

Molekulare Mechanismen der HCC-Entstehung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Katja Piras-Straub

aus Duisburg

April 2015

Die der Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie sowie der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

- 1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Kerstin Herzer*
- 2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Ruth Grümmer*
- 3. Gutachter: Frau Prof. Dr. Ingrid Herr*

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Herr Prof. Dr. Peter Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.2015

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.3 Therapie und Prognose.....	3
1.1.4. Molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms	5
1.2 Der Apoptose induzierende Ligand TRAIL	9
1.2.1 Die physiologische Rolle von TRAIL	9
1.2.2 Das TRAIL-Rezeptor-Liganden-System	10
1.2.3 Die Regulation der TRAIL-Expression.....	13
1.3 Der Tumorsuppressor PML.....	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien	23
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.5 Enzyme.....	24
2.1.6 Antikörper	24
2.1.7 Kompetente Zellen	25
2.1.8 Vektoren	25
2.1.9 Zelllinien.....	25
2.1.10 Kits.....	26

2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Humanes Gewebe	27
2.2.2 Tiermodell und operative Techniken.....	27
2.2.2.1 Verwendete Mausstämme	27
2.2.2.2 Organentnahme	28
2.2.2.3 Histologie	28
2.2.2.4 Genotypisierung.....	29
2.2.3 Zellkulturmodell.....	30
2.2.4 Isolation und Analyse von Nukleinsäuren.....	33
2.2.4.1 RNA Isolierung aus humanem Gewebe.....	33
2.2.4.2 RNA Isolierung aus murinem Gewebe	34
2.2.4.3 RNA-Isolation aus der Zellkultur.....	35
2.2.4.4 Isolierung der genomischen DNA aus humanem Gewebe.....	35
2.2.4.5 Gesamt-DNA-Isolierung aus der Zellkultur	35
2.2.4.6 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	35
2.2.5 Amplifikation der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe	38
2.2.6 Sequenzierung.....	38
2.2.7 <i>Electron Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	39
2.2.8 Isolation und Analyse von Proteinen	41
2.2.8.1 Gesamt-Protein-Isolation aus der Zellkultur.....	41
2.2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
2.2.8.3 SDS-Page und Westernblot	42
2.2.9 Klonierung.....	43
2.2.9.1 Klonierung der vollständigen TRAIL-Promotorregion aus verschiedenen Hepatomzelllinien.....	43
2.2.9.2 Einführung einer Punktmutation in die TRAIL-Promotorregion	44
2.2.9.3 Erstellung von Reportergenkonstrukten mit repetitiven GATA-1 ^{T/T} bzw. GATA-1 ^{T/C} Sequenzvariation.....	45
2.2.10 Transformation in <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	45
2.2.11 Plasmidisolierung	46

2.2.12	Mikroarrays	46
2.2.13	Statistik	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Die Rolle von TRAIL in der Hepatokarzinogenese	49
3.1.1	Die TRAIL-Genexpression in HCC-Patienten	49
3.1.2	Der Einfluss von TRAIL auf die Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen	51
3.1.3	TRAIL als möglicher Prädiktor für das Tumorwachstum, die Rekurrenz und das Überleben von HCC-Patienten	53
3.2	Regulation der TRAIL-Genexpression.....	54
3.2.1	<i>In silico</i> Analysen der TRAIL-Promotorsequenz aus HCC-Patienten	54
3.2.2	Korrelation zwischen den Sequenzvariationen und der TRAIL-Genexpression in HCC-Patienten	59
3.2.3	Der Einfluss der HOXD9/10 Bindungsstelle auf die Regulation der TRAIL-Expression	62
3.2.4	Der Einfluss der GATA-1 Bindungsstelle auf die Regulation der TRAIL-Expression	64
3.2.5	Die Funktionalität der GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor und deren Einfluss auf die TRAIL-Genexpression	66
3.3	Die Rolle des Tumorsuppressorproteins PML in der Hepatokarzinogenese	69
3.3.1	Die PML-Expression im HCC	69
3.3.2	Einfluss von PML auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen	71
3.3.3	Einfluss von PML auf die TRAIL-Expression	73
3.3.4	Der Einfluss von PML auf die HCV-assoziierte Hepatokarzinogenese	75
3.3.4.1	PML-Defizienz und HCV - Die Leberkarzinogenese der Maus im Langzeitmodell.....	75
3.3.4.2	PML-Defizienz und HCV – Genetische Veränderungen im Mausmodell.....	78

3.3.4.3	PML-Defizienz und HCV – Genetische Veränderungen der Hepatokarzinogenese	82
3.4	Medizinische Parameter zur Prognose der Tumorrekurrenz und des Überlebens von HCC-Patienten nach einer Lebertransplantation.....	85
3.4.1	Prädiktoren für die Tumorrekurrenz des HCCs.....	87
3.4.2	Prädiktoren für das post-operative Überleben der HCC-Patienten	90
4	DISKUSSION.....	93
4.1	Die verminderte Expression von TRAIL im HCC hat Einfluss auf das Tumorwachstum, die Rekurrenz und das Überleben der Patienten	93
4.2	Eine Sequenzvariation in der GATA-1 Bindungsstelle des humanen TRAIL-Promotors führt zu einer Dysregulation der TRAIL-Expression.	96
4.3	Der Verlust des Tumorsuppressors PML im HCC begünstigt die (HCV-assoziierte) Hepatokarzinogenese und ist bei der Regulation der TRAIL-Expression von entscheidender Bedeutung.	99
4.4	Die prä-operativen Glutamatdehydrogenase- und Alkalische Phosphatase-Werte eignen sich als unabhängige Prädiktoren für die Rekurrenz und das Überleben von HCC-Patienten nach der Lebertransplantation.....	103
4.5	Ausblick.....	107
5	ZUSAMMENFASSUNG	109
6	SUMMARY	110
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	111

8 ANHANG	134
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	138
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	141
TABELLENVERZEICHNIS	144
FORMELN	146
WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	147
Publikationen	147
Poster und Abstracts	147
Vorträge.....	148
Auszeichnungen	149
Sonstige Qualifikationen	150
DANKSAGUNG	151
LEBENS LAUF	153
ERKLÄRUNGEN	155

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eines der sechs häufigsten Karzinome weltweit und die dritthäufigste Tumor-assoziierte Todesursache (El-Serag and Rudolph, 2007; Mittal and El-Serag, 2013), wobei ausgeprägte geografischen Unterschiede zu beobachten sind (Abbildung 1). Sowohl die Inzidenz zur Entwicklung eines HCCs als auch die HCC-assoziierte Mortalität ist in Asien und Teilen Afrikas am höchsten und in den westlichen Ländern sowie Russland am geringsten.

