/ Trident) ist Teil der Superfamilie der Forkhead Box (FOX) Proteine, welche durch die gleichnamige DNA-Bindungsdomäne charakterisiert sind [41]. Diese Fox-DNA-Bindungsdomäne ist eine hochkonservierte flügelartig konfigurierte Helix-Turn-Helix (winged HTH)-DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus zwei Alpha-Helices, welche an die DNA-Doppelhelix binden und auf diese Weise die Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen ermöglicht [42]. Neben der

üblichen Bindung mittels der Fox-DNA-Bindungsdomäne an spezifische DNA-Sequenzen ist FOXM1 zusätzlich in der Lage durch Interaktion mit dem MMB (Myb-MuvB) - Komplex an CHR Elemente (Cell cycle gene homology region) zu binden [43]. Dies ermöglicht FOXM1 eine spezifische Kontrolle der Genexpression vor allem in der G2-M-Phase des Zellzyklus [43]. Die FOX Protein Familie ist von zentraler Bedeutung für die Regulation einer Vielzahl krebsrelevanter Prozesse, wie der Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Reparatur von DNA-Schäden, der Apoptose sowie der Angiogenese [44]. Dementsprechend findet sich eine Überexpression von *FOXM1* in vielen Karzinomentitäten (z.B. Ovar, Mamma, Prostata, Colon, Lungen, Magen) inklusive dem HCC [44, 45].

Meng et al. zeigten eine direkte positive Korrelation zwischen der FOXM1-Überexpression in HCC-Patientenproben mit Tumorgröße, Gefäßinvasion und damit verbunden mit einem erhöhten TNM-Stadium [46]. Insbesondere im HCC zeigten Kalinichenko et al. die ausgeprägte Resistenzentwicklung gegen DEN/PB induzierte HCC Tumoren von *FOXM1b* Knockout Mäusen im Vergleich zu *FOXM1b* kompetenten Mäusen [47]. Park et al. demonstrierten anhand von *in-vivo* Studien mit ARF *-/-* Mäusen die Entwicklung von sehr aggressiven HCC-Tumoren durch DEN/PB-Therapie bei *FOXM1* Überexpression im Vergleich zu den Kontrollgruppen [48]. Zudem konnte die Induktion eines Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT)-ähnlichen Phänotyps durch FOXM1 gezeigt werden, welcher zu einem aggressiveren Tumormigrations- und Metastasierungsverhalten führt [46, 48]. In Übereinstimmung mit den zuvor genannten Daten bewirkt die Hemmung von FOXM1 *in vivo* wie *in vitro* eine erhöhte Apoptoserate, eine verringerte Tumorzellvitalität, -proliferation und -migration sowie eine reduzierte Angiogenese, EMT und eine verminderte Therapieresistenz [49].

Calvisi et al. stellten eine Verbindung von *FOXM1* zu der Ras/Raf/MEK/ERK Signalkaskade her, welche in über 50% der humanen HCCs aktiviert vorliegt und zu einem der wichtigsten Signalwege im Rahmen der HCC Entwicklung gehört [50, 51]. Die Ras/Raf/MEK/ERK Signalkaskade ist in zentraler Weise an der Regulation von elementaren Zellfunktionen wie Wachstum, Überleben sowie Differenzierung beteiligt und steht über die ERK (Extrazellulär signalregulierte Kinase) in Verbindung mit dem TP53 Netzwerk [50]. Anhand von *in-vitro* Untersuchungen an HuH6, HLE und SNU-182 HCC-Zellen zeigten Calvisi et al. den FOXM1-vermittelten Abbau des ERK-Inhibitors DUSP1 (Dualspezifische Phosphotase 1) über die

Transkriptionsaktivierung von SKP2 (S-Phase-Kinase assoziiertes Protein 2) und CKS1 (CDC28 Proteinkinase 1b), wodurch FOXM1 eine positive Rückkopplungsschleife zur Verstärkung der ERK-Aktivität im humanen HCC reguliert [51]. Eine Verbindung von FOXM1 zum P53 Netzwerk wurde basierend auf *in-vitro* Untersuchungen von Barsotti et al. postuliert, welche darauf hindeuten, dass *FOXM1* ein indirektes Repressionszielgen von P53 sein kann [52].

#### **1.4 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den molekularen Mechanismus der P53-abhängigen HELLS Regulation aufzuschlüsseln mit einem besonderen Fokus auf das P53 Zielgen *CDKN1A* (P21) und dem onkogenen Transkriptionsfaktor FOXM1.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur und Arzneimittelbehandlung**

Die Zelllinien HepG2 und Sk-Hep1 wurden von der ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) und die Zelllinien HLE, HLF, HUH7 und HUH6 von der JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Kansas City, KS, USA) erworben. Die Zelllinien MCF7 und A549 wurden freundlicherweise von der AG Breuhahn (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Alle genannten Zelllinien wurden mithilfe von STR-Analysen validiert (Leibniz-Institut, DSMZ, Braunschweig, Deutschland). Eine Kontamination mit Mykoplasmen wurde regelmäßig durch die Verwendung des MycoAlert™ Plus Mycoplasmen-Detektions-Kit (LT07, Lonza, Köln, Deutschland) ausgeschlossen. Die HepG2 und MCF7 Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Sigma, Taufkirchen, Deutschland); die Sk-Hep1-, HLE-, HLF-, HUH7-, HUH6- und A549 Zellen in DMEM (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) kultiviert, jeweils ergänzt durch 10%iges fetales Kälberserum und 1% Penicillin/ Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nulin-3a (N6287, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurde in DMSO (A994.2, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und bei einer Endkonzentration von 10 µM für 24- bzw. 48 Stunden verwendet.

### **2.2 Transfektion von siRNA und Plasmiden**

Die siRNA-Transfektion wurde mit Oligofectamin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemäß der Herstelleranweisungen durchgeführt. Gen-spezifische siRNAs (siehe Tabelle 1) wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) und Eurofins (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland) bezogen und in einer Endkonzentration von 50 nM verwendet. Der QIAGEN ALL-Stars Duplex diente als Negativkontrolle für alle Knockdown Experimente. Das FOXM1 HA-N-Plasmid (pDEST26\_HA-N) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Breuhahn (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Transiente Transfektionen mit den jeweiligen Plasmiden wurden unter Verwendung des FuGENE HD Transfection Reagent (Progenia, Madison, WI, USA) gemäß der Herstellerempfehlungen durchgeführt.

**Table 1:** Die siRNA Sequenzen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

siRNA	Reihenfolge
TP53/ P53#1	UGUCCGAGAGCUGAAUGA
TP53/ P53#2	AAGGAAUUUGCGUGUGGAGU
CDKN1A/ P21#1	CAGUUUGUGUGUCUAAUUUAU
CDKN1A/ P21#2	CUGGCAUUAGAAUUUUUAAA
FOXM1#1	AUAUUCACAGCAUCAUCAC
FOXM1#2	GGACCACUUUCCCUACUUU
HELLS#1	ATGCGATGGTACCAAGTAGAA
HELLS#2	AAACGGTTAGGCAGAATACTA

### 2.3 Gelelektrophorese und Westernblot

Die Zellyse wurde unter Verwendung eines Zellysepuffers (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt, ergänzt durch einen Protease-Inhibitor-Mix (komplett Mini EDTA-frei, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Ein Bradford Assay (#500-006, Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde verwendet, um den Proteingehalt der jeweiligen Zellysate zu messen (Pro Well wurden 6 µg Zellysate und 200 µg Bradfordassay aufgetragen). Die Proben wurden 5 Minuten lang auf 90 °C erhitzt, anschließend durch ein SDS/PAGE Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen (Amersham Protran 0.2 µm NC, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, USA) übertragen. Die Membranen wurden eine Stunde lang in 5% Milch/TRIS-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween-20 (TBST) (Milchpulver, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) blockiert und über Nacht mit den angegebenen Antikörpern (in Blockierlösung verdünnt) inkubiert: Anti-HA (C29F4), Kaninchen monoklonal (Verdünnung 1:500, 3724S, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland); anti-HELLS, Kaninchen polyklonal (Verdünnung 1:500, GTX54157, GeneTex, Eching, Deutschland); Anti-P21, Kaninchen polyklonal (Verdünnung 1:250, sc-397, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland); Anti-P21, Maus monoklonal (Verdünnung 1:200, sc-6246, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland); Anti-P53, Maus monoklonal (Verdünnung 1:200, sc-17846, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland); Anti-FOXM, Kaninchen polyklonal (Verdünnung 1:50, sc-500, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland). Das nachgewiesene β-ACTIN

unter Verwendung eines entsprechenden monoklonalen Mausantikörpers (Verdünnung 1:10.000, #691001, MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) diente zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Proteinbeladung zwischen den Proben. Die Membranen wurden mit TBST gewaschen und 1 Stunde lang mit dem entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert, wobei die Verdünnung vom Primärantikörper abhing (Maus Sekundär-Antikörper (rot) Verdünnung 1:20.000; Kaninchen Sekundär-Antikörper (grün) Verdünnung 1:10.000, LI-COR, Bioscience, Bad Homburg, Deutschland). Nach erneutem Waschen mit TBST wurde die Detektion mit dem Infrarot-Bildgebungssystem Odyssey LX (LI-COR Bioscience, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt. Die Analyse und densitometrische Quantifizierung der Westernblots erfolgte mit der Image Studio Software (v5.2.5, LI-COR Bioscience, Bad Homburg, Deutschland) einschließlich der Normalisierung auf die Ladungskontrolle  $\beta$ -ACTIN.

## **2.4 RNA Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative Real-Time-PCR**

Die zelluläre RNA wurde mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert. Die RNA (1  $\mu$ g) wurde unter Verwendung des RevertAid RT-Kits (Thermo Scientific, Offenbach, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers revers transkribiert. Die Proben wurden in Triplikaten auf einem Corbett Research Rotor-Gene 6000 Echtzeit-PCR-Gerät (Corbett Life Science, Mortlake, Australien) unter Verwendung des qPCR SYBR Green No-ROX Mix SensiFAST (Bioline, Lonson, UK) analysiert. Zur Analyse wurden die mRNA-Expressionslevel auf die von L32 normalisiert. Primersequenzen wurden von Primer-BLAST (NCBI) entworfen und von Thermo Fisher Scientific (Offenbach, Deutschland) oder von Eurofins (Eurofins Genomics, Germany GmbH Ebersberg, Deutschland) hergestellt (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Die Primer-Sequenzen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Primer	Sequenz
<i>CDKN1A_F</i>	GGCGGCAGACCAGCATGACAGATT
<i>CDKN1A_R</i>	GCAGGGGGCGGCCAGGGTAT
<i>L32_F</i>	TTCCTGGTCCACAAC
<i>L32_R</i>	TGTGAGCGATCTCG
<i>HELLS_F</i>	CAGCCATTGTGAACCGTACAA
<i>HELLS_R</i>	TCTAGTTCGTCGTTTTGGTTCG
<i>FOXM1_F</i>	TGCCCAGATGTGCGCTATTA
<i>FOXM1_R</i>	TCAATGCCAGTCTCCCTGGTA
<i>HELLS_3'UTR_F</i>	TCTTGGATACAGGCTGATGTGT
<i>HELLS_3'UTR_R</i>	ACCTAAAGCCCATGAACTGC
<i>HELLS_CHR_F</i>	CTCCAGTGCATCTCGGGTG
<i>HELLS_CHR_R</i>	GTTCAACCATTGCTGGAGCCT

## 2.5 Identifizierung einer nicht-kanonischen FOXM1 Bindungsstelle im *HELLS* Gen

Öffentlich verfügbare ChIP-Seq-Daten für FOXM1 bei ENCODE ([www.encodeproject.org](http://www.encodeproject.org), abgerufen am 18. November 2021) wurden über den Genome Browser abgefragt (<https://genome.ucsc.edu>, abgerufen am 18. November 2021). ChIP-Seq-Peaks innerhalb der *HELLS* Sequenz wurden auf das nicht-kanonische FOXM1 Bindungselement CHR (Cell Cycle Genes Homolgy Region) untersucht, wie zuvor von Chen et al. beschrieben [96]. Eine Region im ersten Intron von *HELLS* (zwischen Exon 1 und Exon 2), die ein ChIP-Seq-Peak zeigt und zwei CHR-Motive (DTTYRAA) in unmittelbarer Nähe enthält, wurde durch eine FOXM1 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) untersucht.

