

Expressionscharakterisierung und Identifizierung
tumorrelevanter Gene
beim humanen hepatozellulären Karzinom

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sebastian Vreden

aus Bonn

2005

Berichtersteller: Prof. Dr. Jens Brüning

Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 16. Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Verwendete Symbole und Abkürzungen.....	viii
Zusammenfassung.....	x
Abstract.....	xii
1 Einleitung.....	1
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom.....	1
1.2 Ätiologie des HCCs	2
1.3 Molekulare Mechanismen der Hepatokarzinogenese.....	3
1.3.1 Hepatitis-B-Virus.....	3
1.3.2 Hepatitis-C-Virus.....	4
1.3.3 Genomische Alterationen	4
1.3.4 Alterationen in tumorrelevanten Genen	5
1.4 Signalwege und Wachstumsfaktoren	8
1.4.1 Wnt-Signalweg.....	8
1.4.2 TGF- β -Signalweg.....	8
1.4.3 IGF-Signalweg	9
1.5 cDNA-Microarray-Analyse des HCCs.....	10
1.5.1 Microarray-Technologie	10
1.5.2 cDNA-Microarray-Technologie	11
1.5.3 Microarray-Studien am HCC.....	12
1.5.4 <i>Multi tissue arrays</i>	13
1.6 Ziele der Arbeit	15
2 Material.....	16
2.1 Eukaryontische Zelllinien	16
2.1.1 HCC-Zelllinien.....	16
2.1.2 Andere Zelllinien	16
2.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur	16
2.3 Puffer und Lösungen	17

2.3.1	cDNA-Microarrays	17
2.3.2	<i>Northern</i> -Hybridisierung.....	18
2.3.3	Immunoblot-Analyse	18
2.3.4	Gelelektion.....	18
2.3.5	DNA-Isolierung aus TRIzol-Phase	19
2.3.6	Proteinisolierung aus TRIzol-Phase	19
2.3.7	Immunhistochemie.....	19
2.4	Gele	19
2.5	Primer	20
2.5.1	<i>Northern</i> -Hybridisierungssonde	20
2.5.2	<i>Real-time</i> -PCR-Analyse.....	20
2.6	Plasmide	21
2.7	Antikörper	21
2.7.1	Primärantikörper	21
2.7.2	Sekundärantikörper	21
2.8	Kommerzielle Kits	21
2.9	Sonstige Materialien	22
3	Methoden	23
3.1	Gewebeproben	23
3.2	Klinische Daten.....	23
3.3	cDNA-Microarrays	23
3.4	<i>In silico</i> -Analyse.....	24
3.5	Isolierung von Nukleinsäuren	25
3.5.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	25
3.5.2	Isolierung der genomischen DNA	26
3.6	Isolierung der Proteine	27
3.7	Herstellung von Sonden für die <i>Northern</i> -Hybridisierung	27
3.8	<i>Northern</i> -Hybridisierung	28
3.9	Semiquantitative <i>real-time</i> -PCR	29
3.10	Immunohistologie	30
3.11	<i>Multi tissue arrays</i>	31
3.12	Zellkultur	32
3.13	Interferon-Behandlung	32
3.14	Elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid- gelelektrophorese	33
3.15	Immunoblot-Analyse	33

4 Ergebnisse	35
4.1 cDNA-Microarray-Analyse des HCCs.....	35
4.1.1 Etablierung eines Protokolls zur Extraktion von Nukleinsäuren und Proteinen aus Gewebe	35
4.1.2 Etablierung einer Referenz und Reproduzierbarkeit der Array-Analysen	36
4.1.3 cDNA-Microarray-Analysen	36
4.1.4 Subtypisierung der HCCs aufgrund der Expressionsprofile	40
4.1.5 Tumorzellapoptose und Tumor-infiltrierende Lymphozyten.....	43
4.1.6 IGF-II-Expression in einer Subpopulation von HCCs	44
4.2 Verifizierung der IGF-II-Expression im HCC.....	46
4.3 Analyse der IGF-II-Expression durch semiquantitative <i>real-time</i> -PCR.....	46
4.4 Interferon γ reprimiert die Expression von IGF-II in HCC-Zellen	48
4.5 Stathmin-Expression im HCC	49
4.5.1 Semiquantitativer Nachweis der Stathmin-Expression im HCC.....	49
4.5.2 Expressionsnachweis von Stathmin in Zelllinien	51
4.5.3 <i>Multi tissue arrays</i>	54
5 Diskussion	57
5.1 Subgruppierung der HCC-Population aufgrund der Expression von IGF-II und Interferon-modulierten Genen	59
5.2 Therapeutische Optionen	62
5.3 Stathmin	62
6 Literaturverzeichnis	67
7 Anhang	85
Danksagung	88
Erklärung	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung des HCCs als Folge der chronischen Virushepatitis.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der cDNA-Microarray-Analyse.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Herstellung von <i>multi tissue arrays</i>	14
Abbildung 4: Isolierung von Gesamt-RNA, genomischer DNA und Protein mit Hilfe von TRIzol aus Lebergewebe.....	35
Abbildung 5: <i>Cluster</i> -Analyse der untersuchten 43 HCCs und 3 HCC-Zelllinien.....	40
Abbildung 6: Sechszwanzig Apoptose- und Immunabwehr-assoziierte Gene.....	41
Abbildung 7: Immunhistologische Untersuchung der HCCs.....	43
Abbildung 8: <i>Re-clustering</i> der unabhängigen Expressionsdatensätze von 102 HCC- cDNA-Microarrays.....	44
Abbildung 9: <i>Re-clustering</i> der Expressionsdatensätze von 62 Mammakarzinomen.....	45
Abbildung 10: <i>Northern</i> -Hybridisierung mit einer IGF-II-spezifischen Sonde zur Verifizierung der Array-Daten.....	46
Abbildung 11: Semiquantitative <i>real-time</i> -PCR-Analyse der IGF-II-Expression.....	47
Abbildung 12: Interferon γ -abhängige Reduktion der IGF-II-Expression in HUH-7-Zellen.....	48
Abbildung 13: Expression von Stathmin in HCCs auf mRNA-Ebene.....	50
Abbildung 14: Darstellung der Expression von Stathmin und p53 in verschiedenen Zelllinien.....	51
Abbildung 15: Immunoblot-Analyse gegen Stathmin in neun HCCs und deren korrespondierenden nichttumorösen Geweben.....	53
Abbildung 16: <i>Multi tissue array</i> -Analyse der Stathmin-Expression in normaler Leber, dysplastischen Knoten und HCCs.....	54
Abbildung 17: <i>Multi tissue array</i> -Analyse der p53- und Ki-67-Expression.....	56
Abbildung 18: Schematische Darstellung der HCC-Subtypisierung.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der 19 Microarray-Untersuchungen zum HCC.	13
Tabelle 2: Kriterien zur Quantifizierung der Anzahl von immunhistochemisch gefärbten Zellen und Intensität dieser Färbung auf den <i>multi tissue arrays</i>	32
Tabelle 3: Testung der Reproduzierbarkeit der Microarrays	36
Tabelle 4: Liste der 43 HCCs und der korrespondierenden klinischen Daten.....	37
Tabelle 5: Liste der 53 Genen, die G1- von G3-HCCs unterscheiden	39
Tabelle 6: Sechszwanzig mit Apoptose- und Immunabwehr-assoziierte Gene unter den 118 Genen der <i>cluster</i> -Analyse	42
Tabelle 7: Interferon γ -abhängige Transkriptionsfaktoren und ihre Bindestellen im <i>igf2</i> -Gen	49
Tabelle 8: Korrelation der Stathmin-Expression mit der Expression tumorrelevanter Genprodukte.	55
Tabelle 9: Gesamtliste der 118 Gene der <i>cluster</i> -Analyse	85

Verwendete Symbole und Abkürzungen

Acc.-Nr.	<i>Accession-Nummer</i>
Ag	Antigen
Arg	Arginin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CGH	Komparative genomische Hybridisierung (<i>comparative genomic hybridisation</i>)
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DL	Deletion
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse-raddish-Peroxidase</i>)
Hz	Hertz
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF-BP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
IGF-I(I)R	<i>Insulin-like growth factor I(I) receptor</i>

IR	Insulinrezeptor
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LOH	Verlust an Heterogenität (<i>loss of hetreozygosity</i>)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MT	Mutation
MTA	<i>multi tissue array</i>
NaHPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
oligo	Oligonukleotid
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektropherese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RB-1	Retinoblastom 1
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat
Std	Stunde
TAE	Tris/Azetat/EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline</i> mit <i>Tween</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
U	<i>unit</i>
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt zu den häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. In etwa 80% der Fälle liegt der Hepatokarzinogenese eine chronische Lebererkrankung mit einer definierten Ätiologie, wie z.B. chronische Infektionen mit den Hepatitis-Viren B und C (HBV, HCV), zu Grunde. Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von HCCs vor dem Hintergrund einer meist zirrhotisch veränderten Leber führen, sind nur unzureichend verstanden. Eine molekulare Subtypisierung des HCC von potentiell mechanistischer und therapeutischer Bedeutung konnte bisher nicht erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 43 verschiedene humane HCC-Proben und drei HCC-Zelllinien im Vergleich mit gesunder, adulter Leber mit Hilfe von cDNA-Microarrays untersucht. Dreiundfünfzig Gene konnten identifiziert werden, die HCCs mit starker Differenzierung (Differenzierungsgrad G1) von solchen mit geringer Differenzierung (G3) unterscheiden, z.B. Histon-deacetylase 2 (HDAC2), Nucleolin (NCL), oder *seven in absentia homologue-1* (Siah-1). Die Gruppierungs- (*cluster-*) analyse der Microarray-Daten der HCCs und der Zelllinien nach Genen mit den stärksten Expressionsunterschieden innerhalb der Tumoren ergab eine Unterteilung in zwei Hauptgruppen (benannt Gruppe A (65%) und Gruppe B (35%)). Die HCCs der Gruppe A waren durch die Induktion einer Reihe Interferon-regulierter Gene charakterisiert, während die Gruppe B hauptsächlich durch die Reduktion der Expression einiger apoptoserelevanter und Interferon-regulierter Gene charakterisiert war. Auf zellulärer Ebene konnte mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass die Zahl der apoptotischen Zellen und die Zahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten in den Tumoren der Gruppe A im Vergleich zu denen der Gruppe B signifikant höher war.

Die Gruppe B konnte aufgrund ihres Expressionsmusters in zwei weitere Untergruppen (bezeichnet als Subgruppe B1 (sechs von 43 Tumoren, 14%) und Subgruppe B2 (neun von 43 Tumoren, 21%)) unterteilt werden. Ein Hauptcharakteristikum der Subgruppe B1 war die hohe Überexpression von *Insulin-like growth factor II* (IGF-II). Alle getesteten HCC-Zelllinien exprimierten vergleichbar hohe Konzentrationen des dem fötalen Expressionsmuster von IGF-II entsprechenden Transkripts und gruppieren in der *cluster-* Analyse zusammen mit den Tumoren der Subgruppe B1. Die IGF-II-Überexpression schloss auch dann noch die Induktion Interferon-regulierter Gene aus, als die Untersuchungen auf Analysen der Expressionsprofile anderer Tumor-Entitäten ausgedehnt wurden. Zudem wurde die IGF-II-Expression in HCC-Zelllinien durch deren Behandlung mit Interferon γ signifikant reduziert. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der cDNA-Microarray-Analyse eine Subtypisierung des HCC auf, die mit der intratumorösen Inflammation und der Tumorzellapoptose assoziiert ist. Diese Expressionsanalyse könnte sowohl für die Entstehung als auch für die Therapie von HCC von Bedeutung sein, da die Überexpression

von IGF-II bereits mit einer reduzierten Apoptose und einer erhöhten Proliferation in Verbindung gebracht wurde und einen möglichen Ansatzpunkt für einen therapeutischen Eingriff darstellt.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von Stathmin in der Hepatokarzinogenese. Stathmin, ein zytoplasmatisches Phosphoprotein, das u.a. über die Kontrolle der Stabilität von Mikrotubuli mit dem Zellzyklus assoziiert ist, wurde in der cDNA-Microarray-Analyse in allen HCCs überexprimiert. Die Untersuchung der Transkriptmenge mit Hilfe der *real-time*-PCR ergab, dass Stathmin in 38% der HCCs (13 von 34 Tumoren) im Vergleich zur normalen Leber um mindestens den Faktor zwei hochreguliert war. Auf Proteinebene konnte mit Hilfe von *multi tissue microarrays* eine hochsignifikante Korrelation der Zunahme und Häufigkeit der Expression von Stathmin mit der Entdifferenzierung der HCCs nachgewiesen werden. Eine solche Korrelation konnte ebenfalls für die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie für p53 gezeigt werden.

Die Analyse der Proteinexpression von Stathmin in einer Reihe von Zelllinien zeigte eine Verbindung zum Expressionsstatus von p53 auf. Zelllinien, die die Wildtyp-Form des p53 exprimieren, zeigten keine Expression des Stathmins. Eine deutliche Steigerung der Expression von Stathmin in Zelllinien konnte jedoch beobachtet werden, wenn das p53-Gen hingegen mutiert oder deletiert vorlag. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass p53 die Expression von Stathmin beeinflusst.

Stathmin scheint, wie bereits für andere Tumorentitäten gezeigt werden konnte, auch im HCC ein wichtiger Faktor bei der Entdifferenzierung und Proliferation zu sein. Durch seine wichtige Rolle in der Mitose stellt es eine interessante Zielstruktur für einen therapeutischen Ansatz dar.

Abstract

The hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common tumours worldwide. 80% are based on a chronic liver disease with a defined aetiology, e.g. chronic infections with hepatitis virus B or C (HBV, HCV). The molecular mechanisms leading to the development of HCCs, generally on the background of a cirrhotic liver, are not well understood. Molecular subtyping of human HCC with potential mechanistic and therapeutic impact has not been achieved so far. We have analysed the mRNA expression patterns of 43 different human HCC samples and three HCC cell lines in comparison to normal adult liver using high-density cDNA microarrays. Fifty-three genes were identified which discriminated HCCs of differentiation grade G1 from grade G3 tumours, e.g. histone deacetylase 2 (HDAC2), nucleolin (NCL), or seven in absentia homologue-1 (Siah-1). Two main groups of HCCs designated group A (65%) and group B (35%) were distinguished by clustering the most highly varying genes. Group A HCCs were characterised by induction of a number of interferon-regulated genes, whereas group B was mainly characterised by down-regulation of several apoptosis-relevant and interferon -regulated genes. The number of apoptotic tumour cells and tumour infiltrating lymphocytes was the significantly higher in tumours of group A as compared with group B. Based on the expression pattern group B was further subdivided into two subgroups (designated subgroup B1 (six of 43 tumours, 14%) and subgroup B2 (nine of 43 tumours, 21%)). A prominent characteristic of subgroup B1 was high over-expression of IGF-II. All tested HCC-cell lines equally expressed high concentrations of IGF-II transcripts and co-segregated with group B1 in clustering. IGF-II over-expression was mutually exclusive to induction of IFN-related genes even when analysis was extended to other cancer expression profile studies. Moreover, interferon γ treatment significantly reduced IGF-II expression in HCC-cells. In conclusion, cDNA microarray analyses provided a method for subtyping of HCCs that is related to intra tumorous inflammation and tumour cell apoptosis. This profiling may be of mechanistic and therapeutic impact, since IGF-II over-expression has been linked to reduced apoptosis and increased proliferation and may be accessible to therapeutic intervention.

Another gene being differentially expressed in a number of HCCs is stathmin. The expression of this ubiquitously expressed cytosolic protein is altered in a number of malignancies such as ovarian, mamma or prostate carcinomas. It is an important factor during cell mitosis as it is responsible for the polymerisation and de-polymerisation of microtubules. Semiquantitative real time PCR of 34 tumours showed an increase of stathmin expression (at least of factor two) in 38% of the tumours (13 of 34 tumours). Increase in expression correlates with the de-differentiation of HCCs, proliferation (Ki-67), and expression of mutated p53. The analysis of stathmin expression in various cell lines

demonstrated the repression of stathmin if wild-type p53 is present. Stathmin seems to be a critical factor for de-differentiation and proliferation of HCC. It might prove as an ideal target for chemotherapeutic attempt in combination with other substances aiming at microtubules to prevent tumour growth.

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC, *hepatocellular carcinoma*) gehört zu der Gruppe der epithelialen Tumoren und ist der häufigste primäre maligne Lebertumor. Gegenwärtig ist es der fünft- bis siebthäufigste Tumor weltweit (Bosch, 1997). Männer entwickeln zweimal häufiger HCCs als Frauen (Beasley und Hwang, 1984). Nach Diagnose beträgt die durchschnittliche Überlebensdauer etwa sechs Monate, und die Überlebensrate nach fünf Jahren ist kleiner als 3% (Feitelson et al., 2002). Der Tod tritt häufig durch Leberversagen ein, assoziiert mit Zirrhose und/oder einer raschen multifokalen Tumorprogression. Das HCC entwickelt sich oft auf Basis einer chronischen, meist viral bedingten Hepatitis im Stadium der Zirrhose.

Obwohl die Zirrhose ein wichtiger Faktor für die Entstehung von HCCs ist, können Tumoren auch vor dem Hintergrund einer nicht-zirrhotischen Leber entstehen (Dürr und Caselmann, 2000). In der westlichen Welt, in der Infektionen mit Hepatitis-Viren gewöhnlich im Erwachsenenalter erfolgen, sind 70 bis 80% der HCCs mit der Entwicklung einer Zirrhose in der Leber assoziiert (Kern et al., 2002a). In Südostasien und Teilen Afrikas ist der Anteil der Zirrhose als auslösender Faktor jedoch geringer als 50% (Kew und Popper, 1984).

Die humane Hepatokarzinogenese repräsentiert einen graduierten Prozess, der in drei Stadien unterteilt werden kann: (I) Initiation, (II) Promotion und (III) Progression. (I) Die Initiation kann durch Karzinogene wie z.B. Aflatoxine verursacht werden, die zu Mutationen im Genom führen. (II) Die Promotion ist durch die klonale Expansion der initiierten Zellen und die Bildung von dysplastischen Foci mit einer Größe von zunächst weniger als 0,1 cm im Durchmesser und dann von dysplastischen Knoten mit mehr als 0,1 cm Durchmesser charakterisiert (Ishak et al., 2001). Histologisch zeigen die dysplastischen Läsionen bereits einige Charakteristika von Karzinomen, wie erhöhtes Kern-/Zytoplasma-Verhältnis, zytoplasmatische Basophilie und/oder milde trabekuläre Architekturstörung, aber noch keine definitiven Anzeichen einer malignen Transformation, wie vaskuläre und interstitielle Invasion sowie intra- oder extrahepatische Metastasen (Ishak et al., 2001). (III) In der Progressionsphase akkumulieren weitere genomische Aberrationen und Alterationen in tumorrelevanten Genen (Onkogene, Tumorsuppressorgene).

1.2 Ätiologie des HCCs

Obwohl das HCC in westlichen Industrieländern seltener vorkommt als in Entwicklungsländern, zeigen Studien aus Großbritannien, Frankreich und Deutschland einen Anstieg der Inzidenz in den letzten Jahrzehnten (Taylor-Robinson et al., 1997; Becker und Wahrendorf, 1998; Deuffic et al., 1998). Der Grund dafür liegt bei konstanter Hepatitis-B-Virus (HBV)-Prävalenz in der Zunahme der Hepatitis-C-Virus (HCV)-Neuinfektionen.

Die Entwicklung eines HCCs basiert in mehr als 80% der Fälle auf einer chronischen Lebererkrankung mit definierter Ätiologie. In den USA, Europa und Japan sind in über 70% der Fälle chronische Infektionen mit HBV und HCV für die Entstehung von HCCs verantwortlich (Kondoh et al., 2001) (Abbildung 1). In Südost-Asien und in Afrika südlich der Sahara sind die höchsten Prozentsätze an HCC-Erkrankungen innerhalb der Bevölkerung festzustellen. Dies korreliert mit einer hohen Inzidenz an HBV-Infektionen und einer hohen Aflatoxin-Belastung (Dürr und Caselmann, 2000). Eine HBV-Infektion erhöht das Risiko, ein HCC zu entwickeln gegenüber einer nicht-infizierten Person um das Hundertfache. In etwa 10% der Fälle entwickelt sich nach der Infektion mit HBV eine chronische Hepatitis, die in etwa 10 bis 30% der Fälle wiederum Grundlage für die Entstehung einer Zirrhose ist (Feitelson, 1999) (Abbildung 1).

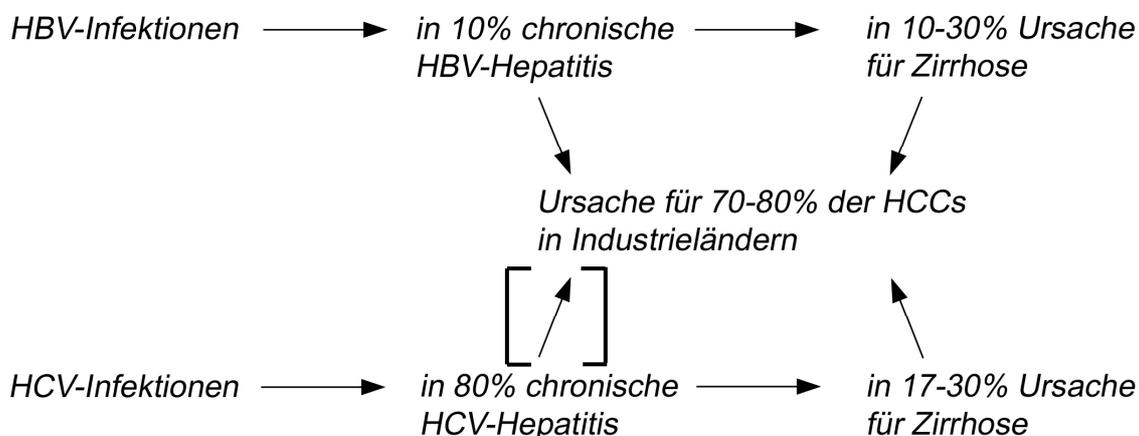


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung des HCCs als Folge der chronischen Virushepatitis.

Die Durchseuchung mit HCV ist weltweit hoch und beträgt in einigen Ländern bis zu 20% der Bevölkerung. Im Vergleich zur HBV-Infektion ist der Verlauf der chronischen HCV-Infektion meist milder; jedoch liegt die Ausprägung einer chronischen Hepatitis mit 80% der Infizierten viel höher. Bis zu 30% der Patienten mit einer chronischen HCV-assoziierten Hepatitis entwickeln eine Zirrhose (Kern et al., 2002a).

Obwohl das HCC-Risiko nach einer Infektion mit HCV etwas geringer ist als bei einer Infektion mit HBV, verdrängt das HCV HBV, für das ein wirksamer Impfstoff vorhanden ist, als maßgeblichen Risikofaktor für die Entwicklung eines HCCs in vielen Industriestaaten (Kubicka et al., 2000). In Japan sind ca. 80% der HCC-Fälle mit einer chronischen HCV-Infektion assoziiert (Okuda, 2000).

Langzeitstudien zeigen, dass Alkoholmissbrauch eine weitere bedeutende Ursache für die Entstehung von HCCs in Europa und den USA darstellt (Okuda, 1992; Ikeda et al., 1993; Benvegnu et al., 1994). Alkoholmissbrauch ist hier die häufigste Ursache für Leberzirrhosen und dadurch auch eine wesentliche Ursache für die Entwicklung von HCCs. In den USA weisen ca. 15% der HCC-Patienten eine durch Alkohol verursachte Zirrhose auf (Caselmann et al., 1990).

Auch Umweltfaktoren konnten als Auslöser für Leberschädigungen identifiziert werden. Aflatoxin B₁, ein Produkt des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus*, welcher hauptsächlich in China und Afrika für die Kontamination von Nahrungsmitteln verantwortlich ist, wurde mit einer spezifischen Mutation im Kodon 249 des p53-Gens assoziiert (Aguilar et al., 1993). In der westlichen Welt spielt dieser Faktor bei der Entstehung von HCCs jedoch keine wesentliche Rolle.

Einen geringen Anteil als auslösende Faktoren zur Entstehung von HCCs haben Stoffwechselerkrankungen, wie die genetische Hämochromatose, α_1 -Antitrypsin-Mangel, die Wilson's Erkrankung, Glykogenspeicherkrankheiten und die hereditäre Tyrosinämie {Kern, 2002 #382}.

1.3 Molekulare Mechanismen der Hepatokarzinogenese

1.3.1 HEPATITIS-B-VIRUS

HBV gehört zur Klasse der *Hepadnaviridae* und ist eines der kleinsten pathogenen Viren (42 nm) mit einem kompakten, partiell doppelsträngigen DNA-Genom von 3,2 Kilobasenpaaren (kbp) (Feitelson, 1999). Das HBV-Genom besteht aus vier offenen Leserastern: Das C-Leseraster kodiert für das Nukleokapsid (HBcAg) und das Serum-E-Antigen (HBeAg), das S-Leseraster für die Oberflächenantigene (HBsAg: prä-S1, prä-S2 und das S-Genprodukt), das P-Leseraster für die Polymerase/reverse Transkriptase RNase H und das X-Leseraster für das X-Antigen (HBxAg) (Kondoh et al., 2001).

Zwei HBV-spezifische Mechanismen tragen maßgeblich zur Entstehung von HCCs bei. (I) Ein Mechanismus beruht auf der zufälligen Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom durch nicht-homologe Rekombination (Matsubara und Tokino, 1990). Diese wird vermutlich durch kurze Abschnitte von Sequenzhomologien oder spezifische lokale Charakteristika der chromosomalen Integrationsstelle begünstigt und führt zur Destabilisierung des Wirtsgenoms (Schirmacher et al., 1995). Zudem wurden Integrationen des HBV-Genoms

nachgewiesen, die zur Aktivierung tumorrelevanter Gene, wie Cyclin A, Melanovtkinase und c-erbB2, führen (Dejean et al., 1986; Wang et al., 1990; Graef et al., 1994). (II) Der zweite pro-tumorigene Mechanismus beruht auf der transaktivierenden Eigenschaft viraler Faktoren (HBxAg und prä-S) (Wollersheim et al., 1988; Caselmann et al., 1990). Die Vielzahl an intrazellulären Interaktionen lässt das HBxAg ähnlich wie Phorbol ester als Tumorpromotor wirken, und es moduliert so die Stimulation des Ras/Raf/MAPK-Signalweges (Kekule et al., 1993; Benn et al., 1996), des JAK/STAT-Signalweges (Lee und Yun, 1998) und die Interaktion mit dem für Zellzyklus und Apoptose relevanten p53 (Terradillos et al., 1997). Ferner konnten weitere pro-tumorigene Interaktionen des HBxAg und des HBsAg, wie z.B. die Aktivierung von c-myc, Transaktivierung durch AP-2 und NF- κ -B oder die Induktion von p21^{waf/cip1} aufgezeigt werden (Kekule et al., 1990; Kekule et al., 1993; Park et al., 2000).

1.3.2 HEPATITIS-C-VIRUS

HCV ist ein Flavivirus mit einem einzelsträngigen RNA-Genom von etwa neun Kilobasen (kB) Länge, bestehend aus einem einzigen offenen Leseraster (Major und Feinstone, 1997). Die Translation des viralen Genoms generiert ein Vorläufer-Polypeptid, das autokatalytisch in verschiedene strukturelle und nicht-strukturelle virale Proteine gespalten wird. Im Gegensatz zu HBV beinhaltet die HCV-Replikation keine DNA-Intermediate; das virale Genom kann deshalb nicht in das Wirtsgenom integrieren. Studien bezüglich des onkogenen Potentials von HCV haben sich hauptsächlich auf zwei Gene konzentriert, das *core*-Gen und das des nichtstrukturellen Proteins NS5A. Das HCV-*core*-Protein induziert in Mäusen, welche dieses transgen in der Leber exprimieren, dort die Bildung von Karzinomen (Moriya et al., 1998). Ferner wird eine Beeinflussung der p53- und p21^{waf/cip1}-Expression sowie eine funktionelle Modulation der MAPK-, NF- κ B-, p53- und TNF- α -Signalwege beschrieben (Ray et al., 1997; You et al., 1999; Hayashi et al., 2000; Ray et al., 2000). Von NS5A wird angenommen, dass es sich um einen transkriptionellen Transaktivator handelt (Kato et al., 1997), der vermutlich über eine direkte Regulation von p53- und cdk-Cyclin-Komplexen oder durch Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose Einfluss auf das Zellwachstum nimmt (Ghosh et al., 2000; Arima et al., 2001; Lan et al., 2002).

1.3.3 GENOMISCHE ALTERATIONEN

Zur Untersuchung von chromosomalen Veränderungen werden zwei unterschiedliche Methoden herangezogen. Zum einen wird die Mikrosatellitenanalyse verwendet, eine PCR-basierte Methode, welche durch den Vergleich polymorpher, repetitiver Sequenzen des Genoms (Mikrosatelliten) den Heterozygotie-Verlust (LOH, *loss of heterozygosity*) feststellen kann.

Mit Hilfe dieser Methode konnten in verschiedenen Studien aus unterschiedlichen Erdteilen für das HCC besonders häufig der LOH an den Chromosomenarmen 8p (42%), 4q (41%), 16q und 17p (40,5%) sowie 1p (37,5%) festgestellt werden. Diese Studien geben Hinweise darauf, dass die nicht zufällig auftretenden chromosomalen Deletionen in einer geordneten Weise beim HCC entstehen. Außerdem könnte der relativ häufige allelische Verlust mit den bisher identifizierten Risikofaktoren assoziiert sein (zusammengefasst in (Buendia, 2000)).

Die andere Methode zur Untersuchung chromosomaler Veränderungen ist die *comparative genomic hybridization* (CGH), welche Zugewinne oder Verluste chromosomaler Abschnitte auf Metaphase-Chromosomen mit Hilfe von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten darstellt (Kallioniemi et al., 1992). In einer Metaanalyse aller CGH-Untersuchungen des HCCs (n = 785), sowie präaligner dysplastischer Knoten (n = 30) von 1997 bis 2003 (Moinzadeh et al., 2004), konnte gezeigt werden, dass im HCC Zugewinne an genomischem Material vornehmlich auf den Chromosomenarmen 1q (57,1%), 8q (46,6%), 6p (22,3%) und 17p (22,2%), Verluste meist auf 8p (38%), 16q (35,9%), 4q (34,3%), 17p (32,1%) und 13q (26,2%) auftreten. In den dysplastischen Knoten sind Zugewinne am häufigsten auf 1q und 8q, Verluste auf 5q, 8p, 13q, 14q, 16q und 17p zu finden. Dies gibt deutliche Hinweise darauf, dass Zugewinne auf 1q und 8q frühe Ereignisse in der Hepatokarzinogenese darstellen, die das Genom für weitere genomische Aberrationen prädisponieren (Moinzadeh et al., 2004).

1.3.4 ALTERATIONEN IN TUMORRELEVANTEN GENEN

Eines der häufigsten molekularen Ereignisse in Karzinomen ist eine veränderte Bioaktivität bzw. Expression von tumorrelevanten Genen. Zwei Hauptmechanismen sind dafür verantwortlich. So kann die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. das Retinoblastom 1-Gen, ebenso wie die Aktivierung von Onkogenen, wie z.B. ras, zu erhöhter Proliferation oder reduzierter Apoptose in Tumorzellen führen. Ferner kann die gegen die Tumorzelle gerichtete Immunantwort maßgeblich moduliert bzw. abgeschwächt werden. Interessanterweise scheint in der Hepatokarzinogenese die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine größere Rolle zu spielen, als die Aktivierung von Onkogenen (Nita et al., 2002). Auch die Dysregulation von Komponenten des Zellzyklus, z.B. Cyclin D1, Transkriptionsfaktoren (z.B. c-myc), Coaktivatoren (β -Catenin), Bestandteilen von Synthesewegen (Cyclooxygenase-2 (COX-2)) oder Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factor II* (IGF-II)) sind maßgeblich an der Entstehung von HCCs beteiligt. Ebenso können epigenetische Modifikationen, wie die DNA-Methylierung von Gen-Promotor-Sequenzen, die Genexpression beeinflussen (Feinberg und Vogelstein, 1983).

TP53

Mehr als 50% der primären humanen Tumoren weisen eine Funktionsverlustmutation (*loss of function mutation*) im Tumorsuppressorgen TP53 auf. Dessen Produkt, p53, ist ein zentraler Regulator der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur und der Apoptose als Reaktion auf genotoxischen Stress. Zu den Zielgenen von p53 gehören PUMA, Bax, Noxa, Bid und DR5, die pro-apoptotisch wirken, oder der Cdk-Inhibitor p21^{waf/cip1}, der das Fortschreiten des Zellzyklusses in der G1-Phase reguliert (zusammengefasst in (Slee et al., 2004)).

In der humanen Hepatokarzinogenese können transaktivierende, virale Proteine (z.B. HBxAg) das Wildtyp-p53 (p53^{w^t}) inaktivieren (Thomas et al., 1996; Feitelson, 1998). Ebenso können p53 inaktivierende Mutationen in 20 bis 40% der HCCs dessen Regulatorfunktion maßgeblich beeinflussen. Diese Mutationen treten typischerweise während der Tumorprogression auf (Nishida et al., 1993), was darauf hindeutet, dass der Mechanismus der p53-Inaktivierung ein spätes Ereignis in der Hepatokarzinogenese darstellt. Die funktionelle Inaktivierung von p53 konnte mit der Tumorgroße, dem Grad der Entdifferenzierung (Hayashi et al., 1995), verstärkter Proliferation (Itoh et al., 2000), einer gesteigerten Invasivität der HCCs (Qiu et al., 1998), sowie einer schlechteren Prognose für die Patienten korreliert werden (Heinze et al., 1999). Die Mutation des Kodon 249 (Arg → Ser) durch Aflatoxin B₁ entspricht ungefähr einem Drittel der im HCC weltweit vorkommenden p53-Mutationen (Ozturk, 1999). Neben dem Verlust der Funktion können auch *gain of function*-Mutationen (Funktions-Zugewinn-Mutationen) in p53 auftreten, die zu erhöhter Mitoserate, Zellvitalität und Angiogeneseinduktivität von Tumorzellen führen können (Sigal und Rotter, 2000; Cadwell und Zambetti, 2001).