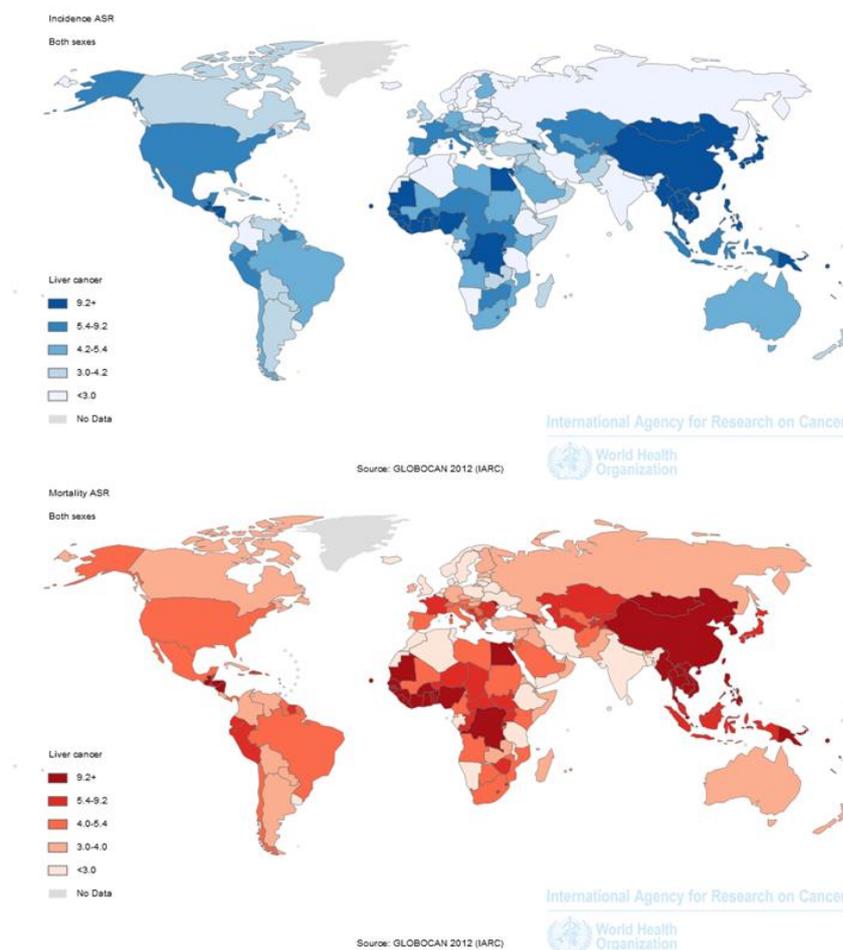


Abbildung 1: Weltweite Inzidenz (oben: blau) und Mortalität (unten: rot) des hepatozellulären Karzinoms pro 100.000.

Die Abbildung wurde aus GLOBOCAN 2012 - International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012 übernommen.

Weiterhin ist ein weltweiter Anstieg des HCC-Auftretens zu beobachten, dass sich auf ca. 750.000 Neuerkrankungen pro Jahr beläuft (El-Serag HB and Mason AC, 2000; Jemal et al., 2011; Kubicka et al., 2000). Dieser Anstieg tritt auch in den westlichen Ländern deutlich zu Tage (El-Serag HB and Mason AC, 2000; Jemal et al., 2011; Kubicka et al., 2000). Hierbei spielt zum Einen die Zunahme von Hepatitis C Infektionen eine Rolle, zum Anderen aber auch der Anstieg metabolischer Erkrankungen wie Übergewicht und Diabetes, was die Inzidenz der NASH assoziierten HCC-Entstehung begünstigt (Calle et al., 2005; El-Serag et al., 2001; Lau and Lai, 2008; Siegel and Zhu, 2009).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Das HCC entsteht in den meisten Fällen auf dem Boden einer Leberzirrhose (Blum and Spangenberg, 2007; Llovet, 2005). Hierbei spielen vor allem chronische Infektionen mit viralen Hepatitiden (Hepatitis B, Hepatitis C) eine Rolle (El-Serag, 2011; El-Serag and Rudolph, 2007). Neben dem chronischen Alkoholabusus ist vor allem in Afrika und Asien die Aflatoxin Intoxikation ein weiterer Risikofaktor für die HCC-Entstehung (Onyemelukwe et al., 1980; Uwaifo and Bababunmi, 1984). Vor allem in der westlichen Welt nehmen metabolische Erkrankungen wie NASH immer mehr an Bedeutung für die HCC-Entstehung zu (Amarapurkar et al., 2013; Archambeaud et al., 2014; Ertle et al., 2011; Farrell and Larter, 2006), hierbei zeigen sich auch zunehmend HCCs, die sich nicht auf dem Boden einer Zirrhose entwickeln. Andere Lebererkrankungen, wie angeborene Stoffwechselerkrankungen (Hämochromatose, Morbus Wilson, Alpha-1-Antitrypsinmangel), Autoimmunerkrankungen sowie primäre biliäre Erkrankungen (biliäre Zirrhose, sklerosierende Cholangitis) zeigen nur geringe Inzidenz zur HCC-Entstehung (Gossard and Lindor, 2014; Teufel et al., 2009).

Die Pathogenese des HCCs verläuft bei nahezu allen Ätiologien gleich und ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Unabhängig von der Ätiologie der Lebererkrankung wird zunächst ein Zustand der chronischen Inflammation erreicht, der über einen Zeitraum von bis zu 40 Jahren vollkommen beschwerdefrei anhalten kann. Im Verlauf dieser chronischen Inflammation werden immunmodulierende Substanzen und Wachstumsfaktoren freigesetzt, was zu einer Destruktion des Lebergewebes führen kann, aber auch zu einer vermehrten Proliferation von Parenchymzellen. Die Aktivierung von hepatischen Sternzellen führt dann zu einer vermehrten Synthese von

Kollagen und Fibronectin und somit zu einer Fibrosierung der Leber. Dauern diese Prozesse weiter an, kommt es im Verlauf zum Fortschreiten der Fibrose und der Entwicklung einer Leberzirrhose (Thomas and Abbruzzese, 2005). In 3-5 % der Fälle kommt es durch weitere Schädigungen (siehe 1.2) zu einem unkontrollierten Anstieg der Proliferation der Hepatozyten, was zur Ausbildung von dysplastischen bzw. hyperplastischen Läsionen führt, aus denen sich dann Vorstufen des HCCs entwickeln. Bei fortschreitender Erkrankung entwickelt sich das HCC weiter, die Differenzierung des Gewebes nimmt ab und es können sich sowohl intra- als auch extrahepatische Metastasen entwickeln.

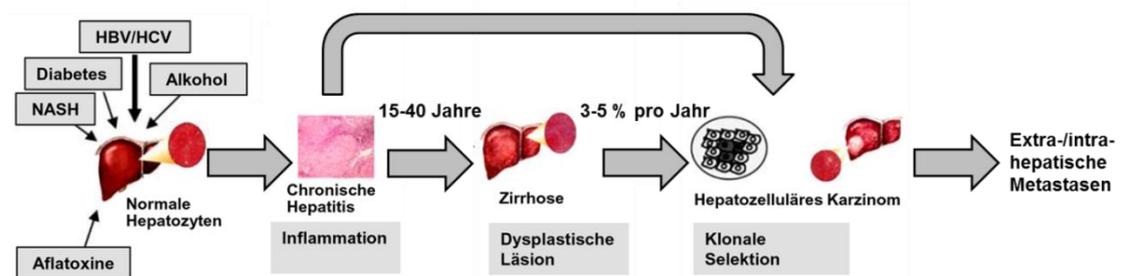


Abbildung 2: Ätiologie und Pathogenese des HCC.

Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms. Modifiziert nach Levrero, 2006; Whittaker et al., 2010. HBV: Hepatitis B Virus; HCV: Hepatitis C Virus; NASH: nicht-alkoholische Steatohepatitis.

1.1.3 Therapie und Prognose

Durch die oftmals nur zufällige und daher meist erst späte Diagnose des HCCs und der limitierten Therapieoptionen ist die generelle Prognose von HCC-Patienten sehr schlecht. Nicht therapierte Patienten zeigen eine 5-Jahresüberlebensrate von 40 %-50 % im Okuda Stadium (Anhang 1) I, 20 % im zweiten Stadium und 3 % bei HCCs im Okuda Stadium III (Okuda et al., 1985; Pons et al., 2005). Weiterhin zeigt sich, dass bei ca. 50 % der Patienten mit kurativen Therapieansatz bereits innerhalb der ersten drei Jahre ein Tumorrezidiv zu beobachten ist.