## 2.6 FOXM1 Chromatin-Immunpräzipitation

Für die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) des Forkhead-Box-Proteins M1 (FOXM1) wurden HepG2- und HLF- Zellen zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 1% Formaldehyd/PBS fixiert, darauffolgend 5 Minuten mit 125mmol/l Glycin versetzt und anschließend zweimal mit kaltem PBS gewaschen.

Abgelöst wurden die Zellen in kaltem RIPA-Puffer (bestehend aus 150 mmol/L NaCl, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 0,5% Na-Desoxycholat, 1% Igepal CA 630, 5 mmol/l EDTA, 50 mmol/L Tris pH 8), anschließend erfolgte eine Behandlung mit Ultraschallwellen um DNA Fragmente von weniger als 500 bp zu generieren (S-4000 Sonicator, Qsonica, Newton, CT). Für die Entfernung von Zelldetritus wurden die Zellen 15 Minuten bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert, anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay bestimmt und mit RIPA-Puffer auf 1mg/ml ausgeglichen. Dynabeads Protein G wurden mit RIPA-Puffer gewaschen, darin resuspendiert und mit dem Zelllysat 90 Minuten lang bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Parallel erfolgte die Vorbereitung weiterer Dynabeads durch RIPA-Puffer Waschschriffe und anschließender Blockung mit Rinderserumalbumin (1mg/ml) und Lachssperma-DNA (0,3 mg/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA) bei 4 °C unter Rotation für 90 Minuten. Im nächsten Schritt erfolgte die Übertragung der vorgereinigten Lysate auf die blockierten Dynabeads, dazu wurden 2µg Antikörper hinzugegeben und anschließend bei 4 °C unter Rotation über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die beladenen Dynabeads zweimal mit RIPA-Puffer, viermal mit Immunpräzipitationswaschpuffer (100 mmol/l Tris pH 8,5, 500 mmol/l LiCl, 1% Igepal CA 630, 1% Na-Desoxycholat) und erneut zweimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschriff erfolgte eine fünfminütige Rotationsphase. Anschließend wurden die Dynabeads mit Tris/EDTA-Puffer gewaschen und darin resuspendiert. Das Herauslösen der entstandenen Immunkomplexe erfolgte mit Talianidis-Elutionspuffer (70mmol/l Tris pH 8,1 mmol/l EDTA, 1,5% Natriumdodecylsulfat) für 10 Minuten bei 65 °C. Die Crosslinking Umkehr des Überstandes wurde durch eine fünfständige Inkubation mit 0,2 mol/l NaCl bei 65 °C erreicht. Die anschließende DNA Reinigung erfolgte mit dem Wizard SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega) gemäß der Anweisung des Herstellers. Die Analyse der detektierten Promotorbindung erfolgte anhand quantitativer Echtzeit-PCR, für dessen Referenzstandardkurve eine serielle Verdünnung genomischer DNA dient. Für die FOXM1-Bindungsstelle im ersten HELLS Intron wurden Primer basierend auf der vorherigen Recherche bei ENCODE (korrespondierender ChIP-Seq Peak mit 2 CHR Motiven) entworfen. Als Negativkontrolle diente eine Region innerhalb der 3'UTR des *HELLS* Gens.

Die ChIP-Sequenzierungsdaten stammen aus dem Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)-Projekt, die anschließende Analyse der Daten erfolgte anhand des

Genome Data Viewer des National Center for Biotechnology Information (NCBI).  
Verwendet wurden die folgenden Datensätze: GEO:GSM1010750,  
GEO:GSM1010856 und GEO:GSM1010769 für FOXM1.

## **2.7 Statistische Analysen und Software**

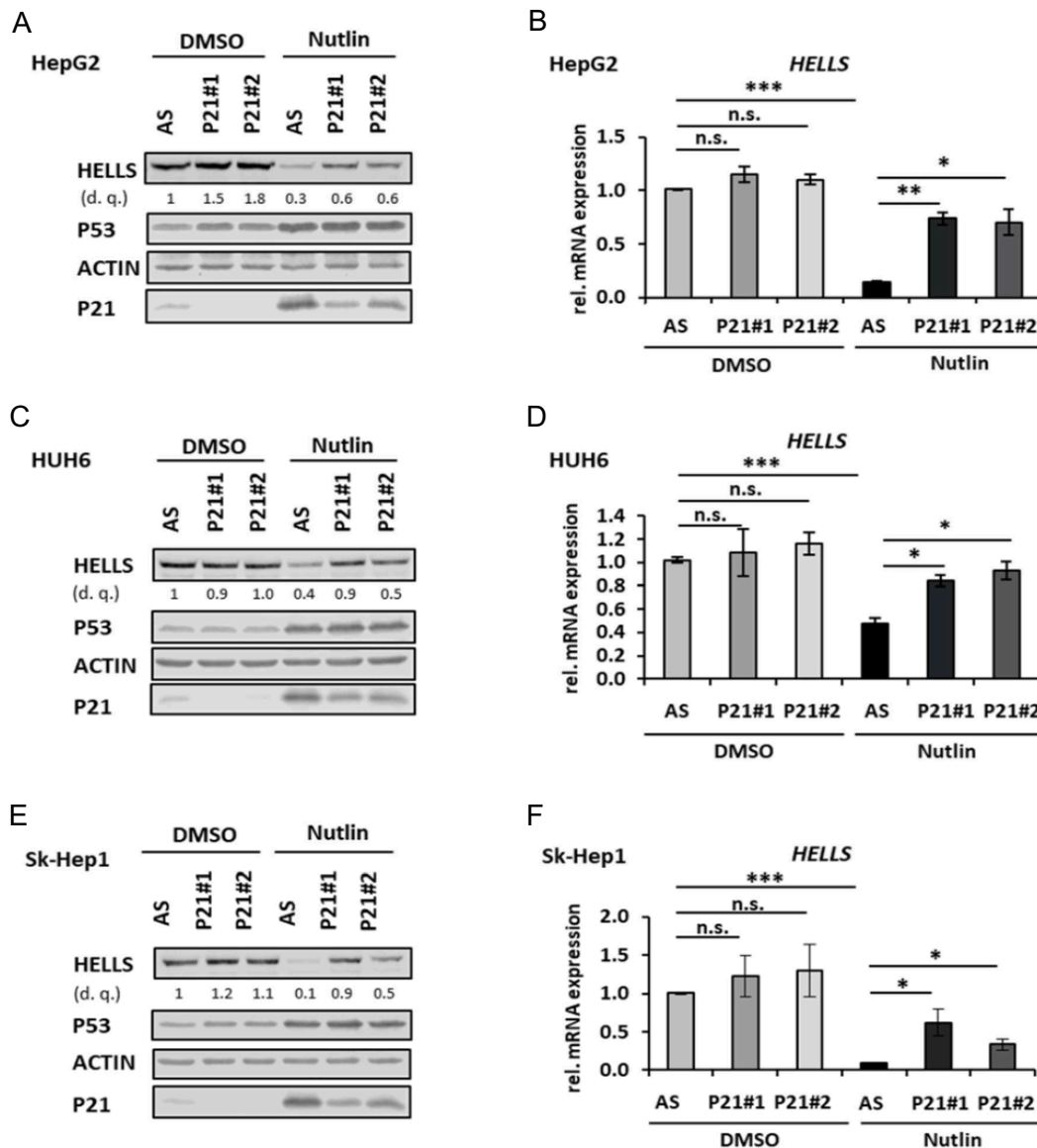
Die in dieser Arbeit gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen jeweils von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten, wenn nicht anders angegeben. Der Student's t-test zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde mit Excel 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Die Korrelationsanalysen (Korrelationskoeffizient bestimmt durch den Spearman-Rank-Test), die Box-Plot-Daten ( $\log_2$  Fold Change  $\geq \pm 1.0$ ; p-value  $\leq 0.05$ ). Die Box-Plot-Elemente sind wie folgt definiert: Mittlere Linie entspricht dem Median, die obere und untere Box-Grenze entspricht der oberen und unteren Quartile) sowie die Kaplan-Meier Kurven basieren auf Daten der TCGA Datenbank von GEPIA2 [53].

### 3 Ergebnisse

Ausgangspunkt für die folgenden mechanistischen Analysen sind vor allem die publizierten Daten von Law et al. (*HELLS*-Überexpression insbesondere in *TP53*-mutierten HCCs) und Daten einer weiteren Promotionsarbeit (Teil Jan Sieker, P53-abhängige Repression von *HELLS*) der AG Singer.

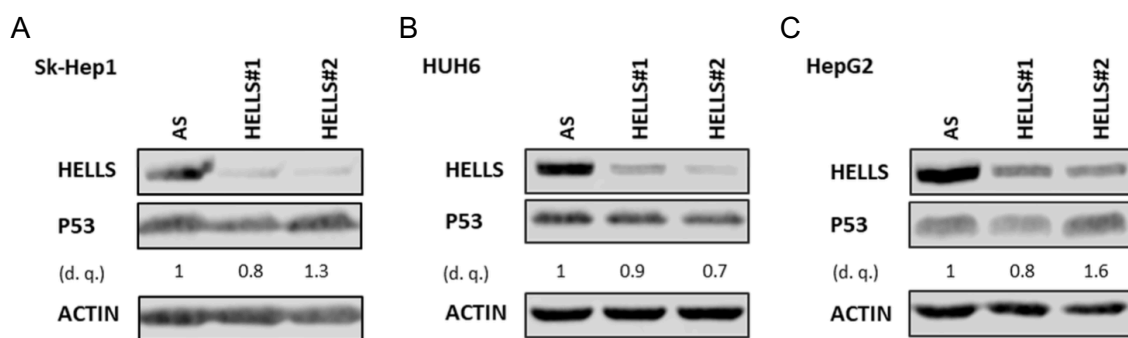
#### 4.1 Die P53-abhängige Repression von *HELLS* ist P21-vermittelt

Wie zuvor beschrieben erfolgt die Transkriptionsrepression von Zielgenen durch P53 häufig P21-vermittelt [23]. Daher wurde zunächst untersucht, ob eine P21 Depletion ausreichend ist, die *HELLS* Repression nach P53 Induktion aufzuheben. Dazu erfolgte ein siRNA-vermittelter P21 (*CDKN1A*) Knockdown durch Transfektion von Zelllinien mit *TP53* WT (HepG2, SkHep1, Huh6) mit einer Kontroll siRNA (Allstars, AS) oder zwei verschiedenen P21 (*CDKN1A*) siRNAs und nachfolgender Nutlin-3a Behandlung. Nutlin3a führt zu einer Aufhebung der P53-MDM2 Interaktion, Hemmung der MDM2-abhängigen P53 Degradation mit konsekutiver Akkumulation von P53 und entsprechender Aktivierung/Repression von positiven/negativen P53 Zielgenen. Wie in Abb. 2 (A-F) gezeigt, konnte die verminderte Expression von *HELLS* Protein und mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe (AS) nach Nutlin-3a Behandlung (abhängig von der Zelllinie) durch einen P21 (*CDKN1A*) Knockdown entweder teilweise oder vollständig aufgehoben werden.