Cyclin D1

Cyclin D1 fördert in der späten G1-Phase des Zellzyklusses zusammen mit cdk4/6 die Hyperphosphorylierung von Retinoblastom-1 (RB-1) und dadurch die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F) induziert. In 10 bis 20% der HCCs liegt Cyclin D1 amplifiziert und überexprimiert vor. Eine erhöhte Cyclin D1-Expression bei HCCs korreliert mit einer schlechteren Differenzierung, mikrovaskulärer Invasion und einem verstärkten Tumorwachstum (Zhang et al., 1993; Nishida et al., 1994; Choi et al., 2001). Die Überexpression von Cyclin D1 scheint ein frühes Ereignis in der Hepatokarzinogenese zu sein, da sie bereits in dysplastischen Knoten sowie in nicht-neoplastischen Hepatozyten nachzuweisen ist (Joo et al., 2001). Ebenso ist die Überexpression weiterer Cycline, wie Cyclin A und Cyclin E, mit der Entdifferenzierung, Invasivität und Metastasierung korreliert (Zhou et al., 2003).

Retinoblastom 1

Der Verlust der Expression des Tumorsuppressors RB-1 korreliert in fast allen HCCs mit dem LOH des RB-1-Gen-Locus auf dem Chromosomenabschnitt 13q14 (Friend et al., 1986), während spezifische Mutationen im RB-1-Gen nur selten auftreten (Zhang et al., 1994). RB-1 ist ein nukleäres Phosphoprotein, das als fundamentaler Vermittler von Differenzierungs- und Wachstumssignalen fungiert (zusammengefasst in (Chau und Wang, 2003)). Es inhibiert die Zellproliferation, indem es durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie für die DNA-Synthese notwendige Gene reprimiert. Durch den Verlust von RB-1 in den HCCs wird diese Repression umgangen und die Kontrolle des Zellzyklusses über RB-1 aufgehoben. Zudem führt der Verlust von RB-1 zur Aktivierung des p53-Signalweges, der als möglicher Schutzmechanismus gegen Zellen mit RB-1-Dysregulationen fungiert (Morgenbesser et al., 1994). In Tumorzellen mit einem RB-1-Funktionsverlust und wildtypischem p53 wird Apoptose induziert. Demnach kommt es zu einem erhöhten Selektionsdruck auf den p53-Signalweg, womit die hohe Zahl an Tumoren mit einem defekten RB-1-Signalweg und mutiertem p53 zu erklären ist (Symonds et al., 1994).

β-Catenin

β-Catenin ist ein wichtiges multifunktionales Protein, das an der Bildung des Zytoskeletts sowie am Wntless/Wnt-Signalweg beteiligt ist (siehe 1.4.1 Wnt-Signalweg) (Aberle et al., 1996). Im HCC sind zumeist Mutationen im dritten Exon des β-Catenin-Gens beschrieben (Miyoshi et al., 1998), wodurch das Protein gegenüber der Ubiquitin-vermittelten Degradation resistent wird. Dies führt dann zu einer nukleären Akkumulation von β-Catenin, welches zusammen mit Faktoren der TCF/LEF-Transkriptorenfamilie die Aktivierung von nachgeschalteten Zielgenen induziert (z.B. c-myc, Cyclin D1, MMP-7) und somit seine onkogene Wirkung entfaltet (Clevers und van de Wetering, 1997).

Cyclooxygenase-2

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Enzym, das die Synthese von Prostaglandinen (z.B. PGE₂) aus Arachidonsäure katalysiert. In extrahepatischen Tumoren, besonders Kolonkarzinomen, konnte für COX-2 gezeigt werden, dass es proliferationsfördernd und anti-apoptotisch wirkt, Prokarzinogene aktiviert und potentiell die Neoangiogenese sowie die Invasivität fördert (Shiff und Rigas, 1997; Fosslin, 2000; Dempke et al., 2001). In etwa 60% aller HCCs ist der chromosomale Bereich, in dem das Gen von COX-2 lokalisiert ist (1q25.2-q25.3), überrepräsentiert (Marchio et al., 1997; Niketeghad et al., 2001). COX-2 wird in 50 bis 97% der HCCs überexprimiert, wobei eine verstärkte Expression in gut differenzierten Tumoren gefunden wurde (Koga et al., 1999; Bae et al., 2001).

In HCC-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Inhibierung von COX-2 durch nicht-steroidale anti-inflammatorische Inhibitoren, wie z.B. Celecoxib, proapoptotisch und wachstumshemmend wirkt (Kern et al., 2002b).

1.4 Signalwege und Wachstumsfaktoren

1.4.1 WNT-SIGNALWEG

Durch Bindung eines Wnt-Liganden (Säugetier-Homolog des Drosophila-Proteins *wingless*) an einen frizzled-Rezeptor kommt es zur Aktivierung des Wnt-Signalweges. In dessen Verlauf führt aktiviertes GSK-3 β zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und anschließend zur proteolytischen Spaltung des Coaktivators β -Catenin. In 25 bis 30% der HCCs sind stabilisierende Mutationen und Deletionen der GSK-3 β -Phosphorylierungsdomäne in Exon 3 des β -Catenin-Gens detektierbar, die für einen reduzierten proteolytischen Abbau des Proteins verantwortlich sind (de La Coste et al., 1998). Die daraus resultierende Akkumulation von β -Catenin führt zu dessen Translokation in den Zellkern, wo es den transkriptionellen Repressor TCF/LEF in einen Aktivator umwandelt (Levine et al., 1991). Als Zielgene des β -Catenin/TCF/LEF-Komplexes konnten u.a. c-myc, Cyclin D1, Fibronectin und Metalloproteinasen identifiziert werden (Buendia, 2000). Auch die Inaktivierung weiterer Komponenten des β -Catenin-Degradationskomplexes, z.B. Axin-I und Axin-II, kann zur Stabilisierung von β -Catenin beitragen und zu dessen Akkumulation führen (Satoh et al., 2000; Taniguchi et al., 2002). Neuere Daten weisen auf eine direkte Verbindung zwischen der p53-abhängigen Zellzykluskontrolle und der wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion hin (Liu et al., 2001; Matsuzawa und Reed, 2001). Das durch p53 induzierte Siah-1, eine E3-Ubiquitin-Ligase, ist Teil eines Multiproteinkomplexes, der für einen GSK-3 β -unabhängigen und somit phosphorylierungsunabhängigen Abbau von β -Catenin verantwortlich ist.

1.4.2 TGF- β -SIGNALWEG

Der TGF- β -Signalweg ist einer der zentralen Mitose-inhibierenden Signalwege für Zellen epithelialen Ursprungs. Es überrascht deshalb, dass inaktivierende Mutationen im signaltransduzierenden TGF- β -Rezeptor im humanen HCC sehr selten zu detektieren sind (Kawate et al., 1999). TGF- β ist sogar im Serum von HCC-Patienten in hohen Mengen detektierbar (Shirai et al., 1992). Es wird diskutiert, ob Tumorzellen, die dem wachstumshemmenden Signal von TGF- β gegenüber resistent sind, von dessen Eigenschaft profitieren, Angiogenese, Invasivität und Metastasierung zu fördern (Kern et al., 2002a). Die dem TGF- β -Rezeptor nachgeschalteten Smads translozieren, aktiviert durch ihre Dimerisierung in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren und somit das TGF- β -Signal in Genaktivität umsetzen {Chen, 2002 #933}.

1.4.3 IGF-SIGNALWEG

IGF-I und -II sind pluripotente Zytokine, die vorwiegend in der Embryogenese für die Regulation von Wachstum und Differenzierung in unterschiedlichen Geweben und spezifischen Zelltypen verantwortlich sind (zusammengefasst in (Werner et al., 1994)). Beide Moleküle werden vorwiegend in der Leber synthetisiert und von dort in den Blutkreislauf sezerniert. Die Expression von IGF-II wird von vier verschiedenen gewebe- und entwicklungspezifischen Promotoren (P1 bis P4) kontrolliert. In der fötalen Leber sind die Promotoren P2, P3 und P4 aktiv, während postnatal die Expression von IGF-II vorwiegend über den Promotor P1 reguliert wird (Nielsen und Christiansen, 1995). Die Promotoren P2 bis P4 werden zu diesem Zeitpunkt durch spezifisches genomisches *imprinting* inaktiviert (Vu und Hoffman, 1994). Die überwiegende Zahl der Transkripte kodieren für das präpro-IGF-II, aus dem wiederum durch proteolytische Prozessierung bioaktives IGF-II entsteht (Duguay, 1999).

In normaler Leber ist die IGF-II-Expression in Hepatozyten und in nicht-parenchymalen Zellen wie Kupferzellen, Endothelzellen und hepatischen Sternzellen nachweisbar (Scharf und Braulke, 2003). IGF-II interagiert mit einer Reihe von verschiedenen Serumproteinen, wie den IGF-*binding-proteins* (IGF-BPs, vor allem IGF-BP-3, das 70% des IGF-II bindet) und den IGF-BP-*like proteins* (Murphy, 1998; Rechler und Clemmons, 1998). Diese binden IGF-II und modulieren dadurch die Bioverfügbarkeit und die Bioaktivität des Wachstumsfaktors. IGF-II zeigt eine hohe Bindungsaffinität zu drei membranständigen Rezeptoren: (I) Der IGF-II/Mannose-6-phosphat-Rezeptor (IGF-IIR) ist durch Internalisierung von IGF-II verantwortlich für dessen lysosomale Degradation (Braulke, 1999). (II) Der IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) vermittelt die intrazelluläre Signaltransduktion sowohl von IGF-I als auch von IGF-II. Das Signal wird über verschiedene dem Rezeptor nachgeschaltete Moleküle, wie den *insulin receptor substrate* (IRS) und/oder dem Shc-Protein, in der Zelle weitergeleitet. Diese übertragen das Signal auf den Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt-Signalweg oder den MAPK-Signalweg, welche beide Proliferation induzieren (zusammengefasst in (Dupont et al., 2003)). Der IGF/IGF-I-Rezeptor-Signalweg ist neben der Regulation von Proliferation auch mit anti-Apoptose, Zelladhäsion und Motilität assoziiert (Valentinis und Baserga, 2001). (III) Auch eine alternative Spleißform des Insulinrezeptors (IR) kann IGF-II binden (Sciacca et al., 1999). Während der IGF-IR (Scharf et al., 2000) und der IR (Spector et al., 1999) in HCCs oft überexprimiert vorliegen, ist die Expression bzw. Bioaktivität des IGF-IIR in einer Vielzahl von HCCs reduziert (De Souza et al., 1995). Beide Mechanismen verstärken die Wirkung von IGF-II.

Die Beteiligung des IGF-II-Signalweges an der Hepatokarzinogenese wurde für verschiedene Tiermodelle und für den Menschen beschrieben (zusammengefasst in (Scharf et al., 2001)). In transgenen Mäusen (MT-D2; major urinary protein (MUP)-promoter/simian

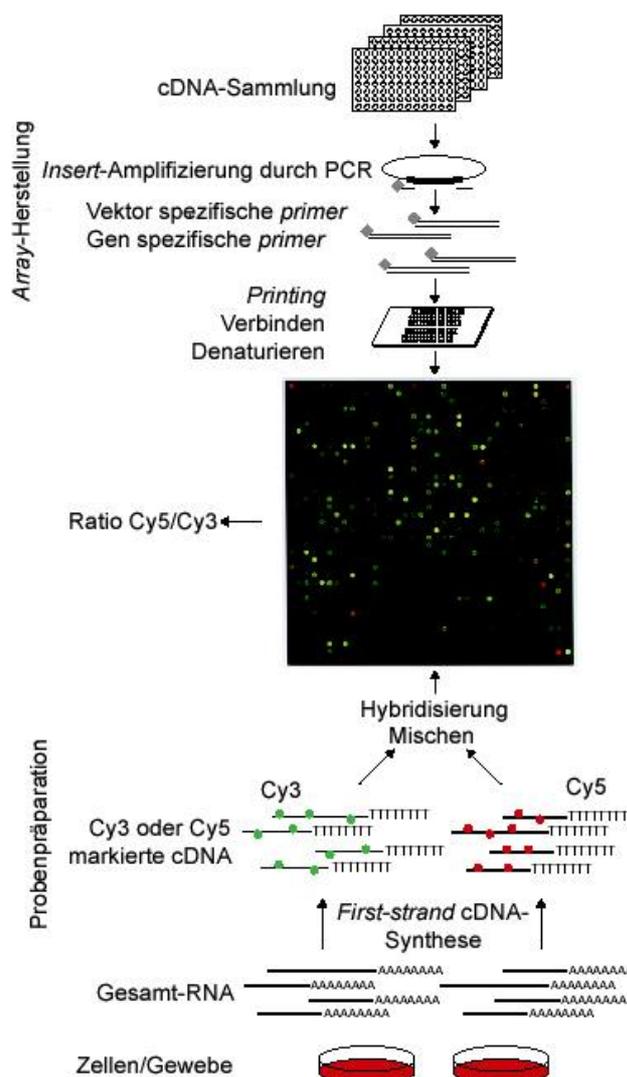
virus 40 (SV40)Tag) war bei einer Leber-spezifischen Expression des SV40-T-Antigens eine stufenweise Progression von multiplen HCCs, begleitet von einer Neo-Expression von IGF-II, zu beobachten (Schirmacher et al., 1991; Schirmacher et al., 1992).

Auch in der humanen Karzinogenese ist zumindest in einem Teil der HCCs die Überexpression von IGF-II nachweisbar (Cariani et al., 1988; Sohda et al., 1996). Dabei zeigte sich, dass diese Überexpression von IGF-II im HCC mit der Re-Expression des fötalen Musters der IGF-II-Transkripte assoziiert ist. Diese Neoexpression des IGF-II wird durch die Aktivierung der fötalen Promotoren P2 bis P4 (Uchida et al., 1997) und dem gleichzeitigen Verlust der Aktivität des adulten Promotors P1 hervorgerufen (Gonzalzo und Jones, 1997).

1.5 cDNA-Microarray-Analyse des HCCs

1.5.1 MICROARRAY-TECHNOLOGIE

Aneuploidie, Genamplifikationen und -deletionen, sowie Punktmutationen haben maßgeblich Einfluss auf den Expressionsstatus vieler Genprodukte. Gegenwärtig werden deshalb Array-Techniken weiterentwickelt, mit denen Veränderungen untersucht werden können, die mit



der Tumorentwicklung assoziiert sind. Mit Hilfe dieser Techniken ist es möglich, sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene, mehrere tausend Genprodukte unterschiedlicher Proben vergleichend zu analysieren. Der Begriff „Array“ bezieht sich hierbei auf den Matrix-artigen Aufbau, der sich in der zwei-dimensionalen Struktur des gebrauchsfertigen Chips widerspiegelt (Abbildung 2).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der cDNA-Microarray-Analyse. In der oberen Hälfte des Schemas ist die Herstellung eines cDNA-Microarrays illustriert. Die untere Hälfte verdeutlicht die Erzeugung fluoreszenzmarkierter Proben (verändert nach (Schulze und Downward, 2001)).

Während cDNA- und Oligonukleotid-Arrays die Expression von Genen auf Transkriptionsebene darstellen, können Genprodukte in Flüssigkeiten mittels Proteinarrays und in Geweben mittels *multi tissue arrays* (MTA) quantitativ und qualitativ analysiert werden. Mit Hilfe der Matrix-CGH lassen sich chromosomale Zugewinne und Verluste mit einer Auflösung von 75 kBp darstellen (Solinas-Toldo et al., 1997).

1.5.2 cDNA-MICROARRAY-TECHNOLOGIE

Die Regulation der Expression von Proteinen findet sowohl auf Transkriptions- und Translationsebene als auch auf posttranslationaler Ebene statt. Da die Transkriptionskontrolle in Eukaryonten die effizienteste Form der Expressionsregulation darstellt, kann bereits die Untersuchung des Transkriptoms mit Hilfe von cDNA-Microarrays Aufschluss über zentrale molekulare Mechanismen bei pathologischen Erscheinungsbildern geben. Die 1995 erstmals beschriebene Methode der cDNA-Microarrays ermöglicht die vergleichende Analyse der Expression tausender Gene unter Verwendung zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (Schena et al., 1995). Durch den Einsatz dieser Farbstoffe zur Markierung der verschiedenen RNA-Proben können zwei unterschiedliche RNA-Populationen gleichzeitig auf einem Array mit vielen tausend cDNAs hybridisiert werden (Abbildung 2). Aus dem Verhältnis der verschiedenfarbigen Signale von Tumorprobe und Referenz eines spezifischen cDNA-Spots (Auftragungspunkt auf dem Array: *spot*) lassen sich dann die relativen Expressionsänderungen für das Transkript in beiden Proben ermitteln. Mit der Entwicklung dieser Methode zur Analyse der Genexpression steht somit ein leistungsfähiges Verfahren zur Verfügung, mit dessen Hilfe das Transkriptom in Gewebeproben und Zelllinien untersucht werden kann.

cDNA-Microarrays werden in vier Hauptstrategien der Tumorforschung angewendet: (I) Zum Vergleich der Expressionsprofile von tumorösem mit nicht-tumorösem Gewebe. (II) Im Vergleich von Tumorproben in unterschiedlichen Stadien der Entdifferenzierung, zur Klärung der molekularen Progressionsereignisse. (III) Zur Klassifizierung oder Subtypisierung durch Vergleich der Transkriptome von verschiedenen Proben derselben Tumorentität. (IV) In der Untersuchung der Responsivität gegenüber Therapieansätzen, wie z.B. nach dem Einsatz von Chemotherapeutika.

Das Hauptaugenmerk lag in vielen der bisher an unterschiedlichen Tumoren durchgeführten cDNA-Microarray-Untersuchungen auf der Identifizierung von Tumorsubtypen sowie der Analyse von tumorspezifischen Markern. Bei verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. Leukämien, Lymphomen oder Mammakarzinomen, konnte mit Hilfe von globalen Genexpressionsanalysen zwischen klinisch relevanten Subgruppen unterschieden werden (Golub et al., 1999; Alizadeh et al., 2000; Bittner et al., 2000; Perou et al., 2000). Zudem konnten spezifische Genexpressionsmuster auch mit klinischen Daten, wie der Überlebens-

dauer von Patienten, korreliert werden (Alizadeh et al., 2000; Dhanasekaran et al., 2001; Garber et al., 2001; Sorlie et al., 2003). Auf Basis der Ergebnisse dieser Untersuchungen in der Literatur hat sich die Verwendbarkeit großmaßstäbiger Analysen von Expressionsprofilen bei der Charakterisierung von Tumoren etabliert. Diese Analysen erlauben die Identifikation molekularer Faktoren, die klinisch-pathologischen Merkmalen unterliegen, sowie die Entdeckung bisher unbekannter Marker, die von klinischer Relevanz sein können.

1.5.3 MICROARRAY-STUDIEN AM HCC

In den letzten fünf Jahren wurden 19 Expressionsanalysen zum HCC veröffentlicht (Tabelle 1). Chen et al. haben die Genexpressionsprofile von insgesamt 102 Tumoren analysiert (Chen et al., 2002). In dieser Arbeit wurde ein allgemeiner Ansatz gewählt, um einen Überblick über das Transkriptom des HCCs zu erhalten. Dazu verwendeten die Autoren für die cDNA-Microarray-Analyse eine unabhängige Referenz aus einem RNA-Mix verschiedener Zelllinien (HepG2, SNU398, Jurkat, RPMI und CCD-1070SK). Es zeigte sich, dass sich das Expressionsprofil aller untersuchten HCCs eindeutig von dem anderer Tumorentitäten und auch vom nicht-tumorösen Lebergewebe unterscheidet (Chen et al., 2002). Eine eindeutige Zuordnung von molekularen Markern zur Ätiologie (HBV oder HCV) ließ sich bisher jedoch nicht nachvollziehen (Kim und Wang, 2003). In den meisten Arbeiten wurde die Genexpression der Tumorproben mit der des korrespondierenden nicht-tumorösen Gewebes desselben Patienten verglichen (Tabelle 1). Da das umgebende Gewebe jedoch in den meisten Fällen durch eine chronische Erkrankung geschädigt ist, sind die Expressionsmuster dieser Gewebe im Vergleich zu gesunder Leber oftmals bereits stark verändert. Die Verwendung von korrespondierenden nicht-tumorösen Geweben als Referenz verhindert somit die Identifizierung von initialen, frühen Expressionsänderungen im geschädigten Gewebe. Bei HCC-Patienten durchgeführte Therapien, wie z.B. die transarterielle Chemoembolisation, sind mögliche Ursachen für eine aberrante Expression von Genprodukten, die primär nicht durch die Entstehung des Tumors hervorgerufen werden.

Der Einsatz von Zelllinienreferenzen lässt zudem keine direkten biologischen Aussagen bezüglich der Veränderungen gegenüber dem gesunden Gewebe zu. Ein weiterer kritischer Punkt der bisherigen Arbeiten ist die geringe Anzahl der untersuchten HCCs (Tabelle 1). Oftmals wurden weniger als 20 HCC-Proben für die Untersuchungen eingesetzt, wodurch statistisch relevante Aussagen kaum zu erreichen sind.

Die Tatsache, dass bisher nur in einem kleinen Anteil der Studien eine biologisch-pathologisch sinnvolle Referenz verwendet wurde und darüber hinaus oft nur eine geringe Anzahl an Proben eingesetzt werden konnte, machte weitere umfassende Analysen zur Genexpression im HCC notwendig.

Tabelle 1: Übersicht der 19 Microarray-Untersuchungen zum HCC. Es werden cDNA-Microarrays (cDNA) und Oligonukleotidarrays (oligo) unterschieden.

Methoden	Anzahl Gene auf dem Array	Referenz	Anzahl HCCs	Artikel
cDNA	597	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	3	(Goldenberg et al., 2002)
cDNA	unbekannt	unbekannt	12	(Hanafusa et al., 2002)
cDNA	23040	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	20	(Okabe et al., 2001)
cDNA	1186	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	15	(Delpuech et al., 2002)
cDNA	1176	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	15	(Xiao et al., 2001)
cDNA	14000	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	9	(Xu et al., 2001a)
cDNA	12400	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	33	(Xu et al., 2001b)
cDNA	1080	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	10	(Shirota et al., 2001)
cDNA	4000	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	10	(Lau et al., 2000)
cDNA	23075	Zelllinienmix	102	(Chen et al., 2002)
cDNA	12800	normale Leber	11	(Li et al., 2002)
cDNA	3100	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	10	(Lee et al., 2003)
cDNA	9180	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	67	(Ye et al., 2003)
cDNA	9180	normale Leber	163	(Kim et al., 2004)
cDNA	unbekannt	unbekannt	unbekannt	(Chen et al., 2004)
cDNA	8716	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	37	(Neo et al., 2004)
oligo	42000	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	6	(Tackels-Horne et al., 2001)
oligo	>6000	normale Leber	45	(Iizuka et al., 2002)
oligo	13600	Korresp. nicht-tumoröses Gewebe	20	(Smith et al., 2003)

		in % der Studien verwendet
Referenz:	Korrespondierendes, nicht-tumoröses Gewebe	68%
	Normale, gesunde Leber	16%
	Zelllinienmix	5%
	unbekannte Referenz	11%

1.5.4 MULTI TISSUE ARRAYS

cDNA-Microarrays erfordern zur Gewinnung der RNA frisch eingefrorenes Tumormaterial, was oft die Anzahl der zur Analyse verfügbaren Gewebeproben limitiert. Im Gegensatz dazu sind in Paraffin eingebettete Gewebe in einem pathologischen Institut in größerer Quantität vorhanden. Da die Proben oft über Jahre zuvor eingelagert wurden, sind häufig auch die klinischen Folgedaten vorhanden. Die Technik der MTAs nutzt das Vorhandensein großer Gewebekbanken; dazu steht ihr im Gegensatz zu den cDNA-Microarrays eine sehr viel größere Zahl an Proben zur Verfügung (Kononen et al., 1998). Mit Hilfe von feinen Kanülen wird aus dem geeigneten Teil eines bestehenden Paraffinblockes eine Gewebestanze entnommen, die in einen Empfängerblock übertragen wird. Auf diese Weise können mehrere hundert verschiedene Gewebe in einen gemeinsamen Empfängerblock übertragen werden (Abbildung 3).

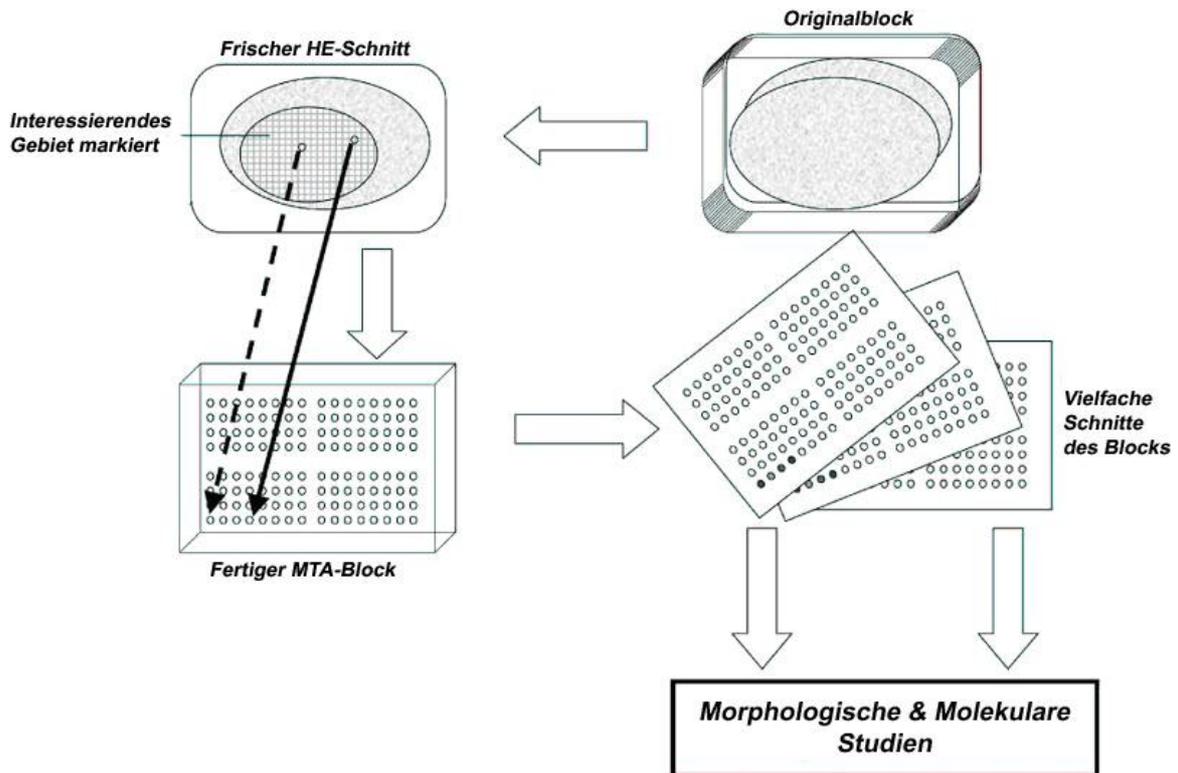


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Herstellung von *multi tissue arrays*. Aus paraffinierten Gewebeproben werden mit Hilfe einer Hohlzylinder herausgestanzt, die in einen neuen Paraffinblock überführt werden. Auf Schnitten dieses Blocks können so für mehrere hundert Proben unter identischen Bedingungen immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden (verändert nach (Shergill et al., 2004)).

Schnitte dieses Blockes können anschließend mit Hilfe von etablierten Protokollen immunhistochemisch bearbeitet und mikroskopisch analysiert werden und erlauben so eine simultane Analyse hunderter Gewebe. Für verschiedene Tumorentitäten, u.a. auch dem HCC, sind MTAs bereits erfolgreich eingesetzt worden (Nocito et al., 2001; Rubin et al., 2002; Wang et al., 2002; Zhang et al., 2003). Diese Methode birgt ein großes Potential, Expressionsänderungen nicht nur auf RNA- sondern auch auf Proteinebene analysieren zu können. Anders als bei den cDNA-Microarrays ist es mit den MTAs möglich, die subzelluläre Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle oder dem Zellverband zu untersuchen und das Expressionsniveau dieser Genprodukte semiquantitativ darzustellen.

1.6 Ziele der Arbeit

Für das HCC konnte bisher keine funktionell relevante Subtypisierung mit klinischer und therapeutischer Relevanz vorgenommen werden. Daher sollen mit Hilfe der cDNA-Microarray-Technologie potentielle neue Funktionsgruppen innerhalb der Gruppe der HCCs identifiziert und mit Hilfe von *Northern*-Hybridisierung, Immunoblot-Analysen sowie *real-time*-PCR verifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden sowohl mit histologischen als auch mit klinischen Daten korreliert. Die funktionelle Unterteilung soll mittels unabhängiger Analysen, wie Immunhistochemie oder *real-time*-PCR, am Tumorge- webe bestätigt werden. Ferner steht die Identifizierung neuer relevanter Markergene und potentieller therapeutischer Zielgene im Mittelpunkt dieser Arbeit.

2 Material

2.1 Eukaryontische Zelllinien

2.1.1 HCC-ZELLINIEN

HUH-7: Hochdifferenzierte HCC-Zelllinie, die aus dem Tumor eines 57 Jahre alten japanischen Patienten etabliert wurde. Artikelnummer der *Japanese Collection of Research Bioresources*: JCRB0403

HepG2: Etabliert aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen südamerikanischer Herkunft. Artikelnummer der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ): ACC 180.

Hep3B: Etabliert aus dem Tumorgewebe eines acht-jährigen Jungen afrikanischer Herkunft. Die Zellen enthalten partiell integriertes, nicht-replikatives HBV-Genom. Artikelnummer des DSMZ: ACC 93.

Alexander-Zellen: Etabliert aus einer Biopsie eines HBV-positiven südafrikanischen HCC-Patienten. Artikelnummer der *American Type Culture Collection (ATCC)*: CRL-8024

2.1.2 ANDERE ZELLINIEN

SK-Hep1: Leberadenokarzinomzelllinie. Diese wurde aus einer Ascites eines 52-jährigen kaukasischen Mannes etabliert. Artikelnummer des DSMZ: ACC 141.

T-47D: Etabliert aus einem duktalem Mammakarzinom einer 54-jährigen Patientin. Artikelnummer der ATCC: HTB-133.

MCF7: Etabliert aus dem Adenokarzinom der Mamma einer 69-jährigen Patientin. Artikelnummer der ATCC: HTB-22.

U-138-MG: Etabliert aus dem Glioblastom eines 47-jährigen Kaukasiers. Artikelnummer des DSMZ: ACC 291.

HT29: Etabliert aus dem primären Tumor einer 44-jährigen Kaukasierin mit Kolonadenokarzinom. Artikelnummer des DSMZ: ACC 299.

2.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Alle Materialien wurden von PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit L-Glutamin

Modified Eagle's Medium (MEM) mit Natriumbicarbonat und L-Glutamin

Fötale Kälberserum (FCS)

Penicillin-Streptomycin-Lösung mit 10.000 U/mL Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin

1xTrypsin-EDTA-Lösung mit 0,5 g/L Trypsin und 0,2 g/L Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat (EDTA)

2.3 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook und Russel (2001) angesetzt: 10xTAE, 10xMOPS-Puffer pH 7, 10xTBS, TE-Puffer pH 8, 3 M Natriumazetat, 7,5 M Lithiumchlorid, DEPC-Wasser, 20xSSC, 20% SDS, 200xDTT, 10xPBS.

Die für die Herstellung der Puffer und Stammlösungen verwendeten Laborchemikalien wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Applichem (Darmstadt), BioRAD (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Promega (Mannheim) und Sigma-Aldrich Chemicals (Taufkirchen) bezogen. In den nachfolgend aufgeführten Puffern und Lösungen sind Endkonzentrationen bzw. Absolutwerte angegeben.

2.3.1 cDNA-MICROARRAYS

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Primer- <i>annealing</i>	50 µg Gesamt-RNA in 9 µL DEPC-Wasser 0,5 µg Oligo-dT ₂₀ (0,5 µg/µL)
Reverse Transkription (RT)	0,75 mM ATP, GTP, TTP 0,3 mM CTP 0,125 M DTT 10 U RNAsin 0,1 mM Cy3-CTP oder Cy5-CTP 2 x 200 U Superscript II
Hybridisierungspuffer	3xSSC 0,2% SDS 4xDenhardt's-Lösung
Blockierungslösung	0,87 µg/µL Poly-dA 1,74 µg/µL Hefe-tRNA 4,35 µg/µL humane Cot-I-DNA
Prähybridisierungspuffer	siehe Hybridisierungspuffer 0,1125 µg/µL gescherte Lachssperma-DNA
Waschpuffer I	1xSSC 0,2% SDS
Waschpuffer II	0,2xSSC 0,2% SDS
Waschpuffer III	0,2xSSC

2.3.2 NORTHERN-HYBRIDISIERUNG

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	20xSSC
Hybridisierungspuffer	1% BSA 1 mM EDTA 0,5 M NaHPO ₄ , pH 7,2 7% SDS
Waschpuffer I	0,1% SSC 2% SDS
Waschpuffer II	0,1% SSC 0,1% SDS

2.3.3 IMMUNOBLOT-ANALYSE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Laufpuffer pH 8,3	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS
Transferpuffer	39 mM Glycin 48 mM Tris 0,037 % SDS 20 % Methanol
2xBeladungspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 6,8 200 mM Dithiothreitol 4 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin
Blockierungs- und Hybridisierungspuffer	0,5% Milchpulver in 1xTBST (0,1% Tween 20 in 1xTBS)
Signaldetektion Lösung A	Je 5 mL 0,1 M Tris HCl, pH 8,0 200 µM Cumarsäure 1,25 mM Luminol
Lösung B	0,009% Hydrogenperoxid

2.3.4 GELELUTION

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Silica-Suspension	10 g Silica / 100 mL PBS
Waschpuffer	50 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 2,5 mM EDTA 50 % (v/v) Ethanol

2.3.5 DNA-ISOLIERUNG AUS TRIZOL-PHASE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Waschpuffer	0,1 M Natriumcitrat in 10% Ethanol

2.3.6 PROTEINISOLIERUNG AUS TRIZOL-PHASE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Waschpuffer	0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol

2.3.7 IMMUNHISTOCHEMIE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Substrat (DAB-Kit)	5 mL bidest. Wasser 2 Tropfen Puffer-Stocklösung 4 Tropfen DAB, gut mischen 2 Tropfen H ₂ O ₂ -Lösung
Trypsinlösung für die enzymatische Vorbehandlung	0,1 g Trypsin (T-8128) 0,1 g Calciumchlorid 100 mL warmes PBS pH 7,8
Citratpuffer für die Mikrowellenbehandlung	0,1 M Citrat 0,1 M Tri-Natriumcitrat pH 6,0

2.4 Gele

Gel/Puffer	Zusammensetzung
DNA-Agarosegel (2%)	2 g Agarose 100 mL 1xTAE 2 µL Ethidiumbromid (10 µg/µL)
Denaturierendes RNA-Agarosegel (1%)	2,4 g Agarose 20 mL 10xMOPS-Puffer 180 mL DEPC-Wasser 6 mL Formaldehyd
Polyacrylamidgel Sammelgel 5% Acrylamid, Trenngel 15% Acrylamid	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 1,5 M Tris pH 8,8 / 1,5 M Tris pH 6,8 10 % SDS 10 % Ammoniumpersulfat TEMED
RNA-Probenpuffer	11,8% 10xMOPS-Puffer 20% Formaldehyd 68% Formamid Bromphenolblau 0,2% Ethidiumbromid (10 µg/µL)

2.5 Primer

Alle Primer, die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die *real-time*-PCR-Analyse eingesetzt wurden, wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

2.5.1 NORTHERN-HYBRIDISIERUNGSSONDE

IGF-II (GenBank-Accession-Nr.: J03242)

Primer <i>sense</i>	5'-GTG CTT CTC ACC TTC TTG GC-3'	(Position 583-603)
Primer <i>antisense</i>	5'-GTC TTG GGT GGG TAG AGC AA-3'	(Position 1047-1027)

GAPDH (GenBank-Acc.-Nr.: M33197)

Primer <i>sense</i>	5'-TTG TTG CCA TCA ATG ACC CC-3'	(Position 149-169)
Primer <i>antisense</i>	5'-TGA CAA AGT GGT CGT TGA GG-3'	(Position 986-966)

2.5.2 REAL-TIME-PCR-ANALYSE

IGF-II (GenBank-Acc.-Nr.: J03242)

Sonde	5'-Fam-TTC AGG GAG GCC AAA CGT CAC CG-Tamra-3'	(Position 997-1020)
Primer <i>sense</i>	5'-GTG CTT CTC ACC TTC TTG GC-3'	(Position 583-603)
Primer <i>antisense</i>	5'-GTC TTG GGT GGG TAG AGC AA-3'	(Position 1020-997)

18s-rRNA (GenBank-Acc.-Nr.: X03205)

Sonde	5'-Fam-AGC AGG CGC GCA AAT TAC CC-Tamra-3'	(Position 473-493)
Primer <i>sense</i>	5'-AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG-3'	(Position 447-467)
Primer <i>antisense</i>	5'-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3'	(Position 602-582)

Stathmin (GenBank-Acc.-Nr.: X94912)

Sonde	5'-Fam-CCC-AGT-GTG-GTT-TGC-ATT-GTC-TCC-Tamra-3'	(Position 1135-1158)
Primer <i>sense</i>	5'-GTT-CTC-TGC-CCC-GTT-TCT-TG-3'	(Position 1114-1133)
Primer <i>antisense</i>	5'-TAA-CAG-CTG-ACC-TGG-GCT-GA-3'	(Position 1207-1188)

2.6 Plasmide

pCR[®]4-TOPO, Invitrogen (Karlsruhe).