Die Therapie des HCCs ist stark abhängig vom Stadium der Tumorerkrankung, also der Größe und Anzahl der Leberläsionen sowie deren Lokalisation. Auch Art und Stadium der zu Grunde liegenden Lebererkrankung sowie der Allgemeinzustand der Patienten sind entscheidend für die Art der anwendbaren Therapie. Durch die 1999 eingeführte Barcelona-Clinic-Liver-Cancer- (BCLC-) Klassifikation (Abbildung 3) sind jedoch standardisierte stadienadaptierte Therapieempfehlungen verfügbar (Bruix et al.,

2011; Llovet et al., 1999). Hierbei wird die Therapie eindeutig zwischen kurativen und nicht-kurativen Ansätzen unterschieden.

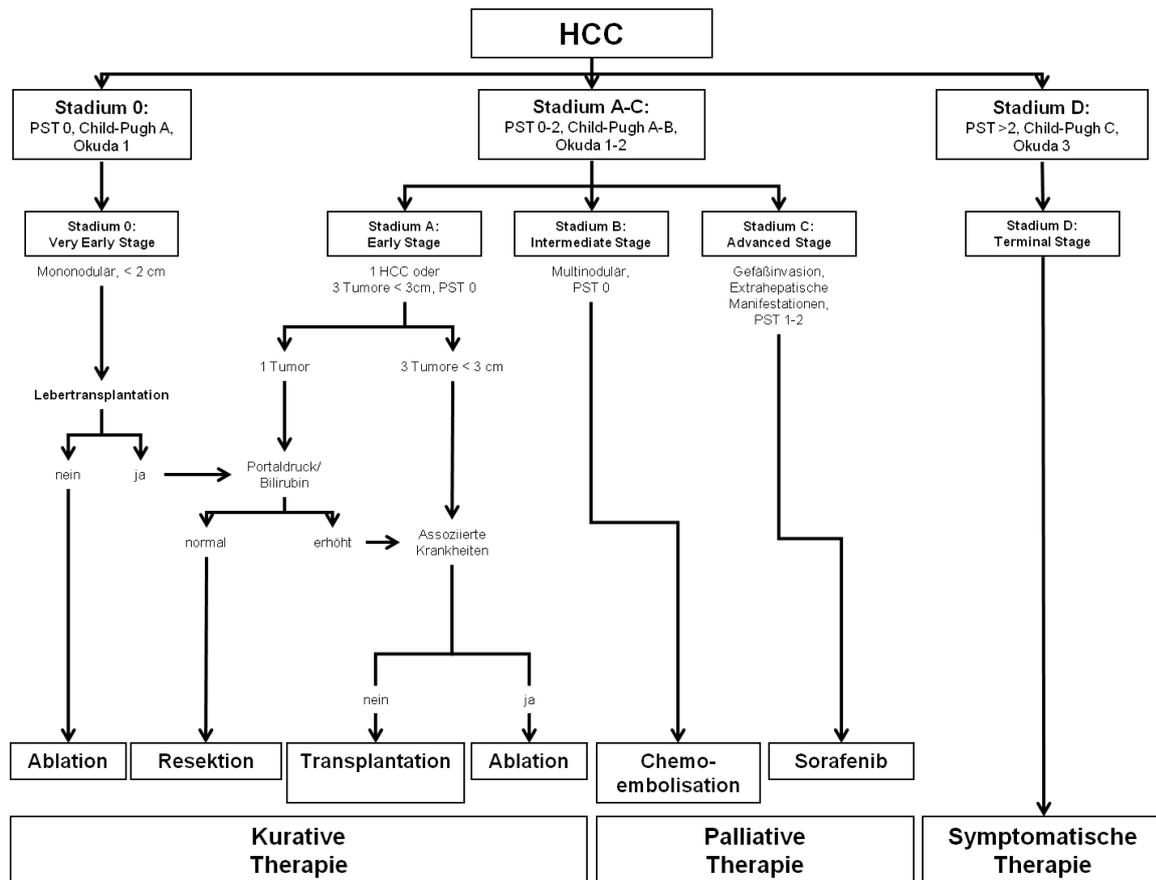


Abbildung 3: Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Stadieneinteilung und Therapieempfehlung bei Patienten mit HCC.

Modifiziert nach Forner et al., 2012. PST: Performance-Status.

Wenn keine Leberzirrhose die Therapie der Tumorerkrankung erschwert, stehen neben ablativen Methoden, wie der perkutanen Ethanolinjektion (PEI) oder der Radiofrequenzablation (RFA), auch die Leberteileresektion oder die Transplantation zu Verfügung, wobei die Resektion mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 60 %-80 % bei kleinen Tumoren und guter Leberfunktion die beste Methode darstellt (Bruix et al., 2011; EASL-EORTC, 2012).

Die Lebertransplantation stellt die beste Option für Zirrhose-Patienten mit einem HCC im Anfangsstadium dar, da neben der Entfernung des Tumors auch die Leberzirrhose selbst therapiert wird (Tabrizian et al., 2014). Der Organmangel ist ein entscheidendes Limit dieser Therapieform, die nur durch effektive Patientenauswahl zu zufriedenstellenden Ergebnissen führt. Hierbei zeigt sich, dass die strikte Einhaltung der MILAN-Kriterien (Mazzaferro et al., 2009) zu einer deutlichen Verbesserung des

Überlebens und Outcomes von transplantierten Patienten führt. Trotzdem kommt es in bis zu 20 % der Patienten zu einer HCC-Rekurrenz (Sotiropoulos et al., 2009). Da bisher ausschließlich Tumor-assoziierte Faktoren (Vaskuläre Invasion, Tumorgröße, Anzahl der Tumore, Differenzierungsgrad des Tumors) zur Abschätzung des Rekurrenzzrisikos zu Verfügung stehen (Bismuth et al., 1993; Hemming et al., 2002; Jonas et al., 2001; Marsh et al., 2000), stellt die HCC-Rekurrenz ein großes medizinisches Problem dar (Clavien et al., 2012).

Zu den palliativen Therapieansätzen gehört neben der transarteriellen Chemoembolisation (Llovet et al., 2003) (TACE) und der selektiven internen Radiotherapie (Kulik et al., 2008) (SIRT) auch die systemische Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib, die auf Grund der molekularen Heterogenität des HCCs nicht als kurative Therapie in Frage kommt (Cillo et al., 2006; Di Maio et al., 2008; Llovet et al., 1999). Ein weiteres Einsatzgebiet der TACE liegt im *Downstaging*, also der Verkleinerung des Tumors prä-operativ, um so die Wartezeit bis zur Transplantation zu überbrücken oder auch die Tumorausdehnung soweit zu verringern, dass eine Transplantation innerhalb der MILAN-Kriterien möglich wird (Marin et al., 2009).

1.1.4. Molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms

Das hepatozelluläre Karzinom ist für seine molekulare Heterogenität bekannt, was nicht ausschließlich auf die Diversität der zu Grunde liegenden Lebererkrankungen zurück zu führen ist, sondern auch auf die Vielzahl der genetischen Veränderungen innerhalb der Hepatokarzinogenese (Abbildung 4). Dies zeigt sich zum Einen in der Anzahl an unterschiedlichen zu beobachtenden chromosomalen Veränderungen (Hoshida et al., 2010). Hierbei sind vor allem die Chromosomen 13q und 4q von Bedeutung, da dort Regionen mit bekannten Tumorsuppressorgenen (p53, Rb (Retinoblastom-Protein)) lokalisiert sind (Moizadeh et al., 2005). Der Verlust der Heterozygotität (LOH: *loss of heterozygosity*) ist ebenfalls ein häufig zu beobachtender Mechanismus innerhalb der HCC-Entstehung (Oda et al., 1992; Zhang et al., 1994), wobei auch hier Veränderungen in bekannten Tumorsuppressorgenen beobachtet werden können (Oda et al., 1992). Weitere genetische Veränderungen, wie *gain of function* Mutationen oder die Mikro-Satelliten Instabilität sind ebenfalls häufige Ereignisse innerhalb der Hepatokarzinogenese (Boix et al., 1994; Salvucci et al., 1999; Tsuda et al., 1989). Bereits einzelne dieser genetischen Veränderungen führen zu

einer Vielzahl an Abweichungen innerhalb der intrazellulären Signalwege (Wörns et al., 2007).