**Abbildung 2:** Die P53 induzierte HELLs Repression ist P21 abhängig. (A) HepG2 Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (AS) oder zwei verschiedenen P21/CDKN1A siRNAs (P21#1, P21#2) transfiziert und anschließend mit DMSO oder Nutlin-3a über 24h inkubiert. Die Zellextrakte wurden durch Westernblot mit entsprechenden Antikörpern analysiert. Die densitometrische Quantifizierung von HELLs erfolgte bezogen auf die DMSO Kontroll-siRNA. (B) Die relativen HELLs Transkriptlevel sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten unter gleichen experimentellen Bedingungen (s. (A)) und wurden durch qRT-PCR gemessen. (C) HUH6 Zellen unter denselben experimentellen Bedingungen wie in (A) beschrieben. (D) Die relativen HELLs Transkriptlevel sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten unter gleichen experimentellen Bedingungen (s. (C)) und wurden durch qRT-PCR gemessen. Sk-Hep1 Zellen unter denselben experimentellen Bedingungen wie in (A) beschrieben. (F) Die relativen HELLs Transkriptlevel sind Mittelwerte von drei biologischen Replikaten unter gleichen Bedingungen (s. (E)) und wurden durch qRT-PCR gemessen. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s. = nicht signifikant (Student's t-test). Alle Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Dies weist darauf hin, dass die durch P53 induzierte Repression von *HELLS* zumindest teilweise durch P21 vermittelt wird. Umgekehrt zeigten Chen et al. bereits eine regulatorische Wirkung von *HELLS* auf P53, indem ein stabiler *HELLS* Knockdown mittels shRNA in A549 Lungenkarzinomzellen zu signifikant verminderten P53 Proteinleveln führte, jedoch die *TP53* mRNA Level nicht veränderte [54]. Um eine regulatorische Wirkung von *HELLS* auf P53 in HCC Zelllinien zu überprüfen, erfolgte ein siRNA-basierte *HELLS* Inhibierung in Sk-Hep1, HUH6 und HepG2 Zellen. Diese zeigte hingegen keine signifikante Veränderung der basalen Proteinlevel von P53 nach *HELLS* Knockdown (Abb. 3A-C).

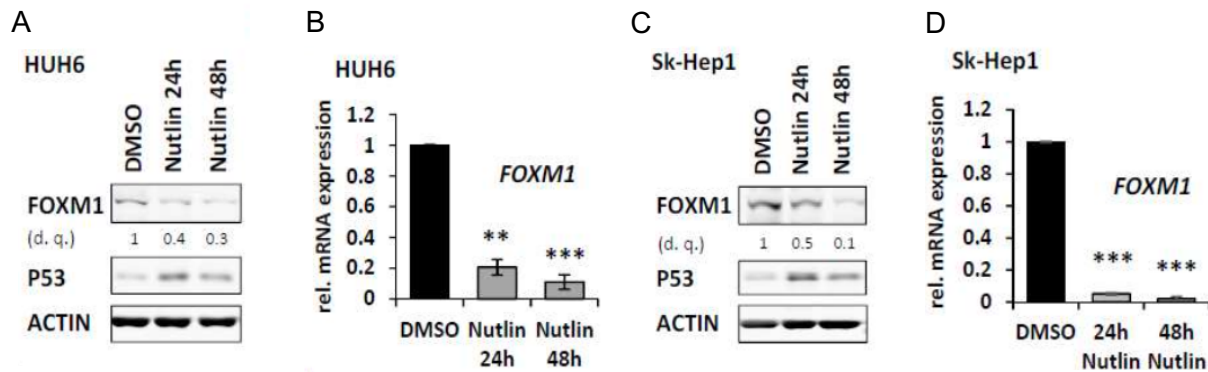


**Abbildung 3:** Die basalen P53 Proteinlevel zeigen keine Veränderung nach verminderter *HELLS* Expression. (A) Sk-Hep1 Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (AS) oder zwei verschiedenen *HELLS* siRNAs (*HELLS*#1, *HELLS*#2) transfiziert. Die Zellextrakte wurden durch Westernblot mit entsprechenden Antikörpern analysiert. Die densitometrische Quantifizierung (d.q.) von P53 erfolgte auf die DMSO Kontroll-siRNA. (B) HUH6 Zellen wie in (A) beschrieben. (C) HepG2 Zellen wie in (A) beschrieben.

#### 4.2 Die P53/P21-abhängige *HELLS* Repression beinhaltet eine Herunterregulation von *FOXM1*

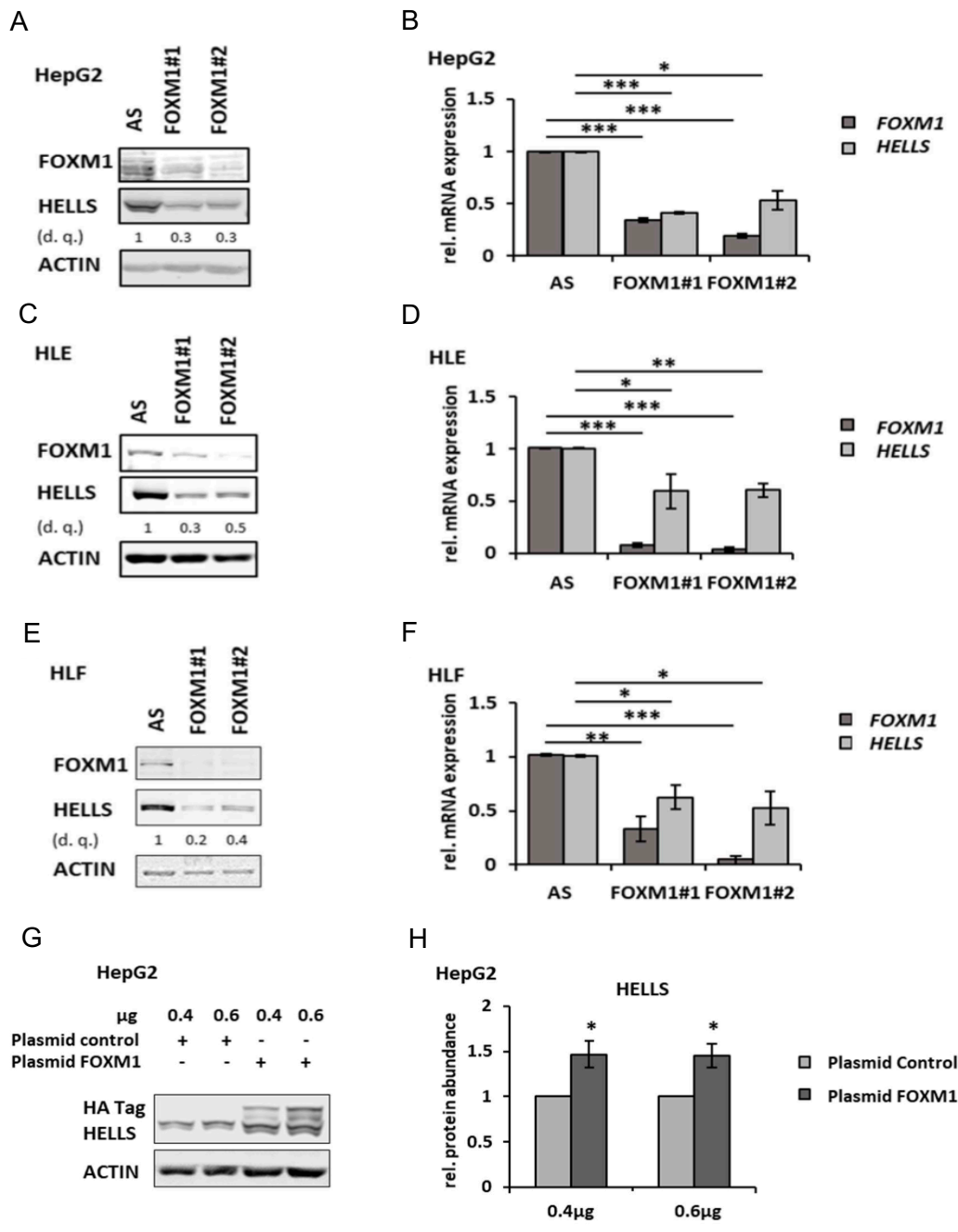
Es erfolgte zur weiteren Untersuchung der *HELLS* Regulation die Identifikation von potentiellen Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der P53/P21-abhängigen Repression von *HELLS* beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde ein Affymetrix Microarray Expressionsdatensatz herangezogen, der an DMSO oder Nutlin-3a behandelten (24h) HepG2 Zellen erhoben wurde. Zunächst wurden (Transkriptions-) Faktoren wie SP1 [29], E2F3 [55] und YAP1 [56] betrachtet, die bereits zuvor als wichtige Regulatoren von *HELLS* oder, wie E2F7, als wichtige Mediatoren der P53

Zielgen-Repression [57, 58], beschrieben wurden. Interessanterweise zeigte keiner dieser Faktoren eine veränderte Expression auf Transkriptebene nach Nutlin-3a Behandlung. Hingegen konnte FOXM1 als Transkriptionsfaktor mit der stärksten



**Abbildung 4:** FOXM1 Repression nach P53 Induktion. (A) HUH6 Zellen wurden mit DMSO oder Nutlin-3a für 24h bzw. 48h behandelt. Die densitometrische Quantifikation (d.q.) von FOXM1 normalisiert auf DMSO. (B) Relative FOXM1 Transkriptlevel aus drei biologischen Replikaten derselben Bedingung wie in (A) beschrieben und via qRT-PCR gemessen. (C) Sk-Hep1 Zellen wie in (A) beschrieben. (D) Relative FOXM1 Transkriptlevel aus drei biologischen Replikaten derselben Bedingung wie in (C) beschrieben und via qRT-PCR gemessen. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Student's t-test). Die Daten werden präsentiert als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

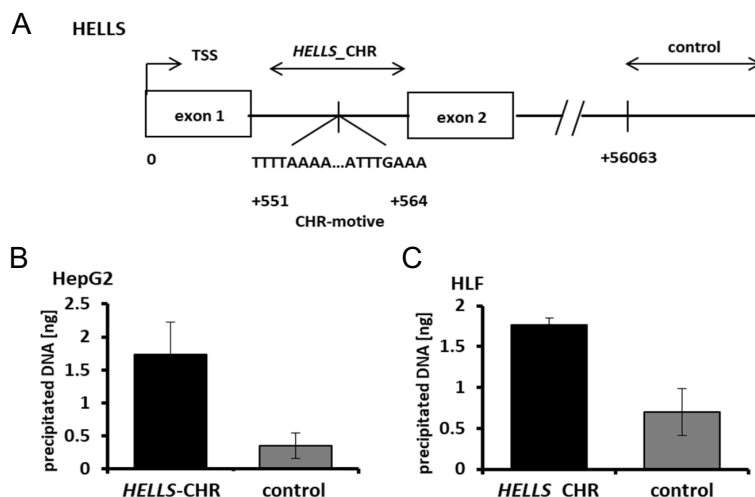
Expressionsverminderung nach Nutlin-3a Behandlung und mit Verbindung zu P53 und P21 sowie mit einer hohen Relevanz in der Hepatokarzinogenese identifiziert werden [59, 60, 61, 62]. Übereinstimmend mit zuvor veröffentlichten Daten in HepG2 Zellen [52] zeigte sich eine starke Verringerung der FOXM1 Protein- und mRNA-Level nach Nutlin-3a Gabe auch in Huh6- und SkHep1-Zellen (Abb. 4A-D). Um weiter zu belegen, dass FOXM1 an der Regulation der HELLS Expression beteiligt ist, erfolgten siRNA-vermittelte FOXM1 Knockdown Experimente. Hierbei konnte, sowohl auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene, eine signifikant verminderte HELLS Expression in HepG2, HLE- und HLF-Zellen nach FOXM1 Knockdown beobachtet werden (Abb. 5A-F). In darauf aufbauenden Untersuchungen erfolgte durch Transfektion eines HA-markierten FOXM1 Expressionskonstruktes (pDEST) die Überexpression von FOXM1 in HepG2 Zellen. Diese bewirkte einen Anstieg der HELLS Proteinlevel im Vergleich zur Kontrollbedingung mit dem korrespondierenden Leervektor in HepG2 Zellen (Abb. 5G und H).