2.7 Antikörper

2.7.1 PRIMÄRANTIKÖRPER

Bezeichnung		Spezies	Firma	Arbeitskonzentration
anti-CD3	monoklonal	Maus	Novocastra (Newcastle, U.K.)	1:200 ^{a)}
m30-CytoDEATH	monoklonal	Maus	Roche (Mannheim)	1:100 ^{a)}
anti-human Stathmin	polyklonal	Kanninchen	Cell Signaling Technologie (Beverly, USA)	1:50 ^{b)} 1:1333 ^{c)}
anti-p53	monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	1:100 ^{b)} 1:1000 ^{c)}
anti-Ki67	polyklonal	Kanninchen	Dako (Cambridge, UK)	1:50 ^{b)}
anti-p21	monoklonal	Maus	BD Pharmingen (Heidelberg)	1:50 ^{b)}
anti-p27	monoklonal	Maus	Dako	1:50 ^{b)}
anti-FBP	polyklonal	Kanninchen	NCI (Bethesda, USA)	1:1000 ^{b)}
anti-FIR	polyklonal	Kanninchen	NCI	1:50 ^{b)}
anti-MSH-2	monoklonal	Maus	Oncogene (Boston, USA)	1:10 ^{b)}
anti-Siah-2	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:100 ^{b)}
anti-Nup88	polyclonal	Maus	Dr. Fornerod, Dr. Zentgraf (Heidelberg)	1:750 ^{b)}
anti- α -Actin		Maus	Oncogene	1:10000 ^{c)}

2.7.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Bezeichnung	Firma	Arbeitskonzentration
anti-Maus	Promega (Mannheim)	1:200 ^{a)+b)} 1:2500 ^{c)} 1:10000 ^{c)} (bei α -Actin)
anti-Kanninchen	Promega	1:300 ^{b)} 1:2500 ^{c)}
anti-Ziege	Dako	1:300 ^{b)} 1:2500 ^{c)}

^{a)} Einsatz in der Immunhistochemie; ^{b)} Einsatz im MTA; ^{c)} Einsatz in der Immunoblot-Analyse

2.8 Kommerzielle Kits

RNeasy kit

Qiagen (Hilden)

Plasmid Midi Kit

Qiagen

First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT

Invitrogen (Karlsruhe)

NucleoSpin[®]-RNA-II-Kit

Macherey-Nagel (Düren)

ABC Standard Kit

Vector Laboratories
(Burlingame, USA)

2.9 Sonstige Materialien

TRIzol	Invitrogen (Karlsruhe)
Humane CoT-I-DNA	Invitrogen
Taq-Pymerase	Invitrogen
EcoRI-Restriktionsendonuklease	New England Biolabs (Beverly, USA)
Protein- und DNA-Marker	Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot)
2X TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemicals (Taufkirchen)
poly-dA	Sigma-Aldrich Chemicals
Hefe-tRNA	Sigma-Aldrich Chemicals
Nitrozellulosemembran	Sigma-Aldrich Chemicals
Trypsin (T-8128)	Sigma-Aldrich Chemicals
PVDF-Membran	Roth (Karlsruhe)
RNAse-Inhibitor	Roche (Mannheim)
RNAse I	Promega
Microcon YM-50-Säulen	Amicon Millipore
Lachssperma-DNA	Boehringer (Mannheim)
Tissue Arrayer	Beecher Instruments Inc. (Sun Prairie, USA)
DAB	Merck (Darmstadt)
FluoroLink™ Cy3-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
FluoroLink™ Cy5-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech
<i>Escherichia-coli</i> -Stamm JM109	Stratagene (La Jolla, USA)
Eukitt	Novoglas Labortechnik (Bern, Schweiz)

3 Methoden

3.1 Gewebeproben

Von 40 HCC-Patienten, bei denen eine Teilresektion oder Lebertransplantation durchgeführt wurde, wurden kryokonservierte Gewebeproben mit einer ungefähren Kantenlänge von 0,8 cm asserviert. Von 38 Patienten war je ein Tumor vorhanden, von einem Patienten waren zwei, von einem weiteren Patienten drei Tumore vorhanden. Die Blöcke wurden sofort nach Resektion in Flüssig-Stickstoff tief gefroren und anschließend bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Von allen Proben wurden zunächst 5 μm dicke Gefrierschnitte angefertigt und eine HE-Übersichtsfärbung angefertigt. Die Schnitte wurden durch einen Pathologen (Prof. Dr. Schirmacher) begutachtet. Nur diejenigen Tumorproben wurden in das endgültige Probenkollektiv aufgenommen, die einen Tumoranteil von wenigstens 90% aufwiesen, deren Nekroseanteil weniger als 10% bzw. deren Fibroseanteil kleiner als 20% war. Außerdem wurden anhand dieser Färbungen ein individuelles *grading* nach AFIP-Kriterien (Ishak et al., 2001) durchgeführt. Zehn HCCs wurden als Grad 1, 22 als Grad 2, zehn als Grad 3 und ein HCC als Grad 4 klassifiziert. Fünf Patienten waren HBV-positiv und elf Patienten waren positiv für HCV. Acht HCCs waren eng mit chronischem Alkoholmissbrauch assoziiert und ein HCC mit genetisch bedingter Hämochromatose (Stadium 3). Die Explantat-Leber einer gesunden männlichen Person, die wegen eines Hämangioms nicht für eine Organtransplantation verwendet wurde, diente für alle Untersuchungen als Quelle für die Referenz-RNA. Um den „normalen“ Status des Referenzgewebes zu überprüfen, wurde das Expressionsprofil dieser Referenz mit kommerziell erhältlicher Gesamt-RNA aus männlicher Leber der Firmen Ambion (Austin, USA) und Stratagene (La Jolla, USA) im cDNA-Microarray (s.u.) verglichen.

3.2 Klinische Daten

Die klinischen Daten der Patienten wurden den medizinischen Aufzeichnungen entnommen und anonymisiert. Von jedem Patienten wurden (soweit vorhanden) Geburtsdatum, Herkunft, Überleben, Ätiologie, TNM-*staging*, Therapie, Tumorgröße, histologische Typisierung, *grading* und Zustand des peritumorösen Gewebes zusammengestellt.

3.3 cDNA-Microarrays

Die im Folgenden beschriebenen cDNA-Microarray-Experimente wurden unter Anleitung von Brian Haab (PhD) und Ramsi Haddad (PhD) am Van-Andel-Institute in Grand Rapids (Michigan, USA) durchgeführt. Dabei wurden cDNA-Microarrays verwendet, deren Herstellung in Haddad, R. et al. (2002) beschrieben ist. Diese enthalten 21632 verschiedene PCR-Produkte des *Human Clone Set* (Research Genetics, Huntsville, USA), was einer 50%igen Abdeckung des humanen Genoms entspricht. Jede der RNA-Proben (jeweils 50 μg) wurde in

9 μL RNase-freiem Wasser aufgenommen und 1 μL Oligo-dT₂₀ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Dieser Ansatz wurde für 10 min auf 70°C inkubiert, die Reaktion abzentrifugiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Reaktionsgemisch der reversen Transkription wurde in 2,5-fach-Ansätzen hergestellt, 10 μL davon mit dem RNA-Ansatz vereint und dies 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 U Superscript II und 0,1 mM Cy3-CTP bzw. Cy5-CTP hinzugefügt und der Ansatz bei 42°C für eine Stunde unter Lichtabschluss im Wasserbad inkubiert. Dann wurden weitere 200 U Superscript II hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Cy3-markierte Tumorprobe und die Cy5-markierte Referenzprobe auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert und vereinigt. Um die noch vorhandene RNA zu entfernen, wurden diesem Ansatz 20 U RNase-I mit dem dazugehörigen Puffer zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige markierte Nukleotide wurden über Microcon YM-50-Säulen von der markierten cDNA abgetrennt und die Probe gleichzeitig auf ein geringeres Volumen eingeeengt. Gegebenenfalls wurde das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 15 μL ergänzt und mit 28,8 μL Hybridisierungspuffer und 2,3 μL Blockierungslösung gemischt. Diese Hybridisierungslösung wurde für 2 min auf 95°C erhitzt und kurz anzentrifugiert. In ein neues Reagenzgefäß überführt, wurde die Lösung für eine Stunde bei 65°C inkubiert. Die Microarray-Objektträger wurden unter Verwendung von 40 μL Prähybridisierungspuffer ebenfalls bei 65°C für wenigstens zwei Stunden prähybridisiert. Nach Beendigung der Prähybridisierung wurden die fluoreszenzmarkierten Proben erneut kurz abzentrifugiert. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt und 35 μL der Hybridisierungslösung wurden auf den Array aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und in einer Hybridisierungskammer unter Lichtabschluss für 16 Std bei 65°C hybridisiert (Eisen und Brown, 1999). Anschließend wurden die Arrays in auf 42°C vorgewärmten Waschpuffer I und anschließend bei Raumtemperatur einmal in Waschpuffer II und zweimal in Waschpuffer III für je 5 min gewaschen und sofort durch Zentrifugieren getrocknet. In einem konfokalen Fluoreszenz-Scanner (Scan Array Lite, GSI Lumonics, Billerica, USA) wurden die Arrays anschließend mit Hilfe von Laser-Licht bei den Wellenlängen 532 und 635 nm eingescannt.

3.4 *In silico*-Analyse

Zur computergetützten Verarbeitung der Daten wurde die Software GENEPIX PRO Version 3.0 (Axon Instruments, Union City, USA) verwendet. Die Verhältnisse der Cy3- und Cy5-Färbung wurden für jedes Gen mit Hilfe verschiedener Qualitätsparametern, wie z.B. Intensität des Spots im Vergleich zum lokalen Hintergrund, bestimmt. Gesättigte, zu schwache Signale und artifizielle Spots wurden manuell entfernt. Für alle folgenden Analysen wurde die Programme Cluster und GeneSpring Version 5.0 (Silicon Genetics, Redwood City, USA) benutzt. Da die verwendete Referenz (Gesamt-RNA einer normalen Leber) biologisch

von Bedeutung ist, wurden die Änderungen in der Genexpression nicht gemittelt. Um die Konsistenz der Array-Daten zu testen, wurden elf Proben zweifach hybridisiert; bei neun Proben wurden die Probenpaare reziprok markiert, zwei wurden je einmal repliziert. Zur Vergleichbarkeit der reziprok markierten Proben mit dem restlichen Kollektiv wurde die Umkehrung der Färbung *in silico* wieder rückgängig gemacht. Der Pearsons-Korrelationskoeffizient der replizierten Experimente wurde auf der Basis von 3500 analysierten Genen berechnet. Dabei wurden die Gene berücksichtigt, deren Pixelintensität wenigstens den Wert von 150 in jedem Kanal einnahm und die in mindestens 75% der Arrays analysierbar waren. Eine Korrelation wurde als gut bezeichnet, wenn der Wert des Pearson-Korrelationskoeffizienten $\geq 0,7$ war (Miki et al., 2001). Die HCC-Daten wurden nach Genen gefiltert, die bei $p = 0,025$ in mindestens 70% der Tumore eine wenigstens zweifache Änderung der Expression gegenüber der Referenz aufwiesen. Insgesamt 118 Gene erfüllten diese Kriterien und wurden für das *hierarchical average linkage clustering* mit Hilfe des Programmes Cluster verwendet (Eisen et al., 1998).

Die Analyse der diskriminierenden Gene wurde mittels des Welch t-Testes durchgeführt, der keine gleichen Varianzen zwischen zwei Gruppen annimmt. Auch der Wilcoxon-Rangsummentest (für nicht normalverteilte Daten) wurde in diesem Zusammenhang angewendet. Um multiple Testfehler zu berücksichtigen, wurde ein Verfahren nach Benjamini and Hochberg zur Analyse des Anteils falschpositiver Daten mit einem Ausschlusswert von $p \leq 0,05$ eingesetzt. Weiter wurden die *ANalysis Of VAriance* (ANOVA), der Student t-Test und der Spearman Rangkorrelationstest zur statistischen Analyse der Daten verwendet. Die *in-silico*-Analyse des humanen *igf2*-Gens (GenBank Acc.-Nr.: X03562) wurde mit MatInspector (Genomatix Software, München) durchgeführt.

3.5 Isolierung von Nukleinsäuren

3.5.1 ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den kryokonservierten Geweben wurden diese in einer Schüttelmühle (MM 200, Retsch, Haan) pulverisiert. Das Gewebe, der Mahlbecher und -deckel, sowie zwei Mahlkugeln (1,2 cm \varnothing) wurden dazu in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und das Gewebe für 30 s bei 30 Hz pulverisiert. Das Gewebepulver (nach Volumen: ca. 100 μ L) wurde in 2mL-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Weiterverarbeitung in Flüssig-Stickstoff aufbewahrt. Die Gesamt-RNA wurde nach einem erweiterten Protokoll mit TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) aufgereinigt. Das Gewebepulver wurde im ersten Schritt in 1000 μ L TRIzol-Reagenz unter Verwendung eines Vortexers gemischt. Dann wurden 200 μ L Chloroform hinzugefügt, erneut durch Vortexen gemischt und die Reaktionsgefäße anschließend zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, für 15 min bei 4°C und 11500g ausgeführt. Ein weiterer TRIzol-Chloroform-Schritte und

ein zusätzlicher Chloroform-Isoamylalkohol-(Verhältnis 24:1)-Schritt wurde durchgeführt, um die Reinheit und Qualität der isolierten Gesamt-RNA weiter zu erhöhen. Nach dem Zusammenfügen der Reagenzien wurden diese jeweils durch Vortexen gemischt und anschließend zentrifugiert. Der wässrigen, farblosen Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß 500 µL TRIzol und 100 µL Chloroform zugefügt. Zur Entfernung möglicher Phenolreste wurde die wässrige Phase anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß mit einer Chloroform-Isoamylalkohol-(24:1)-Lösung versetzt. Danach wurde die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 800 µL Isopropanol intensiv durch Vortexen gemischt und für 10 min bei 4°C und 11500g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für 10 min mit eiskaltem Ethanol (100%) auf Eis inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet dreimal mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Zwischen und nach den Waschschritten wurde für 5 min bei 4°C und 11500g zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst. Dabei wurde vermieden, dass das Pellet völlig austrocknete, da es sich sonst nur noch schwer in Wasser gelöst hätte. Die Gesamt-RNA aller Zelllinien wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die für die cDNA-Microarrays verwendete RNA wurde zudem mit 7,5 M Lithiumchlorid über Nacht bei -20°C präzipitiert, wodurch ein sehr hoher Reinheitsgrad mit einem 260/280-nm-Quotienten von etwa zwei erreicht wurde. Die RNA-Konzentration wurde ebenfalls mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.5.2 ISOLIERUNG DER GENOMISCHEN DNA

Zunächst wurde die wässrige Phase über der bei der Isolierung der Gesamt-RNA zurückgebliebenen phenolischen Phase und Interphase vollständig entfernt. Die sich in der Interphase und der Phenolphase befindliche DNA wurde mit Ethanol präzipitiert. Dazu wurden 0,3 mL Ethanol (96%) pro 1 mL TRIzol zur Probe hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Suspension wurde 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA anschließend bei 2000g und 4°C für 5 min sedimentiert. Der Phenol-Ethanol-Überstand wurde entfernt und bis zur Proteinisolierung (siehe Abschnitt 3.6) bei -20°C aufbewahrt. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit einer 0,1 M Natriumcitrat enthaltenden 10%igen EthanolLösung gewaschen. Dafür wurde 1 mL dieser Lösung pro 1 mL eingesetztem TRIzol verwendet. Die DNA wurde während der Waschschriffe für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend bei 2000g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 75%igen Ethanol (1,5 mL pro 1 mL TRIzol) versetzt und 20 min bei Raumtemperatur unter Schütteln erneut inkubiert und danach abzentrifugiert. Das Ethanol wurde vollständig entfernt und das DNA-Pellet für 3 bis 5 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in einer 0,8 mM NaOH-Lösung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst. Dazu wurden in

Abhängigkeit von der präzipitierten Menge an DNA 0,3 bis 0,6 mL einer 0,8 mM NaOH-Lösung pro 50 bis 70 mg Gewebe zum Lösen des DNA-Pellets verwendet. Unlösliches Material, das zu diesem Zeitpunkt der Aufreinigung noch vorhanden war, wurde durch Abzentrifugieren bei 12000g bei 4°C für 10 min entfernt. Der Überstand mit der gelösten DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Quantifizierung wurden DNA-Aliquots in TE-Puffer pH 8,0 verdünnt und die Absorption der DNA bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Der Quotient der Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm wurde auch hier bestimmt.

3.6 Isolierung der Proteine

Der aus der DNA-Isolierung gewonnene Phenol/Ethanol-Überstand wurde zur Präzipitation der Proteine mit 1,5 mL Isopropanol versetzt, durch einmaliges Invertieren gemischt und für wenigstens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Protein-Präzipitat wurde dann bei 12000g und 4°C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet dreimal mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol (2 mL pro 1 mL TRIzol) gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurde das Pellet für 20 min bei Raumtemperatur in der Waschlösung inkubiert und anschließend bei 7500g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 2 mL reinem Ethanol gevortext, erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Um das Protein-Pellet zu lösen, wurde der Überstand entfernt und das Pellet für 5 bis 10 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit etwa 200 µL einer 1%igen SDS-Lösung versetzt. Zur besseren Löslichkeit der Proteine wurde das Pellet mit einer Pipettenspitze aufgebrochen und die Lösung bei 95°C und 800 rpm für 30 min im Heizblock inkubiert. Das unlösliche Material wurde bei 10000g und 4°C für 10 min sedimentiert und der Überstand in neues Reaktionsgefäß überführt. Mit der Quantifizierung nach Bradford wurde die Protein-Konzentration bestimmt (Sambrock und Russell, 2001). Die Lösung konnte sofort für die Immunoblot-Analyse eingesetzt oder wurde bei -20°C gelagert.

3.7 Herstellung von Sonden für die Northern-Hybridisierung

Mittels PCR (30x[30 s bei 94°C; 45 s bei 58°C; 40 s bei 72°C] und 5 min bei 72°C) wurde die Sonden für IGF-II und GAPDH aus cDNA der HCC-Zelllinie HUH-7 hergestellt. Dabei wurden Primer verwendet, die eine EcoRI-Schnittstelle enthielten. Das DNA-Fragment wurde nach Anleitung des Herstellers mit Hilfe der TOPO-Cloning-Reaktion in den pCR[®]4-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert und dieser in den *Escherichia coli*-Stamm JM109 (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert (Hitzeschock für 30 s bei 42°C). Mit Hilfe einer Test-PCR wurden die Bakterienkolonien identifiziert, die den Vektor mit der ligierten cDNA aufgenommen und vermehrt hatten. Von solchen Kolonien wurde eine „Masterplatte“ angelegt, die als Grundlage für eine Midi-Präparation aus 50 mL Bakterien-Suspension diente. Das Plasmid wurde mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert und die cDNA anschließend mit

20 U EcoRI-Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Beverly, USA) über die mit den Primern eingefügten EcoRI-Schnittstellen aus dem Plasmid ausgeschnitten. Durch elektrophoretische Größenfraktionierung in einem 2%igen Agarosegel wurden das DNA-Fragment und der Vektor voneinander getrennt. Die cDNA gegen IGF-II bzw. GAPDH wurde danach mit Hilfe einer Silica-Suspension aus dem Gel eluiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelfragment in 6 M Natriumiodid für 5 min bei 56°C aufgelöst. Anschließend wurden 15 bis 20 µL Silica-Suspension (100 mg/mL) zugegeben. Ein mg Silica bindet ca. 4,5 µg einer 7 kbp langen DNA. Die Bindung erfolgte in 5 min auf Eis oder in 30 min (bzw. über Nacht) bei 4°C. Anschließend wurde das Silica 30 s bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit je 500 µL Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet luftgetrocknet, bevor es in 10 µL Aqua bidest. aufgenommen und für 3 min bei 56°C inkubiert wurde. Danach wurde das Silica-DNA-Gemisch für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt; das Pellet wurde erneut in 10 µL Aqua bidest. gelöst und pelletiert. Anschließend wurden die beiden erhaltenen Überstände vereinigt und die erfolgreiche Isolierung der DNA durch Auftragung auf ein Agarosegel überprüft.

3.8 Northern-Hybridisierung

In einem 1%igen denaturierenden Agarosegel wurden pro Probe 20 µg der Gesamt-RNA bei 30 V über Nacht elektrophoretisch größenfraktioniert. Durch Blotting wurde die RNA anschließend über Nacht auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, mittels UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm für zweimal für 1 min auf der Membran fixiert und diese danach für 30 min auf 80°C erhitzt. Bevor mit der Sondenherstellung begonnen wurde, wurde die mit der RNA beladene Membran für mindestens 30 min bei 68°C unter langsamer Rotation im Hybridisierungssofen mit dem Hybridisierungspuffer prähybridisiert, so dass die Membran auf ganzer Länge mit Flüssigkeit bedeckt war. Die radioaktiv markierte Sonde wurde in einer *in-vitro*-Transkription generiert. Dabei wurden 100 ng des in Abschnitt 3.7 generierten DNA-Fragmentes bei 95°C für 5 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend 10 µL *random*-Hexamer-Primer (0,2 µg/µL) sowie 3 µL eines dNTP-Gemisches (dGTP, dCTP und dTTP, je 500 µM) hinzugefügt. Die radioaktive Markierung erfolgte in Gegenwart von 10 U Klenow-Polymerase unter Verwendung von 50 µCi [α -³²P]dATP (Amersham-Biosciences, Little Chalfont, UK) bei 37°C für 15 min im Hybridisierungssofen. Nicht eingebaute Radioaktivität wurde über Anionenaustauschersäulen entfernt. Die aufgereinigte radioaktiv markierte Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend dem Hybridisierungspuffer hinzugefügt und über Nacht bei 68°C inkubiert. Danach wurde die Membran einmal mit Waschpuffer I für 15 min und mit Waschpuffer II in 15 minütigen Waschsritten solange gewaschen, bis letzterer keine Radioaktivität mehr enthielt. Anschließend wurde die Membran mit etwas 2xSSC eingeschweißt. Zur Signaldetektion wurden Phospho-Screens

(Amersham-PharmaciaBiotech, Freiburg) und Phospho-Imaging (Storm 840, Amersham-PharmaciaBiotech, Freiburg) verwendet. Die Expositionszeit betrug 3 Stunden. Als Beladungskontrolle wurde eine Sonde gegen das GAPDH-Transkript verwendet (GenBank Acc.-Nr.: M33197).

3.9 Semiquantitative *real-time*-PCR

Die Analyse der Genexpression mit Hilfe der *real-time*-PCR erforderte die reverse Transkription von 1 µg Gesamt-RNA in cDNA. Für den 20-µL-Gesamtansatz dieser Reaktion wurde die RNA zusammen mit 1 µL Hexamer-Primern (20 µM) und 2 µL dNTPs (je 10 mM ATP, TTP, GTP und CTP) für 5 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden 4 µL des fünffachkonzentrierten Reaktionspuffers der reversen Transkriptase Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 25°C und nach der Zugabe von 200 U der Superscript II für weitere 10 min bei 25°C inkubiert. Darauf folgte eine einstündige Inkubation bei 42°C. Im letzten Schritt wurde das Enzym durch Erhöhen der Temperatur auf 72°C für 10 min inaktiviert.

Zunächst wurden in Vorversuchen zur *real-time*-PCR die optimalen Verdünnungen der Proben ermittelt, da die verschiedenen zu untersuchenden cDNAs in den Isolaten in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen. Zum Nachweis von IGF-II wurde eine optimale Verdünnung der cDNA von 1:125 (entspricht einer 1:25-Verdünnung, da 5 µL für den Reaktionsansatz eingesetzt wurden) ermittelt. Die cDNA für den Nachweis des Stathmin-Transkriptes wurde unverdünnt eingesetzt. Die zur Normalisierung eingesetzte 18s-rRNA wurde 1:5000 verdünnt. Für den Reaktionsansatz der *real-time*-PCR wurden 5 µL der oben angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Diesem 25-µL-Ansatz wurden 12,5 µL des 2xTaqMan Universal Master Mixes (Applied Biosystems, Darmstadt), je 5 µM eines jeden genspezifischen Primers und der innerhalb dieser beiden Primer bindenden FAM/TAMRA-markierten PCR-Sonde zugegeben (Metabion, Martinsried). Die Analyse wurde in Dreifachbestimmungen in einem Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Dabei wurde folgendes Programm verwendet: 95°C für 10 min, dann 40 Zyklen mit 95°C für 15 s und 60°C für 1 min. Zur Bestimmung der relativen RNA-Menge wurde für jedes untersuchte Transkript eine Standardkurve erstellt. Dabei wurde die cDNA jeder Probe in ihrer optimierten Verdünnung als Ausgangslösung genommen und in relativen Mengen von 1 bis 0,005 in Dreifachbestimmung wie die Proben in der *real-time*-PCR analysiert. Die für die einzelnen Konzentrationen ermittelten C_t -Werte wurden gegen den Logarithmus der relativen Menge der Standardwerte aufgetragen. Aus der Gradengleichung, die sich für die eingefügte Trendlinie bestimmen ließ, konnten die relativen Mengen aus den ermittelten C_t -Werten der jeweiligen Proben berechnet werden. Die 18s-rRNA diente als endogene Referenz, um unterschiedliche cDNA-Mengen in den verschiedenen Ansätzen normieren zu können.

3.10 Immunhistologie

Fünf µm dicke Gefrierschnitte von HCCs wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet und in Methanol/Azeton (2:1) bei -20°C für 10 min fixiert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte mit 3% Hydrogenperoxid in Methanol für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten die Schnitte mit 5% Milchpulver, 10% Kanninchen-Serum-Albumin und einem Tropfen Avidin in 1xPBS für 1 Std bei Raumtemperatur behandelt werden. Hiernach wurden die Schnitte zweimal mit 1xPBS gewaschen. Danach wurden diese mit einem Tropfen Biotin in 5% Milchpulver in 1xPBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde nach Ende der Inkubationszeit durch Abkippen entfernt. Die Inkubation des Primärantikörpers, der in Antikörperverdünnungspuffer (Zytomed, Berlin) verdünnt wurde (siehe Material Abschnitt 2.7.1), erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Schnitte dreimal gewaschen, mit 1xPBS, mit 1xPBST und wieder mit 1xPBS. Der mit der *horse-raddish*-Peroxidase (HRP) gekoppelte AB-Komplex wurde nach Zusammengeben von je 20 µL Lösung A und B des ABC Standard Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf je 1000 µL 2,5% Milchpulver in 1xPBS 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde in 2,5% Milchpulver in 1xPBS verdünnt (siehe Material Abschnitt 2.7.2) und auf dem Schnitt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde, wie im Schritt zuvor, dreimal gewaschen, der AB-Komplex auf den Schnitten verteilt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit 1xPBS gewaschen. Das Substrat wurde auf den Schnitten verteilt und die Farbreaktion für maximal 10 min unter Mikroskopkontrolle durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Waschen der Schnitte mit Leitungswasser gestoppt. Hierauf wurde 1 bis 3 min mit Hämalaun (Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte einmal mit Aqua bidest. und dreimal mit Leitungswasser gespült, 5 min bei Raumtemperatur belassen und dann die Blaufärbung der Kerne unter dem Mikroskop kontrolliert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 100% Ethanol und zweimal Xylol) wurden die Schnitte entwässert und anschließend mit Eukitt eingedeckt. Die Schnitte konnten nun mikroskopisch ausgewertet werden. Dabei wurden die Schnitte bei 400facher Vergrößerung digital fotografiert und der Anteil der α -CD3- und M30 positiven Zellen durch Zählen aller spezifisch gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld am Bildschirm ermittelt. Dabei wurde die maximale Anzahl an Gesichtsfeldern pro Schnitt (14 bis 65) ausgewertet. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes wurden die Mittelwerte berechnet. Das Signifikanzniveau wurde als $p = 0,05$ definiert.

Die MTAs wurden vor der immunhistochemischen Färbung entparaffiniert. Dazu wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe (3x Xylol für je 10 min; 2x 100% Ethanol für je 5 min; 96%, 70%, 50% Ethanol) und Aqua bidest. behandelt. Danach wurden die Schnitte entweder enzymatisch oder mit Hilfe eines Mikrowellengerätes vorbehandelt. Enzymatisch wurden die Schnitte mit einer Trypsinlösung für 30 min bei 37°C inkubiert. In der Mikrowelle

wurden die Schnitte in kaltem Citratpuffer (pH6) in Plastiküvetten dreimal 5 min bei 600 Watt zum Sieden gebracht. Zwischen den Kochschritten wurde der Puffer in den Küvetten nachgefüllt, damit die Schnitte nicht austrockneten. Anschließend wurden die Schnitte in der Mikrowelle abgekühlt. Nach beiden Vorbehandlungsmethoden wurden die Schnitte jeweils mit Leitungswasser gespült, um dann mit der Blockierung der endogenen Peroxidase fortzufahren.

3.11 Multi tissue arrays

Zur Herstellung der MTAs wurden die verfügbaren in Paraffin eingebetteten normalen Lebern, dysplastischen Knoten und HCCs geschnitten und eine HE-Übersichtsfärbung der Gewebe durchgeführt. Nach Begutachtung durch einen Pathologen (Prof. Schirmacher) wurden nur die Regionen mit Hilfe eines Arrayers (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, USA) aus dem Donorblock „gestanzt“, welche eindeutig das gewünschte Gewebe enthielten. Mittels einer 0,6 mm durchmessenden Hohlzahn wurden die Gewebestücken in einen Akzeptorblock positioniert und eingefügt (Abbildung 3). Insgesamt wurden 15 normale Lebern, 36 dysplastischen Knoten und 152 HCCs (33 x G1; 90 x G2, 25 x G3 und 4 x G4), sowie Kontrollgewebe für die MTAs verwendet.

Alle Gewebe wurden zweimal in separaten Gruppen in den Akzeptorblock übertragen, um den Verlust eines Datenpunktes durch Abschwimmen des Gewebes nach dem Schneiden zu minimieren. Zum Schneiden wurde eine Folie (Instrumedics Inc., Hackensack, USA) auf die Blockoberfläche aufgebracht, unterhalb derer das Mikrotom schneidet. Die 5 µm messenden Schnitte wurden auf einem adhäsiv beschichteten Objektträger aufgetragen und in einer 40 s dauernden Behandlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm mit dem Objektträger verbunden. Zum Entfernen der Folie wurde der Objektträger in TCP-Lösung getaucht. Nach einer Stunde Trocknung war der Schnitt bereit zum Entparaffinieren. Anschließend konnte der Schnitt wie in Abschnitt 3.10 beschrieben gefärbt werden. Für die statistische Auswertung der Expression von Stathmin wurde die Zahl der Zellen mit zytoplasmatischer und/oder nukleärer Färbung, sowie die Intensität dieser Färbungen unter einem Mikroskop bei 250-facher Vergrößerung bestimmt (Tabelle 2). Dabei wurden für eine effizientere statistische Weiterverarbeitung den ermittelten Anteilen bzw. Intensitäten ganze Zahlen zugeordnet. Um der Anzahl der gefärbten Zellen und gleichzeitig deren Färbekonzentration gerecht werden zu können, wurde aus diesen Einzelwerten das zytoplasmatische bzw. nukleäre Produkt (z.B. nukleäres Produkt = nukleäre Akkumulation x nukleäre Intensität) gebildet. Somit erhält man einen rechnerischen Wert, der beide einzelnen Daten (nämlich die Anzahl und die Intensität der nukleär gefärbten Zellen) repräsentiert. Dieses mathematische Produkt spiegelt somit sowohl die qualitativen wie auch die quantitativen Eigenschaften in einem subzellulären Bereich wider.

Tabelle 2: Kriterien zur Quantifizierung der Anzahl von immunhistochemisch gefärbten Zellen und Intensität dieser Färbung auf den *multi tissue arrays*.