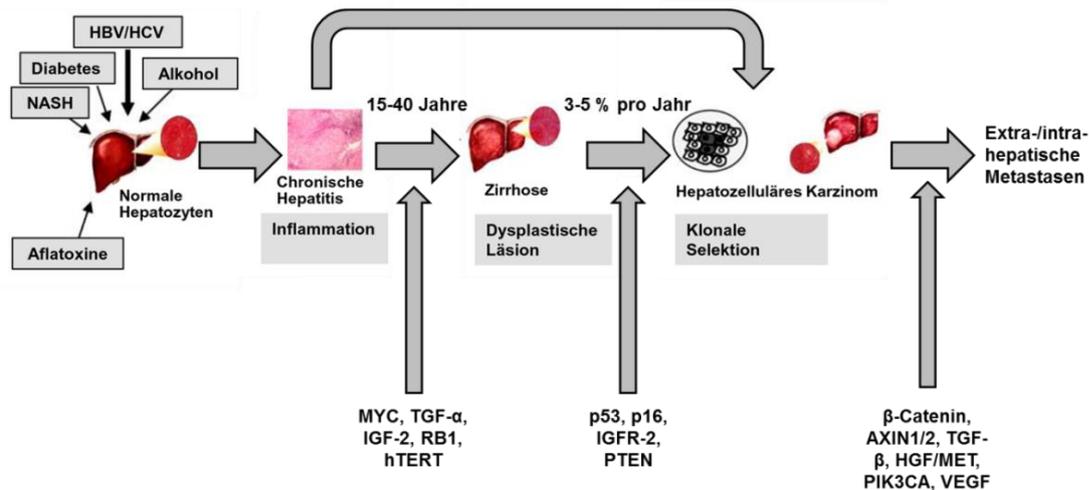


Abbildung 4: Diversität der molekularen Pathogenese des HCCs.

Molekulare Entstehungsmechanismen des hepatozellulären Karzinoms. Modifiziert nach Levrero, 2006; Whittaker et al., 2010. HBV: Hepatitis B Virus; HCV: Hepatitis C Virus; NASH: nicht-alkoholische Steatohepatitis; MYC: Protoonkogen; TGF- α : transforming growth factor- α ; IGF-2: insulin-like growth factor 2; RB1: retinoblastoma protein 1; hTERT: human telomerase reverse transcriptase; p53: Tumorsuppressorprotein; p16: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A); IGF-1: IGF-2 receptor; PTEN; phosphatase and tensin homolog; AXIN1/2: Axin Proteine 1 und 2; TGF- β : transforming growth factor- β ; MET/HGF, mesenchymal-epithelial transition factor; PIK3CA, phosphatidylinositol-3-kinase; VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Die gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren mit proliferationsfördernden Effekten ist mit der Invasion von Tumorzellen assoziiert (El-Assal et al., 2001; Li et al., 2006; Stock et al., 2007). Dies ist vor allem damit zu begründen, dass eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren zu einer konsekutiven Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskaden führt (Abbildung 5).

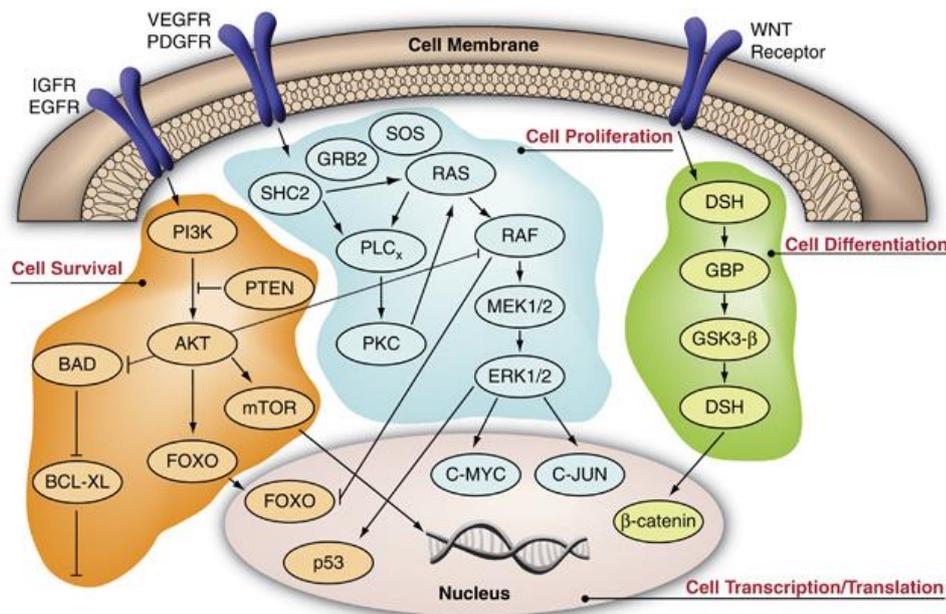


Abbildung 5: Signalwege mit Assoziation zur Entstehung und Progression von HCC.

Nach Whittaker et al., 2010. Die Aktivierung der verschiedenen Signalwege verläuft über unterschiedliche membranständige Rezeptoren (IGFR: Insulin-like growth factor receptor; EGFR: Epidermal growth factor receptor; VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor; PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor; WNT: Wnt-Signalprotein). Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist mit dem Zellüberleben assoziiert (PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PTEN: Phosphatase und Tensin Homolog; AKT: Proteinkinase B; BAD: Bcl-2-Antagonist of Cell Death; mTOR: Mechanistic/mammalian Target of Rapamycin; FOXO: O-Untergruppe der Forkhead-Box-Proteine; BCL-XL: B-cell lymphoma-extra large). Der RAF/MEK/ERK-Signalweg ist an der Proliferation von Zellen beteiligt (SOS: son of sevenless; GRB2: Growth factor receptor-bound Protein 2; SHC2: SRC homology 2 domain-containing (SHC)-transforming Protein 2; PLC_x: Phospholipase C_x; RAS: Rat sarcoma G-Protein; RAF: MAP Kinase Kinase Kinase; MEK: MAP Kinase Kinase; ERK: Extracellular signal-regulated Kinases; PKC: Protein Kinase C). Der Wnt- β -Catenin-Signalweg spielt in erster Linie in der Zelldifferenzierung eine Rolle (DSH: Downstream effector Dishevelled; GBP: Guanylate-binding Protein; GSK3- β : Glycogen synthase Kinase-3 β). Alle Signalwege führen im Nucleus zu verschiedenen transkriptionellen Prozessen (p53: Tumorsuppressorprotein; c-MYC: Protoonkogen; c-JUN: Untereinheit des Activator Protein-1 (AP-1) Transkriptionsfaktors; β -Catenin: Cadherin-associated Protein- β).

Die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges durch die Wachstumsfaktoren IGF (Insulin-like growth factor) und EGF (Epidermal growth factor) führt zur Proliferation und gesteigertem Überleben von Tumorzellen (Chen et al., 2005). Weiterhin zeigt sich, dass in 50 % der HCCs eine verminderte Expression von PTEN (Phosphatase and tensin homologs) zu beobachten ist, einem essentiellen Regulator des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges (Hu et al., 2003). Bei der Aktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalweges durch VEGF (Vascular endothelial growth factor) und PDGF (Platelet-derived growth factor) kommt es zur Expression von Proteinen die bei der Proliferation und Angiogenese involviert sind (Ozanne et al., 2007), was mit der Progression der Erkrankung in Zusammenhang steht (Chen et al., 2011). Die gestörte Funktionalität des Transkriptionsfaktors β -Catenin und somit die erhöhte Expression von antiapoptischen Proteinen, sowie von Proteinen, die an der Zellproliferation,

Angiogenese und der Ausbildung der extrazellulären Matrix involviert sind (Avila et al., 2006) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Verlauf der Hepatokarzinogenese.