**Abbildung 5:** Die P53/P21-abhängige HELLS Repression beinhaltet die verminderte Expression von FOXM1: (A) HepG2 Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (AS) oder zwei verschiedenen FOXM1 siRNAs (FOXM1#1, FOXM1#2) transfiziert und anschließend mit DMSO oder Nutlin-3a über 24h inkubiert. Die Zellextrakte wurden durch Immunoblotting mit entsprechenden Antikörpern analysiert. Die densitometrische Quantifizierung von HELLS erfolgte auf die DMSO Kontroll-siRNA. (B) HepG2 Zellen wie in (A) beschrieben mit HELLS und FOXM1 Transkriptleveln, mittels qRT-PCR gemessen. Die Standardabweichungen stammen von drei biologischen Replikaten. (C) HLE Zellen wie in (A) beschrieben. (D) HLE Zellen wie in (C) beschrieben mit HELLS und FOXM1 Transkriptleveln, mittels qRT-PCR gemessen. Die Standardabweichungen stammen von drei biologischen Replikaten. (E) HLF Zellen wie in (A) beschrieben. (F) HLF Zellen wie in (E) beschrieben mit HELLS und FOXM1 Transkriptleveln, mittels qRT-PCR gemessen. Die Standardabweichungen stammen von drei biologischen Replikaten. (G) HepG2 Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid oder einem FOXM1 Plasmid in verschiedenen Konzentrationen, wie angezeigt, transfiziert und anschließend durch Immunoblotting mit entsprechenden Antikörpern analysiert. (H) Die relative densitometrische Quantifizierung der Immunoblots erfolgte auf Basis von drei unabhängigen Experimenten jeweils auf DMSO normalisiert wie in (G) beschrieben. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Student's t-test). Die Daten werden präsentiert als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

### 4.3 Das *HELLS* Gen weist eine Bindungsstelle für FOXM1 auf

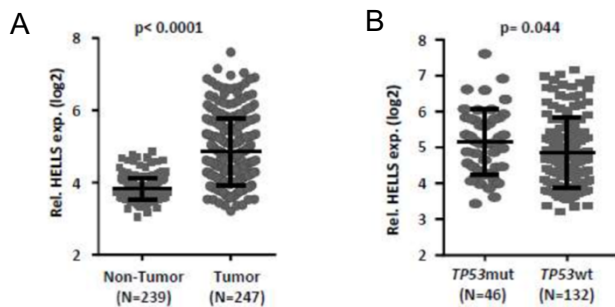
Um nun zu belegen, dass FOXM1 die *HELLS* Expression direkt reguliert, erfolgte zunächst eine *in silico* Analyse über öffentlich verfügbare ChIP-Seq-Datensätze bei ENCODE ([www.encodeproject.org](http://www.encodeproject.org)) mit dem Ziel mögliche Bindungsstellen für FOXM1 im *HELLS* Gen zu identifizieren. Hier zeigte sich eine potentielle nicht-kanonische FOXM1 Bindungsstelle im ersten Intron von *HELLS* mit zwei CHR-Motiven, die bereits zuvor beschrieben wurde [43]. Für die weitere Überprüfung dieser Bindungsstelle erfolgte eine Chromatin Immunpräzipitation (ChIP), bei dem FOXM1 präzipitiert wurde und die mit FOXM1 verbundenen DNA Fragmente mit qRT-PCR amplifiziert wurden. Die hierzu verwendeten Primerpaare umfassten einerseits die Region der potentiellen Bindungsstelle (*HELLS*\_CHR) und andererseits eine Region innerhalb der 3'UTR des *HELLS* Gens als Negativkontrolle (Abb. 6 A). Es zeigte sich unter Verwendung des *HELLS*-CHR Primer-Paares im Vergleich zur Negativkontrolle ein bis zu dreifach erhöhtes Signal, wie in Abbildung 6 B und C gezeigt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass FOXM1 die *HELLS* Expression direkt reguliert, indem es an die nicht-kanonische Bindungsstelle im ersten Intron des *HELLS* Gens bindet. Somit erhärtet sich die Hypothese, dass die P53/P21 vermittelte negative Regulation von *HELLS* über eine Repression von FOXM1 als direkter transkriptioneller Regulator von *HELLS* im HCC erfolgt.



**Abbildung 6:** FOXM1 bindet direkt an eine Region im ersten Intron des *HELLS* Gens. (A) Eine Schematische Darstellung der nicht-kanonischen FOXM1 Bindungsstelle zwischen Exon 1 und 2, welche zwei CHR Motive enthält. Das Primerpaar *HELLS*\_CHR diente der Ermittlung der FOXM1 Bindung, ein Primerpaar für das 3'UTR Ende diente als Negativkontrolle. (B) Balkendiagramme zeigen die DNA-Menge, welche durch FOXM1 IP in HepG2 (B) und HLF (C) Zellen ausgefällt wurde. Hierbei zeigt sich in HepG2 wie in HLF Zellen ein bis zu dreifach erhöhtes Signal. Alle Experimente wurden in Duplikaten angefertigt.

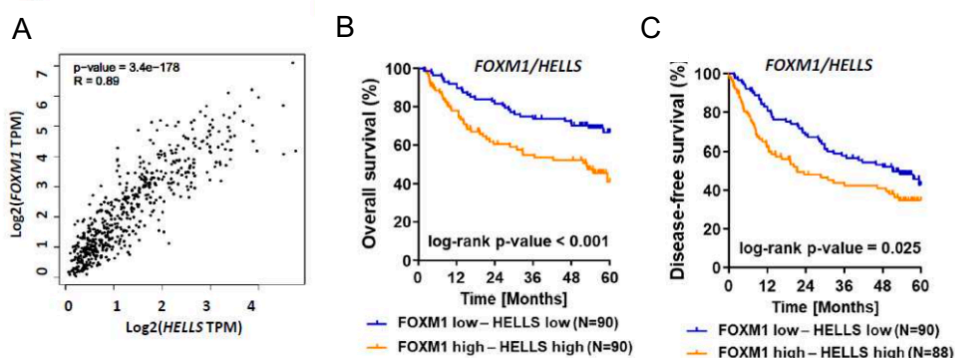
## 4.4 HELLS und FOXM1 korrelieren auf mRNA Ebene in humanen HCC Kohorten

Zur Überprüfung, inwieweit sich die bisherigen *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragen lassen, erfolgten Expressionsanalysen von *HELLS* und *FOXM1* in humanen HCC-Gewebeproben. Hierzu erfolgte die Analyse zweier HCC Kohorten (TCGA (LIHC) und Roessler et. Al. [63]).



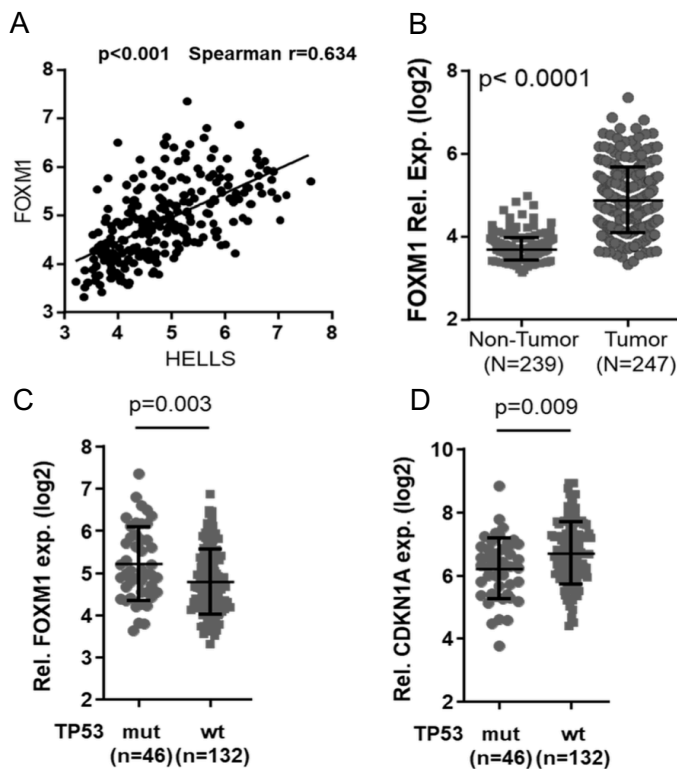
**Abbildung 7:** *HELLS* Expressionsanalysen: (A) *HELLS* Expression im hepatozellulären Karzinom (HCC, Tumor) und nicht-tumorösem Lebergewebe (NT). (B) *HELLS* Expression in HCCs entweder mit wildtypischem- (wt) oder mutiertem (mut) TP53. Die Analyse des Datensatzes wurde wie zuvor von Roessler et al. veröffentlicht durchgeführt [63]. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt.  $p$  – Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

In beiden Kohorten konnte eine deutliche, hochsignifikante Korrelation zwischen der mRNA Expression von *HELLS* und *FOXM1* (Abb. 8A, Abb. 9A;  $r = 0.89$ ,  $p \leq 0.001$  und  $r = 0.64$ ,  $p \leq 0.001$ ) beobachtet werden. In Übereinstimmung mit zuvor veröffentlichten Daten, zeigen sich sowohl *HELLS* (Abb. 7A) als auch *FOXM1* (Abb. 9B) in HCC Proben im Vergleich zu nicht-tumorösem Lebergewebe deutlich überexprimiert [29].



**Abbildung 8:** Hohe Expressionswerte von *HELLS* und *FOXM1* korrelieren mit schlechterem Überleben im HCC (A) Die Korrelation der *HELLS* und *FOXM1* Expression in humanen HCC Proben (aus der TCGA (LIHC) Datenbank). (B) Kaplan Meier Darstellung mit dem Endpunkt des Gesamtüberlebens von HCC-Patienten mit hoher bzw. geringer Expression von *HELLS* sowie *FOXM1* basierend auf zuvor publizierten Daten von Roessler et. al. [63]. (C) Kaplan Meier Darstellung mit dem Endpunkt des Erkrankungs-freien Überlebens von HCC-Patienten mit hoher bzw. geringer Expression von *HELLS* sowie *FOXM1* basierend auf zuvor publizierten Daten von Roessler et. al. [63].

Auch konnte eine Überexpression von *HELLS* (Abb. 7B) und *FOXM1* (Abb. 9C) in *TP53* mutierten Tumoren im Vergleich zu *TP53 WT* HCCs festgestellt werden, während *P21/CDKN1A* in *TP53* mutierten HCCs im Vergleich zu *TP53 WT* HCCs verringert exprimiert vorlagen (Abb. 9D). Passend dazu, dass beide Faktoren für sich bereits als unabhängige negative Prognosemarker [29, 51] beschrieben wurden, korrelierten eine kombinierte, über dem Median liegende Expression von *HELLS* und *FOXM1* signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben und krankheitsfreien Überleben bei HCC-Patienten (Abb. 8 B, C).