	Färbung	relativer Zahlenwert
Anzahl der Zellen pro Gewebestanze	0%	0
	bis 1%	1
	1 bis 10%	2
	10 bis 50%	3
	über 50%	4
Intensität der Färbung	Keine	0
	Schwach	1
	Mittel	2
	Stark	3

Die statistische Auswertung dieser Daten wurde mit dem Programm SPSS Version 11 durchgeführt. Dabei wurde die Prüfung der Korrelation nach Spearman gewählt. Der hierbei ermittelte Korrelationskoeffizient *rho* gibt den Grad des Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen wieder. Die Prüfung der Korrelation nach Spearman besitzt den Vorteil gegenüber anderen statistischen Methoden, keine Normalverteilung der Variablen zu erfordern und auch für einen kleinen Stichprobenumfang exakt zu sein. Je mehr sich der Koeffizient dem Wert 1 annähert, desto größer ist die Korrelation. Der angegebene p-Wert stellt das Signifikanzniveau dar, welches die Korrelation der beiden Merkmale aufweist.

3.12 Zellkultur

Als *in vitro*-Modellsysteme für das HCC wurden die Zelllinien HUH-7, HepG2, Hep3B und Alexander verwendet (siehe Material 2.1.1). Als Kontrollen dienten die Zelllinien Sk-Hep1, T-47D, MCF7, U-138-MG und HT29 (siehe Material 2.1.2). Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (5% CO₂ und 37°C) mit den in der Literatur angegebenen Zellkulturmedien kultiviert.

3.13 Interferon-Behandlung

1x10⁵ HUH-7-Zellen wurden in *six-well*-Schalen ausgesät und nach 8 Std in einem Volumen von 2 mL mit Interferon- γ (300, 600 und 1000 U/mL) und Interferon- α (600 U/mL) für 16 Std behandelt. Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubation mit 1XPBS gewaschen und mit 350 μ L des Lysepuffers (Mercaptoethanol wurde diesem nach Vorschrift zugesetzt) aus dem NucleoSpin[®]-RNA-II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) versetzt. Die Gesamt-RNA wurde entsprechend des Protokolls des Herstellers mit Hilfe des Kits aufgereinigt. Die Qualität der RNA wurde sowohl photometrisch als auch mittels eines denaturierenden Gels überprüft.

3.14 Elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese

Die Größenfraktionierung der isolierten Proteine erfolgte mit der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Das Gel bestand aus einem 5%igen Sammelgel und einem 15%igen Trenngel. Es wurde in die mit Laufpuffer gefüllte Vertikal-Gelelektrophoreseapparatur eingesetzt. 20 bzw. 30 µg Gesamtprotein wurden mit Aqua bi-dist. auf 10 µL aufgefüllt und mit 10 µL 2xLadepuffer gemischt. Dieser Ansatz wurde für 3 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben sowie ein vorgefärbter Größenmarker in die Geltaschen einpipettiert. Die Fokussierung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei einem konstanten Strom von 50 mA pro Gel. Hatte die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht wurde der Strom auf 100 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, kurz bevor die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hatte.

3.15 Immunoblot-Analyse

Mit Hilfe des Immunoblots sollten die extrahierten Proteine nach elektrophoretischer Trennung auf eine proteinbindende Membran überführt (*blotting*) und anschließend in einer spezifischen Nachweisreaktion auf die Anwesenheit von Stathmin und p53 untersucht werden. Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel vom Trenngel abgelöst und dieses in einem *blotting-sandwich* aufgebaut: Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Mini Trans-Blot[®]-Kammer (Biorad, München). Hierbei wurden pro Gel zwei Schwämme und zwei auf 8,2 x 6,5 cm zugeschnittene Whatman-Papiere in Transferpuffer getränkt; die Vorinkubation der PVDF-Membran (8,2 x 6,5 cm) erfolgte über 2 min in Methanol. Auf das Kunststoffgitter der Blot-Kammer wurden nacheinander Schwamm, Whatman-Papier, Gel, PVDF-Membran, Whatman-Papier und Schwamm gelegt. Das Sandwich wurde so in den mit Transferpuffer gefüllten Puffertank geschoben, so dass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet waren. Im Anschluss daran erfolgte der Transfer der Proteine bei 90 mA über Nacht oder 300 mA in 2 Std unter Eiskühlung. Der Erfolg des Transfers wurde anhand der Übertragung des vorgefärbten Größenmarkers auf die Membran abgeschätzt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10 mL Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der Primäantikörper in gewünschter Konzentration hinzugefügt (siehe Material Abschnitt 2.7.1) und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Die einstündige Inkubation der Membran mit den Peroxidase-gekoppelten Sekundäantikörpern und dem α -Actin-Primäantikörper wurde bei Raumtemperatur in 10 mL Hybridisierungspuffer durchgeführt. Zwischen der Behandlung mit Primär- und Sekundäantikörper sowie nach Beendigung der Inkubationen wurde die Membran jeweils dreimal je 5 min bei Raumtemperatur mit 1xTBST gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschriffe wurden unter permanenter Bewegung der Lösungen

durchgeführt. Die Membran wurde bis zur Signaldetektion in 1xTBST bei 4°C aufbewahrt. Für die Signaldetektion wurde das 1xTBST entfernt, die Lösung A (200 µM Cumarsäure und 1,25 mM Luminol in 5 mL 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) mit der Lösung B (0,009% Hydrogenperoxid in 5 mL 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) vereinigt und auf die Membran gegeben. Die Detektionslösung wurde 1 min geschwenkt, so dass sich die Lösung gleichmäßig über die Membran verteilen konnte. Anschließend wurde die Membran in einer Plastikhülle in eine Filmkassette gelegt. Auf die Membran wurde nun ein passend zurechtgeschnittenes Stück BioMax®-Light-1-Film (Kodak, Stuttgart) positioniert und dieser zunächst für 1 min belichtet. Nach der Belichtung wurde der Film in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis sich Banden gut auf dem Film abzeichneten. Nach erfolgter Entwicklung wurde das Filmstück kurz im Wasserbad von Entwicklerrückständen befreit, bevor es im Fixierbad geschwenkt wurde. Dort wurde es einige Minuten belassen bevor der Film erneut gewässert wurde. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach dem Einscannen der entwickelten Filme mit Photoshop Version 7.0 (Adobe, Unterschleißheim). α -Actin diente als Beladungskontrolle für alle Proteine und wurde für die semiquantitative Auswertung der Stathmin- und p53-Expression herangezogen. Hierbei wurde die Farbdichte in einer für alle Messungen eines Filmes identischen Fläche bestimmt. Dabei wurde die Farbdichte des Hintergrundes eines Filmes dreifach bestimmt und der Mittelwert dieser Bestimmungen vom Wert der einzelnen Banden abgezogen. Um Beladungsunterschiede herauszurechnen und die Werte der unterschiedlichen Proben miteinander vergleichbar zu machen, wurden diese durch den Wert ihrer korrespondierenden Actin-Bande geteilt und das Ergebnis graphisch in einem Balkendiagramm dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 cDNA-Microarray-Analyse des HCC

4.1.1 ETABLIERUNG EINES PROTOKOLLS ZUR EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN UND PROTEINEN AUS GEWEBE

Zur Durchführung der cDNA-Microarrays musste RNA mit sehr hoher Reinheit in ausreichenden Mengen isoliert werden. Im ersten Schritt wurde das modifizierte Protokoll für die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Gewebe mit Hilfe von TRIzol ausgeführt. Um die erforderliche Reinheit der RNA zu gewährleisten, wurde dem ersten TRIzol-Schritt zur Abtrennung der RNA ein zweiter nachgeschaltet. Mit dessen Hilfe konnte die Menge an isolierter Gesamt-RNA deutlich erhöht werden. Um Phenolverschleppungen möglichst vollständig zu eliminieren, wurde das Protokoll nach diesen beiden Schritten um eine Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion ergänzt. Zur weiteren Steigerung der Reinheit der Gesamt-RNA wurde jede Probe mit Lithiumchlorid präzipitiert und in einem TE-Puffer erneut gelöst. Die so aufgereinigte Gesamt-RNA wurde auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen, um die Integrität der Probe zu überprüfen (Abbildung 4 A). Die Reinheit der RNA wurde photometrisch über den Quotienten der Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt. Bei allen für die Array-Analysen verwendeten RNA-Isolaten konnte ein Verhältnis von zwei oder mehr erzielt werden. Die Aufreinigung der Gesamt-RNA aus Gewebe mit TRIzol birgt darüber hinaus den Vorteil, dass aus der bei der Aufarbeitung zurückbleibenden phenolischen Phase in getrennten Arbeitsgängen sowohl die genomische DNA als auch die Proteine isoliert werden können (Abbildung 4 B und C). Die Integrität der aufgereinigten DNA wurde in einer PCR-Analyse unter Verwendung von Primern gegen das Gen von $p21^{waf/cip1}$ untersucht. Die Qualität der isolierten Proteinextrakte wurde in einer Immunoblot-Analyse mit Hilfe eines Antikörpers gegen β -Catenin überprüft. In beiden Experimenten konnten spezifische Banden erzeugt werden; Degradationsprodukte wurden nicht detektiert.

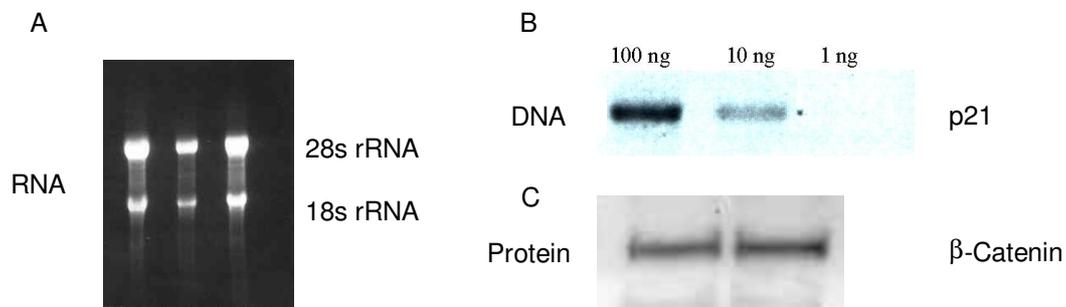


Abbildung 4: Isolierung von Gesamt-RNA, genomischer DNA und Protein mit Hilfe von TRIzol aus Lebergewebe. A: Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA auf einem denaturierenden Agarosegel. B: Amplifikation eines Abschnitts des Gens von $p21^{waf/cip1}$ mittels PCR. C: Immunoblot mit Antikörpern gegen β -Catenin.

4.1.2 ETABLIERUNG EINER REFERENZ UND REPRODUZIERBARKEIT DER ARRAY-ANALYSEN

Um zu verifizieren, dass es sich bei der für die cDNA-Microarrays als Quelle für die Referenz-RNA verwendeten gesunden Leber um ein in seinem Expressionsmuster repräsentatives Gewebe handelt, wurden die Expressionsprofile dieser Leber und zweier kommerziell erhältlicher RNAs aus normaler humaner Leber miteinander verglichen. Achtundfünfzig, z.T. hormonregulierte (z.B. Granulin, Prostatin oder *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain precursor* (CSF2R)) oder am Metabolismus beteiligte Gene (z.B. Mevalonatkinase, Argininosuccinatlyase oder N-Acetylglutamatsynthase), wiesen Expressionsänderungen entsprechend der festgesetzten Kriterien auf (siehe Methoden Abschnitt 3.4). Dieser Versuch belegt, dass die für die Array-Analysen gewählte Referenz eine normale humane Leber repräsentiert und bezüglich ihres Expressionsprofils nur im geringen Umfang von anderen, unabhängigen Leberproben abweicht, da die abweichenden Gene, soweit bekannt, nicht an der Hepatokarzinogenese beteiligt sind.

Die Reproduzierbarkeit der Arrays wurde mit Hilfe eines mathematischen Verfahrens untersucht. Hierbei wurden neun reziprok und zwei identisch markierte Tumor-RNA-Proben in unabhängigen Experimenten hybridisiert und analysiert. Zehn der elf Proben zeigten in der Pearson-Analyse, die auf der Grundlage von etwa 3500 Genen durchgeführt wurde, eine hohe Korrelation ($r > 0,72$) (Tabelle 3), was für eine ausreichende Reproduzierbarkeit mittels der cDNA-Microarray-Analyse generierten Daten spricht (Miki et al., 2001).

Tabelle 3: Testung der Reproduzierbarkeit der Microarrays mit Angabe des Pearson Korrelationskoeffizienten auf der Basis von 3500 analysierten Genen. (-R: Wiederholung des Experiments mit reziproker Markierung der Proben; -D: Wiederholung des Experiments mit identischer Markierung.)

Arraypaar	Korrelationskoeffizient
R3 ↔ R3-R	0,83
R4 ↔ R4-R	0,80
R7 ↔ R7-R	0,87
R8 ↔ R8-R	0,88
R9 ↔ R9-R	0,82
R10 ↔ R10-R	0,86
R11 ↔ R11-R	0,75
R13 ↔ R13-R	0,85
R15 ↔ R15-R	0,82
R51 ↔ R51-D	0,72
R73 ↔ R73-D	0,56

4.1.3 CDNA-MICROARRAY-ANALYSEN

Von den 100 initial zur Verfügung stehenden kryoasservierten HCCs wurden letztlich 43 Proben für die cDNA-Microarray-Untersuchungen verwendet (Tabelle 4). Grund für den Ausschluss von Proben aus der weitergehenden Analyse waren vor allem die strengen Einschlusskriterien (siehe Methoden Abschnitt 3.1) und in einigen Fällen eine zu geringe RNA-Ausbeute von weniger als 50 µg.

Tabelle 4: Liste der 43 HCCs und der korrespondierenden klinischen Daten.

Tumor (interne Probennummerierung)	Geschlecht 0 = unbek. 1 = männl. 2 = weibl.	Ätiologie			grading
		HBV 0 = unbekannt 1 = positiv 2 = negativ	HCV	Sonstiges	
3	1	2	0		G2
6	1	1	0		G2/G3
7	2	2	0	Alkohol	G2
8	1	2	0		G2
9	1	2	0		G3
10	2	0	0	Alkohol	G1
11	1	0	0	Alkohol	G2
13	1	2	0		G1/G2
15	1	0	0	Alkohol	G2
29	1	0	0	Alkohol	G2
30	1	2	0		G2
31	1	0	0	Alkohol	G2
35	1	0	1		G2
37	1	2	0		G2
39	1	2	0		G1/G2
40	1	0	0	Alkohol	G1
42	1	0	1		G2/G3
44	2	2	2		G3
46	2	0	0		G2
49	1	0	0		G3
50	1	0	0		G2
51	1	0	0		G1
53	2	0	0		G2
60	1	2	2		G1/G2
61	1	2	1		G1
62	1	2	1		G2/G3
63	1	2	2		G3/G4
65	1	0	1		G2
66	1	0	1		G2
68	1	2	2		G2/G3
69	1	0	1		G1
70	1	2	2		G1
73	1	0	1		G1
74	0	0	0		G3
75	1	0	1		G3
76	2	1	2		G3
80	1	1	2		G1
81	1	1	2		G1-G2
82	1	0	0		G1
83	1	1	0	Alkohol	G2
84	1	0	0		G2
85	2	0	1		G2
86	1	0	1		G3

Für die cDNA-Microarray-Experimente wurden Arrays verwendet, die 21632 verschiedene PCR-Produkte des *Human Clone Sets* (Research Genetics, Huntsville, USA) umfassten. Zunächst wurde untersucht, ob zwischen den generierten Expressionsdaten einerseits und den ätiologischen Parametern und klinischen Daten andererseits signifikante Korrelationen zu beobachten sind. Es konnte jedoch bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ keine signifikanten Korrelationen bezüglich der klinischen Daten, d.h. Ätiologie (HBV-, HCV-Infektion), *grading*, Alter der Patienten, TMN-Klassifikation oder Alkoholmissbrauch und der Expression von Genen bzw. Gengruppen festgestellt werden. Die statistische Analyse der Expressionsprofile von HCCs unterschiedlicher Differenzierungsgrade (G1 und G2 bzw. G2 und G3) ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Es konnten jedoch 53 Gene identifiziert werden, die G1- von G3-Tumoren diskriminieren ($p < 0,075$; Tabelle 5). Darunter befinden sich Gene, die an der Regulation der Mitose (z.B. Histondeacetylase 2 (HDAC2), *replication factor C4* (RFC4), Apoptose (z.B. nucleolin (NCL), *desoxyribonuclease I-like 3* (DNA-SE1L3)), Signaltransduktion (z.B. Proteinkinase C, ι -type (PKC- ι) und Proteindegradierung (z.B. *seven in absentia homologue-1* (Siah-1), *anaphase-promoting complex subunit 7* (ANAPC7), *ankyrin repeat and SOCS box containing protein 13* (ASB13)) beteiligt sind.

Tabelle 5: Liste der 53 Genen, die G1- von G3-HCCs unterscheiden ($p < 0.075$). Die Standardabweichungen wurden für jeden Wert angegeben (bei $n = 43$ Proben). Gennamen und die Symbole wurden der Datenbank *locuslink* entnommen.

Genname	Symbol	Regulation in HCCs	
		G1	G3
H2A histone family	H2AFY	1 ± 1.3	1.8 ± 1.4
EST (<i>expressed sequence tag</i>)	-	1.6 ± 1.3	2.6 ± 1.3
papillary renal cell carcinoma	PRCC	1 ± 1.3	1.7 ± 1.4
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRPM	1 ± 1.2	1.6 ± 1.5
microspherule protein 1	MCRS1	-1.2 ± 1.2	1.3 ± 1.4
ribosomal protein S23	RPS23	-1.3 ± 1.4	1.6 ± 1.3
histone deacetylase 2	HDAC2	-1.2 ± 1.5	1.8 ± 1.8
CGI-69 protein	CGI-69	-1.5 ± 1.8	1.5 ± 1.5
replication factor C (activator 1) 4	RFC4	-1.6 ± 1.8	1.6 ± 1.7
EST	-	-1.3 ± 1.3	1.3 ± 1.5
nucleolin	NCL	-1.6 ± 1.6	1.6 ± 1.5
bromodomain containing 4	BRD4	-1.1 ± 1.4	1.6 ± 1.5
Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	SSB	-1.4 ± 1.4	1.4 ± 1.5
CDW92 antigen	CDw92	-2.7 ± 1.3	-1.2 ± 1.7
aryl hydrocarbon receptor	AHR	-1.5 ± 1.4	1.2 ± 1.6
fatty acid desaturase 1	FADS1	-4 ± 2.6	1.7 ± 2.4
vesicle docking protein p115	VDP	1.2 ± 1.5	-1.8 ± 1.7
glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	GRHPR	-1.3 ± 1.9	-3.9 ± 1.6
complement component 8, alpha polypeptide	C8A	-1.6 ± 2.1	-7.6 ± 2.2
deoxyribonuclease I-like 3	DNASE1L3	-2.5 ± 2.2	-9.6 ± 2.7
liver-expressed antimicrobial peptide 2	LEAP-2	-1.5 ± 1.8	-4.1 ± 1.7
liver-expressed antimicrobial peptide 2	LEAP-2	-1.6 ± 1.9	-4.5 ± 1.9
Lutheran blood group (Auberger b antigen included)	LU	-2.3 ± 1.4	-3.6 ± 1.4
seven in absentia homolog 1	SIAH1	-1.4 ± 1.9	-4.1 ± 1.7
EST	-	-1.6 ± 1.7	-6.4 ± 2.4
mitochondrial ribosomal protein L46	MRPL46	-1.3 ± 1.5	-2.1 ± 1.2
CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)	CD8A	-1.8 ± 1.6	-3.6 ± 1.6
protein kinase C, iota	PRKCI	1 ± 1.4	-3.7 ± 2.5
EST	-	1.1 ± 1.5	-5 ± 2.5
epithelial membrane protein 2	EMP2	1.1 ± 1.5	-2.6 ± 1.9
alcohol dehydrogenase 6 (class V)	ADH6	-1.2 ± 2.3	-4.7 ± 2.5
solute carrier family 38, member 2	SLC38A2	-1.3 ± 2.4	-3.8 ± 1.6
translocation protein 1	TLOC1	1 ± 1.5	-1.7 ± 1.6
EST	-	1.1 ± 1.4	-1.4 ± 1.2
acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	FACL6	2 ± 1.6	-1.1 ± 1.3
EST	-	1.5 ± 1.7	-1.8 ± 1.8
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	HSD17B4	2 ± 1.7	-1.7 ± 2.1
betaine-homocysteine methyltransferase 2	BHMT2	2 ± 1.8	-2.4 ± 2.5
interferon-stimulated transcription factor 3, gamma	ISGF3G	2.5 ± 2.2	-1.8 ± 2.2
cytochrome b-5	CYB5	2 ± 2.2	-2.5 ± 2.5
formyltetrahydrofolate dehydrogenase	FTHFD	2.1 ± 2.6	-3.7 ± 4
anaphase promoting complex subunit 7	ANAPC7	2.1 ± 1.9	-3.1 ± 2.4
regucalcin	RGN	1.6 ± 1.8	-2.2 ± 2.3
acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	ACAA2	1.5 ± 1.5	-2.4 ± 1.6
acyl-Coenzyme A dehydrogenase	ACADM	2.3 ± 1.6	-1.1 ± 2.3
hypothetical protein FLJ13456	FLJ13456	1.9 ± 1.4	-1.1 ± 1.4
putative ethanolamine kinase	FLJ10761	4.7 ± 2.6	-1.1 ± 2.1
EST	-	4.5 ± 1.5	1 ± 2.3
solute carrier family 16	SLC16A2	2.4 ± 1.5	-1.1 ± 1.7
sorbitol dehydrogenase	SORD	5.4 ± 1.6	1.8 ± 2.2
betaine-homocysteine methyltransferase	BHMT	4 ± 2.7	-1.9 ± 4
ankyrin repeat and SOCS box-containing 13	ASB13	1.5 ± 2.4	-2.1 ± 1.6
selenium binding protein 1	SELENBP1	2.8 ± 2.2	-1.5 ± 2.4

4.1.4 SUBTYPISIERUNG DES HCCs AUFGRUND DER EXPRESSIONSPROFILE

Unter Anwendung der Kriterien für differentiell exprimierte Gene (siehe Methoden Abschnitt 3.4) konnten 118 Gene identifiziert werden, die in den 43 HCCs im Vergleich zu der normalen, gesunden Leber signifikant induziert oder reprimiert wurden ($p = 0,025$) (Abbildung 5; Tabelle Anhang).

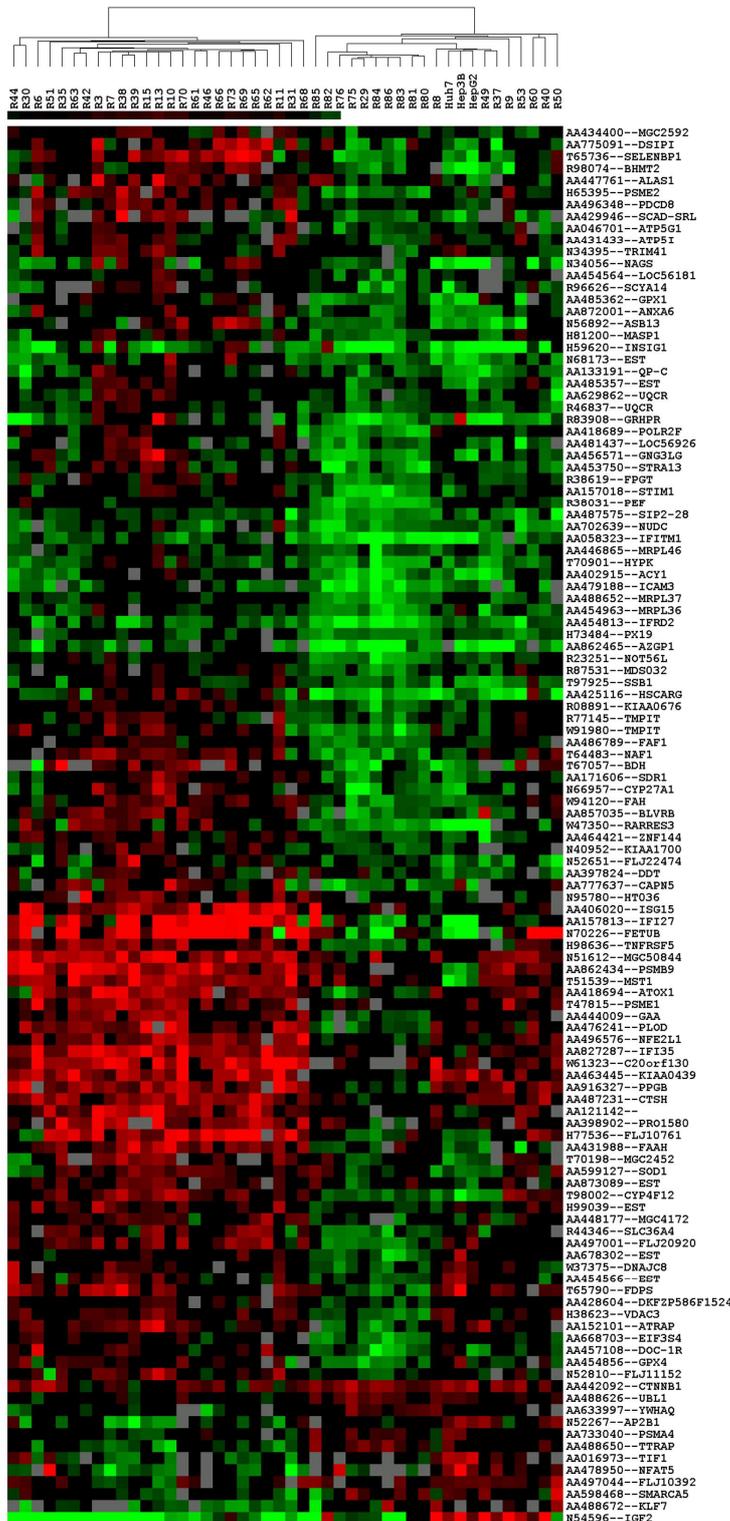


Abbildung 5: Cluster-Analyse der untersuchten 43 HCCs und drei HCC-Zelllinien. 118 Gene weichen in wenigstens 70% der Tumoren in ihrer Expression um einen Faktor von mindestens zwei gegenüber der normalen, gesunden Leber ab. Die Farbe Rot gibt die Induktion gegenüber der Referenz wieder; Grün bedeutet Repression. Die maximale Farbintensität drückt eine wenigstens zehnfache Regulation des Gens aus. Keine Regulation wird durch ein schwarzes Feld symbolisiert. Ein graues Feld bedeutet eine fehlende Datenerhebung für diesen Punkt. Die Gene sind mit ihren GenBank-Accession-Nummern und ihren Abkürzungen aus der *locuslink*-Datenbank angegeben.

Unter den identifizierten Genen befanden sich bereits beschriebene Gene (z.B. IGF-II, β -Catenin und Apoptose-induzierender Faktor (AIF)), hypothetische Gene (z.B. FLJ11152) und ESTs (*expressed sequence tag*). Eine erste Durchsicht der gefundenen Gene deutete darauf hin, dass es sich bei zahlreichen der identifizierten Gene um Apoptose- und Inflammations-assoziierte Gene handelt (z.B. PDCD8, TNFRSF5 und IFI35). Mit Hilfe der Datenbank *locuslink* konnten in Folgeanalysen insgesamt 26 Gene identifiziert werden, die im Rahmen der Apoptoseinduktion und der Regulation der Immunantwort beschrieben sind (Abbildung 6; Tabelle 6).

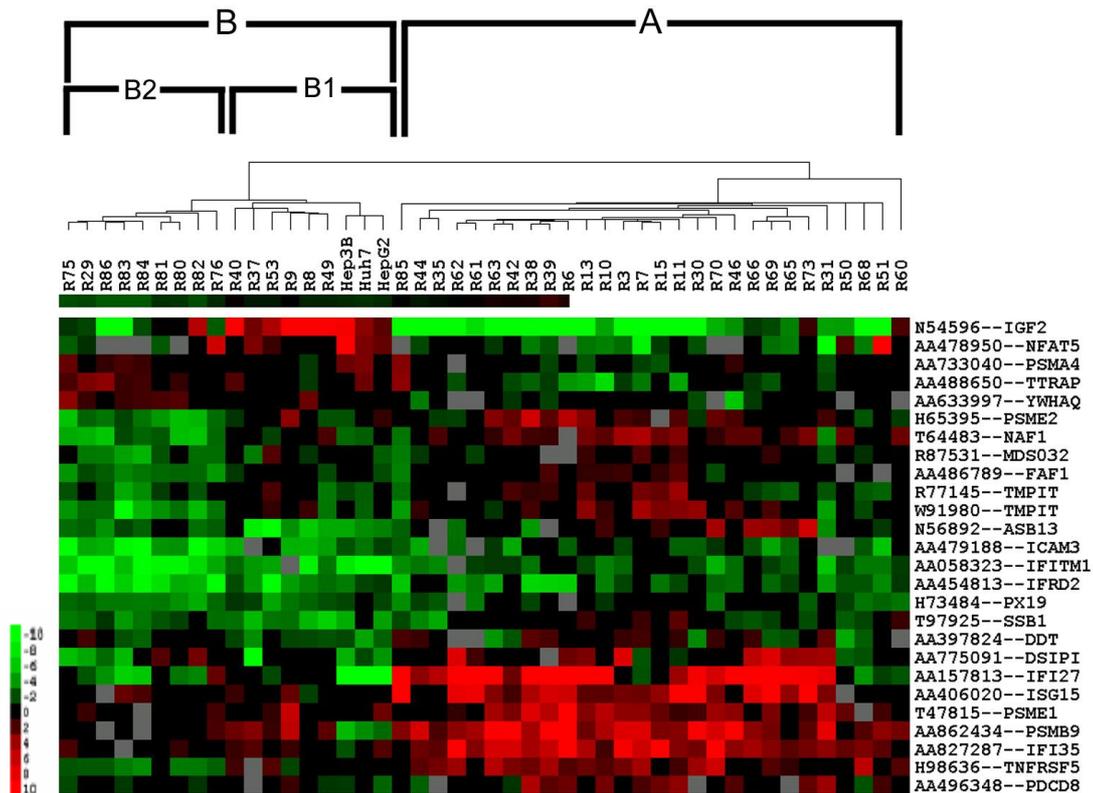


Abbildung 6: Sechszwanzig Apoptose- und Immunabwehr-assoziierte Gene. Die Anordnung der Tumoren entsprechend der Ähnlichkeit der Expressionsmuster führte zur Identifizierung der Gruppen A und B sowie der Subgruppen B1 und B2 (siehe Abschnitt 4.1.6).

Nach der Gruppierung dieser Gene entsprechend der Expression in den verschiedenen HCCs ließen sich Gruppen von Tumoren mit ähnlichen Expressionsmustern erkennen. Eine Gruppe von HCCs war durch die starke Induktion zahlreicher Interferon (IFN)-regulierter Gene gekennzeichnet (Gruppe A; 28 von 43 HCCs; 65%). Zu diesen Interferon-regulierten Genen der Gruppe A gehörten z.B. *interferon-induced gene 35* (IFI35), *interferon-induced gene 27* (IFI27) und *interferon-stimulated protein 15k* (ISG15), *tumor necrosis factor receptor super family member 5* (TNFRSF5 (CD40)) und *proteasome activator subunit 1* (PA28 alpha). In den verbleibenden 35% der HCCs ist eine solche Induktion nicht zu beobachten (Gruppe B; 15 von 43 HCCs).

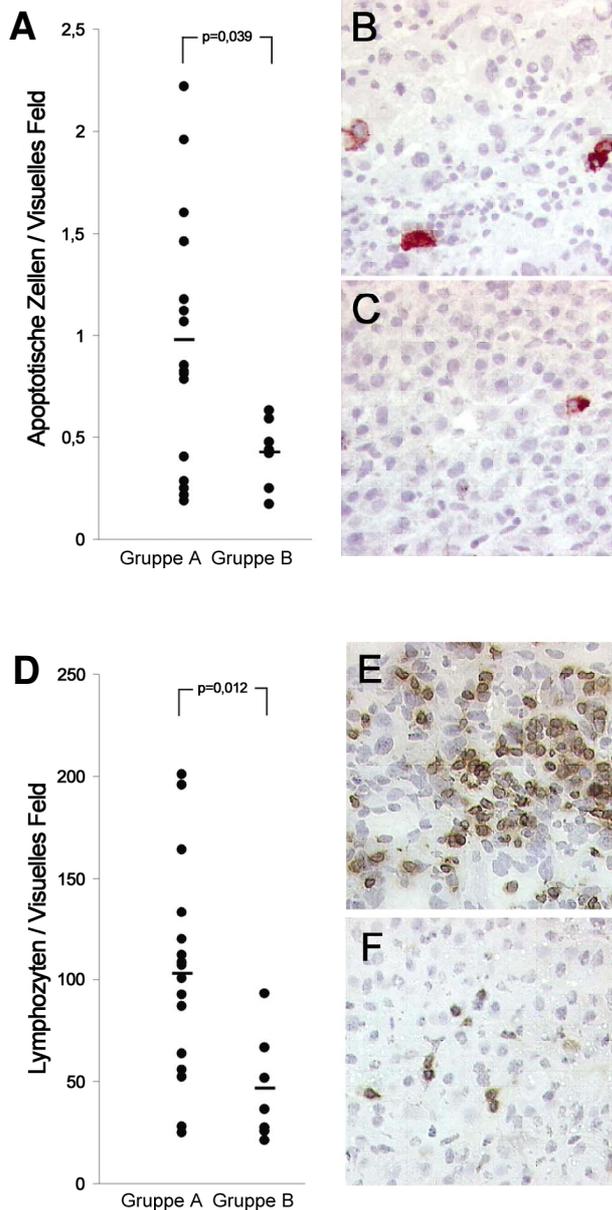
Gleichzeitig wurden andere Interferon-modulierte Gene in HCCs der Gruppe B reprimiert, z.B. *interferon induced transmembraneprotein 1* (IFITM1) und *interferon-related developmental regulator 2* (IFRD2). Außerdem waren in der Gruppe B einige an der Apoptose beteiligten Gene reprimiert, z.B. *proteasome subunit beta type 9* (PSMB9), PA28beta, TNFRSF6, die in der Gruppe A induziert waren (Abbildung 6; Tabelle 6). Die drei analysierten HCC-Zelllinien Hep3B, HUH-7 und HepG2 gruppieren mit den Tumoren der Subgruppe B. Zusammenfassend kann das Expressionsprofil der HCC-Gruppen und Subgruppen wie folgt beschrieben werden: Die größte Gruppe A wies eine Induktion von Inflammations-assoziierten Genen auf, die in Gruppe B nicht zu beobachten war. Diese zeigten eine Reduktion der Expression von Apoptose-assoziierten Genen.