Als weiteres Merkmal der Hepatokarzinogenese ist die Fehlregulation der Apoptose-Signalwege zu beschreiben. Die Mehrzahl der HCCs weist Veränderungen von Mitgliedern des FAS-assoziierten Apoptose-Signalwegs auf, die zu einer Inhibition der FAS induzierten Apoptose führen (Lee et al., 2001). Dies kann zum Einen durch eine verminderte Expression von FAS, des FAS Liganden oder anderen Molekülen der Signalkaskade (FADD, FLICE) entstehen (Ito et al., 2000; Lee et al., 2001; Shin et al., 1998), zum Anderen konnte auch eine vermehrte Expression und Aktivität von Proteinen mit anti-apoptotischen Eigenschaften beobachtet werden (Takahashi et al., 1999). Auch die Apoptose-Signalwege der anderen Todesrezeptoren (TNF, TRAIL: siehe 1.2) können Veränderungen im Verlauf der Hepatokarzinogenese zeigen (Schattenberg et al., 2011; Walczak, 2013).

Durch die individuelle Kombination dieser genetischen Alterationen, auch häufig in Abhängigkeit von der zu Grunde liegenden Lebererkrankung, kommt es zu einer sehr spezifischen Tumorentstehung, was die therapeutische Situation innerhalb der Klinik weiter verkompliziert.

1.2 Der Apoptose induzierende Ligand TRAIL

1.2.1 Die physiologische Rolle von TRAIL

TRAIL (Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand) ist ein 281 Aminosäuren großes Protein, das ubiquitär exprimiert wird, doch hauptsächlich in der Lunge, Milz und Prostata nachgewiesen werden kann. TRAIL ist ein Mitglied der TNF-Familie und ist somit sowohl an der Organisation und Funktion des Immunsystems, als auch der gezielten Induktion der Apoptose beteiligt (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). TRAIL kann durch proteolytische Spaltung in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Pitti et al., 1996) und kann als einziges Mitglied der TNF-Familie sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form Apoptose induzieren (Wiley et al., 1995).

Die physiologische Rolle von TRAIL ist sehr vielfältig. Es ist bekannt, dass TRAIL eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielt und dass in Abhängigkeit vom Stimulationsstatus des Immunsystems eine gezielte TRAIL-Expression an der Oberfläche von Immuneffektorzellen wie natürlich Killer (NK)-Zellen, dendritische Zellen oder zytotoxische T-Zellen erfolgt (Fanger et al., 1999; Griffith et al., 1999; Kemp et al., 2004; Mariani and Krammer, 1998; Zamai et al., 1998). Die TRAIL-Expression in NK-Zellen führt dabei zu einer direkten anti-tumoralen Wirkung (Kayagaki et al., 1999; Takeda et al., 2001a, 2001b). Auch spielt die TRAIL-induzierte Apoptose bei der Immunantwort bei viralen Infektionen eine Rolle. Die Infektionen von humanen Fibroblasten mit dem humanen Cytomegalie-Virus (hCMV) führt zu einer Induktion der Expression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5, was in einer Sensitivierung der infizierten Zellen für eine TRAIL-induzierte Apoptose resultiert (Sedger et al., 1999). Die komplexe Funktionalität von TRAIL wird durch Untersuchungen in vaskulären glatten Muskelzellen weiter verdeutlicht, da TRAIL zum Einen die Proliferation induziert, gleichzeitig aber auch die Erneuerung der Gefäßwände durch Apoptose-Initiation reguliert (Kavurma et al., 2008).

Die Besonderheit von TRAIL liegt in der Eigenschaft begründet Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen (Tracey et al., 1986; Walczak et al., 1999; Zhang et al., 2000), zudem zeigen Untersuchungen an TRAIL-defizienten Mäusen, dass der Verlust von TRAIL nicht zur Induktion von spontanen Tumoren führt, jedoch die Bildung von Metastasen begünstigt (Grosse-Wilde et al., 2008; Sedger et al., 2002).

1.2.2 Das TRAIL-Rezeptor-Liganden-System

Seine biologische Aktivität erlangt TRAIL sowohl in membrangebundener als auch in seiner löslichen Form erst durch die Bildung eines Homotrimerers, was durch die Komplexierung eines Zink-Ions durch die Cystein-Reste an Position 230 der drei monomeren TRAIL Proteine (Abbildung 6) stabilisiert wird. Weiterführende Analysen haben gezeigt, dass die Substitution des Cysteins 230 durch Serin, Glycin oder Alanin die Trimerisierung vollständig unterbindet und zum Verlust der TRAIL-Aktivität führt (Hymowitz et al., 2000; Tratzuni et al., 2000).

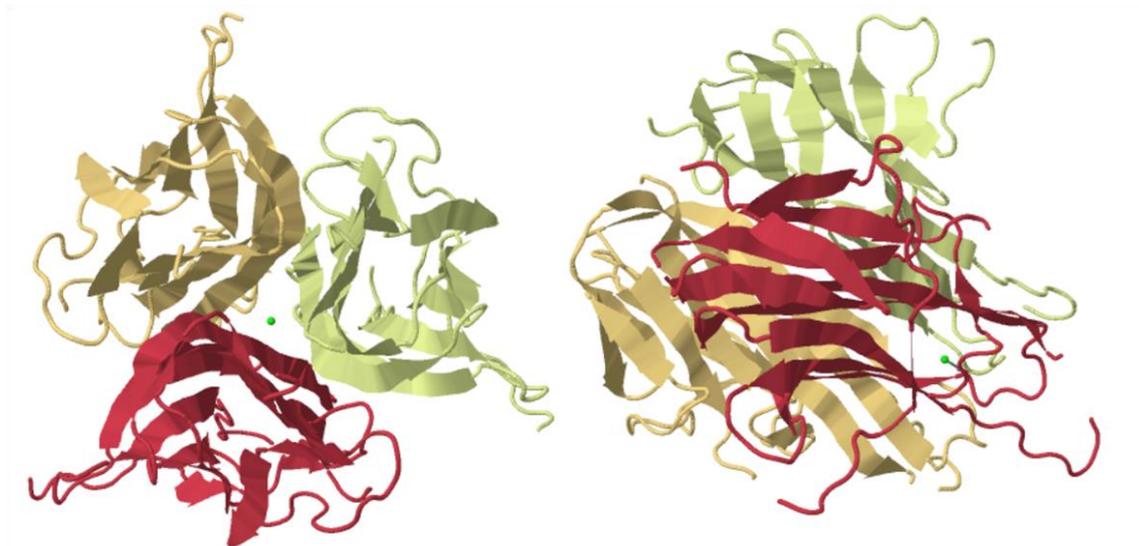


Abbildung 6: Kristallstruktur von homotrimerem TRAIL.

Die Kristallstruktur basiert auf dem PDB-Eintrag 1DG6 (Hymowitz et al., 2000).

Trimeres TRAIL kann an die cysteinreichen extrazellulären Bereiche von fünf verschiedenen Rezeptoren binden (Abbildung 7). Die beiden Todesrezeptoren DR4 und DR5 sind membranständig und haben zusätzlich eine cytosolische Domäne, die so genannte Todesdomäne, über die die Vermittlung der nachfolgenden Signalweiterleitung erfolgt. Die beiden TRAIL-Rezeptoren DcR1 und DcR2 sind ebenfalls membranständig, haben jedoch keine oder nur eine unfunktionale cytosolische Domäne, sodass keine Signalweiterleitung erfolgen kann, was die Vermutung nahelegt, dass diese Rezeptoren zur Inhibition der TRAIL-induzierten Apoptose führen (Degli-Esposti et al., 1997; Pan et al., 1997). Mit deutlich niedrigerer Affinität bindet TRAIL an den Rezeptor Osteoprotegerin (OPG), ein Protein, das von den Zellen sezerniert wird und in erster Linie mit seinem Liganden RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) interagiert.