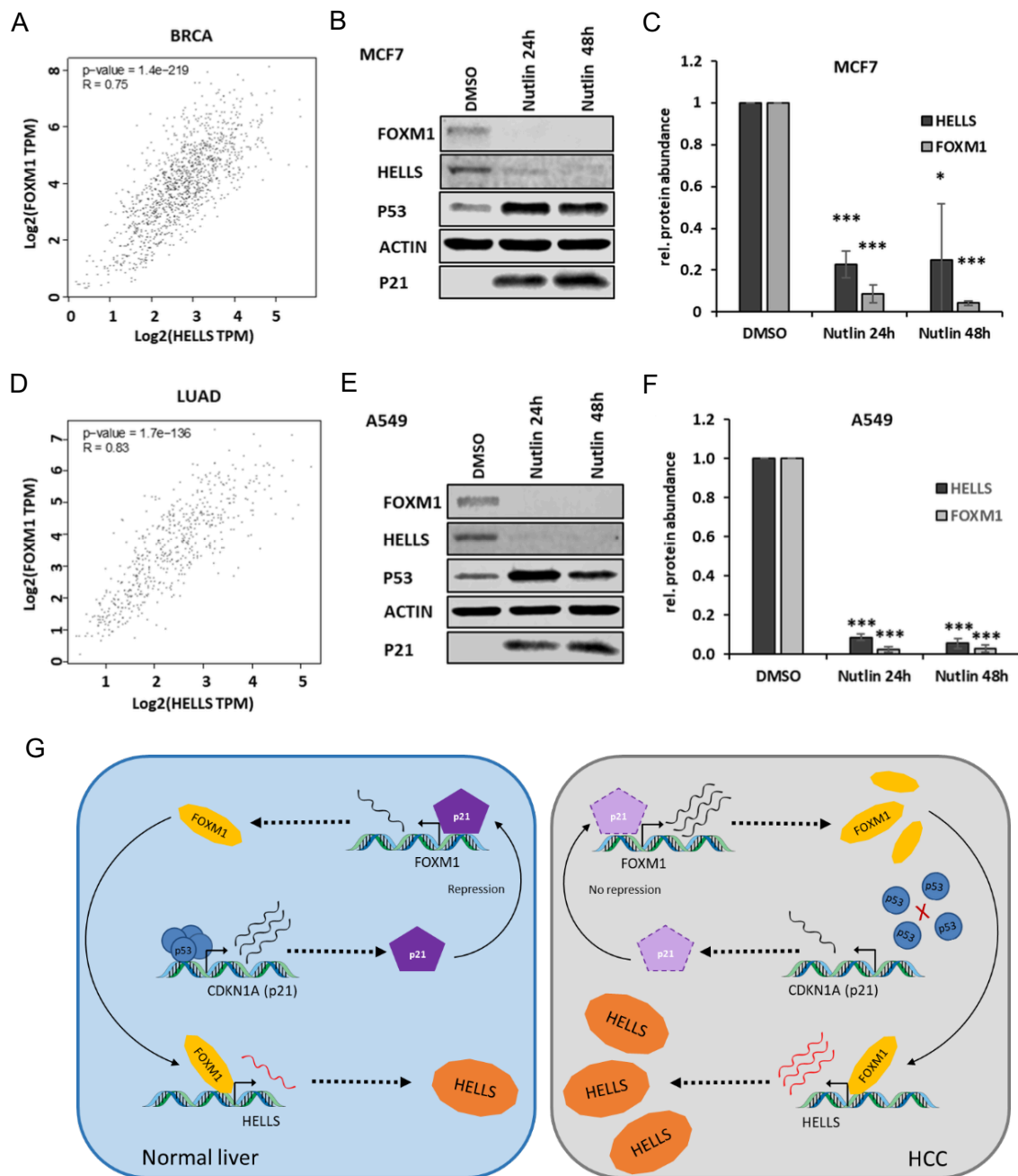


**Abbildung 9:** *HELLS*, *FOXM1* und *CDKN1A* Expressionslevel in humanen HCC Proben. (A) Die Korrelation zwischen der *HELLS* und *FOXM1* Expression in humanen HCC Proben. (B) *FOXM1* Expression im hepatozellulärem Karzinom (Tumor) sowie im nicht-tumorösen Lebergewebe. (C) *FOXM1* Expression in Wildtyp (WT) *TP53* HCC Proben sowie in mutierten (mut) *TP53* HCC Proben. (D) *CDKN1A* Expression in Wildtyp (WT) *TP53* HCC Proben sowie in mutierten (mut) *TP53* HCC Proben. Die Datenanalyse wurde wie zuvor in Roesler et. al. beschrieben, durchgeführt [63]. Die statistische Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney Test ermittelt. Der *p*-Werte  $\leq 0.05$  wurden als signifikant gewertet.

#### 4.5 *HELLS* und *FOXM1* Expression in humanen Mamma- und Lungenkarzinom Kohorten

Ergänzend zu den bisherigen Analysen erfolgte eine weitere Analyse von TCGA Daten, um zu überprüfen, ob die bisherigen Ergebnisse HCC-spezifisch oder auch auf andere Tumorentitäten übertragbar sind. Hierbei konnte auch beim Mammakarzinom (BRCA)- und Lungenkarzinom (LUAD, Adenokarzinom) eine starke, hochsignifikante Korrelation der *HELLS* und *FOXM1* Expression (Abb. 10 A, D) beobachtet werden. Ergänzend erfolgte an einer humanen Mammakarzinom- (MCF7) und einer humanen Lungenkarzinom-Zelllinien (A549) jeweils mit wildtypischem *TP53/P53* eine 24- und 48-stündige Nutlin-3a Behandlung mit anschließender quantitativer Analyse der Proteinlevel von *FOXM1*, *HELLS*, *P53*, *P21* (Abb. 10 B, C, E, F). Auch hier konnten in beiden Zelllinien nach Induktion von *P53* und *P21* geringere Proteinlevel von *FOXM1* und *HELLS* nach Nutlin-3a Gabe beobachtet werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die regulatorische *P53/P21/FOXM1/HELLS* Achse auch in anderen Tumorentitäten nachweisen lässt. Zusammenfassend legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass *HELLS* unter physiologischen Bedingungen von wildtypischem *P53* über *P21* unter Einbeziehung von *FOXM1* negativ reguliert wird (Abb. 10 G – linke Seite). Dementsprechend führt die funktionelle oder mutationsbedingte Inaktivierung von *P53* im Rahmen der (Hepato-)Karzinogenese und dem daraus resultierenden Verlust der *P21*-Induktion zu einer Überexpression von *FOXM1* und konsekutiv zu einer Überexpression von *HELLS* (Abb. 10 G – rechte Seite).



**Abbildung 10:** Die HELLs und FOXM1 Expression in humanem Mamma-Karzinom und humanem Lungenadenokarzinom. (A) Korrelation der HELLs und FOXM1 Expression in humanem Mamma-Karzinom (BRCA) basierend auf dem TCGA Datensatz. (B) MCF7 Zellen wurden mit DMSO oder Nutlin-3a für 24h oder 48h inkubiert. Die Zellextraktanalyse erfolgte durch Immunoblotting mit den angegebenen Antikörpern. (C) Relative densitometrische Quantifikation der Immunoblots von vier unabhängigen Experimenten, die Normalisierung erfolgte auf die DMSO Kontrolle wie in (B) beschrieben. (D) Die Korrelation der HELLs und FOXM1 Expression in humanem Lungenadenokarzinom (LUAD) basierend auf dem TCGA Datensatz. (E) A549 Zellen wurden mit DMSO oder Nutlin-3a für 24h oder 48h inkubiert. Die Zellextraktanalyse erfolgte durch Immunoblotting mit den angegebenen Antikörpern. (F) Relative densitometrische Quantifikation der Immunoblots stammt von vier unabhängigen Experimenten, die Normalisierung erfolgte auf die DMSO Kontrolle wie in (E) beschrieben. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung gezeigt. (G) Schematische Darstellung der regulatorischen Beziehung von P53 und HELLs: In normalem Lebergewebe (links) – P53 Aktivierung induziert eine verminderte HELLs Expression durch eine P21-vermittelte Repression von FOXM1. Im HCC (rechts) – Mutiertes oder funktionell inaktiviertes P53 führt zu einer FOXM1 Überexpression und daraus folgender HELLs Überexpression.

## 4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit konnten, basierend auf der bereits entdeckten P53-vermittelten Repression von *HELLS* im HCC [1 – Teil Jan Sieker], experimentelle mechanistische Daten erhoben werden, die für die wichtigen Rollen von P21 und FOXM1 in der Regulation der Helikase *HELLS* im HCC sprechen. Es konnte gezeigt werden, dass die *HELLS* Regulation durch P53 zumindest partiell von P21 abhängt und dass die P53/P21-vermittelte *HELLS* Regulation die Repression von FOXM1 als direkten Transkriptionsfaktor von *HELLS* im HCC beinhaltet.

Die Helikase *HELLS* ist ein wichtiger Bestandteil des Chromatin-Remodelling-Komplexes, der durch Mechanismen wie DNA-Methylierung, posttranslationale Histonmodifikation und Nukleosomen-Remodelling bei der DNA Reparatur unterstützt und ebenso in Verbindung mit der Zellzyklus Regulation steht [64]. *HELLS* reguliert DNA-Methylierung im Genom, in dem es ATP-abhängig die Histon/DNA-Wechselwirkung auflöst und somit das Gleiten von Nukleosomen auf der DNA ermöglicht [65, 66]. Dies ist elementar für die Zugänglichkeit der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B zum Genom und damit der Regulation der Genexpression [67, 68, 69, 70, 71].

Darüber hinaus konnte im humanen Kolonkarzinom gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von *HELLS* zu einem G2/M Zellzyklusarrest führt [72] und *HELLS* in Verbindung mit YY1, einem ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor mit Zinkfingerdomäne, transkriptionell eine große Anzahl an Zellzyklusgenen reguliert [73]. Dies wiederum passt mit den hier gezeigten Daten (negative Regulation von *HELLS* durch P53 WT) sehr gut zum G2/M Zellzyklusarrest als wichtige tumorsuppressive P53 Antwort.

Über die Regulation der Helikase *HELLS* selbst und über ihre Expression im HCC war zu Beginn der Dissertation wenig bekannt. Allerdings konnten während der frühen Phase der Dissertation Law et al. eine signifikante Überexpression von *HELLS* im HCC, insbesondere in *TP53* mutierten Tumoren, sowie einen Zusammenhang der Hochregulation von *HELLS* im HCC mit dem Tumorzellwachstum, der Tumorzellmigration und einem aggressiveren Tumorphänotyp demonstrieren [29]. Eine *HELLS* Depletion war hingegen mit einer höheren Apoptoserate in Leberkrebszellen verbunden [29]. Auch hier ergibt sich im Zusammenhang mit den eigenen Daten wieder ein plausibler Zusammenhang zu

einer weiteren gut definierten tumorsuppressiven P53 Antwort, nämlich der Apoptoseinduktion. Zusammengefasst sind die Daten und Erkenntnisse von Law et al., die *HELLS* als überexprimiert im HCC beschreiben und funktionell als protumorigenen Faktor charakterisieren, sehr gut vereinbar mit der in der vorliegenden Arbeit (inkl. 1 – Teil Jan Sieker) negativen Regulation von *HELLS* durch den Tumorsuppressor P53.

Der Tumorsuppressor P53 reguliert ein großes Genexpressionsnetzwerk durch Hoch- und Herunterregulierung spezifischer mRNAs [74]. Traditionell wurden jedoch bislang P53 Aktivierungszielgene viel ausführlicher untersucht als Repressionszielgene und es ist seit langem umstritten, inwieweit P53 überhaupt als direkter Transkriptionsrepressor fungiert [23]. In der Vergangenheit wurden verschiedene Modelle der direkten Zielgenrepression durch P53 postuliert, beispielsweise die Rekrutierung von Co-Repressoren und unvollständige P53-REs, die zur Repressionsaktivität führen [23, 75, 76]. Die vorherrschende Meinung ist allerdings, dass die negative Genregulation durch P53 auf indirekte Weise erfolgt. Diesbezüglich sind verschiedene Signalwege bekannt, durch welche P53 seine negative regulatorische Funktion ausübt. Zum einen kann P53 die *CDKN1A* (P21) Expression direkt aktivieren, woraus einer Aktivierung des DREAM Komplexes und des RB-E2F4 Signalwegs sowie eine transkriptionelle Unterdrückung diverser Zellzyklusgene resultiert [17, 18, 23, 24]. Darüber hinaus ist P53 ebenfalls in der Lage, über E2F7, einem Mitglied der E2F Transkriptionsfaktorenfamilie mit repressiven Eigenschaften, eine transkriptionelle Inaktivierung von bestimmten Repressionszielgenen zu erreichen [23]. Ein weiterer Mechanismus besteht in der indirekten, posttranskriptionellen Unterdrückung der Ziel-Gen Expression über microRNAs (miRNAs), wie bspw. miR34a, die über den RNA-induzierten Silencing Komplex (RISC) negativ regulierend auf bestimmte mRNAs wirken [23]. Auch die miR34a führt zur negativen Regulation von Zellzyklusgenen über den E2F Signalweg [77, 78].