Tabelle 6: Sechszwanzig mit Apoptose- und Immunabwehr-assoziierte Gene unter den 118 Genen der *cluster*-Analyse unter Angabe der GenBank-Accession-Nummer (Acc.Nr.).

Genname	Acc.Nr.	Symbol
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	N54596	IGF2
nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	AA478950	NFAT5
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4	AA733040	PSMA4
TRAF and TNF receptor associated protein	AA488650	TTRAP
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	AA633997	YWHAQ
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	H65395	PSME2
TNFAIP3 interacting protein 1	T64483	NAF1
uncharacterized hematopoietic stem/progenitor cells protein MDS032	R87531	MDS032
Fas (TNFRSF6) associated factor 1	AA486789	FAF1
transmembrane protein induced by tumor necrosis factor alpha	R77145	TMPIT
transmembrane protein induced by tumor necrosis factor alpha	W91980	TMPIT
ankyrin repeat and SOCS box-containing 13	N56892	ASB13
intercellular adhesion molecule 3	AA479188	ICAM3
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	AA058323	IFITM1
interferon-related developmental regulator 2	AA454813	IFRD2
PX19-like protein	NM_013237	PX19
SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1	T97925	SSB1
D-dopachrome tautomerase	AA397824	DDT
delta sleep inducing peptide, immunoreactor	AA775091	DSIPI
interferon, alpha-inducible protein 27	AA157813	IFI27
interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	AA406020	ISG15
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	T47815	PSME1
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multi-functional protease 2)	AA862434	PSMB9
interferon-induced protein 35	AA827287	IFI35
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	H98636	TNFRSF5
programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	AA496348	PDCD8

4.1.5 TUMORZELLAPOPTOSE UND TUMOR-INFILTRIERENDE LYMPHOZYTEN

Die differierenden Expressionsmuster von Genen, die an der Regulierung der Immunantwort und der Apoptose beteiligt sind, deuteten darauf hin, dass sich HCCs der Gruppen A und B durch das Ausmaß von Tumorzellapoptose und Lymphozyteninfiltration unterscheiden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden immunhistochemische Analysen von allen



verfügbaren HCC-Geweben aus beiden Gruppen (Gruppe A: n = 17, Gruppe B: n = 7) durchgeführt. Apoptotische Zellen wurden mit dem M30-cytodeath-Antikörper (Abbildung 7 A bis C) und infiltrierende Lymphozyten mit einem anti-CD3-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 7 D bis F). Die Daten belegen, dass in Gruppe B die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant geringer ist (durchschnittlich 0,43 apoptotische Zellen pro Gesichtsfeld) als in der Gruppe A (durchschnittlich 0,98 apoptotische Zellen pro Gesichtsfeld; $p = 0,039$; Abbildung 7 A). Die Infiltration mit T-Lymphozyten war in HCCs der Gruppe A (durchschnittlich 103,2 Lymphozyten pro Gesichtsfeld) signifikant höher als in der Gruppe B (durchschnittlich 46,6 Lymphozyten pro Gesichtsfeld; $p = 0,012$; Abbildung 7 D).

Abbildung 7: Immunhistologische Untersuchung der HCCs. A: Statistische Auswertung der M30-Färbung durch Auszählung positiv gefärbter Zellen in der maximalen Anzahl von visuellen Feldern pro Gewebeschnitt. B und C: Exemplarische Darstellung einer typischen Färbung für Tumoren der Gruppe A bzw. der Gruppe B. D: Statistische Auswertung der CD3-Färbung für infiltrierende T-Lymphozyten durch Auszählung positiv gefärbter Zellen in der maximalen Anzahl von visuellen Feldern pro Gewebeschnitt. E und F: Exemplarische Darstellung einer typischen Färbung für Tumoren der Gruppe A bzw. der Gruppe B. Die Striche in den Abbildungen A und D geben den jeweiligen Mittelwert der Datenpunkte wieder.

4.1.6 IGF-II-EXPRESSION IN EINER SUBPOPULATION VON HCCs

Basierend auf der Expression von Interferon-regulierten Genen zeigten weitere Untersuchungen, dass sich die Gruppe B wiederum in zwei Untergruppen unterteilen lässt (Abbildung 6). In der Gruppe B1 (sechs von 43 HCCs; 14%) sind diejenigen Tumoren zusammengefasst, die eine IGF-II-Überexpression aufwiesen. Die HCCs der Gruppe B2 (neun von 43 HCCs; 21%) zeichnete sich dadurch aus, dass sie IGF-II und Interferon-induzierte Gene nicht überexprimierten. Insgesamt war die Expression von IGF-II in den Gruppen A und B2 in 32 Fällen (74%) reduziert und in vier HCCs (9%) kaum verändert. Die IGF-II positiven HCCs zeigten gegenüber der normalen Leber eine im Durchschnitt acht- bis elffache Überexpression von IGF-II. Sechsdreißig HCCs wiesen eine durchschnittliche Reduktion der IGF-II-Expression um den Faktor -3,2 bis -3,9 auf.

Die Unterteilung der Gruppe B in die Subgruppen B1 und B2 wurde durch die differentielle Regulation von Genen, die an der TNF-Signaltransduktion beteiligt sind (*fas-associated factor 1* (FAF1) und *nef-associated factor 1* (NAF1)), in der Subgruppe B2 unterstützt. Diese Gene waren nicht oder kaum in den IGF-II-positiven Tumoren (Subgruppe B1) reguliert, wohingegen eine deutliche Reduktion in Subgruppe B2 zu beobachten war (Abbildung 6).

Die deutliche Exklusivität bezüglich der Expression von IGF-II und Interferon-regulierten Genen wurde in einer *in-silico*-Analyse der im Internet publizierten cDNA-Microarray-Daten der HCC-Studie aus Stanford verifiziert (Chen et al., 2002). In diesem vollständig unabhängigen Datensatz mit insgesamt 102 analysierten HCCs konnte ebenfalls die Expression von Interferon-regulierten Genen in einer Gruppe von HCCs gefunden werden (induziert in 52% der HCCs). Eine zweite unabhängige Gruppe, die IGF-II überexprimierte, wies im Gegensatz dazu keine erhöhte Expression von Interferon-modulierten Genen auf (in 29% der HCCs). Zudem konnte in den Daten dieser Studie eine dritte Gruppe identifiziert werden, die weder eine Überexpression von Interferon-regulierten Genen noch von IGF-II zeigte (Abbildung 8).

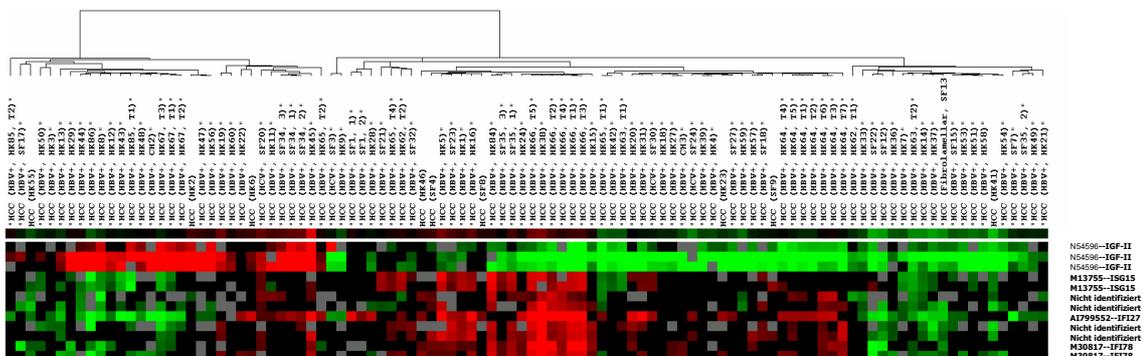


Abbildung 8: *Re-clustering* der unabhängigen Expressionsdatensätze von 102 HCC-cDNA-Microarrays (Chen et al., 2002). Auch hier ist eine exklusive Expression von IGF-II (Reihe 1 bis 3) und den Interferon induzierten Genen (Reihe 4 bis 9) zu beobachten.

Gleichermaßen konnte die exklusive Expression von IGF-II und Interferon-regulierten Genen unter Verwendung der Daten einer cDNA-Microarray-Studie von 62 humanen Mammakarzinomen bestätigt werden (Perou et al., 1999; Perou et al., 2000) (Abbildung 9). Insgesamt wurden hier 13 Interferon-abhängige Gene identifiziert (z.B. *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1), *ISG15*, *interferon-induced gene 41* (IFG41), *interferon-induced gene 30* (IIG30) und *guanylate binding protein 1* (GBP1)), die in einer Subpopulation (56%) der Mammakarzinome deutlich induziert waren. Die IGF-II-überexprimierenden Tumoren (13%) hingegen wiesen keine erhöhte Expression dieser Gene auf. Auch innerhalb der Mammakarzinome ließ sich eine dritte Subgruppe (31%) identifizieren, die weder IGF-II noch Interferon-induzierte Gene überexprimierte.

Diese Daten belegen, dass die exklusive Expression von IGF-II- und Interferon-regulierten Genen nicht nur in anderen Datensätzen der gleichen Tumorentität zu beobachten ist, sondern dass sie sich auch in differierenden Tumorentitäten nachweisen lässt.

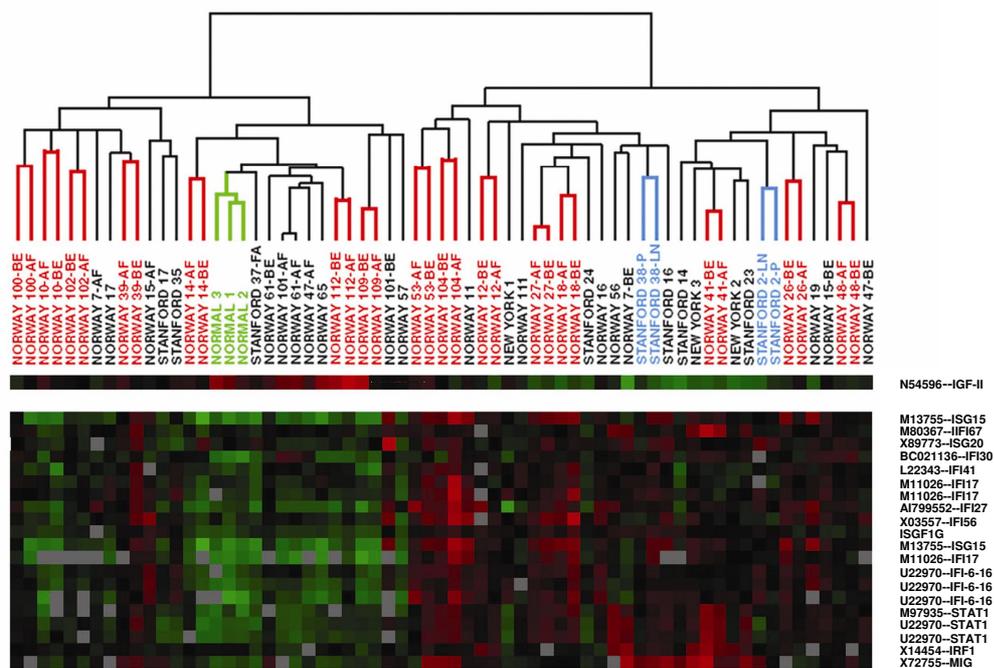


Abbildung 9: *Re-clustering* der Expressionsdatensätze von 62 Mammakarzinomen (Perou et al., 1999; Perou et al., 2000). Hier zeigte sich ebenso wie bei den HCCs eine exklusive Expression von IGF-II (Reihe 1) und Interferon-modulierten Genen (Reihe 2 bis 21), welche die Tumoren in drei Subgruppen unterteilt.

4.2 Verifizierung der IGF-II-Expression im HCC

Zur Verifizierung der durch die cDNA-Microarrays generierten IGF-II-Expressionsdaten wurde eine *Northern*-Hybridisierung mit repräsentativen Gesamt-RNAs aus HCCs und HCC-Zelllinien sowie nicht-hepatozellulären Zelllinien durchgeführt (Abbildung 10). Die analysierten Tumoren R49 und R53 gehörten zur Gruppe B1, die in der Microarray-Analyse IGF-II-positiv waren. Beide zeigen eine intensive Bande bei 6,0 kB und eine etwas schwächere bei 4,8 kB. Diese entsprechen den Transkripten der embryonalen Promotoren P3 und P4 (Holthuisen et al., 1990). Ebenso wiesen die drei analysierten Hepatomazelllinien HUH-7, HepG2 und Hep3B hohe IGF-II-Transkriptmengen gleicher Größe auf. Der auf den Arrays als IGF-II-negativ getestete Tumor R62 (Gruppe A) zeigte kein Signal entsprechender Größe. Alle anderen getesteten Zelllinien des Mammakarzinoms (T-47D, MCF7), des Glioblastoms (U-138-MG), des Colonkarzinoms (HT-29) und des Leberadenoms (SK-Hep1) waren negativ für IGF-II-Transkripte. Die normale, gesunde Leber wies ein schwaches Signal bei 5,3 kB auf. Diese entspricht dem IGF-II-Transkript des P1-Promotors, der in der adulten Leber aktiv ist (Holthuisen et al., 1990).

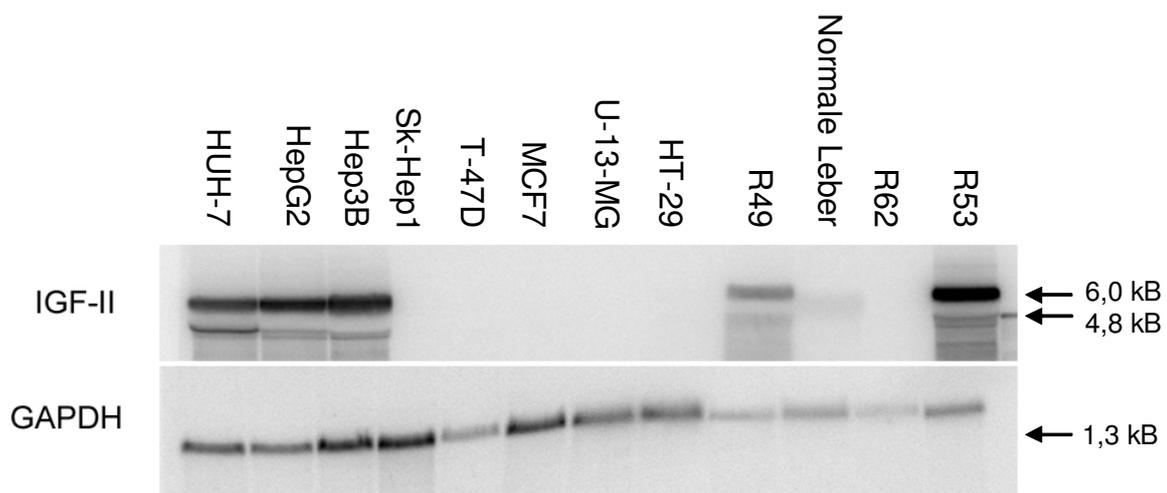


Abbildung 10: *Northern*-Hybridisierung mit einer IGF-II spezifischen Sonde zur Verifizierung der Array-Daten.

4.3 Analyse der IGF-II-Expression durch semiquantitative *real-time*-PCR

In der semiquantitativen *real-time*-PCR-Analyse wurden 32 von 43 (74%) der in den cDNA-Microarrays analysierten HCCs, von denen noch Material zur Verfügung stand, auf ihre IGF-II-Expression hin untersucht (Abbildung 11 A). Die mit Hilfe der cDNA-Microarrays generierten Daten konnten durch die *real-time*-PCR bestätigt werden, bzw. darüber hinaus die relative Induktion bzw. Repression der IGF-II-Expression in den HCCs im Vergleich zur Kontrolle genauer bestimmt werden. In den HCCs der Subgruppe B1 (R8, R9, R37, R49, R53) konnte eine Induktion der IGF-II-Expression bis zu einem Faktor 80 (Tumor R8) beobachtet werden, während Tumoren der Subgruppe B2 (R75, R83, R84, R85) und der Gruppe A eine Reduk-

tion bis zu einem Faktor 90 (Tumor R63) aufwiesen (Abbildung 11 A). Die Tumoren R80 und R82 zeigen in der *real-time*-PCR-Analyse eine Induktion der IGF-II-Expression. Die Expression der Apoptose- und Immunabwehr-relevanten Gene entspricht jedoch der der Gruppe B2, weshalb diese Tumoren dieser Gruppe zugeordnet wurden (Abbildung 6). Die drei Hepatoma-Zelllinien (HUH-7, HepG2 und Hep3B), T-47D, MCF7, U-138-MG und SK-Hep1 wurden ebenfalls mit Hilfe der *real-time*-PCR-Analyse auf ihre IGF-II-Expression hin untersucht (Abbildung 11 B). Wie schon in der *Northern*-Hybridisierung zu beobachten war, wiesen auch hier nur die drei HCC-Zelllinien deutliche IGF-II-Transkriptmengen auf. Alle anderen Tumorzelllinien enthielten, mit der Ausnahme der Mammakarzinom-Zelllinie T-47D, nur sehr geringe oder keine detektierbaren Transkriptmengen.

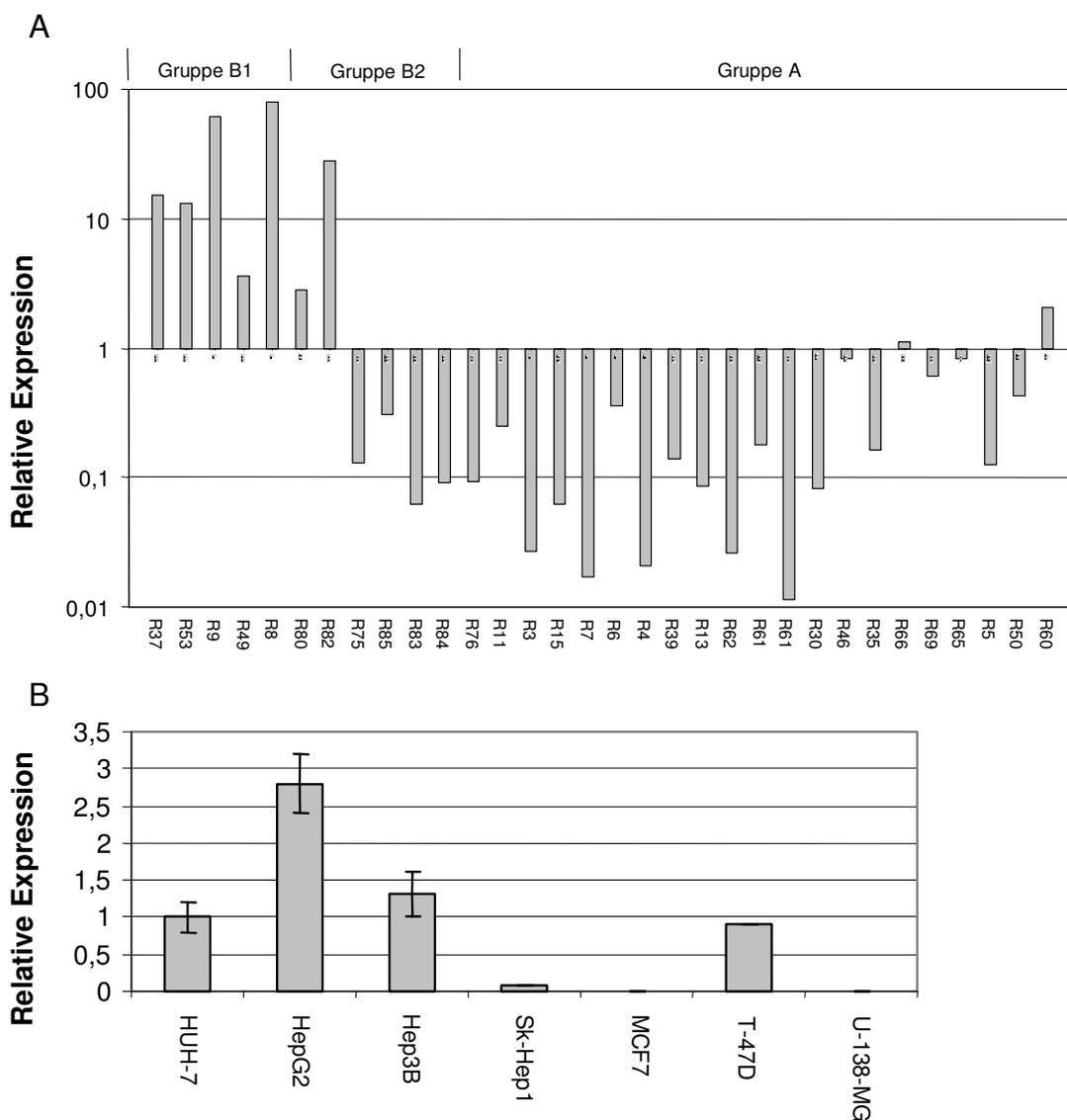


Abbildung 11: Semiquantitative *real-time*-PCR-Analyse der IGF-II-Expression. A: Die relative Expression von IGF-II in den verschiedenen Gruppen und Subgruppen. Die Expression in der normalen, gesunden Leber wurde als Kalibrator eingesetzt. B: Die Untersuchung der IGF-II-Expression verschiedener hepatozellulärer und nicht-hepatozellulärer Zelllinien. Das Expressionsniveau der Zelllinie HUH-7 diente als Kalibrator.

4.4 Interferon γ reprimiert die Expression von IGF-II in HCC-Zellen

Alle drei getesteten Hepatoma-Zelllinien wiesen eine hohe Expression von IGF-II auf und gruppierten bei der Analyse mit den IGF-II-überexprimierenden HCCs der Subgruppe B1 (Abbildung 6). Wie auch die Tumoren der Subgruppe B1, wiesen die HCC-Zelllinien keine Induktion Interferon regulierter Gene auf. Die exklusive Expression von IGF-II und Interferon-regulierter Gene als auch deren potentielle Interaktion wurden im folgenden Experiment analysiert.

HUH-7-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Interferon γ über einen Zeitraum von 16 Std behandelt. Eine signifikante Reduktion ($p = 0,05$) der IGF-II-Transkript-Mengen um den Faktor 2,3 konnte nach Behandlung mit 600 U/mL Interferon γ beobachtet werden (Abbildung 12). Nach Erhöhung der Zytokinmenge auf 1000 U/mL Interferon γ konnte eine hochsignifikante Reduktion ($p \leq 0,001$) der IGF-II Transkriptmenge um den Faktor 50 beobachtet werden (Abbildung 12). Weiterführende *in silico*-Analysen belegen das Vorhandensein verschiedener Bindungsstellen von Interferon γ -abhängigen Transkriptionsfaktoren im *igf2*-Gen (Tabelle 7). Diese Daten sprechen dafür, dass es zwischen dem IGF-II-Signalweg und dem Interferon-Signalweg eine mechanistische Verbindung bzw. Interaktion gibt.

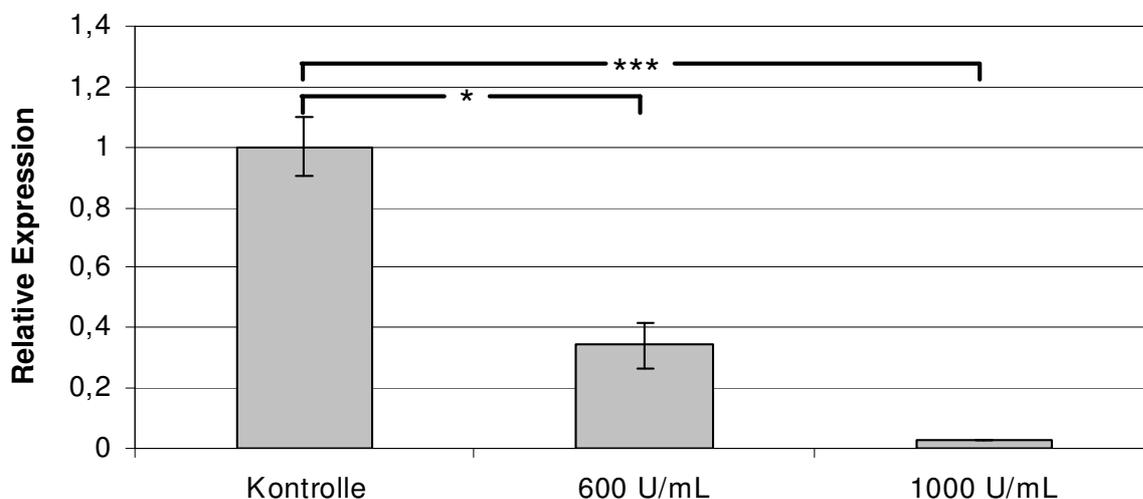


Abbildung 12: Interferon γ -abhängige Reduktion der IGF-II-Expression in HUH-7-Zellen. Semiquantitative TaqMan-Analyse der behandelten Zellen, die für 16 Stunden mit den Interferon γ -Konzentrationen behandelt wurden. Die unbehandelten Zellen wurden zur Kalibrierung verwendet. * : $p = 0,05$ und *** : $p \leq 0,001$

Tabelle 7: Interferon γ -abhängige Transkriptionsfaktoren und ihre Bindestellen im *igf2*-Gen (GenBank X03562).

Faktor	Position im <i>igf2</i> -Gen
<i>interferon-regulatory factor 1</i> (IRF-1)	5523-5541
IRF-3	557-575; 2548-2566
IRF-7	2640-2658; 4170-4188
Signal transducer and activator of transcription (STAT1)	2711-2729; 2969-2987

4.5 Stathmin-Expression im HCC

4.5.1 SEMIQUANTITATIVER NACHWEIS DER STATHMIN-EXPRESSION IM HCC

Nicht nur die Gruppierung der Karzinome entsprechend ihrer Expressionsprofile kann das Verständnis über die Abläufe in der Hepatokarzinogenese vertiefen. Auch die Analyse einzelner tumorrelevanter Gene als potentielle therapeutische Zielstrukturen wird durch ein Hochdurchsatzverfahren wie dem cDNA-Microarray erleichtert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche stark regulierte Gene identifiziert, die Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum von HCCs haben können (z.B. β -Catenin, Cyclin D1, p53, Proteinkinase C δ , Laminin).

Im Folgenden soll näher auf die Untersuchung von Stathmin eingegangen werden, einem Protein, das maßgeblich an der Regulation der Mitose beteiligt ist. Stathmin ist ein zytoplasmatisches Phosphoprotein, das eine wichtige Rolle im dynamischen Auf- und Abbau des Spindelapparates während der Mitose spielt. Die cDNA-Microarray-Analyse der HCCs ergab für die Transkripte des Stathmin-Gens eine Überexpression um mindestens den Faktor zwei in 87% der untersuchten Tumorproben (31 von 39 HCCs; Abbildung 13 A). Die mittlere relative Expressionsänderung lag bei einem Faktor von $3,77 \pm 1,15$ gegenüber der gesunden Leber. Die semiquantitative *real-time*-PCR-Analyse bestätigte die Tendenz der Array-Untersuchung bezüglich der Stathmin-Expression. Hier wiesen 38% (13 von 34) der HCCs eine deutliche Induktion der Expression (Faktor > 2) im Vergleich zur gesunden Leber auf (Abbildung 13 B). 59% (20 von 34 HCCs) der Proben zeigten keine Veränderung (Faktor kleiner zwei) und eine Probe wies eine Reduktion der Stathmin-Expression um den Faktor zwei auf.

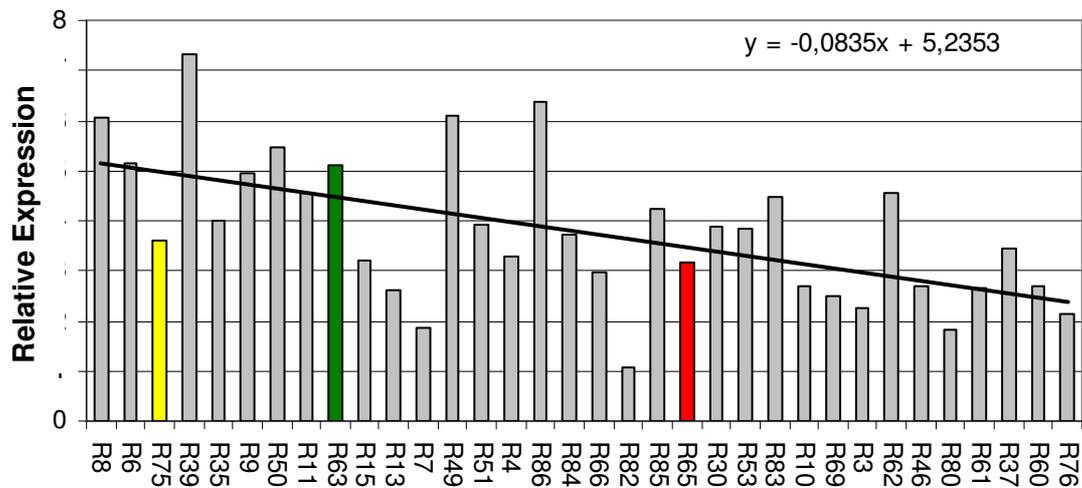
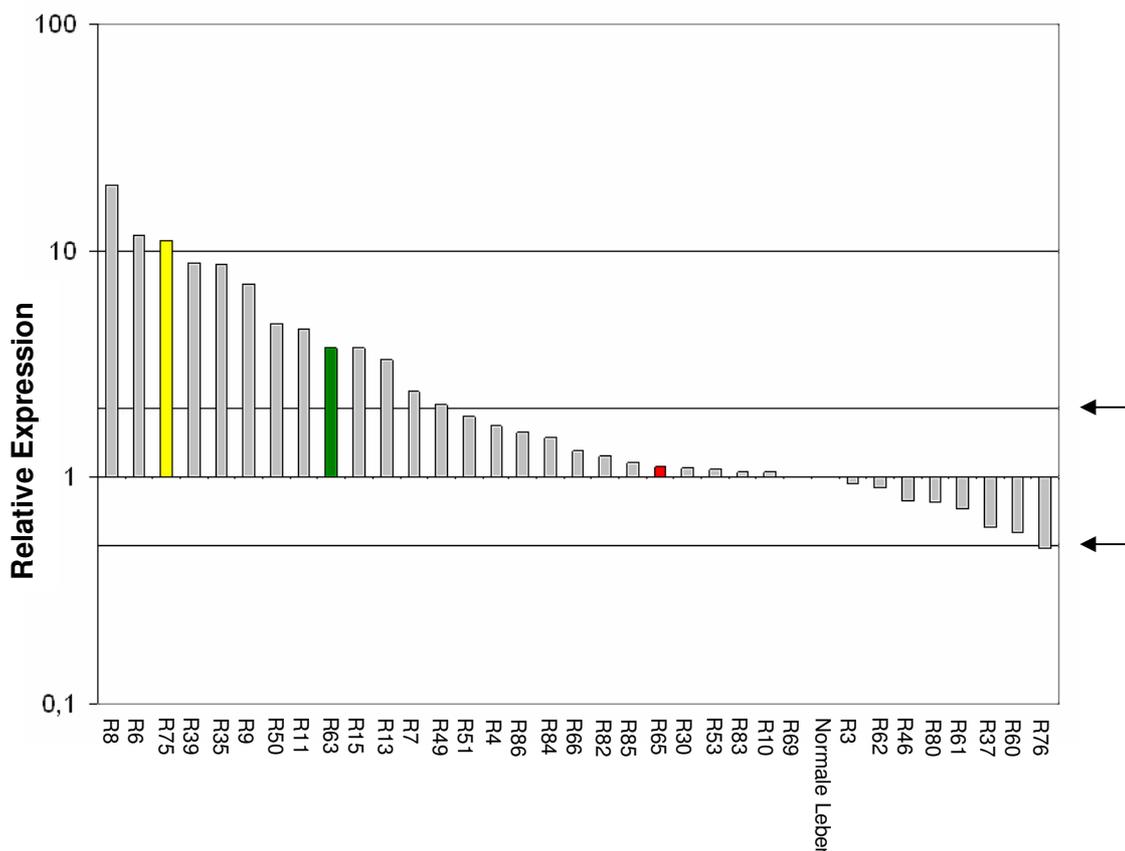
A**B**

Abbildung 13: Expression von Stathmin in HCCs auf mRNA-Ebene. A: Stathmin-Expression (cDNA-Microarray-Daten) sortiert nach der Reihenfolge der in 13 B aufgeführten Tumoren. Die computergenerierte Trendlinie gibt die Tendenz der Abnahme der Stathmin-Expression wieder. B: *Real-time*-PCR-Analyse der Stathmin-Expression, der relativen Expression nach sortiert. Die Stathmin-Expression in normaler, gesunder Leber diente als Kalibrator. Die farbig markierten Fälle (R63, R65, R75) konnten ebenfalls für die Proteinexpression von Stathmin herangezogen werden (Abbildung 15 E). Die Pfeile sind auf Höhe der Änderung der Expression um den Faktor zwei.

Die Expressionsdaten des cDNA-Microarrays wiesen keine vollständige Übereinstimmung mit den Daten der *real-time*-PCR auf. Insbesondere wurde bei letzterer Analyse in der Mehrzahl der Tumoren eine geringe Expressionsänderung von Stathmin um einen Faktor kleiner als zwei im Verhältnis zur Expression in normaler Leber beobachtet. Trotz dieses Unterschiedes ließ sich in der Korrelationsanalyse nach Spearman ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen beiden Datensätzen (ρ von 0,584; $p < 0,001$) ermitteln. Demnach ist die Stathmin-Expression auf RNA-Ebene mindestens in 40% aller HCCs im Vergleich zur normalen, gesunder Leber deutlich erhöht, wie mit zwei unabhängigen Methoden, dem Immunoblot und dem MTA, gezeigt werden konnte.

4.5.2 EXPRESSIONSNACHWEIS VON STATHMIN IN ZELLINIEN

Um die Expression von Stathmin in Zelllinien zu bestimmen, wurden Immunoblot-Analysen mit Proteinextrakten durchgeführt (Abbildung 14 A und B). Densitometrische Messungen der detektierten Stathmin-Signale zeigten eine heterogene Expression in allen analysierten hepatozellulären und nicht-hepatozellulären Zelllinien.