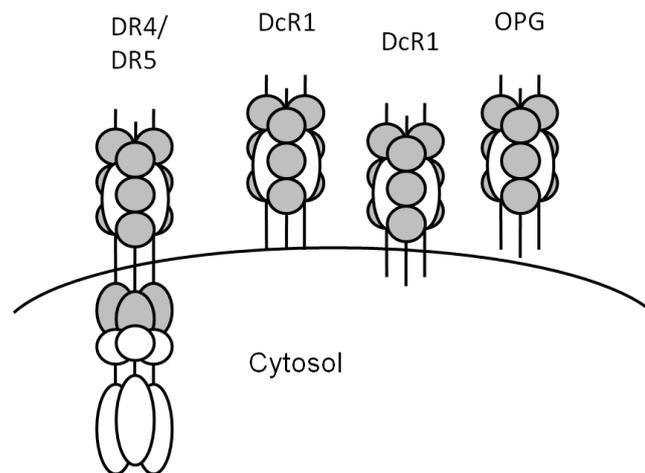


Abbildung 7: TRAIL-Rezeptoren.

DR4: Death receptor 4 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A); DR5: Death receptor 5 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B); DcR1: Decoy receptor 1 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10C); Dcr2: Decoy receptor 2 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10D); OPG: Osteoprotegerin (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B).

Bindet TRAIL an einen der beiden Todesrezeptoren DR4 und DR5 kommt es zur Aktivierung dieser Rezeptoren und zur Rekrutierung von FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) an die cytosolische Domäne des Rezeptors (Abbildung 8). Durch die anschließende Rekrutierung von Caspase-8 bzw. Caspase-10 kommt es zur Ausbildung des DISC (death inducing silencing complex). Nach der autokatalytischen Aktivierung von Caspasen-8 bzw. Caspase-10 und der nachfolgenden Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 kommt es zur Initialisierung der Apoptose über den so genannten extrinsischen Signalweg (Hymowitz et al., 1999; Mongkolsapaya et al., 1999). Durch die Aktivierung von Caspase-8 kann auch der intrinsische Apoptose-Signalweg initiiert werden (Abbildung 8). Hierbei kommt es zu einer Aktivierung von tBID (truncated BH3 interacting domain;), Bak und BAX, was zur Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien führt. Im Anschluss erfolgt die Bildung des Apoptosomes durch Komplexierung von Cytochrom-C, Caspase-9 und Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1), zur Aktivierung der Caspase-9 und somit der nachfolgenden Effektorcaspasen-3, -6 und -7, was ebenfalls zur Initialisierung der Apoptose führt (Han et al., 1999; Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

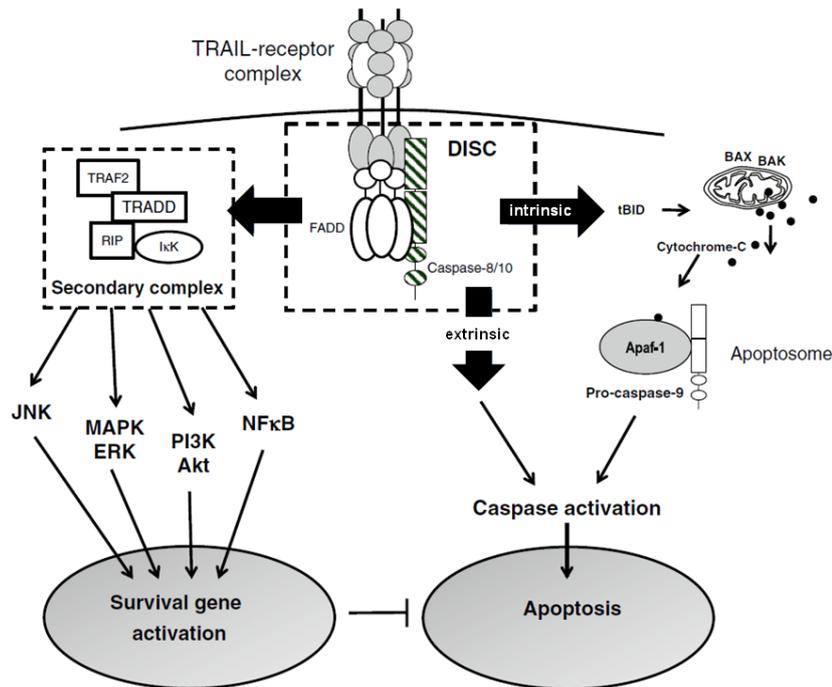


Abbildung 8: Der TRAIL-Signalweg.

Modifiziert nach Azahri and Kavurma, 2013. TRAIL: Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand; DISC: Death-inducing signaling complex; FADD: Fas-Associated protein with Death Domain; TRAF2: TNF receptor-associated factor 2; TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein; RIP: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase; IκK: Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; Akt: Serine/threonine-protein kinase; NFκB: Nuclear factor NF-kappa-B; tBID: truncated BH3 interacting domain; BAX: Apoptotic regulator BAX; BAK: Bcl-2 homologous antagonist/killer; Apaf-1: Apoptotic protease-activating factor 1.

Neben der Induktion der Apoptose kann TRAIL auch Signalkaskaden zur Inhibition der Apoptose initiieren (Abbildung 8). Hierbei wird nach der Bindung von TRAIL an DR4 oder DR5, ebenfalls durch Rekrutierung von FADD und Caspase-8, der DISC gebildet. Anschließend erfolgt dann die Ausbildung eines sekundären Komplexes aus TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), RIP (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase) und IκK (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase). Nach der Assemblierung des Komplexes können NFκB und andere Signalwege aktiviert werden, die für das Überleben der Zelle von Bedeutung sind (Kavurma and Bennett, 2008; Newsom-Davis et al., 2009; Varfolomeev et al., 2005).

1.2.3 Die Regulation der TRAIL-Expression

Das TRAIL-Gen ist in erster Linie auf Grund seines Apoptose induzierenden Potentials und seine Rolle in der Immunantwort stark reguliert. Bereits die ersten Beschreibungen der TRAIL-Promotorregion konnten einen ca. 1,6 kB großen Bereich mit verschiedenen mutmaßlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifizieren (Gong and Almasan, 2000), der im Laufe verschiedenster Untersuchungen weiter charakterisiert werden konnte (Abbildung 9).

Die IFN- γ vermittelte TRAIL-Induktion verläuft über STAT1 und IRF-1 Bindungsstellen innerhalb des TRAIL-Promotors (Wang et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass die Behandlung gesunder wie auch transformierter Hepatozyten mit TGF- β zu einer Induktion der Apoptose durch die Aktivierung der TRAIL-Expression und somit des TRAIL-Rezeptor-Liganden-Systems führt (Herzer et al., 2005a). Diese Induktion der TRAIL-Expression durch TGF- β erfolgt über eine Bindungsstelle des humanen Transkriptionsfaktors AP-1 innerhalb des TRAIL-Promotors (Herzer et al., 2008).

Es konnte nachgewiesen werden, dass *Interferon-Stimulated Response Elements* (ISRE) innerhalb des TRAIL-Promotors liegen und eine funktionelle Aktivität besitzen (Clarke et al., 2004; Kirshner et al., 2005; Sato et al., 2001), was den Zusammenhang der IFN- α induzierten Apoptose mit der TRAIL-Expression erklärt (Herzer et al., 2009). Zudem zeigen sich auch funktionelle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF κ B, Sp-1, NFAT und p53, was den Zusammenhang von TRAIL mit verschiedenen immunologischen und auch apoptotischen Prozessen weiter bestätigt (Azahri et al., 2012; Baetu et al., 2001; Chan et al., 2010; Kuribayashi et al., 2008; Wang et al., 2011).