In Übereinstimmung mit dem vorherrschenden Modell der indirekten Regulation von P53 Repressionszielgenen konnten in der vorliegenden Arbeit P21 (*CDKN1A*) und FOXM1 als Bestandteile der P53-abhängigen negativen Regulation von *HELLS* identifiziert werden.

Chen et. al. konnten zeigen, dass HELLS in Nasopharynxkarzinom- und Lungenkarzinom- Zelllinien in der Lage ist, P53 posttranskriptionell zu stabilisieren, indem es seinen proteasomalen Abbau verhindert und seine Phosphorylierung fördert [54]. Diese Daten legen nahe, dass ggf. auch in Lebertumorzelllinien eine Rückkopplungsschleife zwischen P53/P21 und HELLS bestehen könnte. Allerdings konnte in dieser Arbeit, wie in Abb. 3 dargestellt, nach siRNA-vermitteltem Knockdown von HELLS in drei verschiedenen Krebszelllinien, die P53 WT enthalten (HepG2, HUH6 und Sk-Hep1), keine nennenswerte und konsistente Verringerung des basalen P53 beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse könnte in zellspezifischen Effekten liegen (Chen et al. verwendeten Nasopharynx- und Lungenkarzinomzelllinien, wohingegen in dieser Arbeit Leberkrebszelllinien verwendet wurden). Des Weiteren könnten in diesem Zusammenhang auch technische und zeitliche Aspekte eine Rolle spielen, da in dieser Arbeit lediglich die Effekte eines transienten *HELLS* Knockdowns über siRNA Transfektion auf das basale P53 analysiert wurden, während Chen et al. die P53 Proteinspiegel im Kontext eines stabilen shRNA-vermittelten *HELLS* Knockdowns untersuchten.

FOXM1 ist mit seiner regulierenden Funktion auf den Zellzyklus, die Proliferation und die Differenzierung bereits als wichtiger Faktor im HCC und im Kontext von weiteren Karzinomen wie bspw. der Mamma, Lunge, Pankreas, Prostata, Kolon sowie des Nasopharynx beschrieben worden [47, 79, 80, 81, 82, 83, 84]. Hierbei konnte jeweils eine FOXM1 Überexpression nachgewiesen werden, welche mit einer schlechteren Prognose korrelierte [85, 86]. FOXM1 gilt als Schlüsselregulator des Zellzyklus [87, 88, 89], der insbesondere für den Übergang von G1 zur S-Phase und das Fortschreiten von G2 zur M-Phase entscheidend ist [90]. Im HCC erfolgt die Zellzyklusregulation durch FOXM1 über verschiedene Wege, wie bspw. die posttranskriptionelle Beeinflussung der P21 und P27 Expressionsniveaus [90, 91], sowie über die anteilige Regulation der AFP Expression, welche mit dem Zellzyklusprogress in Verbindung steht [92]. FOXM1 ist zudem ein wichtiges Ziel des im HCC aberrant aktivierten Hedgehog-Signalweges und moduliert die Expression des Xenopus-Kinesin-ähnlichen Proteins 2 (TPX2), einem Onkogen mit wichtiger Funktion während der Mitose und ebenfalls Zielgen des Hedgehog-Signalweges [93]. Neben der Regulierung des Zellzyklus ist ein weiterer elementarer

epigenetischer Mechanismus, der während der Karzinogenese vieler Neoplasien eine wichtige Rolle spielt, die DNA-Methylierung. Hierbei werden Methylgruppen an den 5' Enden den Cytosin Basen hinzugefügt [94]. Die dynamische Regulierung der DNA-Methylierung und damit einhergehende Veränderung der Genexpression ist ein entscheidender Mechanismus für die Entstehung sowie das Fortschreiten von Neoplasien [95]. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte *FOXM1* Expression mit genomischer Instabilität [96] sowie mit Promotorhypermethylierung in Verbindung steht [94, 97].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *FOXM1* bei der Suche nach relevanten Transkriptionsfaktoren von *HELLS* in der Analyse eines Mikroarray Expressionsdatensatzes aus Nutlin-3a behandelten HepG2 Zellen als einziger potenzieller Transkriptionsfaktor mit Beziehung zu P53/P21 und hoher Relevanz in Leberkrebs identifiziert werden. Andere bereits beschriebene Transkriptionsfaktoren von *HELLS* (SP1, E2F3, YAP1) [29, 55, 56] zeigten nach Nutlin-3a vermittelter P53 Aktivierung keine signifikante Änderung ihrer Expression (zumindest auf mRNA Ebene) und schienen daher für den vorliegenden Phänotyp nicht unmittelbar entscheidend zu sein. Zur Bestätigung der Relevanz von *FOXM1* im gegebenen Kontext konnte in entsprechenden Experimenten gezeigt werden, dass die P53/P21 abhängige *HELLS* Regulation mit einer Repression von *FOXM1* einhergeht, *FOXM1* direkt am *HELLS* Gen bindet und somit als positiver Transkriptionsregulator von *HELLS* im HCC agiert. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Resultate von Barsotti et al., welche *FOXM1* in MCF7 (Mammakarzinom), HepG2 (HCC) sowie H1299 Zellen (Lungenkarzinom) ebenfalls als indirektes Repressionszielgen von P53 nachweisen konnten [52]. Zudem untermauern die Resultate von Waseem et al. sowie Gemenetzidis et al. [98, 99] die hier gezeigten Ergebnisse, da deren Untersuchungen *HELLS* ebenfalls als *FOXM1* Zielgen identifizieren konnten (allerdings im Nasopharynxkarzinom).

Die in dieser Arbeit anhand der Analyse zweier HCC Patientenkohorten (TCGA (LIHC) und Roessler et al. [63]) gezeigte hochsignifikante Korrelation der mRNA Expressionswerte von *HELLS* und *FOXM1* unterstützt in Zusammenschau mit den mechanistischen Analysen *in vitro* eine auch *in vivo* relevante Regulation von *HELLS* durch *FOXM1* im HCC. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien konnten *HELLS* und *FOXM1* im Tumorgewebe (HCC) deutlich überexprimiert im Vergleich zu Nicht-Tumorgewebe [29, 100] nachgewiesen werden, sowie in *TP53* mutierten- im

Vergleich zu *TP53* WT HCCs. Über das HCC hinaus konnte eine positive Korrelation von *HELLS* und *FOXM1* auch in Mamma- und Lungenkarzinom Kohorten (Abb. 9 A-F) beobachtet werden. Der regulatorische Zusammenhang, zwischen *HELLS* und *FOXM1*, scheint somit auch in anderen Neoplasien zu bestehen.

## 5 Zusammenfassung

Die molekularen Mechanismen, die der Entstehung und Progression des hepatozellulären Karzinoms (HCC) zugrunde liegen, sind trotz intensiver Forschung nach wie vor nur unzureichend verstanden. Zu diesen Mechanismen zählen auch solche, die den Tumorsuppressor P53 mit Chromatin-Remodelling-Enzymen verknüpfen und somit potentiell neue therapeutische Ansätze eröffnen könnten. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der P53-abhängigen Regulation der Chromatinstruktur-modulierenden Helikase HELLS untersucht. Dazu wurden siRNA-vermittelte Knockdown-Experimente, Western-Blot-Analysen, Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) sowie quantitative Real-Time-PCR an Lebertumor-Zelllinien (HepG2, HUH6, SkHep1, HLE, HLF und HUH7) durchgeführt. Zunächst konnte mit Knockdown Untersuchungen gezeigt werden, dass die P53-induzierte Repression von HELLS zumindest partiell durch P21 (=CDKN1A, einem wichtigen P53 Zielgen) vermittelt wird. Über Mikroarray-basierte Expressionsanalysen wurde dann FOXM1 als potentiell relevanter Transkriptionsfaktor bei der P53/P21-vermittelten HELLS Regulation identifiziert. Im Weiteren erfolgte über direkte FOXM1-Knockdown- und Überexpressionsversuche sowie über ChIP-Analysen der Nachweis einer direkten Regulation von *HELLS* durch FOXM1 in Lebertumorzellen. Diese experimentellen Daten unterstützen die Hypothese, dass die P53/P21-vermittelte Repression von *HELLS* über eine verminderte Expression von FOXM1 als direktem Transkriptionsfaktor von *HELLS* im HCC erfolgt. Ergänzend ergaben Expressionsanalysen von humanen HCC Proben eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen *HELLS*- und *FOXM1*-mRNA-Leveln (Abb. 8A, Abb. 9A;  $r = 0.89$ ,  $p \leq 0.001$  und  $r = 0.64$ ,  $p \leq 0.001$ ) sowie eine deutliche Überexpression beider Faktoren im HCC im Vergleich zu nicht-tumorösen Lebergewebe. Zudem konnten in Mammakarzinom- (MCF7) und Lungenkarzinom-Zelllinien (A549) ähnlich experimentelle Daten erhoben werden, die nahelegen, dass die regulatorische P53/P21/FOXM1/HELLS-Achse auch auf andere Tumorentitäten übertragen werden kann.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit konnte die wichtige Rolle von P21 und FOXM1 in der P53-vermittelten HELLS Repression dargestellt werden. Die im Rahmen der Hepatokarzinogenese häufig zu verzeichnende funktionelle oder mutationsbedingte Inaktivierung von P53 und dadurch aufgehobene Repression von FOXM1 und HELLS kann somit als ein wichtiger Mechanismus der Überexpression von HELLS und FOXM1 im HCC (und wahrscheinlich auch in anderen Neoplasien) betrachtet werden. Dennoch bedarf es weiterer (u.a. *in vivo*) Studien diesen Zusammenhang noch genauer zu charakterisieren.

Perspektivisch wären aufgrund ihres Expressionsprofils und ihrer pro-tumorigenen Wirkung sowohl HELLS als auch FOXM1 potentiell interessante Kandidaten für zielgerichtete Therapien. Zu zielgerichteten Ansätzen gegen Chromatin-modifizierende Proteine/Enzyme wurden bereits Studien bspw. unter Verwendung von 5-Azacytidin (DNA-Methyltransferase-1-Inhibitor) im Mammakarzinom und Vorinostat (Histon-Deacetylase-Inhibitor) im Kolon-, Mamma-, Ovarial- und hepatozellulären Karzinom durchgeführt [101, 102, 103, 104, 105]. Somit wäre auch HELLS als Chromatin-modifizierendes Enzym durchaus auch als mögliches pharmakologisches Ziel für zukünftige Tumorthérapien denkbar.

Das insgesamt in der krebsrelevanten Literatur deutlich intensiver untersuchte FOXM1 stellt ggf. einen noch vielversprechenderen Kandidaten für zukünftige onkologische Therapien dar. Für gängige Chemotherapeutika wie bspw. Daunorubicin, Cisplatin und 5-FU konnte bereits gezeigt werden, dass diese die FOXM1 Expression verringern [106, 107, 108]. Potentiell spezifischere Ansatzpunkte könnten sich über die Verwendung von Thiazol-Antibiotika wie bspw. Siomycin A ergeben, welches neben der Expression auch die Transkriptionsaktivität von FOXM1 inhibiert [109, 110].