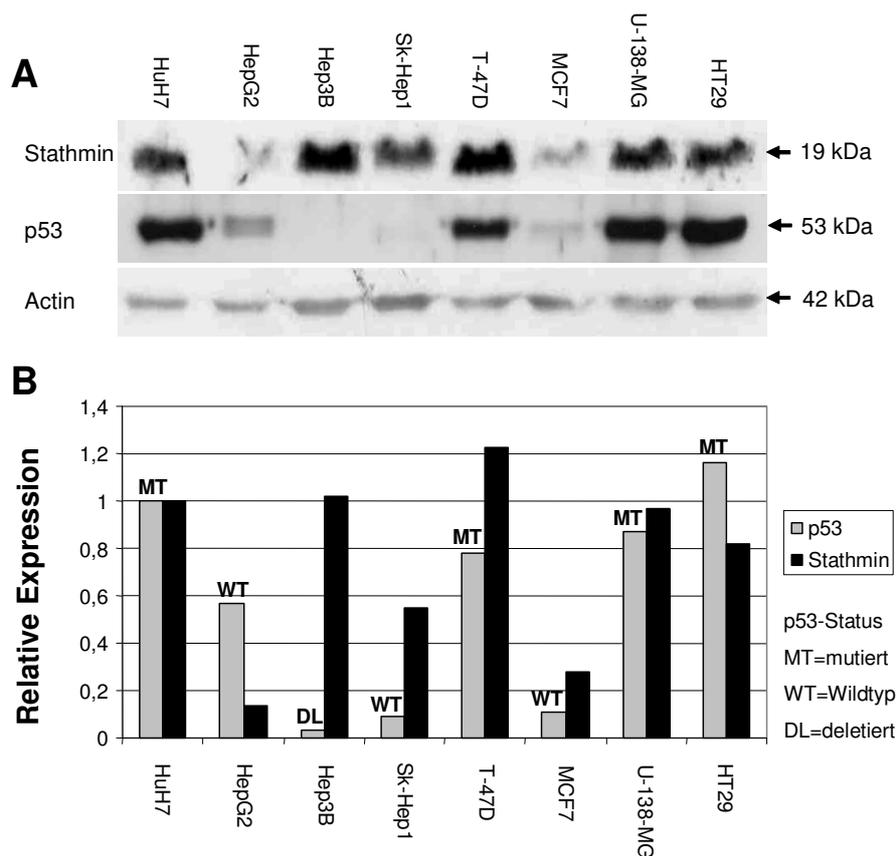


Abbildung 14: Darstellung der Expression von Stathmin und p53 in verschiedenen Zelllinien. A: Immunoblot-Analyse von hepatozellulären und nicht-hepatozellulären Zelllinien mit Antikörpern gegen Stathmin, p53 und Actin (Beladungskontrolle). B: Semiquantitative Darstellung der Stathmin- und p53-Expression nach densitometrischer Messung der detektierbaren Signale. Hierbei wurde die Farbdichte des Hintergrundes von der der Banden abgezogen und der Quotient aus dem Wert für Stathmin bzw. p53 und dem für das entsprechende Actin gebildet. Der jeweilige p53-Status der Zelllinien ist angegeben (MT = mutiert; WT = Wildtyp; DL = deletiert). Für Stathmin und p53 diente HUH-7 als Kalibrator.

In HUH-7, Hep3B, T-47D, SK-Hep1, U-138-MG und HT29 wird das Protein stark, in HepG2 und MCF7 relativ schwach exprimiert.

p53, das als Regulator der Stathmin-Expression diskutiert wird, wurde ebenfalls mit Hilfe der Immunoblot-Analyse untersucht. In den Zelllinien, die kein p53^{wt} exprimieren (HUH-7, Hep3B, T-47D, U-138-MG und HT29) zeigte sich eine hohe Expression von Stathmin (Abbildung 14 A). Die beiden p53^{wt} exprimierenden Zelllinien HepG2 und MCF7 zeigten hingegen keine oder eine nur sehr geringe Expression von Stathmin. Eine Ausnahme bildete das Ergebnis von SK-Hep1. Für diese Zelllinie ist in der Literatur keine Mutation oder Deletion für p53 beschrieben, sondern lediglich eine Translokation eines der beiden Allele. Jedoch ist auch in diesen Zellen die Expression von Stathmin im Vergleich zu HUH-7 oder Hep3B deutlich reduziert.

Die primär visuellen Daten wurden durch die densitometrische Quantifizierung der Signale für Stathmin und p53 und den Abgleich gegen eine interne Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge (Actin) bestätigt. In weiteren Immunoblot-Analysen wurde die Stathmin-Expression in Tumorgewebe und peritumoröses Gewebe von neun HCC-Patienten untersucht (Abbildung 15 A bis C). Es zeigte sich eine heterogene Expression von Stathmin in den analysierten Tumoren. Vier der neun Tumoren (44%) wiesen eine detektierbare Stathmin-Expression auf, wohingegen alle nicht-tumorösen Gewebe keine Expression von Stathmin erkennen ließen. Bei vier Probenpaaren konnte weder im Peritumor- noch im Tumorgewebe eine Stathmin-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 15 E). Die normale Leber zeigte eine nur sehr geringe Proteinexpression von Stathmin (Abbildung 15 E).

Drei Gewebepaare stammten von Patienten, die auch in der *real-time*-PCR-Analyse auf mRNA-Ebene untersucht wurden (Tumoren R63, R65 und R75). Die Induktion der Expression sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene korreliert in allen untersuchten Fällen (Abbildungen 15 D und 15 E). So weist der Fall R75 auf Transkriptionsebene im Vergleich zur normalen Leber eine Induktion um den Faktor elf auf (Abbildung 13 D), während auf Proteinebene eine Induktion um den Faktor 14 im Vergleich zum peritumorösen Gewebe zu beobachten ist (Abbildung 15 E).

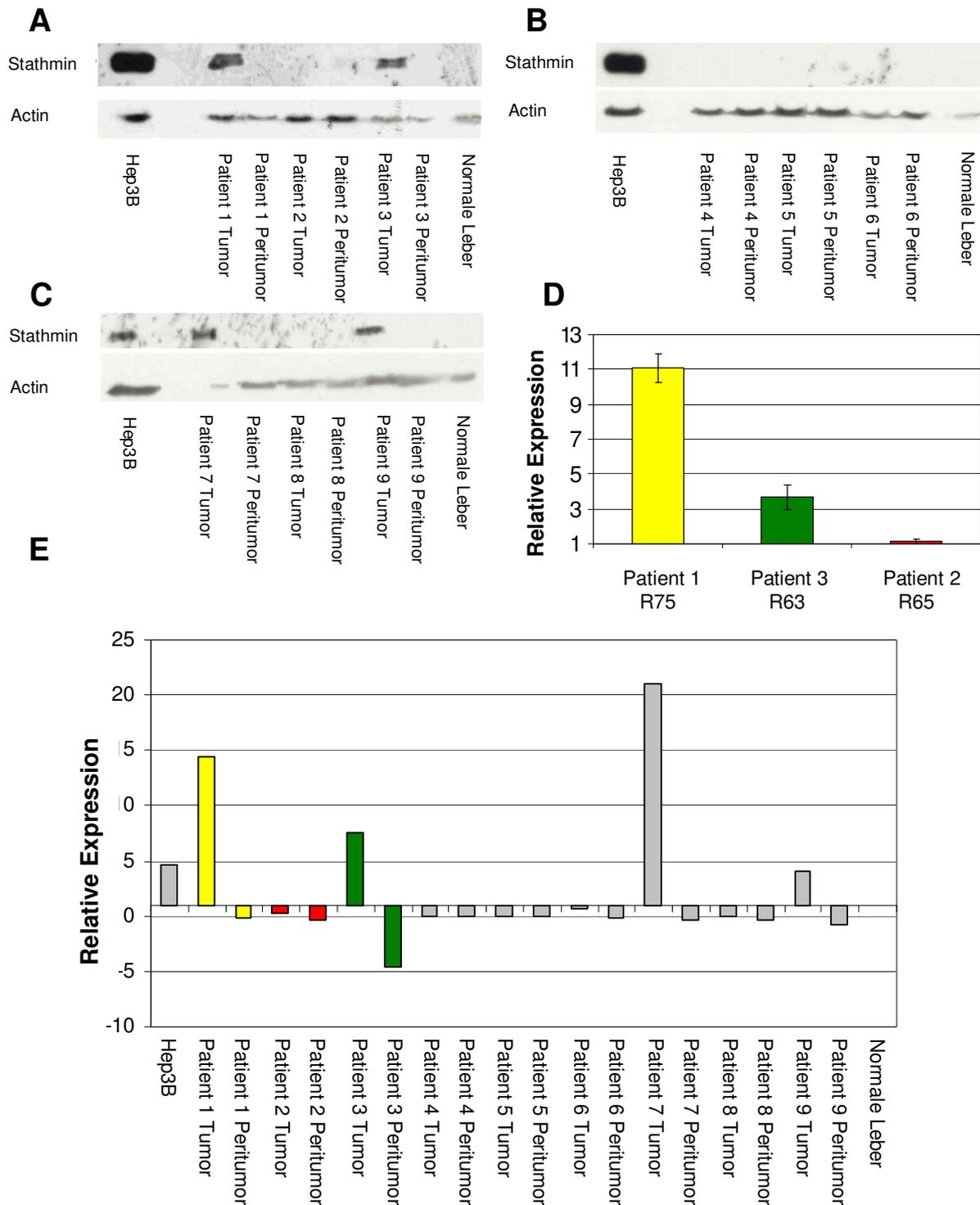


Abbildung 15: Immunoblot-Analyse gegen Stathmin in neun HCCs und deren korrespondierenden nicht-tumorösen Geweben. A bis C: Immunoblot-Analysen mit Antikörpern gegen Stathmin und Actin von jeweils drei Tumor-/Peritumorpaaren. Zur Kontrolle wurde bei jeder Analyse Proteinextrakte von normaler Leber und Hep3B (Positivkontrolle) untersucht. D: *Real-time*-PCR-Analyse der drei farbig markierten Tumoren aus Abbildung 13 B (R63, R65, R75). E: Densitometrische Auswertung der relativen Stathmin-Expression in allen analysierten HCCs und korrespondierenden nicht-tumorösen Geweben mit normaler, gesunder Leber als Kalibrator.

4.5.3 MULTI TISSUE ARRAYS

Korrelation der Stathmin-Expression mit dem Differenzierungsgrad

Auf vier MTA waren insgesamt Gewebestanden von 15 normalen Lebern, 36 dysplastischen Knoten und 152 HCCs (33 x G1; 90 x G2, 25 x G3 und 4 x G4), sowie Kontrollgewebe positioniert. Die Stathmin-Expression wurde auf den Arrays immunhistochemisch mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen. Nachdem sowohl die zytoplasmatische wie auch die nukleäre Färbung quantitativ und qualitativ bestimmt wurde (siehe Methoden Abschnitt 3.11), konnten die Daten mit Hilfe von Korrelationsanalysen nach Spearman mit anderen Merkmalen, wie z.B. dem Differenzierungsgrad des Gewebes, vergleichend analysiert werden.

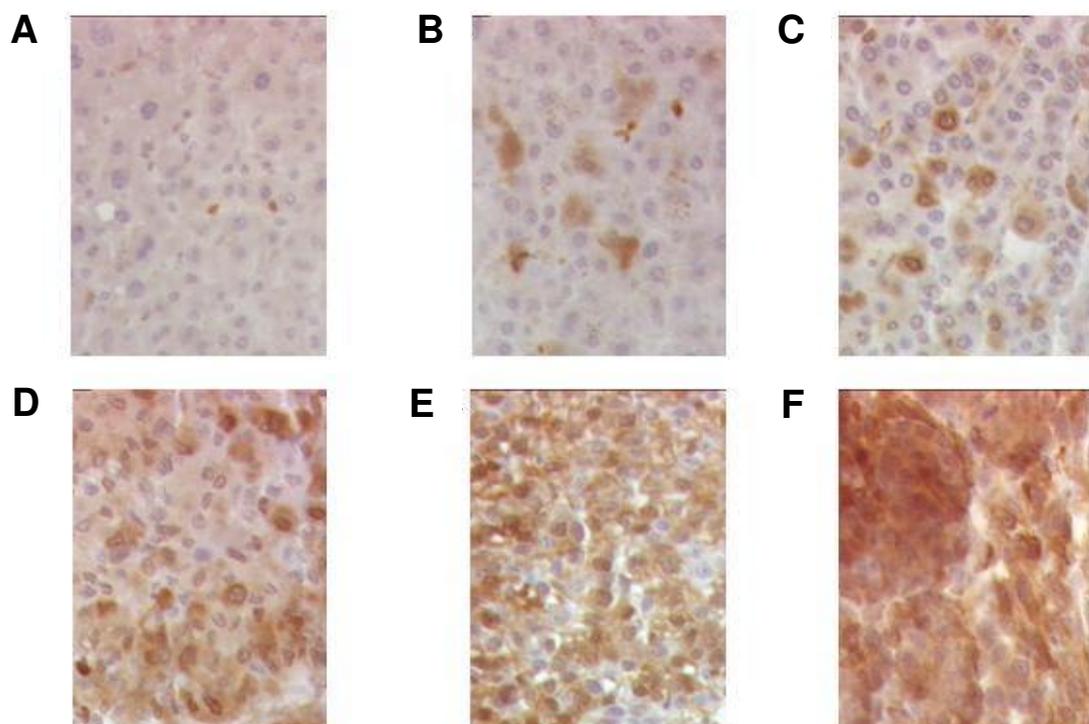


Abbildung 16: *Multi tissue array*-Analyse der Stathmin-Expression in normaler Leber, dysplastischen Knoten und HCCs. Exemplarische Darstellung der Stathmin-Expressionsmuster in A: normaler Leber, B: dysplastischen Knoten, C: HCC Grad G1, D: HCC Grad G2, E: HCC Grad G3 und F: HCC Grad G4.

Die Anzahl der zytoplasmatisch positiven Zellen wie auch die Intensität der Stathmin-Färbung nimmt mit zunehmender Entdifferenzierung zu ($\rho = 0,45$; $p < 0,001$) (Abbildung 16). Die Korrelation der nukleären Akkumulation mit dem Grad der Entdifferenzierung ist weniger deutlich, jedoch immer noch signifikant ($\rho = 0,219$; $p = 0,002$). Diese Daten belegen, dass die Expression von Stathmin im Rahmen der Entdifferenzierung deutlich in verschiedenen Kompartimenten der Zelle zunimmt.

Korrelation der Stathminexpression mit der Expression tumorrelevanter Gene

Die Immunoblot-Analyse der Zelllinien sowie publizierte Arbeiten haben bereits angedeutet, dass eine mechanistische Verbindung zwischen der Expression von Stathmin und p53 besteht (Ahn et al., 1999). Deshalb wurden mit Hilfe der HCC-MTAs Korrelationsanalysen zur Expression von p53 und anderen tumorrelevanten Genen (Ki-67, MSH-2, Siah-2, Nup88) mit Stathmin durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 8 aufgeführt sind.

Tabelle 8: Korrelation der Stathmin-Expression mit der Expression tumorrelevanter Genprodukte.

Korrelation	Stathmin	
	zytoplasm. Expression	nukleäre Expression
p53 nukleäre Expression Signifikanz	0,500 ≤ 0,0001	0,371 ≤ 0,0001
Ki-67 nukleäre Expression Signifikanz	0,540 ≤ 0,0001	0,430 ≤ 0,0001
MSH-2 nukleäre Expression Signifikanz	0,541 ≤ 0,0001	0,244 0,004
Siah-2 nukleäre Expression Signifikanz	0,376 ≤ 0,0001	0,213 0,012
Nup88 nukleäre Expression Signifikanz	0,458 0,0001	0,171 0,044

Die nukleäre Akkumulation von p53 (Abbildung 17 A) wies in der Gruppe der HCCs (n = 152) eine hochsignifikante Korrelation mit der zytoplasmatischen Expression von Stathmin auf ($\rho = 0,500$; $p < 0,0001$). Ebenso war auch eine deutliche Korrelation der nukleären Stathmin-Expression mit der nukleären Akkumulation von p53 zu beobachten ($\rho = 0,371$; $p < 0,0001$) (Tabelle 8). Die nukleäre Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 (Abbildung 17 B) korrelierte sowohl mit der zytoplasmatischen ($\rho = 0,540$; $p < 0,0001$) wie auch der nukleären Expression von Stathmin ($\rho = 0,43$; $p < 0,0001$) (Tabelle 8). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Expression von Stathmin und seiner Funktion in der Mitose sowie der Proliferation der Tumorzellen. Darüber hinaus gibt es zahlreiche hochsignifikante Korrelationen zu Genprodukten mit nachgewiesenen oder potentiellen protumorigenen Eigenschaften.

So ist z.B. eine deutliche, positive Korrelation der Stathmin-Expression zur Expression von DNA-Reparatur-Genen (MSH-2), Ubiquitin-Ligasen (Siah-2) oder Strukturproteinen der Kernporen (Nup88) zu beobachten (Tabelle 8). Über die möglichen funktionellen Aspekte der übereinstimmenden Expressionsprofile ist jedoch bisher nur wenig bekannt.

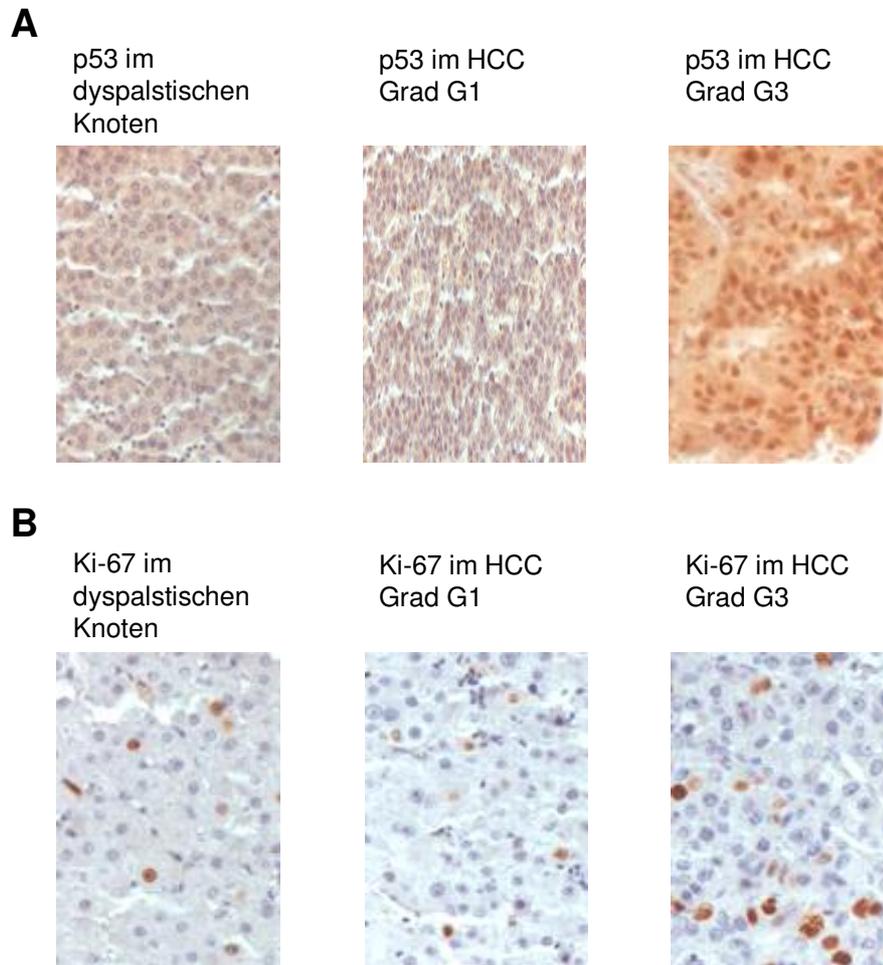


Abbildung 17: *Multi tissue array*-Analyse der p53- und Ki-67-Expression. A: p53-Expression in dysplastischen Knoten, HCC Grad G1 und HCC Grad G3. B: Ki67-Expression in dysplastischen Knoten, HCC Grad G1 und HCC Grad G3.

5 Diskussion

Das HCC ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose des Tumors ist kleiner als 3% (Feitelson et al., 2002) und der Median der Überlebensrate aller HCC-Patienten in Europa liegt bei acht Monaten (Schöninger-Hekele et al., 2001). Um neue therapeutische Optionen bei der Behandlung von HCC-Patienten zu identifizieren, ist es notwendig, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die in einer chronisch erkrankten Leber zur Entwicklung von Tumoren führen. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Behandlung des HCC ist die Identifizierung therapeutischer Zielstrukturen.

Es konnten bereits einige molekulare Mechanismen identifiziert werden, die maßgeblich zur Entstehung von HCCs beitragen, wie z.B. die Dysregulation der Wnt- und TGF- β -Signalwege, Mutationen bei p53 oder β -Catenin, Neoexpression von IGF-II, Verlust von genetischem Material am Genlocus bei RB-1 sowie Überexpression von COX-2 oder Cyclin D1 (Friend et al., 1986; Cariani et al., 1988; Buendia, 2000; Feo et al., 2000; Bae et al., 2001; Joo et al., 2001; Laurent-Puig et al., 2001). In den meisten Studien wurden oft nur wenige Gene oder deren Genprodukte isoliert in einzelnen HCCs untersucht, was nicht das hochkomplexe Expressions- und Interaktionsnetzwerk im oftmals heterologen Tumor widerspiegelt und erklärt. Mit der Entwicklung der Microarray-Technologie ist es nunmehr möglich geworden, das gesamte Expressionsprofil eines Tumorgewebes in einem Ansatz parallel zu analysieren. Die Erstellung von Genexpressionsprofilen bildet somit die Basis für die Identifizierung von dysregulierten Genen und Gengruppen, die eventuell an spezifische regulatorische Signalwege und molekulare Mechanismen gekoppelt sind.

In den letzten Jahren sind für das HCC mehrere cDNA-Microarray-Studien veröffentlicht worden (Tabelle 1), in denen Gene identifiziert werden konnten, die mit Tumordifferenzierung und Metastasierung korrelieren. In zwei Drittel der Arbeiten wurde die Genexpression der Tumorproben mit der des korrespondierenden nicht-tumorösen Gewebes desselben Patienten verglichen (Tabelle 1). Hierbei lassen sich die detektierten Expressionsunterschiede der einzelnen Tumoren nicht uneingeschränkt miteinander vergleichen, da eine gemeinsame Referenz mit einheitlicher biologischer Relevanz nicht existiert. Die Genexpressionsprofile in nicht-tumorösen Gewebeanteilen und Tumoren verschiedener Patienten sind maßgeblich durch den Entzündungsgrad und den Fasergehalt der Zirrhose, den HBV-/HCV-Titer und die Therapie beeinflusst. Demnach können tumorspezifische Veränderungen in den Expressionsmustern der HCCs maskiert und gegebenenfalls nicht vom Kontext des umgebenden alterierten Gewebes getrennt werden. Zwar bieten die vereinzelt als Referenz verwendeten reproduzierbaren Zellliniengemische eine einheitliche, interindividuelle Vergleichsgruppe (Chen et al., 2002), doch sind direkte biologische Aussagen nicht möglich. Eine weitere Einschränkung zahlreicher Microarray-Studien zum HCC ist die in den meisten

Fällen geringe Anzahl der untersuchten Tumoren (Tabelle 1). In mehr als der Hälfte der Studien wurden weniger als 20 HCC-Proben für die Untersuchungen eingesetzt, wodurch statistisch relevante Aussagen kaum zu erreichen sind. In der Studie von Chen et al. (2002), mit 102 HCCs von 82 Patienten, wurde unter Verwendung einer RNA-Referenz aus sechs verschiedenen Zelllinien die Genexpression der Tumoren eindeutig von der anderer Tumorentitäten diskriminiert. Der Versuch, den verschiedenen Expressionsprofilen der HCCs Ätiologien zuzuordnen, schlug in dieser Studie fehl (Chen et al., 2002). Auch wenn Okabe et al. (2001) in ihrer Studie die Expression spezifischer Gene, wie z.B. die UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) oder die Gluthationperoxidase 2 (GPX2), mit der Entstehung viral induzierter Tumoren in Verbindung zu bringen versuchen, ist die Interpretation dieser Daten schwierig, da die Expressionsmuster des als Referenz eingesetzten nicht-tumorösen Gewebes der einzelnen Patienten erheblich variieren. Unsere Ergebnisse zeigen, ebenso wie die anderer Studien, keine signifikanten Korrelationen zu einer Reihe anderer klinischer Parameter, wie z.B. Alter, Geschlecht, Überleben und TNM-Klassifikation. Es konnten jedoch 53 Gene identifiziert werden, die gut differenzierte Tumoren (Grad G1) von gering differenzierten Tumoren (Grad G3) unterscheiden (Tabelle 4). In den gering differenzierten HCCs war im Vergleich zu denen des Grades G1 die Expression von solchen Genen hochreguliert, die mit der Transkriptions- und der Translationsregulation in Verbindung gebracht wurden. Als Beispiel zu nennen wäre die Histondeacetylase 2 (HDAC2), die an der Regulation der Chromatinstruktur beteiligt ist und somit die DNA für den Transkriptionsapparat zugänglich macht. Das ribosomale Protein S23 als weiteres Beispiel ist ein Teil der 40S-Untereinheit der Ribosomen (Tabelle 5). In diesen Expressionsänderungen spiegelt sich möglicherweise der in den Tumoren des Grades G3 erhöhte Zellumsatz wider. Die Herabregulierung von typischen Genen des Lebermetabolismus ist eventuell Ausdruck der Entdifferenzierung der Tumorzellen. Hepatozelluläre Gene, wie z.B. die Alkoholdehydrogenase 6 (ADH6) oder Gene des Fettsäuremetabolismus, wie z.B. die δ -5-Fettsäuredesaturase (FADS1), die Acetyl-Coenzyme-A-Acyltransferase 2 (ACAA2) oder die *medium-chain* Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACADM) werden in den HCCs des Grades G3 in verringertem Umfang exprimiert. Die Entdifferenzierung der Tumorzellen, die sich in der Reduktion Leberspezifischer Gene widerspiegelt, konnte in verschiedenen Arbeiten belegt werden (Okabe et al., 2001; Xu et al., 2001; Chen et al., 2002). Okabe et al. konnten ebenfalls eine Reduktion der Expression von Leber-spezifischen Genen in differenzierten verglichen mit entdifferenzierten HCCs aufzeigen (Okabe et al., 2001). Ebenso sind zahlreiche immunmodulierte Gene, wie z.B. das CD8-Antigen (CD8A), in entdifferenzierten Tumoren im Vergleich zu differenzierten Tumoren in Ihrer Expression reudziert (Tabelle 5), was offenbar Zeichen einer geringeren intratumoralen Lymphozyten-Infiltration ist. In einer anderen Arbeit konnte ebenfalls die Repression von Immunsystem-assoziierten Genen mit der Entdifferenzierung der

HCCs in Verbindung gebracht werden (Okabe et al., 2001). Ferner konnte die Repression der E3-Ubiquitin-Ligase Siah-1 detektiert werden, die an der proteolytischen Degradation zahlreicher tumorrelevanter Proteine, wie z.B. β -Catenin, NumB oder *c-myc*, beteiligt ist (Tanikawa et al., 2000; Matsuzawa und Reed, 2001; Susini et al., 2001). Die Reduktion der Siah-1-Aktivität ist mit der Akkumulation dieser Faktoren assoziiert. Somit ist diese Ubiquitin-Ligase ein neues potentielles Tumorsuppressorgen, welches in der Hepatokarzinogenese an der Regulation zahlreicher protumorigener Signalwege beteiligt sein könnte.

5.1 Subgruppierung der HCC-Population aufgrund der Expression von IGF-II und Interferon-modulierten Genen

Die Diagnose und Klassifizierung humaner Tumorentitäten beruht meist auf lichtmikroskopischen Untersuchungen, die auf histomorphologischen Kriterien und immunhistochemischen Analysen basieren. Die pathologische Klassifizierung kombiniert mit klinischen Daten kann zur Diskriminierung bestimmter Tumorguppen genutzt werden, die sich in der Prognose wie auch in ihrem Verhalten bei Reaktion auf eine Therapie unterscheiden können. Die Vielfalt des klinischen Verhaltens von morphologisch identischen Tumoren lässt vermuten, dass auch eine molekularbiologische Subtypisierung innerhalb vordefinierter Tumorentitäten von diagnostischem und/oder therapeutischem Nutzen ist. In einigen grundlegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auf Basis der mittels cDNA-Microarray generierten Genexpressionsprofile von Tumoren eine Unterteilung von Tumorentitäten in Subgruppen mit funktionellen Unterschieden erfolgen kann (Golub et al., 1999; Perou et al., 1999; Alizadeh et al., 2001). Obwohl die untersuchten Tumoren morphologisch z.T. sehr ähnlich waren, zeigten sie auf der Ebene des Transkriptomts deutliche Unterschiede, die z.B. mit der Überlebensrate der Patienten oder dem Ansprechen auf Chemotherapien signifikant korrelierten. Für das HCC wurde eine derartige Subgruppierung bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit konnten 118 Gene identifiziert werden, die HCCs aufgrund ihrer differentiellen Expression in zwei Hauptgruppen unterteilt werden (Abbildung 5; Tabelle Anhang). Tumoren der Gruppe A sind dabei durch eine hohe Expressionsrate Interferon-induzierter Gene gekennzeichnet, während Tumoren der Gruppe B keine oder nur eine geringe Induktion sowohl Interferon-regulierter wie auch Apoptose-relevanter Gene aufweisen. Innerhalb der Gruppe B existieren zwei weitere Subgruppen von Tumoren, von denen sich die Subgruppe B1 vor allem durch eine deutliche Überexpression von IGF-II auszeichnet. Die in dieser Studie beobachtete exklusive Expression von IGF-II und Interferon-regulierten Genen konnte für das HCC an einem unabhängigen Datensatz bestätigt werden (Chen et al., 2002) (Abbildung 8).

Interessanterweise wurde bei cDNA-Microarray-Analysen des Mammakarzinoms ebenfalls diese exklusive IGF-II-Expression und Reprimierung von Interferon-modulierten Genen beobachtet (Perou et al., 2000) (Abbildung 9).

Da in verschiedenen Arbeiten die exklusive Expression von IGF-II und Interferon-regulierten Genen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob Interferon selbst an der Regulation der IGF-II-Expression beteiligt ist. Eine Literaturrecherche führte zu zwei Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass Interferon γ in Zellen der Nebennierenrinde und in Neuroblastomzellen zu einer Reduktion von IGF-II führt (Ilvesmaki et al., 1993; Martin et al., 1993). Bei Überprüfung dieses Modells an HUH-7-Zellen konnte bei diesen eine signifikante Reduktion der IGF-II-Expression durch Behandlung mit Interferon γ nachgewiesen werden. *In silico*-Analysen konnten mehrere potentielle Bindungsstellen Interferon-abhängiger Transkriptionsfaktoren im Bereich der P2-P4-Promotorregion des *igf2*-Gens, wie z.B. IRF-1 oder STAT1, identifizieren (Tabelle 6). Für einige dieser Faktoren (z.B. IRF-1) konnte gezeigt werden, dass sie die Expression von Interferon-responsiven Zielgenen in Abhängigkeit vom biologischen Kontext beeinflussen können (Lu et al., 2002; Sanceau et al., 2002; Brucet et al., 2004). Da die Überexpression von IGF-II in HCCs maßgeblich durch die Promotoren P2 bis P4 reguliert wird (Li et al., 1997), ist es denkbar, dass die Expression von Interferon γ im Tumor zu einer Suppression der IGF-II-Expression auf Transkriptionsebene führt.

Die zweite Subgruppe in den HCCs der Gruppe B (B2) zeichnet sich weder durch die Überexpression von IGF-II noch Interferon-induzierter Gene aus. Stattdessen sind in diesen HCCs Gene reprimiert, die mit dem Prozess der Apoptose, wie z.B. *fas associated factor 1* (FAF1), *TRAF and TNF receptor-associated protein* (TTRAP), und der Immunantwort, wie z.B. *delta sleep inducing peptide immunoreactor* (DSIPI), *tumor necrosis factor receptor superfamily member 5* (TNFRSF5 oder CD40), assoziiert sind. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der den Tumoren dieser Subgruppe das Überleben durch die Reduktion der Expression an der Apoptose-beteiligter Gene sichert.

Unter den Interferon-regulierten Genen der Gruppe A befinden sich Genprodukte, die alle durch Interferone des Typs I (Interferon α und β) induziert werden (Rasmussen et al., 1993; Zhou et al., 2000; Meraro et al., 2002). Allerdings wurden nicht alle bekannten Interferon-regulierten Gene, die auf den Array aufgebracht waren, signifikant reguliert (z.B. *interferon stimulated gene 20kDa* (ISG20)). Dies deutet auf eine vom Mikromilieu abhängige Regulation der Expression von Genen in verschiedenen Tumoren hin, z.B. durch T-Lymphozyten-Infiltration und Tumorzellapoptose. Tatsächlich konnten in der Gruppe A im Vergleich zur Gruppe B eine erhöhte Anzahl an infiltrierenden, immunkompetenten Lymphozyten und eine höhere Zahl apoptotischer Tumorzellen nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden in cDNA-Microarray-Studien am Mammakarzinom gemacht, die ebenfalls eine IGF-II-Überexpression in einer Untergruppe der Tumoren aufwiesen (Perou et al., 2000).

Hier zeigte sich ebenfalls eine Korrelation von erhöhter Expression Interferon-induzierter Gene mit einer verstärkten intra-tumorösen Leukozyten-Infiltration und Induktion von nukleärer STAT-1-Reaktivität (Perou et al., 1999).

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten bilden die Grundlage für ein Modell der Unterteilung von HCCs in funktionelle Subgruppen (Abbildung 18). HCCs der Gruppe A repräsentieren Tumoren, welche einen stärker inflammatorisch und apoptotisch geprägten Phänotyp aufweisen. Dieser gibt Hinweise auf eine effizientere anti-tumoröse Immunreaktion in den HCCs der Gruppe A. Im Gegensatz zur Gruppe A wurde die Gruppe B durch die Expression anti-apoptotischer Faktoren, wie z.B. IGF-II in der Subgruppe B1, und die Reduktion apoptoserelevanter, wie z.B. TNFRSF6 (FAF1) in der Subgruppe B2, charakterisiert, die den entsprechenden Tumoren einen Überlebensvorteil verschaffen.