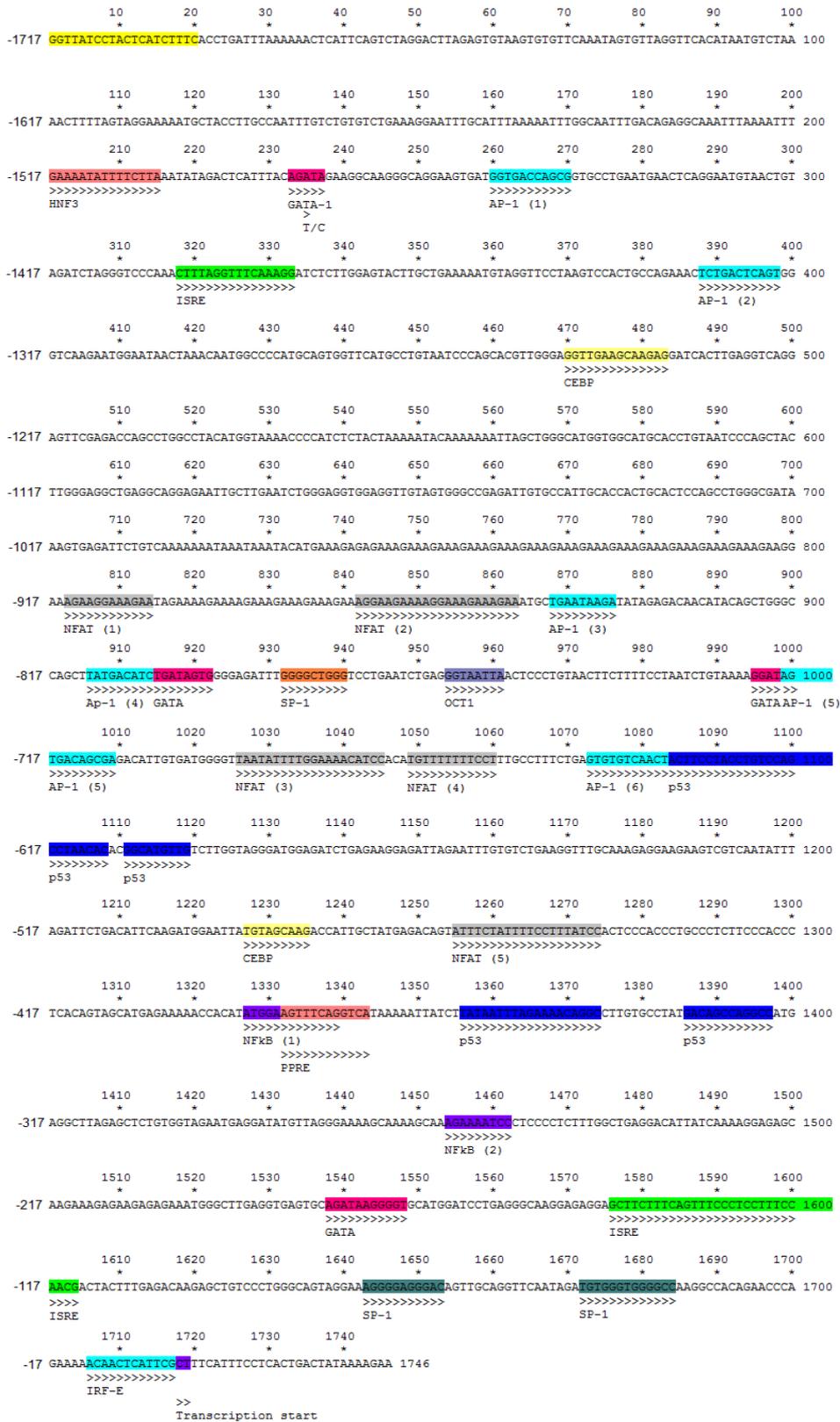


Abbildung 9: Promotorregion des humanen TRAIL-Gens.

In der Analyse der humanen TRAIL-Promotorsequenz sind vermeintliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen farblich markiert und unterhalb der Sequenz definiert (Allen and El-Deiry, 2012).

Im Zusammenhang mit Veränderungen der TRAIL-Expression bei verschiedenen Erkrankungen erfolgten Untersuchungen hinsichtlich Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP). Hierbei konnten Assoziationen von SNPs sowohl im TRAIL-Promotor als auch in kodierenden Bereichen des TRAIL-Gens mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen identifiziert werden. So zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einem SNP an Position -716 des TRAIL-Promotors mit dem sporadischen Auftreten von Brustkrebs (Pal et al., 2011), auch besteht eine Assoziation des -1525/-1595 SNPs mit dem Auftreten von Fettlebererkrankungen (Yan et al., 2009). In Bezug auf SNPs in kodierenden Bereichen des TRAIL-Gens konnte ein Zusammenhang zwischen dem SNP in Exon 5 mit dem Auftreten von Multipler Sklerose hergestellt werden (Kikuchi et al., 2005).

1.3 Der Tumorsuppressor PML

Das *Promyelocytic Leukemia Protein* (PML) wurde erstmals im Zusammenhang mit akuter promyelozytärer Leukämie (APL) entdeckt, bei der die Fusion von PML mit dem Retinsäure-Rezeptor- α (RARA) zu einer dauerhaften Aktivierung von RARA führt, was die Entstehung und Progression der APL begünstigt (Goddard et al., 1992, 1991; Luo et al., 2014).

PML ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einer Vielzahl von molekularen Funktionen (Abbildung 10), das sowohl im Zytoplasma als auch dem Nukleoplasma vorkommt. Die Funktionalität von PML ist durch die Bildung subnuklearer Strukturen, den so genannten *PML-Nuclear-Bodys* (PML-NBs) gegeben, bei deren Bildung PML eine essentielle Rolle spielt (Ishov et al., 1999). Hierbei konnte gezeigt werden, dass PML eine Rolle innerhalb des DNA-Reparatur-Systems, der Genregulation und Proteolyse spielt, aber auch an Prozessen zur Apoptose-Induktion und der Immunantwort bei viralen Infektionen beteiligt ist (Lunardi et al., 2011; Maarifi et al., 2014; Pearson et al., 2000).

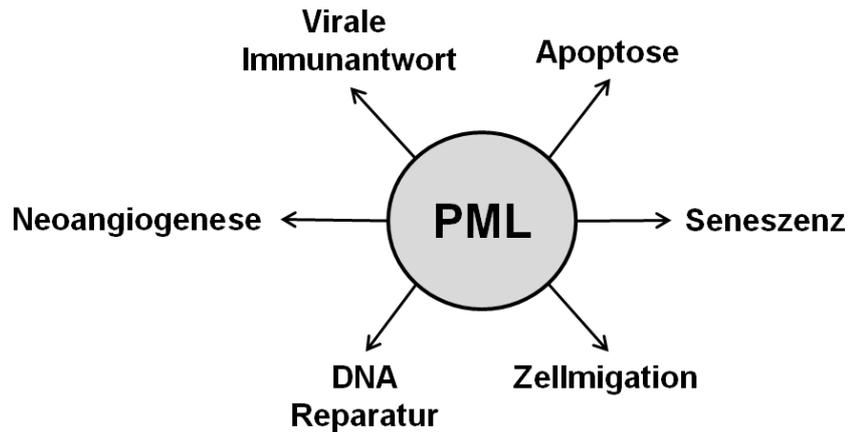


Abbildung 10: Zelluläre Funktionen von PML.