In Abhängigkeit des Nebenwirkungsprofils der jeweiligen neuen zielgerichteten Therapieansätze wären vor allem Kombinationen mit den leitlinienbasierten Systemtherapien naheliegend. Insbesondere für einen potentiellen Inhibitor von FOXM1 als transkriptioneller Regulator von PD-L1 und VEGF [80, 111, 112] wäre demnach eine Kombinationstherapie mit bspw. Atezolizumab (Anti-PD-L1) und/oder Bevacizumab (Anti-VEGF) eine Überlegung. Künftige *in vivo* und *in vitro* Studien unter Verwendung von umfangreichen Compoundscreens könnten in diesem Zusammenhang entscheidende Erkenntnisse liefern.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Petrick JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS, Ferlay J, Valery PC, Bray F, McGlynn KA. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. *Int J Cancer*. 2020 Jul 15;147(2):317-330.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.
- [3] Papaconstantinou D, Tsilimigras DI, Pawlik TM. Recurrent Hepatocellular Carcinoma: Patterns, Detection, Staging and Treatment. *J Hepatocell Carcinoma*. 2022 Sep 3;9:947-957.
- [4] European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018 Jul;69(1):182-236.
- [5] Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016 Apr;150(4):835-53.
- [6] Brar G, Greten TF, Graubard BI, McNeel TS, Petrick JL, McGlynn KA, Altekruse SF. Hepatocellular Carcinoma Survival by Etiology: A SEER-Medicare Database Analysis. *Hepatol Commun*. 2020 Aug 9;4(10):1541-1551.
- [7] Rungay H, Arnold M, Ferlay J, Lesi O, Cabasag CJ, Vignat J, Laversanne M, McGlynn KA, Soerjomataram I. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *J Hepatol*. 2022 Dec;77(6):1598-1606.
- [8] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 7, 6 (2021).
- [9] Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan;2(1):a001008.
- [10] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49-53.
- [11] Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):333-339.
- [12] Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 May 2;6(5):a026062.

- [13] Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1062-1078.
- [14] Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413-31.
- [15] Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørli T, Hovig E, Smith-Sørensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*. 1994 Sep;22(17):3551-5.
- [16] Lees A, Sessler T, McDade S. Dying to Survive-The p53 Paradox. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 29;13(13):3257.
- [17] Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. 2022 May;29(5):946-960.
- [18] Quaas M, Müller GA, Engeland K. p53 can repress transcription of cell cycle genes through a p21(WAF1/CIP1)-dependent switch from MMB to DREAM protein complex binding at CHR promoter elements. *Cell Cycle*. 2012 Dec 15;11(24):4661-72.
- [19] Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prospero E. Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol*. 2015 Feb;89(2):155-78.
- [20] Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prospero E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res*. 2010 Apr-Jun;704(1-3):12-20.
- [21] Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Mar 29;9:645593.
- [22] Shamloo B, Usluer S. p21 in Cancer Research. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 14;11(8):1178.
- [23] Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysiak Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ*. 2018 Jan;25(1):133-143.
- [24] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*. 2007 Jun 8;26(5):745-52.
- [25] Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ*. 2018 Jan;25(1):114-132.

- [26] Pfister NT, Fomin V, Regunath K, Zhou JY, Zhou W, Silwal-Pandit L, Freed-Pastor WA, Laptenko O, Neo SP, Bargonetti J, Hoque M, Tian B, Gunaratne J, Engebraaten O, Manley JL, Børresen-Dale AL, Neilsen PM, Prives C. Mutant p53 cooperates with the SWI/SNF chromatin remodeling complex to regulate VEGFR2 in breast cancer cells. *Genes Dev.* 2015 Jun 15;29(12):1298-315.
- [27] Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J, Crabtree GR. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet.* 2013 Jun;45(6):592-601.
- [28] Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2014 May;14(5):359-70.
- [29] Law CT, Wei L, Tsang FH, Chan CY, Xu IM, Lai RK, Ho DW, Lee JM, Wong CC, Ng IO, Wong CM. HELLS Regulates Chromatin Remodeling and Epigenetic Silencing of Multiple Tumor Suppressor Genes in Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2019 May;69(5):2013-2030.
- [30] Ryan DP, Owen-Hughes T. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. *Curr Opin Chem Biol.* 2011 Oct;15(5):649-56.
- [31] Dürr H, Flaus A, Owen-Hughes T, Hopfner KP. Snf2 family ATPases and DExx box helicases: differences and unifying concepts from high-resolution crystal structures. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(15):4160-7.
- [32] Neugeborn L, Carlson M. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1984 Dec;108(4):845-58.
- [33] Stern M, Jensen R, Herskowitz I. Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J Mol Biol.* 1984 Oct 5;178(4):853-68.
- [34] Flaus A, Martin DM, Barton GJ, Owen-Hughes T. Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res.* 2006 May 31;34(10):2887-905.
- [35] Kohashi K, Yamamoto H, Yamada Y, Kinoshita I, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. SWI/SNF Chromatin-remodeling Complex Status in SMARCB1/INI1-preserved Epithelioid Sarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2018 Mar;42(3):312-318.
- [36] Nambirajan A, Singh V, Bhardwaj N, Mittal S, Kumar S, Jain D. SMARCA4/BRG1-Deficient Non-Small Cell Lung Carcinomas: A Case Series and Review of the Literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2021 Jan 1;145(1):90-98.
- [37] Schwartz CJ, Pareja F, da Silva EM, Selenica P, Ross DS, Weigelt B, Brogi E, Reis-Filho JS, Wen HY. Histologic and genomic features of breast cancers with alterations affecting the SWI/SNF (SMAR) genes. *Mod Pathol.* 2021 Oct;34(10):1850-1859.

- [38] Kollárovič G, Topping CE, Shaw EP, Chambers AL. The human HELLS chromatin remodelling protein promotes end resection to facilitate homologous recombination and contributes to DSB repair within heterochromatin. *Nucleic Acids Res.* 2020 Feb 28;48(4):1872-1885.
- [39] Han M, Li J, Cao Y, Huang Y, Li W, Zhu H, Zhao Q, Han JJ, Wu Q, Li J, Feng J, Wong J. A role for LSH in facilitating DNA methylation by DNMT1 through enhancing UHRF1 chromatin association. *Nucleic Acids Res.* 2020 Dec 2;48(21):12116-12134.
- [40] Hou X, Yang L, Wang K, Zhou Y, Li Q, Kong F, Liu X, He J. HELLS, a chromatin remodeler is highly expressed in pancreatic cancer and downregulation of it impairs tumor growth and sensitizes to cisplatin by reexpressing the tumor suppressor TGFBR3. *Cancer Med.* 2021 Jan;10(1):350-364.
- [41] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol.* 2004 Nov;25(5):1495-500.
- [42] Dai S, Qu L, Li J, Chen Y. Toward a mechanistic understanding of DNA binding by forkhead transcription factors and its perturbation by pathogenic mutations. *Nucleic Acids Res.* 2021 Oct 11;49(18):10235-10249.
- [43] Chen X, Müller GA, Quaas M, Fischer M, Han N, Stutchbury B, Sharrocks AD, Engeland K. The forkhead transcription factor FOXM1 controls cell cycle-dependent gene expression through an atypical chromatin binding mechanism. *Mol Cell Biol.* 2013 Jan;33(2):227-36.
- [44] Koo CY, Muir KW, Lam EW. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jan;1819(1):28-37.
- [45] Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):2129-37.
- [46] Meng FD, Wei JC, Qu K, Wang ZX, Wu QF, Tai MH, Liu HC, Zhang RY, Liu C. FoxM1 overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015 Jan 7;21(1):196-213.
- [47] Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, Petrovic V, Kuechle J, Yoder HM, Dennewitz MB, Shin B, Datta A, Raychaudhuri P, Costa RH. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev.* 2004 Apr 1;18(7):830-50.
- [48] Park HJ, Gusarova G, Wang Z, Carr JR, Li J, Kim KH, Qiu J, Park YD, Williamson PR, Hay N, Tyner AL, Lau LF, Costa RH, Raychaudhuri P. Dereglulation of FoxM1b leads to tumour metastasis. *EMBO Mol Med.* 2011 Jan;3(1):21-34.
- [49] Liao GB, Li XZ, Zeng S, Liu C, Yang SM, Yang L, Hu CJ, Bai JY. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Commun Signal.* 2018 Sep 12;16(1):57.

- [50] Moon H, Ro SW. MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 17;13(12):3026.
- [51] Calvisi DF, Pinna F, Ladu S, Pellegrino R, Simile MM, Frau M, De Miglio MR, Tomasi ML, Sanna V, Mironi MR, Feo F, Pascale RM. Forkhead box M1B is a determinant of rat susceptibility to hepatocarcinogenesis and sustains ERK activity in human HCC. *Gut*. 2009 May;58(5):679-87.
- [52] Barsotti AM, Prives C. Pro-proliferative FoxM1 is a target of p53-mediated repression. *Oncogene*. 2009 Dec 3;28(48):4295-305.
- [53] Schuller S, Sieker J, Riemenschneider P, Köhler B, Drucker E, Weiler SME, Dauch D, Sticht C, Goeppert B, Roessler S, Ribback S, Breuhahn K, Fend F, Dombrowski F, Singer K, Singer S. HELLS Is Negatively Regulated by Wild-Type P53 in Liver Cancer by a Mechanism Involving P21 and FOXM1. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 17;14(2):459.
- [54] Chen L, Shi Y, Liu N, Wang Z, Yang R, Yan B, Liu X, Lai W, Liu Y, Xiao D, Zhou H, Cheng Y, Cao Y, Liu S, Xia Z, Tao Y. DNA methylation modifier LSH inhibits p53 ubiquitination and transactivates p53 to promote lipid metabolism. *Epigenetics Chromatin*. 2019 Oct 8;12(1):59.
- [55] von Eyss B, Maaskola J, Memczak S, Möllmann K, Schuetz A, Loddenkemper C, Tanh MD, Otto A, Muegge K, Heinemann U, Rajewsky N, Ziebold U. The SNF2-like helicase HELLS mediates E2F3-dependent transcription and cellular transformation. *EMBO J*. 2012 Feb 15;31(4):972-85.
- [56] Robinson MH, Maximov V, Lallani S, Farooq H, Taylor MD, Read RD, Kenney AM. Upregulation of the chromatin remodeler HELLS is mediated by YAP1 in Sonic Hedgehog Medulloblastoma. *Sci Rep*. 2019 Sep 20;9(1):13611.
- [57] Aksoy O, Chicas A, Zeng T, Zhao Z, McCurrach M, Wang X, Lowe SW. The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev*. 2012 Jul 15;26(14):1546-57.
- [58] Carvajal LA, Hamard PJ, Tonnessen C, Manfredi JJ. E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes Dev*. 2012 Jul 15;26(14):1533-45.
- [59] Chand V, Pandey A, Kopanja D, Guzman G, Raychaudhuri P. Opposing Roles of the Forkhead Box Factors FoxM1 and FoxA2 in Liver Cancer. *Mol Cancer Res*. 2019 May;17(5):1063-1074.
- [60] Kurahashi T, Yoshida Y, Ogura S, Egawa M, Furuta K, Hikita H, Kodama T, Sakamori R, Kiso S, Kamada Y, Wang IC, Eguchi H, Morii E, Doki Y, Mori M, Kalinichenko VV, Tatsumi T, Takehara T. Forkhead Box M1 Transcription Factor Drives Liver Inflammation Linking to Hepatocarcinogenesis in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9(3):425-446.