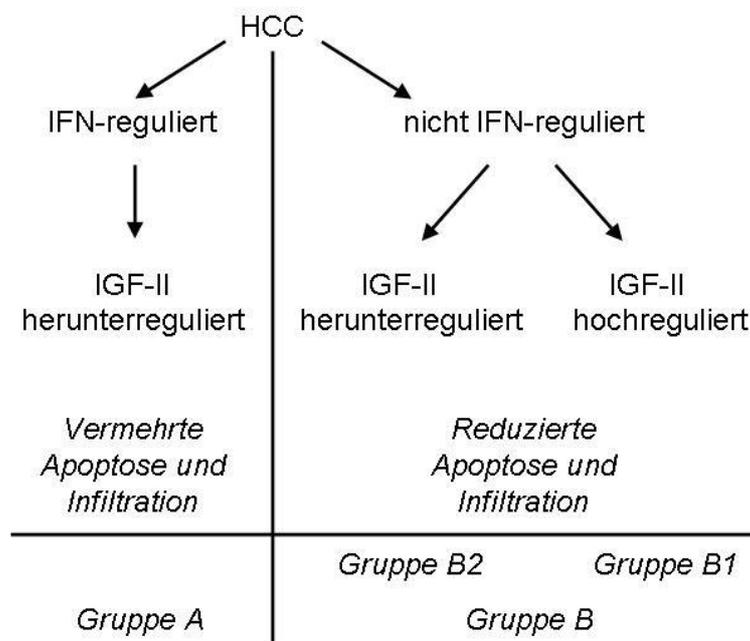


Abbildung 18: Schematische Darstellung der HCC-Subtypisierung.

Interessanterweise haben multivariate Analysen mit hohen Patientenzahlen eine signifikant bessere Prognose für diejenigen Patienten mit HCCs beschrieben, die eine massive Leukozyten-Infiltration aufwiesen (Ng et al., 1995). In einem Fall konnte sogar die spontane Regression eines stark inflammatorischen HCCs beobachtet werden (Matsuo et al., 2001). Die Rekrutierung Tumor-infiltrierender Lymphozyten könnte teilweise durch Sekretionsprodukte

der HCC-Zellen hervorgerufen werden, wie Chemokine (z.B. *human monokine induced by gamma-interferon* (HuMig)), die ihrerseits wiederum durch Interferon induziert werden können (Yoong et al., 1999). Die mögliche Induktion von Apoptose in HCC-Zellen durch Tumorinfiltrierende Lymphozyten ist z.T. der Aktivierung des Fas/FasL-Systems zuzuordnen (Fukuzawa et al., 2001).

5.2 Therapeutische Optionen

Der in dieser Arbeit geführte Nachweis einer mit IGF-II-Überexpression-assoziierten Subgruppe (B1) in HCCs ist von biologischer und therapeutischer Bedeutung. Für reversible Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren, wie Trichostatin A (TSA), konnte gezeigt werden, dass sie den IGF-Signalweg beeinflussen können (Gray et al., 1999; Gray et al., 2000). Zusätzlich zur Reduktion des *H19*-Genprodukts induziert TSA *in vitro* spezifisch die Expression des *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3), welches das dominierende Bindeprotein für freies IGF-II darstellt und dessen Konzentration maßgeblich beeinflusst (zusammengefasst in (Clemmons, 1997)); zudem induziert IGFBP3 p53-abhängig Apoptose (Rajah et al., 1997). Verschiedene HDAC-Inhibitoren, darunter TSA-Analoga, werden bereits in klinischen Studien in nicht-hepatozellulären Tumoren, wie Mamma-, Colon-, Prostata- oder Lungenkarzinomen eingesetzt (Butler et al., 2002; Tsurutani et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auch Überlegungen zu, die Re-Expression von IGF-II durch Gabe von Interferon γ zu unterbinden. Ebenso gibt es therapeutische Ansätze, die auf eine Modulation epigenetischer Effekte und daraus resultierende Expressionsänderungen abzielen. Da für das *igf2*-Gen und das chromosomal eng benachbarte *H19*-Gen bekannt ist, dass ihre Expression durch Änderungen des genomischen *Imprinting* bzw. durch aberrante Methylierung der Promotorregionen im HCC dysreguliert ist (Li et al., 1997), könnten Substanzen, wie z.B. Budesonid, die die Remethylierung unterstützen, zu einer verringerten Expression von IGF-II führen und als mögliche Therapeutika für diese HCC-Subgruppe in Frage kommen (Tao et al., 2002). Durch die starke Überexpression von IGF-II in den analysierten HCC-Zelllinien HUH-7, HepG2 und Hep3B, und die Tatsache, dass diese im Array mit der Subgruppe B1 zusammen *clustern*, stellen diese offenbar valide und repräsentative *in vitro*-Modelle zur funktionellen Testung therapeutischer Substanzen dar, die den IGF-Signalweg beeinflussen.

5.3 Stathmin

Neben der Detektion von klinisch relevanten Subgruppen innerhalb der HCCs durch den Vergleich der Expressionsprofile konnten auch einzelne z.T. stark regulierte Zielgene identifiziert werden, die eine potentielle Bedeutung in der Hepatokarzinogenese aufweisen. In dieser Arbeit wurde das Stathmin-Gen auf Transkriptionsebene und auf Ebene des Proteinpro-

duktes in etwa 40% der untersuchten HCCs überexprimiert gefunden. Stathmin ist ein kleines, ubiquitär exprimiertes zytosolisches Phosphoprotein, das als Schaltstelle zwischen verschiedenen Signalwegen in der Zelle fungiert (Sobel, 1991). Dieses Protein ist maßgeblich an der Mitose beteiligt, indem es die Dynamik der Mikrotubulopolymerisation und -depolymerisation reguliert (zusammengefasst in (Cassimeris, 2002)). Stathmin bindet je zwei Moleküle α - β -Tubulin (Curmi et al., 1997; Jourdain et al., 1997), wobei zwei grundsätzliche Mechanismen zur Depolymerisation der Mikrotubuli beitragen. Zum einen kann es freie Tubulindimere binden, wodurch es zu einer Verschiebung der stöchiometrischen Verhältnisse und zum Abbau der Mikrotubuli kommt (Belmont und Mitchison, 1996; Amayed et al., 2002). Darüber hinaus kann Stathmin auch direkt mit den Mikrotubulifilamenten interagieren und unmittelbar die Depolymerisation katalysieren (Belmont und Mitchison, 1996; Howell et al., 1999). Gesteuert wird die Aktivität von Stathmin durch Phosphorylierung von vier Serinresten, Ser 16, Ser 25, Ser 38 und Ser 63 (Beretta et al., 1993; Marklund et al., 1993). Durch diese Phosphorylierung wird Stathmin am Übergang der G2- zur M-Phase der Mitose inaktiviert (Marklund et al., 1996). Dies ermöglicht die Bildung der Mitosespindel und polarer Mikrotubuli, die an das Kinetochor der Schwesterchromatiden binden und durch die Verkürzung am Spindelapparat für die Chromosomensegregation verantwortlich sind. Dazu wird Stathmin am Ende der Mitose dephosphoryliert und somit wieder aktiviert, um die Depolymerisation des Spindelapparates voranzutreiben.

In den Hepatozyten adulter Lebern ist die Stathmin-Expression sehr gering. Ein Grund dafür ist, dass die ausgereifte Leber ein post-mitotisches Gewebe darstellt. Durch Leberschädigungen und Leberregeneration wird die Stathmin-Expression induziert und korreliert dann mit Größenwachstum des Organs und der Proliferation der Hepatozyten (Okazaki et al., 1993). Die Expression von Stathmin im HCC ist bisher nicht analysiert worden. Die Autoren einer Untersuchung am Hepatoblastomen konnten zeigen, dass in diesen eine stärkere Stathmin-Expression vorliegt als im benignen Leberadenom (Ghosh et al., 1993). In mehreren Tumorentitäten wurde bereits eine Überexpression von Stathmin beobachtet. Darunter befinden sich Leukämien und Lymphome (Ghosh et al., 1993; Roos et al., 1993), Prostatakarzinome (Friedrich et al., 1995), Ovarialkarzinome (Price et al., 2000) und Mammakarzinome (Bieche et al., 1998). Eine *antisense*-Inhibierung der Stathmin-Expression in Leukämiezellen führte *in vitro* zur Aufhebung des transformierten Phänotyps und zu einer reduzierten Tumorbildung an leukämischen Zellen in einem Mausmodell (Jeha et al., 1996). Dies verdeutlicht, dass eine hohe Stathmin-Expression für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps von Leukämiezellen notwendig ist.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen auf Transkriptionsebene eine Stathmin-Überexpression in 38% der analysierten HCCs. Mit Hilfe von MTAs konnte auf Proteinebene eine positive Korrelation der Stathmin-Expression mit zunehmender Entdifferenzierung der HCCs beobachtet werden. Diese Daten wurden durch eine Studie an 133 Mammakarzi-

men bestätigt; hier wiesen 22% der Tumoren eine signifikante Induktion der Stathmin-Expression auf (Curmi et al., 2000). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen an weiteren Systemen, wie z.B. Teratokarzinomen oder Megakaryozyten, dass die Expression von Stathmin positiv mit der Entdifferenzierung von Zellen korreliert (Doye et al., 1992; Rubin et al., 2003). Dies wird dadurch untermauert, dass die Überexpression von Stathmin im HCC mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (eigene Daten), sowie im Mammakarzinom (Brattsand, 2000) und Lymphomen (Nylander et al., 1995) mit dem Proliferationsmarker PCNA korreliert. Somit ist die Überexpression von Stathmin ein Vorgang, der sowohl in HCCs als auch in nicht-hepatozellulären Systemen zu beobachten ist. Die oftmals dabei auftretende gesteigerte Zellteilungsaktivität korreliert positiv mit der Akkumulation von Stathmin, was mit seiner Funktion in der Mitose vereinbar ist.

Erste Publikationen beschreiben einen möglichen Zusammenhang des Tumorsuppressorgens p53 mit dem Zellzyklusregulator Stathmin (Ahn et al., 1999; Johnsen et al., 2000). Die Expression von p53^{wt} führt zu einer deutlichen Reduktion von Stathmin in Melanomazellen und Mammakarzinomzellen. Diese Ergebnisse bestätigten die hier generierten Daten, wonach Zelllinien mit p53-Aktivitätsverlust, wie z.B. HUH-7 und Hep3B, Stathmin stark exprimieren, wohingegen Zelllinien mit bioaktivem p53^{wt}, wie z.B. MCF-7 und HepG2, nur relativ geringe Mengen an Stathmin aufweisen. Die Expression von p53 in HCCs wurde auch mit Hilfe der MTAs untersucht. Dabei zeigte sich eine zunehmende nukleäre Akkumulation von p53, die sowohl positiv mit der zytoplasmatischen wie auch der nukleären Expression von Stathmin korrelierte. Mutationen im p53 korrelieren beim HCC stark mit dessen zunehmender Entdifferenzierung (Ng et al., 1994). Da p53^{wt} die Stathmin-Expression inhibiert, ist diese Zunahme an mutiertem, *loss of function* p53 möglicherweise eine Voraussetzung für die hohe Expression von Stathmin.

Diese Daten belegen somit die Hypothese, wonach der Selektionsdruck auf das Zellzykluskontrollprotein p53 in der Hepatokarzinogenese zu dessen funktioneller Inaktivierung führen kann. Außer den in der Literatur beschriebenen protumorigenen Effekten nach Mutation von p53, wie z.B. β -Catenin-Akkumulation und relaxierter Kontrolle der Apoptose, kann möglicherweise auch die Aktivierung von Stathmin die Entstehung und Progression von HCCs unterstützen.

Neben p53 wurden noch weitere bekannte Proteine mit Hilfe der MTAs identifiziert, die eine Korrelation zur Stathmin-Expression aufwiesen (Tabelle 7). Die Analyse dieser Genprodukte führt zu einem tieferen Verständnis der molekularen Mechanismen in der Hepatokarzinogenese und bildet die Grundlage zur Generierung weiterer Arbeitshypothesen: Siah-2 ist eine Ubiquitin-Ligase, die für die Markierung und proteosomale Degradation zahlreicher zellulärer Bestandteile diverser Signalwege verantwortlich ist. Es kann, z.B. über die Degradation von TRAF-2, proapoptotisch auf die Zelle wirken (Habelhah et al., 2002). In einer Studie an Mammakarzinomen wurde Siah-2 in der Mehrzahl der untersuchten

Tumoren überexprimiert (Roh et al., 2004). In der Gruppe der HCCs zeigt die nukleäre Expression von Siah-2 eine deutliche Korrelation mit der Entdifferenzierung der Tumoren. Sowohl die zytoplasmatische wie auch die nukleäre Akkumulation von Stathmin korreliert signifikant mit der Expression von Siah-2. Die erhöhte Expression von Siah-2 in den entdifferenzierten HCCs legt nahe, dass dieses Protein in der Hepatokarzinogenese über noch zu klärende Mechanismen die Karzinogenese fördert, so z.B. über die Degradation von proapoptotischen Faktoren. Ein möglicher mechanistischer Zusammenhang zwischen Siah-2 und Stathmin könnte ebenfalls in weiteren Studien untersucht werden.

Nup88 ist Teil des Kernporenkomplexes (Fornerod et al., 1997), der für den Transport von Molekülen in und aus dem Zellkern verantwortlich ist. In verschiedenen Tumorentitäten wird Nup88 überexprimiert vorgefunden (Martinez et al., 1999). Beim Mammakarzinom ist diese Überexpression mit der Expression von mutiertem p53, hoher Proliferation (Ki-67) und Metastasierung korreliert (Agudo et al., 2004). In der Hepatokarzinogenese zeigt die nukleäre Expression von Nup88 deutliche Korrelationen mit der Entdifferenzierung der HCCs, der Expression von Ki-67 und p53 sowie der zytoplasmatischen Expression von Stathmin. Die Tatsache, dass die für das Mammakarzinom gefundenen Korrelationen mit Nup88 nur für dieses Protein, nicht aber für den gesamten Kernporenkomplex zutrifft (Agudo et al., 2004), spricht dafür, dass die veränderte Expression von Nup88 zur Karzinogenese beiträgt und nicht bloß eine Folge dieses Prozesses ist. Die genauen Mechanismen, wie dies erfolgen könnte, sind noch nicht aufgeklärt. Ein möglicher Mechanismus ist der selektive Transport protumorigener Faktoren durch die Kernmembran.

Stathmin korrelierte in den Untersuchungen dieser Arbeit auch im HCC mit der Entdifferenzierung der Tumoren und Proliferation der Tumorzellen. Durch seine zentrale Rolle im Zellzyklus bietet Stathmin einen guten Ansatzpunkt für therapeutische Strategien. Zur Zeit gibt es verschiedene Ansätze, Tumorwachstum über die Regulation der Mikrotubulidynamik zu inhibieren (Jordan und Wilson, 2004). Zum einen werden z.B. mit Vinca-Alkaloiden freie Tubuline gebunden und somit die Synthese der Mikrotubuli verhindert, wodurch die Zellen in der Mitose arretiert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Förderung der Mikrotubulipolymerisation durch die Gabe von z.B. Taxol[®], das durch die Stabilisierung der polaren Mikrotubuli deren Depolymerisation verhindert (Jordan und Wilson, 2004). Alli et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von Stathmin in einer Mammakarzinom-Zelllinie deren Resistenz gegenüber diesen Chemotherapeutika fördert (Alli et al., 2002). Dies könnte erklären, dass bei der Anwendung von Chemotherapeutika mit *antisense*-Molekülen gegen Stathmin bereits additive und sogar synergistische Effekte beobachtet wurden (Iancu et al., 2000). Die *antisense*-Inhibierung alleine resultierte in Abnormalitäten der Mitosespindel, wodurch der Mitose-inhibierende Effekt von Taxol[®] verstärkt werden könnte (Beiche et al., 1998). Insgesamt kommt es durch die Kombinationstherapie zur synergistischen Inhibierung des Zellwachs-

tums, Zunahme der Apoptose und zu einem verringerten Potential der Tumorzellen, Kolonien zu bilden. Die Kombination aus Anti-Stathmin-Therapie und Mikrotubuli-gerichteter Chemotherapie ist besonders attraktiv, da beide Ansätze die gleichen Zielstrukturen in unterschiedlichen Stadien anvisieren. Dadurch wäre dieser therapeutische Ansatz mit geringerer Toxizität assoziiert, wie sie aus den Ansätzen mit multiplen chemotherapeutischen Substanzen mit überlappenden Toxizitätsprofilen resultiert. Eine weitere Möglichkeit einer pharmakologischen Intervention wäre der Einsatz niedermolekularer Inhibitoren, die direkt die Bindung von Tubulin-Monomeren an Stathmin unterbinden (Mistry und Atweh, 2002). Die bisher publizierten Studien, wie auch die vorliegende Arbeit, haben insgesamt gezeigt, dass Stathmin eine exzellente Zielstruktur für eine Krebstherapie darstellt. Weitere Studien sind allerdings notwendig, bevor diese Beobachtungen in eine effektive Therapie für humane Tumorerkrankungen umgesetzt werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., H. Schwartz und R. Kemler. **1996**. "Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function." *J Cell Biochem* 61(4): 514-23.
- Agudo, D., F. Gomez-Esquer, F. Martinez-Arribas, M. J. Nunez-Villar, M. Pollan und J. Schneider. **2004**. "Nup88 mRNA overexpression is associated with high aggressiveness of breast cancer." *Int J Cancer* 109(5): 717-20.
- Aguilar, F., S. P. Hussain und P. Cerutti. **1993**. "Aflatoxin B1 induces the transversion of G->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8586-90.
- Ahn, J., M. Murphy, S. Kratowicz, A. Wang, A. J. Levine und D. L. George. **1999**. "Down-regulation of the stathmin/Op18 and FKBP25 genes following p53 induction." *Oncogene* 18(43): 5954-8.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, Jr., L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, L. M. Staudt und et al. **2000**. "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature* 403(6769): 503-11.
- Alizadeh, A. A., D. T. Ross, C. M. Perou und M. van de Rijn. **2001**. "Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns." *J Pathol* 195(1): 41-52.
- Alli, E., J. Bash-Babula, J. M. Yang und W. N. Hait. **2002**. "Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer." *Cancer Res* 62(23): 6864-9.
- Amayed, P., D. Pantaloni und M. F. Carlier. **2002**. "The effect of stathmin phosphorylation on microtubule assembly depends on tubulin critical concentration." *J Biol Chem* 277(25): 22718-24.
- Arima, N., C. Y. Kao, T. Licht, R. Padmanabhan, Y. Sasaguri und R. Padmanabhan. **2001**. "Modulation of cell growth by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A." *J Biol Chem* 276(16): 12675-84.
- Bae, S. H., E. S. Jung, Y. M. Park, B. S. Kim, B. K. Kim, D. G. Kim und W. S. Ryu. **2001**. "Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398." *Clin Cancer Res* 7(5): 1410-8.

- Beasley, R. P. und L. Y. Hwang (1984). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. G. N. Vyas, J. L. Dienstag und J. H. Hoofnagle. New York, Grune and Stratton, Inc. 209-224.
- Becker, N. und J. Wahrendorf (1998). *Atlas of cancer mortality in the Federal Republic of Germany*. Berlin, Springer. 190-218.
- Beiche, I., S. Lachkar, V. Becette, C. Diaz-Cifuentes, A. Sobel, R. Lidereau und P. Curmi. **1998**. "Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer." *Br J Cancer* 78: 701-709.
- Belmont, L. D. und T. J. Mitchison. **1996**. "Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules." *Cell* 84(4): 623-31.
- Benn, J., F. Su, M. Doria und R. J. Schneider. **1996**. "Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases." *J Virol* 70(8): 4978-85.
- Benvegna, L., G. Fattovich, F. Noventa, F. Tremolada, L. Chemello, A. Cecchetto und A. Alberti. **1994**. "Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study." *Cancer* 74(9): 2442-8.
- Beretta, L., T. Dobransky und A. Sobel. **1993**. "Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2." *J Biol Chem* 268(27): 20076-84.
- Bieche, I., S. Lachkar, V. Becette, C. Cifuentes-Diaz, A. Sobel, R. Lidereau und P. A. Curmi. **1998**. "Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer." *Br J Cancer* 78(6): 701-9.
- Bittner, M., P. Meltzer, Y. Chen, Y. Jiang, E. Seftor, M. Hendrix, M. Radmacher, R. Simon, Z. Yakhini, A. Ben-Dor, N. Sampas, E. Dougherty, E. Wang, F. Marincola, C. Gooden, J. Lueders, A. Glatfelter, P. Pollock, J. Carpten, E. Gillanders, D. Leja, K. Dietrich, C. Beaudry, M. Berens, D. Alberts und V. Sondak. **2000**. "Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling." *Nature* 406(6795): 536-40.
- Bosch, F. X. (1997). *Global epidemiology of hepatocellular carcinoma*. Liver Cancer. K. Okuda und E. Tabor. New York, Churchill Livingstone. 13-28.
- Brattsand, G. **2000**. "Correlation of oncoprotein 18/stathmin expression in human breast cancer with established prognostic factors." *Br J Cancer* 83(3): 311-8.
- Braulke, T. **1999**. "Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein." *Horm Metab Res* 31(2-3): 242-6.
- Brucet, M., L. Marques, C. Sebastian, J. Lloberas und A. Celada. **2004**. "Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1." *Genes Immun* 5(1): 26-35.

- Buendia, M. A. **2000**. "Genetics of hepatocellular carcinoma." *Semin Cancer Biol* 10(3): 185-200.
- Butler, L. M., X. Zhou, W. S. Xu, H. I. Scher, R. A. Rifkind, P. A. Marks und V. M. Richon. **2002**. "The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11700-5.
- Cadwell, C. und G. P. Zambetti. **2001**. "The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth." *Gene* 277(1-2): 15-30.
- Cariani, E., C. Lasserre, D. Seurin, B. Hamelin, F. Kemeny, D. Franco, M. P. Czech, A. Ullrich und C. Brechot. **1988**. "Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis." *Cancer Res* 48(23): 6844-9.
- Caselmann, W. H., M. Meyer, A. S. Kekule, U. Lauer, P. H. Hofschneider und R. Koshy. **1990**. "A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(8): 2970-4.
- Cassimeris, L. **2002**. "The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers." *Curr Opin Cell Biol* 14(1): 18-24.
- Chau, B. N. und J. Y. Wang. **2003**. "Coordinated regulation of life and death by RB." *Nat Rev Cancer* 3(2): 130-8.
- Chen, W., X. Fu und Z. Sheng. **2002a**. "Review of current progress in the structure and function of Smad proteins." *Chin Med J* 115(3): 446-450.
- Chen, X., S. T. Cheung, S. So, S. T. Fan, C. Barry, J. Higgins, K. M. Lai, J. Ji, S. Dudoit, I. O. Ng, M. Van De Rijn, D. Botstein und P. O. Brown. **2002b**. "Gene expression patterns in human liver cancers." *Mol Biol Cell* 13(6): 1929-39.
- Chen, X., J. Higgins, S. T. Cheung, R. Li, V. Mason, K. Montgomery, S. T. Fan, M. Rijn Mv und S. So. **2004**. "Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma." *Mod Pathol*.
- Choi, Y. L., S. H. Park, J. J. Jang und C. K. Park. **2001**. "Expression of the G1-S modulators in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: association of cyclin D1 and p53 proteins with the progression of hepatocellular carcinoma." *J Korean Med Sci* 16(4): 424-32.
- Clemmons, D. R. **1997**. "Insulin-like Growth Factor Binding Proteins and their Role in Controlling IGF Actions." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(1): 45-62.
- Clevers, H. und M. van de Wetering. **1997**. "TCF/LEF factor earn their wings." *Trends Genet* 13(12): 485-9.

- Curmi, P. A., S. S. Andersen, S. Lachkar, O. Gavet, E. Karsenti, M. Knossow und A. Sobel. **1997**. "The stathmin/tubulin interaction in vitro." *J Biol Chem* 272(40): 25029-36.
- Curmi, P. A., C. Nogues, S. Lachkar, N. Carelle, M. P. Gonthier, A. Sobel, R. Lidereau und I. Bieche. **2000**. "Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours." *Br J Cancer* 82(1): 142-50.
- de La Coste, A., B. Romagnolo, P. Billuart, C. A. Renard, M. A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, J. Chelly, C. Beldjord, A. Kahn und C. Perret. **1998**. "Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8847-51.
- De Souza, A. T., G. R. Hankins, M. K. Washington, T. C. Orton und R. L. Jirtle. **1995**. "M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity." *Nat Genet* 11(4): 447-9.
- Dejean, A., L. Bougueleret, K. H. Grzeschik und P. Tiollais. **1986**. "Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma." *Nature* 322(6074): 70-2.
- Delpuech, O., J. B. Trabut, F. Carnot, J. Feuillard, C. Brechot und D. Kremsdorf. **2002**. "Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma." *Oncogene* 21(18): 2926-37.
- Dempke, W., C. Rie, A. Grothey und H. J. Schmolli. **2001**. "Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?" *J Cancer Res Clin Oncol* 127(7): 411-7.
- Deuffic, S., T. Poynard, L. Buffat und A. J. Valleron. **1998**. "Trends in primary liver cancer." *Lancet* 351(9097): 214-5.
- Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, D. Ghosh, R. Shah, S. Varambally, K. Kurachi, K. J. Pienta, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan. **2001**. "Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer." *Nature* 412(6849): 822-6.
- Doye, V., O. Kellermann, M. H. Buc-Caron und A. Sobel. **1992**. "High expression of stathmin in multipotential teratocarcinoma and normal embryonic cells versus their early differentiated derivatives." *Differentiation* 50(2): 89-96.
- Duguay, S. J. **1999**. "Post-translational processing of insulin-like growth factors." *Horm Metab Res* 31(2-3): 43-9.
- Dupont, J., A. Pierre, P. Froment und C. Moreau. **2003**. "The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression." *Horm Metab Res* 35(11-12): 740-50.
- Dürr, R. und W. H. Caselmann. **2000**. "Carcinogenesis of primary liver malignancies." *Langenbecks Arch Surg* 385(3): 154-61.
- Eisen, M. B. und P. O. Brown. **1999**. "DNA arrays for analysis of gene expression." *Methods Enzymol* 303: 179-205.

- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown und D. Botstein. **1998**. "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14863-8.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein. **1983**. "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts." *Nature* 301(5895): 89-92.
- Feitelson, M. A. **1998**. "Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5(4): 367-74.
- Feitelson, M. A. **1999**. "Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis." *J Cell Physiol* 181(2): 188-202.
- Feitelson, M. A., B. Sun, N. L. Satiroglu Tufan, J. Liu, J. Pan und Z. Lian. **2002**. "Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis." *Oncogene* 21(16): 2593-604.
- Feo, F., R. M. Pascale, M. M. Simile, M. R. De Miglio, M. R. Muroli und D. Calvisi. **2000**. "Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies." *Crit Rev Oncog* 11(1): 19-62.
- Fornerod, M., J. van Deursen, S. van Baal, A. Reynolds, D. Davis, K. G. Murli, J. Fransen und G. Grosveld. **1997**. "The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88." *Embo J* 16(4): 807-16.
- Fosslien, E. **2000**. "Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia." *Ann Clin Lab Sci* 30(1): 3-21.
- Friedrich, B., H. Gronberg, M. Landstrom, M. Gullberg und A. Bergh. **1995**. "Differentiation-stage specific expression of oncoprotein 18 in human and rat prostatic adenocarcinoma." *Prostate* 27(2): 102-9.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert und T. P. Dryja. **1986**. "A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma." *Nature* 323(6089): 643-6.
- Fukuzawa, K., K. Takahashi, K. Furuta, T. Tagaya, T. Ishikawa, K. Wada, Y. Omoto, T. Koji und S. Kakumu. **2001**. "Expression of fas/fas ligand (fasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC)." *J Gastroenterol* 36(10): 681-8.
- Garber, M. E., O. G. Troyanskaya, K. Schluens, S. Petersen, Z. Thaesler, M. Pacyna-Gengelbach, M. van De Rijn, G. D. Rosen, C. M. Perou, R. I. Whyte, R. B. Altman, P. O. Brown, D. Botstein und I. Petersen. **2001**. "Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung." *Proc Natl Acad Sci U S A* 13: 13.
- Ghosh, A. K., M. Majumder, R. Steele, K. Meyer, R. Ray und R. B. Ray. **2000**. "Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death." *Virus Res* 67(2): 173-8.

- Ghosh, P. K., J. Anderson, N. Cohen, K. Takeshita, G. F. Atweh und P. Lebowitz. **1993**. "Expression of the leukemia-associated gene, p18, in normal and malignant tissues; inactivation of expression in a patient with cleaved B cell lymphoma/leukemia." *Oncogene* 8(10): 2869-72.
- Goldenberg, D., S. Ayesh, T. Schneider, O. Pappo, O. Jurim, A. Eid, Y. Fellig, T. Dadon, I. Ariel, N. de Groot, A. Hochberg und E. Galun. **2002**. "Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays." *Mol Carcinog* 33(2): 113-24.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield und E. S. Lander. **1999**. "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." *Science* 286(5439): 531-7.
- Gonzalzo, M. L. und P. A. Jones. **1997**. "Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation." *Mutat Res* 386(2): 107-18.
- Graef, E., W. H. Caselmann, J. Wells und R. Koshy. **1994**. "Insertional activation of mevalonate kinase by hepatitis B virus DNA in a human hepatoma cell line." *Oncogene* 9(1): 81-7.
- Gray, S. G., S. Kytola, W. O. Lui, C. Larsson und T. J. Ekstrom. **2000**. "Modulating IGFBP-3 expression by trichostatin A: potential therapeutic role in the treatment of hepatocellular carcinoma." *Int J Mol Med* 5(1): 33-41.
- Gray, S. G., T. Yakovleva, W. Hartmann, M. Tally, G. Bakalkin und T. J. Ekstrom. **1999**. "IGF-II enhances trichostatin A-induced TGFbeta1 and p21(Waf1,Cip1, sdi1) expression in Hep3B cells." *Exp Cell Res* 253(2): 618-28.
- Habelhah, H., I. J. Frew, A. Laine, P. W. Janes, F. Relaix, D. Sassoon, D. D. Bowtell und Z. Ronai. **2002**. "Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2." *Embo J* 21(21): 5756-65.
- Hanafusa, T., Y. Yumoto, K. Nouse, H. Nakatsukasa, T. Onishi, T. Fujikawa, M. Taniyama, S. Nakamura, M. Uemura, Y. Takuma, E. Yumoto, T. Higashi und T. Tsuji. **2002**. "Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma." *Cancer Lett* 176(2): 149-58.
- Hayashi, H., K. Sugio, T. Matsumata, E. Adachi, K. Takenaka und K. Sugimachi. **1995**. "The clinical significance of p53 gene mutation in hepatocellular carcinomas from Japan." *Hepatology* 22(6): 1702-7.
- Hayashi, J., H. Aoki, K. Kajino, M. Moriyama, Y. Arakawa und O. Hino. **2000**. "Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha." *Hepatology* 32(5): 958-61.

- Heinze, T., S. Jonas, A. Karsten und P. Neuhaus. **1999**. "Determination of the oncogenes p53 and C-erb B2 in the tumour cytosols of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and correlation to survival time." *Anticancer Res* 19(4A): 2501-3.
- Holthuizen, P., F. M. van der Lee, K. Ikejiri, M. Yamamoto und J. S. Sussenbach. **1990**. "Identification and initial characterization of a fourth leader exon and promoter of the human IGF-II gene." *Biochim Biophys Acta* 1087(3): 341-3.
- Howell, B., N. Larsson, M. Gullberg und L. Cassimeris. **1999**. "Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin." *Mol Biol Cell* 10(1): 105-18.
- Iancu, C., S. J. Mistry, S. Arkin und G. F. Atweh. **2000**. "Taxol and anti-stathmin therapy: a synergistic combination that targets the mitotic spindle." *Cancer Res* 60(13): 3537-41.
- Iizuka, N., M. Oka, H. Yamada-Okabe, N. Mori, T. Tamesa, T. Okada, N. Takemoto, A. Tangoku, K. Hamada, H. Nakayama, T. Miyamoto, S. Uchimura und Y. Hamamoto. **2002**. "Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method." *Cancer Res* 62(14): 3939-44.
- Ikedo, K., S. Saitoh, I. Koida, Y. Arase, A. Tsubota, K. Chayama, H. Kumada und M. Kawanishi. **1993**. "A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis." *Hepatology* 18(1): 47-53.
- Ilvesmaki, V., M. Jaattela, E. Saksela und R. Voutilainen. **1993**. "Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin-like growth factor II gene expression in human fetal adrenal cell cultures." *Mol Cell Endocrinol* 91(1-2): 59-65.
- Ishak, K., Z. D. Goodman und J. T. Stocker (2001). Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts, Armed Forces Institute of Pathology, Washington. 356.
- Itoh, T., T. Shiro, T. Seki, T. Nakagawa, M. Wakabayashi, K. Inoue und A. Okamura. **2000**. "Relationship between p53 overexpression and the proliferative activity in hepatocellular carcinoma." *Int J Mol Med* 6(2): 137-42.
- Jeha, S., X. N. Luo, M. Beran, H. Kantarjian und G. F. Atweh. **1996**. "Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cells." *Cancer Res* 56(6): 1445-50.
- Johnsen, J. I., O. N. Aurelio, Z. Kwaja, G. E. Jorgensen, N. S. Pellegata, R. Plattner, E. J. Stanbridge und J. F. Cajot. **2000**. "p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest." *Int J Cancer* 88(5): 685-91.
- Joo, M., Y. K. Kang, M. R. Kim, H. K. Lee und J. J. Jang. **2001**. "Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma." *Liver* 21(2): 89-95.