- [61] Tian C, Wu H, Li C, Tian X, Sun Y, Liu E, Liao X, Song W. Downregulation of FoxM1 by miR-214 inhibits proliferation and migration in hepatocellular carcinoma. *Gene Ther.* 2018 Jul;25(4):312-319.
- [62] Yan D, Yan X, Dai X, Chen L, Sun L, Li T, He F, Lian J, Cai W. Activation of AKT/AP1/FoxM1 signaling confers sorafenib resistance to liver cancer cells. *Oncol Rep.* 2019 Aug;42(2):785-796.
- [63] Roessler S, Jia HL, Budhu A, Forgues M, Ye QH, Lee JS, Thorgeirsson SS, Sun Z, Tang ZY, Qin LX, Wang XW. A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res.* 2010 Dec 15;70(24):10202-12.
- [64] Liang X, Li L, Fan Y. Diagnostic, Prognostic, and Immunological Roles of HELLS in Pan-Cancer: A Bioinformatics Analysis. *Front Immunol.* 2022 Jun 14;13:870726.
- [65] De Dieuleveult M, Bizet M, Colin L, Calonne E, Bachman M, Li C, Stancheva I, Miotto B, Fuks F, Deplus R. The chromatin remodelling protein LSH/HELLS regulates the amount and distribution of DNA hydroxymethylation in the genome. *Epigenetics.* 2022 Apr;17(4):422-443.
- [66] Peixoto E, Khan A, Lewis ZA, Contreras-Galindo R, Czaja W. The Chromatin Remodeler HELLS: A New Regulator in DNA Repair, Genome Maintenance, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 18;23(16):9313.
- [67] Dennis K, Fan T, Geiman T, Yan Q, Muegge K. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev.* 2001 Nov 15;15(22):2940-4.
- [68] Ren J, Briones V, Barbour S, Yu W, Han Y, Terashima M, Muegge K. The ATP binding site of the chromatin remodeling homolog Lsh is required for nucleosome density and de novo DNA methylation at repeat sequences. *Nucleic Acids Res.* 2015 Feb 18;43(3):1444-55.
- [69] Zhu H, Geiman TM, Xi S, Jiang Q, Schmidtman A, Chen T, Li E, Muegge K. Lsh is involved in de novo methylation of DNA. *EMBO J.* 2006 Jan 25;25(2):335-45.
- [70] Myant K, Stancheva I. LSH cooperates with DNA methyltransferases to repress transcription. *Mol Cell Biol.* 2008 Jan;28(1):215-26.
- [71] Baumann C, Ma W, Wang X, Kandasamy MK, Viveiros MM, De La Fuente R. Helicase LSH/Hells regulates kinetochore function, histone H3/Thr3 phosphorylation and centromere transcription during oocyte meiosis. *Nat Commun.* 2020 Sep 8;11(1):4486.
- [72] Liu X, Hou X, Zhou Y, Li Q, Kong F, Yan S, Lei S, Xiong L, He J. Downregulation of the Helicase Lymphoid-Specific (HELLS) Gene Impairs Cell Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest in Colorectal Cancer Cells. *Onco Targets Ther.* 2019 Nov 26;12:10153-10163.

- [73] Tameni A, Sauta E, Mularoni V, Torricelli F, Manzotti G, Inghirami G, Bellazzi R, Fragliasso V, Ciarrocchi A. The DNA-helicase HELLS drives ALK<sup>+</sup> ALCL proliferation by the transcriptional control of a cytokinesis-related program. *Cell Death Dis.* 2021 Jan 27;12(1):130.
- [74] Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysiak Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):133-143.
- [75] Johnson RA, Ince TA, Scotto KW. Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem.* 2001 Jul 20;276(29):27716-20.
- [76] Wang B, Xiao Z, Ren EC. Redefining the p53 response element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 25;106(34):14373-8.
- [77] Li XJ, Ren ZJ, Tang JH. MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer. *Cell Death Dis.* 2014 Jul 17;5(7):e1327.
- [78] Slabáková E, Culig Z, Remšík J, Souček K. Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis.* 2017 Oct 12;8(10):e3100.
- [79] Sanders DA, Ross-Innes CS, Beraldi D, Carroll JS, Balasubramanian S. Genome-wide mapping of FOXM1 binding reveals co-binding with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Genome Biol.* 2013 Jan 24;14(1):R6.
- [80] Madhi H, Lee JS, Choi YE, Li Y, Kim MH, Choi Y, Goh SH. FOXM1 Inhibition Enhances the Therapeutic Outcome of Lung Cancer Immunotherapy by Modulating PD-L1 Expression and Cell Proliferation. *Adv Sci (Weinh).* 2022 Oct;9(29):e2202702.
- [81] Xie D, Yu S, Li L, Quan M, Gao Y. The FOXM1/ATX signaling contributes to pancreatic cancer development. *Am J Transl Res.* 2020 Aug 15;12(8):4478-4487.
- [82] Kalin TV, Wang IC, Ackerson TJ, Major ML, Detrisac CJ, Kalinichenko VV, Lyubimov A, Costa RH. Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1712-20.
- [83] Yang K, Jiang B, Lu Y, Shu Q, Zhai P, Zhi Q, Li Q. FOXM1 promotes the growth and metastasis of colorectal cancer via activation of  $\beta$ -catenin signaling pathway. *Cancer Manag Res.* 2019 May 1;11:3779-3790.
- [84] Roh V, Hiou-Feige A, Misetic V, Rivals JP, Sponarova J, Teh MT, Ferreira Lopes S, Truan Z, Mermoud M, Monnier Y, Hess J, Tolstonog GV, Simon C. The transcription factor FOXM1 regulates the balance between proliferation and aberrant differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2020 Jan;250(1):107-119.
- [85] Chu XY, Zhu ZM, Chen LB, Wang JH, Su QS, Yang JR, Lin Y, Xue LJ, Liu XB, Mo XB. FOXM1 expression correlates with tumor invasion and a poor prognosis of colorectal cancer. *Acta Histochem.* 2012 Dec;114(8):755-62.

- [86] Priller M, Pöschl J, Abrão L, von Bueren AO, Cho YJ, Rutkowski S, Kretschmar HA, Schüller U. Expression of FoxM1 is required for the proliferation of medulloblastoma cells and indicates worse survival of patients. *Clin Cancer Res*. 2011 Nov 1;17(21):6791-801.
- [87] Korver W, Roose J, Clevers H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res*. 1997 May 1;25(9):1715-9.
- [88] Costa RH. FoxM1 dances with mitosis. *Nat Cell Biol*. 2005 Feb;7(2):108-10.
- [89] Korver W, Schilham MW, Moerer P, van den Hoff MJ, Dam K, Lamers WH, Medema RH, Clevers H. Uncoupling of S phase and mitosis in cardiomyocytes and hepatocytes lacking the winged-helix transcription factor Trident. *Curr Biol*. 1998 Dec 3;8(24):1327-30.
- [90] Wang IC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ, Tan Y, Ackerson T, Costa RH. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(24):10875-94.
- [91] Tan Y, Chen Y, Yu L, Zhu H, Meng X, Huang X, Meng L, Ding M, Wang Z, Shan L. Two-fold elevation of expression of FoxM1 transcription factor in mouse embryonic fibroblasts enhances cell cycle checkpoint activity by stimulating p21 and Chk1 transcription. *Cell Prolif*. 2010 Oct;43(5):494-504.
- [92] Li R, Okada H, Yamashita T, Nio K, Chen H, Li Y, Shimakami T, Takatori H, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. FOXM1 Is a Novel Molecular Target of AFP-Positive Hepatocellular Carcinoma Abrogated by Proteasome Inhibition. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 27;23(15):8305.
- [93] Wang Y, Wang H, Yan Z, Li G, Hu G, Zhang H, Huang D, Wang Y, Zhang X, Yan Y, Lu Q, Cheng M, Luo S. The critical role of dysregulated Hh-FOXM1-TPX2 signaling in human hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Commun Signal*. 2020 Jul 28;18(1):116.
- [94] Teh MT, Gemenetzidis E, Patel D, Tariq R, Nadir A, Bahta AW, Waseem A, Hutchison IL. FOXM1 induces a global methylation signature that mimics the cancer epigenome in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(3):e34329.
- [95] Lakshminarasimhan R, Liang G. The Role of DNA Methylation in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;945:151-172.
- [96] Teh MT, Gemenetzidis E, Chaplin T, Young BD, Philpott MP. Upregulation of FOXM1 induces genomic instability in human epidermal keratinocytes. *Mol Cancer*. 2010 Feb 26;9:45.
- [97] Carr JR, Kiefer MM, Park HJ, Li J, Wang Z, Fontanarosa J, DeWaal D, Kopanja D, Benevolenskaya EV, Guzman G, Raychaudhuri P. FoxM1 regulates mammary luminal cell fate. *Cell Rep*. 2012 Jun 28;1(6):715-29.

- [98] Waseem A, Ali M, Odell EW, Fortune F, Teh MT. Downstream targets of FOXM1: CEP55 and HELLS are cancer progression markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010 Jul;46(7):536-42.
- [99] Gemenetzidis E, Bose A, Riaz AM, Chaplin T, Young BD, Ali M, Sugden D, Thurlow JK, Cheong SC, Teo SH, Wan H, Waseem A, Parkinson EK, Fortune F, Teh MT. FOXM1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation. *PLoS One.* 2009;4(3):e4849.
- [100] Weiler SME, Pinna F, Wolf T, Lutz T, Geldiyev A, Sticht C, Knaub M, Thomann S, Bissinger M, Wan S, Rössler S, Becker D, Gretz N, Lang H, Bergmann F, Ustiyan V, Kalin TV, Singer S, Lee JS, Marquardt JU, Schirmacher P, Kalinichenko VV, Breuhahn K. Induction of Chromosome Instability by Activation of Yes-Associated Protein and Forkhead Box M1 in Liver Cancer. *Gastroenterology.* 2017 Jun;152(8):2037-2051.e22.
- [101] Kaur J, Daoud A, Eblen ST. Targeting Chromatin Remodeling for Cancer Therapy. *Curr Mol Pharmacol.* 2019;12(3):215-229.
- [102] Wawruszak A, Borkiewicz L, Okon E, Kukula-Koch W, Afshan S, Halasa M. Vorinostat (SAHA) and Breast Cancer: An Overview. *Cancers (Basel).* 2021 Sep 19;13(18):4700.
- [103] Liao B, Zhang Y, Sun Q, Jiang P. Vorinostat enhances the anticancer effect of oxaliplatin on hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Med.* 2018 Jan;7(1):196-207.
- [104] Wang Y, Janku F, Piha-Paul S, Hess K, Broaddus R, Liu L, Shi N, Overman M, Kopetz S, Subbiah V, Naing A, Hong D, Tsimberidou AM, Karp D, Yao J, Fu S. Phase I studies of vorinostat with ixazomib or pazopanib imply a role of antiangiogenesis-based therapy for TP53 mutant malignancies. *Sci Rep.* 2020 Feb 20;10(1):3080.
- [105] Butler C, Sprowls S, Szalai G, Arsiwala T, Saralkar P, Straight B, Hatcher S, Tyree E, Yost M, Kohler WJ, Wolff B, Putnam E, Lockman P, Liu T. Hypomethylating Agent Azacitidine Is Effective in Treating Brain Metastasis Triple-Negative Breast Cancer Through Regulation of DNA Methylation of Keratin 18 Gene. *Transl Oncol.* 2020 Jun;13(6):100775.
- [106] Xu XS, Miao RC, Wan Y, Zhang LQ, Qu K, Liu C. FoxM1 as a novel therapeutic target for cancer drug therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(1):23-9.
- [107] Wierstra I. The transcription factor FOXM1 (Forkhead box M1): proliferation-specific expression, transcription factor function, target genes, mouse models, and normal biological roles. *Adv Cancer Res.* 2013;118:97-398.
- [108] Wierstra I. FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis: overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy. *Adv Cancer Res.* 2013;119:191-419.

- [109] Gartel AL. Thiazole Antibiotics Siomycin a and Thiostrepton Inhibit the Transcriptional Activity of FOXM1. *Front Oncol.* 2013 Jun 6;3:150.
- [110] Radhakrishnan SK, Bhat UG, Hughes DE, Wang IC, Costa RH, Gartel AL. Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9731-5.
- [111] Zhang Y, Zhang N, Dai B, Liu M, Sawaya R, Xie K, Huang S. FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells. *Cancer Res.* 2008 Nov 1;68(21):8733-42.
- [112] Xue YJ, Xiao RH, Long DZ, Zou XF, Wang XN, Zhang GX, Yuan YH, Wu GQ, Yang J, Wu YT, Xu H, Liu FL, Liu M. Overexpression of FoxM1 is associated with tumor progression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Transl Med.* 2012 Sep 24;10:200.

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel (einschließlich Werkzeuge der Künstlichen Intelligenz) benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum, Unterschrift