- Jordan, M. A. und L. Wilson. **2004**. "Microtubules as a target for anticancer drugs." *Nat Rev Cancer* 4(4): 253-65.
- Jourdain, L., P. Curmi, A. Sobel, D. Pantaloni und M. F. Carlier. **1997**. "Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules." *Biochemistry* 36(36): 10817-21.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J. W. Gray, F. Waldman und D. Pinkel. **1992**. "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." *Science* 258(5083): 818-21.
- Kato, N., K. H. Lan, S. K. Ono-Nita, Y. Shiratori und M. Omata. **1997**. "Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator." *J Virol* 71(11): 8856-9.
- Kawate, S., S. Takenoshita, S. Ohwada, A. Mogi, T. Fukusato, F. Makita, H. Kuwano und Y. Morishita. **1999**. "Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma." *Int J Oncol* 14(1): 127-31.
- Kekule, A. S., U. Lauer, M. Meyer, W. H. Caselmann, P. H. Hofschneider und R. Koshy. **1990**. "The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator." *Nature* 343(6257): 457-61.
- Kekule, A. S., U. Lauer, L. Weiss, B. Lubber und P. H. Hofschneider. **1993**. "Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway." *Nature* 361(6414): 742-5.
- Kern, M. A., K. Breuhahn und P. Schirmacher. **2002a**. "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma." *Adv Cancer Res* 86: 67-112.
- Kern, M. A., D. Schubert, D. Sahi, M. M. Schoneweiss, I. Moll, A. M. Haugg, H. P. Dienes, K. Breuhahn und P. Schirmacher. **2002b**. "Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells." *Hepatology* 36(4 Pt 1): 885-94.
- Kew, M. C. und H. Popper. **1984**. "Relationship between hepatocellular carcinoma and cirrhosis." *Semin Liver Dis* 4(2): 136-46.
- Kim, J. W. und X. W. Wang. **2003**. "Gene expression profiling of preneoplastic liver disease and liver cancer: a new era for improved early detection and treatment of these deadly diseases?" *Carcinogenesis* 24(3): 363-9.
- Kim, J. W., Q. Ye, M. Fargues, Y. Chen, A. Budhu, J. Sime, L. J. Hofseth, R. Kaul und X. W. Wang. **2004**. "Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis." *Hepatology* 39(2): 518-27.
- Koga, H., S. Sakisaka, M. Ohishi, T. Kawaguchi, E. Taniguchi, K. Sasatomi, M. Harada, T. Kusaba, M. Tanaka, R. Kimura, Y. Nakashima, O. Nakashima, M. Kojiro, T. Kurohiji

- und M. Sata. **1999**. "Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation." *Hepatology* 29(3): 688-96.
- Kondoh, N., T. Wakatsuki, A. Hada, M. Shuda, K. Tanaka, M. Arai und M. Yamamoto. **2001**. "Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis." *Int J Oncol* 18(6): 1271-8.
- Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter und O. P. Kallioniemi. **1998**. "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." *Nat Med* 4(7): 844-7.
- Kubicka, S., K. L. Rudolph, M. Hanke, M. K. Tietze, H. L. Tillmann, C. Trautwein und M. Manns. **2000**. "Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area." *Liver* 20(4): 312-8.
- Lan, K. H., M. L. Sheu, S. J. Hwang, S. H. Yen, S. Y. Chen, J. C. Wu, Y. J. Wang, N. Kato, M. Omata, F. Y. Chang und S. D. Lee. **2002**. "HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis." *Oncogene* 21(31): 4801-11.
- Lau, W. Y., P. B. Lai, M. F. Leung, B. C. Leung, N. Wong, G. Chen, T. W. Leung und C. T. Liew. **2000**. "Differential gene expression of hepatocellular carcinoma using cDNA microarray analysis." *Oncol Res* 12(2): 59-69.
- Laurent-Puig, P., P. Legoix, O. Bluteau, J. Belghiti, D. Franco, F. Binot, G. Monges, G. Thomas, P. Bioulac-Sage und J. Zucman-Rossi. **2001**. "Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis." *Gastroenterology* 120(7): 1763-73.
- Lee, D., S. W. Choi, M. Kim, J. H. Park, J. Kim und I. B. Lee. **2003**. "Discovery of differentially expressed genes related to histological subtype of hepatocellular carcinoma." *Biotechnol Prog* 19(3): 1011-5.
- Lee, Y. H. und Y. Yun. **1998**. "HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling." *J Biol Chem* 273(39): 25510-5.
- Levine, A. J., J. Momand und C. A. Finlay. **1991**. "The p53 tumour suppressor gene." *Nature* 351(6326): 453-6.
- Li, X., Z. Nong, C. Ekstrom, E. Larsson, H. Nordlinder, W. J. Hofmann, C. Trautwein, M. Odenthal, H. P. Dienes, T. J. Ekstrom und P. Schirmacher. **1997**. "Disrupted IGF2 promoter control by silencing of promoter P1 in human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 57(10): 2048-54.
- Li, Y., R. Tang, H. Xu, M. Qiu, Q. Chen, J. Chen, Z. Fu, K. Ying, Y. Xie und Y. Mao. **2002**. "Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays." *J Cancer Res Clin Oncol* 128(7): 369-79.

- Liu, J., J. Stevens, C. A. Rote, H. J. Yost, Y. Hu, K. L. Neufeld, R. L. White und N. Matsunami. **2001**. "Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein." *Mol Cell* 7(5): 927-36.
- Lu, R., P. A. Moore und P. M. Pitha. **2002**. "Stimulation of IRF-7 gene expression by tumor necrosis factor alpha: requirement for NFkappa B transcription factor and gene accessibility." *J Biol Chem* 277(19): 16592-8.
- Major, M. E. und S. M. Feinstone. **1997**. "The molecular virology of hepatitis C." *Hepatology* 25(6): 1527-38.
- Marchio, A., M. Meddeb, P. Pineau, G. Danglot, P. Tiollais, A. Bernheim und A. Dejean. **1997**. "Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization." *Genes Chromosomes Cancer* 18(1): 59-65.
- Marklund, U., G. Brattsand, O. Osterman, P. I. Ohlsson und M. Gullberg. **1993**. "Multiple signal transduction pathways induce phosphorylation of serines 16, 25, and 38 of oncoprotein 18 in T lymphocytes." *J Biol Chem* 268(34): 25671-80.
- Marklund, U., N. Larsson, H. M. Gradin, G. Brattsand und M. Gullberg. **1996**. "Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics." *Embo J* 15(19): 5290-8.
- Martin, D. M., R. O. Carlson und E. L. Feldman. **1993**. "Interferon-gamma inhibits DNA synthesis and insulin-like growth factor-II expression in human neuroblastoma cells." *J Neurosci Res* 34(5): 489-501.
- Martinez, N., A. Alonso, M. D. Moragues, J. Ponton und J. Schneider. **1999**. "The nuclear pore complex protein Nup88 is overexpressed in tumor cells." *Cancer Res* 59(21): 5408-11.
- Matsubara, K. und T. Tokino. **1990**. "Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis." *Mol Biol Med* 7: 243-260.
- Matsuo, R., H. Ogata, H. Tsuji, T. Kitazono, M. Shimada, K. Taguchi und M. Fujishima. **2001**. "Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma--a case report." *Hepatogastroenterology* 48(42): 1740-2.
- Matsuzawa, S. I. und J. C. Reed. **2001**. "Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses." *Mol Cell* 7(5): 915-26.
- Meraro, D., M. Gleit-Kielmanowicz, H. Hauser und B. Z. Levi. **2002**. "IFN-stimulated gene 15 is synergistically activated through interactions between the myelocyte/lymphocyte-specific transcription factors, PU.1, IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein, and IFN regulatory factor-4: characterization of a new subtype of IFN-stimulated response element." *J Immunol* 168(12): 6224-31.
- Miki, R., K. Kadota, H. Bono, Y. Mizuno, Y. Tomaru, P. Carninci, M. Itoh, K. Shibata, J. Kawai, H. Konno, S. Watanabe, K. Sato, Y. Tokusumi, N. Kikuchi, Y. Ishii, Y.

- Hamaguchi, I. I. Nishizuka, H. Goto, H. Nitanda, S. Satomi, A. Yoshiki, M. Kusakabe, J. L. DeRisi, M. B. Eisen, V. R. Iyer, P. O. Brown, M. Muramatsu, H. Shimada, Y. Okazaki und Y. Hayashizaki. **2001**. "Delineating developmental and metabolic pathways in vivo by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2199-2204.
- Mistry, S. J. und G. F. Atweh. **2002**. "Role of stathmin in the regulation of the mitotic spindle: potential applications in cancer therapy." *Mt Sinai J Med* 69(5): 299-304.
- Miyoshi, Y., K. Iwao, Y. Nagasawa, T. Aihara, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano und Y. Nakamura. **1998**. "Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3." *Cancer Res* 58(12): 2524-7.
- Moinzadeh, P., K. Breuhahn, H. Stützer und P. Schirmacher. **2004**. "Genomic imbalances in human hepatocellular carcinoma correlate with etiology and histological grading - results of an explorative metaanalysis of CGH-data." (*in press*).
- Morgenbesser, S. D., B. O. Williams, T. Jacks und R. A. DePinho. **1994**. "p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens." *Nature* 371(6492): 72-4.
- Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura und K. Koike. **1998**. "The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice." *Nat Med* 4(9): 1065-7.
- Murphy, L. J. **1998**. "Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy?" *J Mol Endocrinol* 21(2): 97-107.
- Neo, S. Y., C. K. Leow, V. B. Vega, P. M. Long, A. F. Islam, P. B. Lai, E. T. Liu und E. C. Ren. **2004**. "Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach." *Hepatology* 39(4): 944-53.
- Ng, I. O., E. C. Lai, S. T. Fan, M. M. Ng und M. K. So. **1995**. "Prognostic significance of pathologic features of hepatocellular carcinoma. A multivariate analysis of 278 patients." *Cancer* 76(12): 2443-8.
- Ng, I. O., G. Srivastava, L. P. Chung, S. W. Tsang und M. M. Ng. **1994**. "Overexpression and point mutations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese people." *Cancer* 74(1): 30-7.
- Nielsen, F. C. und J. Christiansen. **1995**. "Posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor II mRNA." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 220: 37-46.
- Niketeghad, F., H. J. Decker, W. H. Caselmann, P. Lund, F. Geissler, H. P. Dienes und P. Schirmacher. **2001**. "Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis." *Br J Cancer* 85(5): 697-704.

- Nishida, N., Y. Fukuda, H. Kokuryu, J. Toguchida, D. W. Yandell, M. Ikenaga, H. Imura und K. Ishizaki. **1993**. "Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 53(2): 368-72.
- Nishida, N., Y. Fukuda, T. Komeda, R. Kita, T. Sando, M. Furukawa, M. Amenomori, I. Shibagaki, K. Nakao, M. Ikenaga und et al. **1994**. "Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 54(12): 3107-10.
- Nita, M. E., V. A. Alves, F. J. Carrilho, S. K. Ono-Nita, E. S. Mello und J. J. Gama-Rodrigues. **2002**. "Molecular aspects of hepatic carcinogenesis." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44(1): 39-48.
- Nocito, A., L. Bubendorf, E. Maria Tinner, K. Suess, U. Wagner, T. Forster, J. Kononen, A. Fijan, J. Bruderer, U. Schmid, D. Ackermann, R. Maurer, G. Alund, H. Knonagel, M. Rist, M. Anabitarte, F. Hering, T. Hardmeier, A. J. Schoenenberger, R. Flury, P. Jager, J. Luc Fehr, P. Schraml, H. Moch, M. J. Mihatsch, T. Gasser und G. Sauter. **2001**. "Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade." *J Pathol* 194(3): 349-57.
- Nylander, K., U. Marklund, G. Brattsand, M. Gullberg und G. Roos. **1995**. "Immunohistochemical detection of oncoprotein 18 (Op18) in malignant lymphomas." *Histochem J* 27(2): 155-60.
- Okabe, H., S. Satoh, T. Kato, O. Kitahara, R. Yanagawa, Y. Yamaoka, T. Tsunoda, Y. Furukawa und Y. Nakamura. **2001**. "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* 61(5): 2129-37.
- Okazaki, T., T. Himi, C. Peterson und N. Mori. **1993**. "Induction of stathmin mRNA during liver regeneration." *FEBS Lett* 336(1): 8-12.
- Okuda, K. **1992**. "Hepatocellular carcinoma: recent progress." *Hepatology* 15(5): 948-63.
- Okuda, K. **2000**. "Hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* 32(1 Suppl): 225-37.
- Ozturk, M. **1999**. "Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis." *Semin Liver Dis* 19(3): 235-42.
- Park, U. S., S. K. Park, Y. I. Lee und J. G. Park. **2000**. "Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1 to S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells." *Oncogene* 19: 3384-94.
- Perou, C. M., S. S. Jeffrey, M. van de Rijn, C. A. Rees, M. B. Eisen, D. T. Ross, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. X. Zhu, J. C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, P. O. Brown und D. Botstein. **1999**. "Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9212-7.

- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown und D. Botstein. **2000**. "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406(6797): 747-52.
- Price, D. K., J. R. Ball, Z. Bahrani-Mostafavi, J. C. Vachris, J. S. Kaufman, R. W. Naumann, R. V. Higgins und J. B. Hall. **2000**. "The phosphoprotein Op18/stathmin is differentially expressed in ovarian cancer." *Cancer Invest* 18(8): 722-30.
- Qiu, S. J., S. L. Ye, Z. Q. Wu, Z. Y. Tang und Y. K. Liu. **1998**. "The expression of the mdm2 gene may be related to the aberration of the p53 gene in human hepatocellular carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* 124(5): 253-8.
- Rajah, R., B. Valentinis und P. Cohen. **1997**. "Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism." *J Biol Chem* 272(18): 12181-8.
- Rasmussen, U. B., C. Wolf, M. G. Mattei, M. P. Chenard, J. P. Bellocq, P. Chambon, M. C. Rio und P. Basset. **1993**. "Identification of a new interferon-alpha-inducible gene (p27) on human chromosome 14q32 and its expression in breast carcinoma." *Cancer Res* 53(17): 4096-101.
- Ray, R. B., K. Meyer und R. Ray. **2000**. "Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes." *Virology* 271(1): 197-204.
- Ray, R. B., R. Steele, K. Meyer und R. Ray. **1997**. "Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein." *J Biol Chem* 272(17): 10983-6.
- Rechler, M. M. und D. R. Clemmons. **1998**. "Regulatory actions of insulin-like growth factor binding proteins." *Trends Endocrinol Metabol* 9: 176-183.
- Roh, M. S., S. H. Hong, J. S. Jeong, H. C. Kwon, M. C. Kim, S. H. Cho, J. H. Yoon und T. H. Hwang. **2004**. "Gene expression profiling of breast cancers with emphasis of beta-catenin regulation." *J Korean Med Sci* 19(2): 275-82.
- Roos, G., G. Brattsand, G. Landberg, U. Marklund und M. Gullberg. **1993**. "Expression of oncoprotein 18 in human leukemias and lymphomas." *Leukemia* 7(10): 1538-46.
- Rubin, C. I., D. L. French und G. F. Atweh. **2003**. "Stathmin expression and megakaryocyte differentiation: a potential role in polyploidy." *Exp Hematol* 31(5): 389-97.
- Rubin, M. A., R. Dunn, M. Strawderman und K. J. Pienta. **2002**. "Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis." *Am J Surg Pathol* 26(3): 312-9.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanceau, J., D. D. Boyd, M. Seiki und B. Bauvois. **2002**. "Interferons inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B." *J Biol Chem* 277(38): 35766-75.
- Satoh, S., Y. Daigo, Y. Furukawa, T. Kato, N. Miwa, T. Nishiwaki, T. Kawasoe, H. Ishiguro, M. Fujita, T. Tokino, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano, Y. Yamaoka und Y. Nakamura. **2000**. "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." *Nat Genet* 24(3): 245-50.
- Scharf, J. G. und T. Braulke. **2003**. "The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis." *Horm Metab Res* 35(11-12): 685-93.
- Scharf, J. G., F. Dombrowski und G. Ramadori. **2001**. "The IGF axis and hepatocarcinogenesis." *Mol Pathol* 54(3): 138-44.
- Scharf, J. G., G. Ramadori und F. Dombrowski. **2000**. "Analysis of the IGF axis in preneoplastic hepatic foci and hepatocellular neoplasms developing after low-number pancreatic islet transplantation into the livers of streptozotocin diabetic rats." *Lab Invest* 80(9): 1399-411.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis und P. O. Brown. **1995**. "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* 270(5235): 467-70.
- Schirmacher, P., W. A. Held, D. Yang, L. Biempica und C. E. Rogler. **1991**. "Selective amplification of periportal transitional cells precedes formation of hepatocellular carcinoma in SV40 large tag transgenic mice." *Am J Pathol* 139(1): 231-41.
- Schirmacher, P., W. A. Held, D. Yang, F. V. Chisari, Y. Rustum und C. E. Rogler. **1992**. "Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth." *Cancer Res* 52(9): 2549-56.
- Schirmacher, P., H. Wang, G. Stahnke, H. Will und C. E. Rogler. **1995**. "Sequences and structures at hepadnaviral integration: recombination sites implicate topoisomerase I in hepadnaviral DNA rearrangements and integration." *J Hepatol* 22(1 Suppl): 21-33.
- Schöninger-Hekele, M., C. Müller, M. Kutilek, C. Oesterreicher, P. Ferenci und A. Gangl. **2001**. "Hepatocellular carcinoma in Central Europe: prognostic features and survival." *Gut* 48: 103-109.
- Schulze, A. und J. Downward. **2001**. "Navigating gene expression using microarrays--a technology review." *Nat Cell Biol* 3(8): E190-5.
- Sciaccia, L., A. Costantino, G. Pandini, R. Mineo, F. Frasca, P. Scalia, P. Sbraccia, I. D. Goldfine, R. Vigneri und A. Belfiore. **1999**. "Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism." *Oncogene* 18(15): 2471-9.

- Shergill, I. S., N. K. Shergill, M. Arya und H. R. Patel. **2004**. "Tissue microarrays: a current medical research tool." *Curr Med Res Opin* 20(5): 707-12.
- Shiff, S. J. und B. Rigas. **1997**. "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions." *Gastroenterology* 113(6): 1992-8.
- Shirai, Y., S. Kawata, N. Ito, S. Tamura, K. Takaishi, S. Kiso, H. Tsushima und Y. Matsuzawa. **1992**. "Elevated levels of plasma transforming growth factor-beta in patients with hepatocellular carcinoma." *Jpn J Cancer Res* 83(7): 676-9.
- Shirota, Y., S. Kaneko, M. Honda, H. F. Kawai und K. Kobayashi. **2001**. "Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays." *Hepatology* 33(4): 832-40.
- Sigal, A. und V. Rotter. **2000**. "Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome." *Cancer Res* 60(24): 6788-93.
- Slee, E. A., D. J. O'Connor und X. Lu. **2004**. "To die or not to die: how does p53 decide?" *Oncogene* 23(16): 2809-18.
- Smith, M. W., Z. N. Yue, G. K. Geiss, N. Y. Sadovnikova, V. S. Carter, L. Boix, C. A. Lazaro, G. B. Rosenberg, R. E. Bumgarner, N. Fausto, J. Bruix und M. G. Katze. **2003**. "Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 63(4): 859-64.
- Sobel, A. **1991**. "Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction?" *Trends Biochem Sci* 16(8): 301-5.
- Sohda, T., K. Yun, K. Iwata, H. Soejima und M. Okumura. **1996**. "Increased expression of insulin-like growth factor 2 in hepatocellular carcinoma is primarily regulated at the transcriptional level." *Lab Invest* 75(3): 307-11.
- Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Dohner, T. Cremer und P. Lichter. **1997**. "Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances." *Genes Chromosomes Cancer* 20(4): 399-407.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lonning, P. O. Brown, A. L. Borresen-Dale und D. Botstein. **2003**. "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8418-23.
- Spector, S. A., E. T. Olson, A. A. Gumbs, H. Friess, M. W. Buchler und N. E. Seymour. **1999**. "Human insulin receptor and insulin signaling proteins in hepatic disease." *J Surg Res* 83(1): 32-5.

- Susini, L., B. J. Passer, N. Amzallag-Elbaz, T. Juven-Gershon, S. Prieur, N. Privat, M. Tuynder, M. C. Gendron, A. Isreal, R. Amson, M. Oren und A. Telerman. **2001**. "Siah-1 binds and regulates the function of Numb." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15067-72.
- Symonds, H., L. Krall, L. Remington, M. Saenz-Robles, S. Lowe, T. Jacks und T. Van Dyke. **1994**. "p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo." *Cell* 78(4): 703-11.
- Tackels-Horne, D., M. D. Goodman, A. J. Williams, D. J. Wilson, T. Eskandari, L. M. Vogt, J. F. Boland, U. Scherf und J. G. Vockley. **2001**. "Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling." *Cancer* 92(2): 395-405.
- Taniguchi, K., L. R. Roberts, I. N. Aderca, X. Dong, C. Qian, L. M. Murphy, D. M. Nagorney, L. J. Burgart, P. C. Roche, D. I. Smith, J. A. Ross und W. Liu. **2002**. "Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas." *Oncogene* 21(31): 4863-71.
- Tanikawa, J., E. Ichikawa-Iwata, C. Kanei-Ishii, A. Nakai, S. Matsuzawa und J. C. Reed. **2000**. "p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3." *J Biol Chem* 275(20): 15578-85.
- Tao, L., Y. Li, W. Wang, P. M. Kramer, W. T. Gunning, R. A. Lubet, V. E. Steele und M. A. Pereira. **2002**. "Effect of budesonide on the methylation and mRNA expression of the insulin-like growth factor 2 and c-myc genes in mouse lung tumors." *Mol Carcinog* 35(2): 93-102.
- Taylor-Robinson, S. D., G. R. Foster, S. Arora, S. Hargreaves und H. C. Thomas. **1997**. "Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94." *Lancet* 350(9085): 1142-3.
- Terradillos, O., O. Billet, C. A. Renard, R. Levy, T. Molina, P. Briand und M. A. Buendia. **1997**. "The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice." *Oncogene* 14(4): 395-404.
- Thomas, M., G. Matlashewski, D. Pim und L. Banks. **1996**. "Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV-18 E6 through ubiquitin mediated degradation." *Oncogene* 13(2): 265-73.
- Tsurutani, J., H. Soda, M. Oka, M. Suenaga, S. Doi, Y. Nakamura, K. Nakatomi, K. Shiozawa, Y. Y. Amada, S. Kamihira und S. Kohno. **2003**. "Antiproliferative effects of the histone deacetylase inhibitor FR901228 on small-cell lung cancer lines and drug-resistant sublines." *Int J Cancer* 104(2): 238-42.
- Uchida, K., M. Kondo, S. Takeda, H. Osada, T. Takahashi und A. Nakao. **1997**. "Altered transcriptional regulation of the insulin-like growth factor 2 gene in human hepatocellular carcinoma." *Mol Carcinog* 18(4): 193-8.

- Valentinis, B. und R. Baserga. **2001**. "IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation." *Mol Pathol* 54(3): 133-7.
- Vu, T. H. und A. R. Hoffman. **1994**. "Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene." *Nature* 371(6499): 714-7.
- Wang, J., X. Chenivresse, B. Henglein und C. Brechot. **1990**. "Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma." *Nature* 343(6258): 555-7.
- Wang, Y., M. C. Wu, J. S. Sham, L. S. Tai, Y. Fang, W. Q. Wu, D. Xie und X. Y. Guan. **2002**. "Different expression of hepatitis B surface antigen between hepatocellular carcinoma and its surrounding liver tissue, studied using a tissue microarray." *J Pathol* 197(5): 610-6.
- Werner, H., M. Adamo, C. T. Roberts und D. LeRoith. **1994**. "Molecular and Cellular Aspects of Insulin-like Growth Factor Action." *Vitamins and Hormones* 48: 1-58.
- Wollersheim, M., U. Debelka und P. H. Hofschneider. **1988**. "A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state." *Oncogene* 3(5): 545-52.
- Xiao, S. Y., H. L. Wang, J. Hart, D. Fleming und M. R. Beard. **2001**. "cDna arrays and immunohistochemistry identification of cd10/calla expression in hepatocellular carcinoma." *Am J Pathol* 159(4): 1415-21.
- Xu, L., L. Hui, S. Wang, J. Gong, Y. Jin, Y. Wang, Y. Ji, X. Wu, Z. Han und G. Hu. **2001a**. "Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 61(7): 3176-81.
- Xu, X. R., J. Huang, Z. G. Xu, B. Z. Qian, Z. D. Zhu, Q. Yan, T. Cai, X. Zhang, H. S. Xiao, J. Qu, F. Liu, Q. H. Huang, Z. H. Cheng, N. G. Li, J. J. Du, W. Hu, K. T. Shen, G. Lu, G. Fu, M. Zhong, S. H. Xu, W. Y. Gu, W. Huang, X. T. Zhao, G. X. Hu, J. R. Gu, Z. Chen und Z. G. Han. **2001b**. "Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15089-94.
- Ye, Q. H., L. X. Qin, M. Forgues, P. He, J. W. Kim, A. C. Peng, R. Simon, Y. Li, A. I. Robles, Y. Chen, Z. C. Ma, Z. Q. Wu, S. L. Ye, Y. K. Liu, Z. Y. Tang und X. W. Wang. **2003**. "Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning." *Nat Med* 9(4): 416-23.
- Yoong, K. F., S. C. Afford, R. Jones, P. Aujla, S. Qin, K. Price, S. G. Hubscher und D. H. Adams. **1999**. "Expression and function of CXC and CC chemokines in human malignant liver tumors: a role for human monokine induced by gamma-interferon in lymphocyte recruitment to hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 30(1): 100-11.

-
- You, L. R., C. M. Chen und Y. H. Lee. **1999**. "Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha." *J Virol* 73(2): 1672-81.
- Zhang, D., M. Salto-Tellez, T. C. Putti, E. Do und E. S. Koay. **2003**. "Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer." *Mod Pathol* 16(1): 79-84.
- Zhang, X., H. J. Xu, Y. Murakami, R. Sachse, K. Yashima, S. Hirohashi, S. X. Hu, W. F. Benedict und T. Sekiya. **1994**. "Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 54(15): 4177-82.
- Zhang, Y. J., W. Jiang, C. J. Chen, C. S. Lee, S. M. Kahn, R. M. Santella und I. B. Weinstein. **1993**. "Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun* 196(2): 1010-6.
- Zhou, Q., Q. He und L. J. Liang. **2003**. "Expression of p27, cyclin E and cyclin A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance." *World J Gastroenterol* 9(11): 2450-4.
- Zhou, X., J. Liao, A. Meyerdierks, L. Feng, L. Naumovski, E. C. Bottger und M. B. Omary. **2000**. "Interferon-alpha induces nmi-IFP35 heterodimeric complex formation that is affected by the phosphorylation of IFP35." *J Biol Chem* 275(28): 21364-71.

7 Anhang

Tabelle 9: Gesamtliste der 118 Gene der *cluster*-Analyse, deren Expression in wenigstens 70% der untersuchten 43 HCCs um einen Faktor von mindestens zwei gegenüber der normalen, gesunden Leber verändert war

Genname	Acc.Nr.	Symbol
chromosome 20 open reading frame 116	AA434400	C20orf116
delta sleep inducing peptide, immunoreactor	AA775091	DSIPI
selenium binding protein 1	T65736	SELENBP1
betaine-homocysteine methyltransferase 2	R98074	BHMT2
aminolevulinate, delta-, synthase 1	AA447761	ALAS1
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	H65395	PSME2
programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	AA496348	PDCD8
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	AA429946	DHRS4
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1	AA046701	ATP5G1
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e	AA431433	ATP5I
tripartite motif-containing 41	N34395	TRIM41
N-acetylglutamate synthase	N34056	NAGS
hypothetical protein RP1-317E23	AA454564	LOC56181
chemokine (C-C motif) ligand 15	R96626	SCYA15
glutathione peroxidase 1	AA485362	GPX1
annexin A6	AA872001	ANXA6
ankyrin repeat and SOCS box-containing 13	N56892	ASB13
mannose-binding protein associated serine protease-1	H81200	MASP1
insulin induced gene 1	H59620	INSIG1
Homo sapiens, Similar to hypothetical protein PRO2831, clone MGC:23813	N68173	-
low molecular mass ubiquinone-binding protein (9.5kD)	AA133191	QP-C
EST, coding protein	AA485357	MBC3205
ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit	AA62862	UQCR
ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit	R46837	UQCR
glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	R83908	GRHPR
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	AA418689	POLR2F
hypothetical protein from EUROIMAGE 2021883	AA481437	LOC56926
Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin)	AA456571	GNG3LG
stimulated by retinoic acid 13	AA453750	STRA13
fucose-1-phosphate guanylyltransferase	R38619	FPGT
stromal interaction molecule 1	AA157018	STIM1
PEF protein with a long N-terminal hydrophobic domain (pefflin)	R38031	PEF
calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	AA487575	SIP2-28
nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans)	AA702639	NUDC
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	AA058323	IFITM1
mitochondrial ribosomal protein L46	AA446865	MRPL46
Huntingtin interacting protein K	T70901	HYPK
aminoacylase 1	AA402915	ACY1
intercellular adhesion molecule 3	AA479188	ICAM3
mitochondrial ribosomal protein L37	AA488652	MRPL37
mitochondrial ribosomal protein L36	AA454963	MRPL36
interferon-related developmental regulator 2	AA454813	IFRD2
PX19-like protein	NM_013237	PX19
alpha-2-glycoprotein 1, zinc	AA862465	AZGP1
asparagine-linked glycosylation 3 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase)	R23251	NOT56L
uncharacterized hematopoietic stem/progenitor cells protein MDS032	R87531	MDS032

Tabelle 9: Fortsetzung 1.

Genname	Acc.Nr.	Symbol
SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1	T97925	SSB1
HSCARG protein	AA425116	HSCARG
KIAA0676 protein	R08891	KIAA0676
transmembrane protein induced by tumor necrosis factor alpha	R77145	TMPIT
transmembrane protein induced by tumor necrosis factor alpha	W91980	TMPIT
Fas (TNFRSF6) associated factor 1	AA486789	FAF1
TNFAIP3 interacting protein 1	T64483	NAF1
3-hydroxybutyrate dehydrogenase (heart, mitochondrial)	T64483	BDH
short-chain dehydrogenase/reductase 1	AA171606	SDR1
cytochrome P450, subfamily XXVIIA (steroid 27-hydroxylase, cerebrotendinous xanthomatosis), polypeptide 1	N66957	CYP27A1
fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	W94120	FAH
biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	AA857035	BLVRB
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	W47350	RARRES3
zinc finger protein 144 (Mel-18)	AA464421	ZNF144
dual specificity phosphatase 16	N40952	KIAA1700
growth hormone regulated TBC protein 1	N52651	GRTP1
D-dopachrome tautomerase	AA397824	DDT
calpain 5	AA777637	CAPN5
hypothetical protein HT036	N95780	HTO36
interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	AA406020	ISG15
interferon, alpha-inducible protein 27	AA157813	IFI27
fetuin B	N70226	FETUB
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	H98636	TNFRSF5
ESTs, Weakly similar to T4S9_HUMAN Transmembrane 4 superfamily, member 8 (Tetraspanin 5) (Tspan-5) (Tetraspan NET-4) [H.sapiens]	N51612	MGC50844
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)	AA862434	PSMB9
macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	NM_020998	MST1
natural killer cell transcript 4	AA458965	NK4
ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)	AA418694	ATOX1
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	T47815	PSME1
glucosidase, alpha; acid (Pompe disease, glycogen storage disease type II)	AA444009	GAA
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers-Danlos syndrome type VI)	AA476241	PLOD
nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	AA496576	NFE2L1
interferon-induced protein 35	AA827287	IFI35
elastin microfibril interfacier 5/chromosome 20 open reading frame 130	W61323	C20orf130
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	AA463445	KIAA0439
phospholipid transfer protein	AA913627	PLTP
cathepsin H	AA487231	CTSH
hypothetical protein PRO1580 mRNA	AA398902	PRO1580
putative ethanolamine kinase	H77536	FLJ10761
fatty acid amide hydrolase	AA431988	FAAH
hypothetical protein MGC2452	T70198	MGC2452
superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))	AA599127	SOD1
cytochrome P450, subfamily IIIA (niphedipine oxidase), polypeptide 5	AA873089	CYP3A5/EST
cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 12	T98002	CYP4F12
chromosome 3 open reading frame 4	H99039	-
hypothetical protein MGC4172	AA448177	MGC4172
solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4	R44346	SLC36A4
hypothetical protein FLJ20920	AA497001	FLJ20920
fem-1 homolog a (C.elegans)	AA678302	FEM1A
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8	W37375	DNAJC8

Tabelle 9: Fortsetzung 2.

Genname	Acc.Nr.	Symbol
mitochondrial ribosomal protein L21	AA454566	MRPL21
farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase, dimethylallyltranstransferase, geranyltranstransferase)	T65790	FDPS
polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2	AA428604	POLDIP2
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2	H38623	ATP5J2
angiotensin II receptor-associated protein	AA152101	ATRAP
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 delta, 44kDa	AA668703	EIF3S4
tumor suppressor deleted in oral cancer-related 1	AA457108	DOC1R
glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)	AA454856	GPX4
chromosome 6 open reading frame 70	N52810	FLJ11152
catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	AA442092	CTNNB1
ubiquitin-like 1 (sentrin)	AA488626	UBL1
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	AA633997	YWHAQ
adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	N52267	AP2B1
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4	AA733040	PSMA4
TRAF and TNF receptor associated protein	AA488650	TTRAP
transcriptional intermediary factor 1	AA016973	TIF1
nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	AA478950	NFAT5
hypothetical protein FLJ10392	AA497044	FLJ10392
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	AA598468	SMARCA5
Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	AA488672	KLF7
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	N54596	IGF2
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	N54596	IGF2
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	N54596	IGF2

Danksagung an ...

- ...Prof. Dr. Schirmacher für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die kritische Diskussion meiner Arbeit sowie die Möglichkeit, einen Teil der Experimente in den USA durchzuführen.
- ...Prof. Dr. Brüning und Prof. Dr. Langer für ihre Bereitschaft, Gutachter meiner Arbeit zu sein.
- ...Dr. Kai Breuhahn, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.
- ...Katharina Petmecky und Silke Kummer für ihre Immunhistochemien und ihre wertvollen praktischen Tipps.
- ...die AG Schirmacher, i. e. Stephanie Schnickmann, Renate Eilers, Tanja Nussbaum, Florian Glanschneider, Eva Eiteneuer, Michael Kern, Thomas Longerich, Michael Gerharz, alle unsere Zivis und unseren Adoptivforscher Udo Siebolts für die gute Arbeitsatmosphäre und eine schöne gemeinsame Zeit.
- ...Anke Haugg für die offene und herzliche Begegnung.
- ...Dr. Brian Haab für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, in seinem Labor die Microarray-Experimente durchzuführen.
- ...Dr. Ramsi Haddad für die unschätzbare Hilfe bei Durchführung und Auswertung der cDNA-Microarrays sowie für die praktische Unterstützung meines Lebens in den USA.
- ...alle Kooperationspartner, die durch die Bereitstellung von HCC-Proben diese Arbeit erst möglich gemacht haben.
- ...Astrid und Per für ihre Hilfe.

- ...Korinna, dass Du immer für mich da bist.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. Jens Brüning selbständig angefertigt, die benutzen Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss dieses Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jens Brüning betreut worden.

K. Breuhahn, S. Vreden, R. Haddad, S. Beckebaum, D. Stippel, P. Flemming, T. Nussbaum, W. Caselmann, B. Haab, P. Schirmacher: *Molecular Profiling of Human Hepatocellular Carcinoma Defines Mutually Exclusive Interferon Regulation and Insulinlike Growth Factor II Overexpression*. *Cancer Research*, 64, 6058-64, 2004

Köln, Juli 2005