PML-NBs sind in nahezu jedem humanen Gewebe zu finden. Ihre Aktivität kann durch oxidativen Stress, virale Infektionen oder anderen Auslösern induziert werden (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2010; Muratani et al., 2002), wobei eine Veränderung der Anzahl, Größe und auch Proteinzusammensetzung der PML-NBs in Abhängig der Art des zellulären Stresses zu beobachten ist (Bernardi and Pandolfi, 2007; Dellaire and Bazett-Jones, 2004). Neben ribosomalen Proteinen, Transkriptionsfaktoren, sowie -cofaktoren können auch Onkoproteine und virale Proteine mit den PML-NBs assoziieren (Hofmann and Will, 2003). Die Diversität der PML-Aktivität ist in erster Linie mit der großen Anzahl an PML-Isoformen zu erklären. Alle Isoformen zeigen Übereinstimmungen im konservierten Bereich innerhalb der N-terminalen Domäne. In diesem Bereich sind in erster Linie Zinkfinger-Motive (RING-Motiv und 2 B-Boxen) lokalisiert (Nisole et al., 2005; Reymond et al., 2001). Zudem befindet sich auch die für die Protein-Protein-Interaktionen und die PML-Multimerisierung zuständige RBCC-Domäne im N-terminalen Bereich des Proteins. Der C-terminalen Bereich von PML variiert stark und ist für die Lokalisation von PML ins Cyto- bzw. Nukleoplasma verantwortlich.

Weiterführende *in vivo* Analysen konnten eine Tumorsuppressor-Funktion von PML aufzeigen (Bernardi et al., 2006; Salomoni and Pandolfi, 2002). So steigt die Anfälligkeit von PML-defizienten Mäusen gegen Infektionen deutlich an (Lunardi et al., 2011) und auch die Sensitivität PML-defizienter Mäusen gegenüber physisch oder chemisch induzierter Karzinogenese ist deutlich erhöht (Wang et al., 1998b). Die verminderte Expression von PML in einer Vielzahl von Tumoren (Gurrieri et al., 2004) und auch die Korrelation der PML-Expression mit Tumorrekurrenz, p53-Mutationen und

schlechter Prognose (Carracedo et al., 2012) bestätigen dieses Protein als Tumorsuppressor.

Ein weiteres wichtiges Merkmal von PML ist die Beteiligung an Cytokin-vermittelten Signalwegen. Hierbei konnte zum Einen gezeigt werden, dass die Expression von PML durch alle drei Interferon (IFN)-Subtypen (α , β und γ) induziert wird und dass dies zu einer Zunahme der PML-NBs führt (Chelbi-Alix et al., 1995). Zudem wird die basale PML-Expression durch Interleukin-6 reguliert (Hubackova et al., 2012).

Auf der anderen Seite zeigt sich, dass auch PML für die Cytokine-vermittelte Signalweiterleitung von entscheidender Bedeutung ist. PML-defiziente Zellen zeigen eine Resistenz gegen verschiedene apoptotische Stimuli, wie beispielsweise γ -Strahlung oder CD95/Fas Induktion (Bernardi et al., 2008; Wang et al., 1998a), sowie eine Resistenz gegenüber der TNF- α (Wu et al., 2003) und auch TGF- β induzierten Apoptose (Lin et al., 2004).

PML spielt auch bei der TRAIL-vermittelten Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle. Hierbei zeigt sich, dass eine verminderte PML-Expression zu einer Blockierung der IFN- α vermittelten TRAIL-induzierten Apoptose führt (Crowder et al., 2005; Herzer et al., 2009). Zudem zeigt sich, dass die IFN- α vermittelte Induktion der TRAIL-Expression in primären Hepatozyten durch PML-Defizienz vollständig inhibiert werden kann (Herzer et al., 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung molekularer Mechanismen bei der HCC-Entstehung auf der einen Seite und die Identifikation medizinischer Parameter zur Prognose der Tumorrekurrenz und dem Überleben von HCC-Patienten nach der Lebertransplantation auf der anderen Seite. Hierbei sollte vor allem die Bedeutung des Apoptose induzierenden Liganden TRAIL auf die Entstehung und Progression des HCCs näher untersucht werden. Weiterhin sollte die Bedeutung des Tumorsuppressorproteins PML im Rahmen dieser Mechanismen näher charakterisiert werden:

1. Zunächst sollte analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der TRAIL-Expression und der Entstehung und Entwicklung des HCCs besteht. Hierbei sollte vor allem analysiert werden, ob eine Korrelation der TRAIL-Expression mit Patienten- und auch Tumorcharakteristika zu beobachten ist. Weiterführend sollte der Einfluss von TRAIL auf das Migrationsverhalten von Hepatomzellen untersucht und der prognostische Wert der TRAIL-Expression für die Tumorrekurrenz und das Überleben der Patienten ermittelt werden.
2. Im Folgenden sollte die TRAIL-Promotorregion auf mögliche Sequenzvariationen innerhalb regulatorischer Bereiche untersucht werden. Zudem sollte der Einfluss dieser Sequenzvariationen auf die Regulation der TRAIL-Expression geklärt werden.
3. Der Einfluss des Tumorsuppressors PML auf die Regulation der TRAIL-Expression sollte ebenfalls analysiert werden. Hierbei sollte zudem der Einfluss von PML auf die nicht-induzierte HCV-assoziierte Hepatokarzinogenese im *in vivo* Modell unter Verwendung von HCV-transgenen (HCV^{+/+}) oder PML-defizienten (PML^{-/-}) Mäusen näher charakterisiert werden.
4. Weiterführend erfolgten Untersuchungen zu klinischen Parametern mit prädiktive Wert für die HCC-Rekurrenz und das Überleben von HCC-Patienten nach der Lebertransplantation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav 2540 EL und Systec VX-150	Systec GmbH, Wettenberg
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
CO2 Inkubatoren Hera Cell	Heraeus, Hanau
CO2 Inkubatoren Heraeus BB15	Thermo Scientific
E-BOX VX2 Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese-Kammer	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe
ELISA Reader ELx808	BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall
Feinwaage AT261 DeltaRange	Mettler Toledo, Giessen
Fusion FX-advanced	Vilber Lourmat, Eberhardzell
HYBAID OmniGene Heizblock	Thermo HYBAID GmbH, München
GeneTitan® Instrument	Affimetrix
Inkubationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific/Eppendorf, Hamburg
Inverses Gewebekulturmikroskop TMSF	Nikon GmbH, Düsseldorf
LaminAir®	Heraeus, Hanau
Luminometer Fluorostar Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mini-PROTEAN® Tetra cell	Bio-Rad, München
Multipette stream®	Eppendorf, Hamburg
Multipette® M4	Eppendorf, Hamburg
Peristaltikpumpe Masterflex 77200-50	Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten (research plus): 0,1-2,5µl, 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, elektrisch	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific
Schüttler Certomat TC3	B.Braun Biotech International, Melsungen
Sterilwerkbank (Biological Safety Cabinet Class II)	NuAir, Plymoth, USA
Stromquelle BioRad PowerPac 300 und PowerPac HD	Bio-Rad, München
SureCycler 8800 Thermal Cycler	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
Thermoblock Dri-Block DB-2A	Techne, Stone, Staffordshire, UK
TissueRuptor	Qiagen, Hilden
Trans-Blot®Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München

Waage MP-3000	Chyo Balance Corp., Komatsu, Japan
Wasserbad GLF und Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zählkammer Neubauer improved	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifugen 5810R, 5415R und 5424	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
15ml Falcon™ Röhren Polystyrene	Beckton Dickinson/ BD Bioscience, Heidelberg
15ml und 50ml Röhren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar 6-well und 24-well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Combitips advanced® Biopure 0,5ml, 5ml, 10ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Einwegskalpelle	Servoprax® GmbH, Wesel
Kryogefäße (2ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Microvette® 500	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mini-PROTEAN® TGX™ Gels 12% für Mini-PROTEN® Tetra cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Objektträger	Menzel GmbH & CO KG, Braunschweig
Parafilm™	American National Can, Greenwich, CT, USA
Hard-Shell® Low-Profil Thin-wall 96-well skirted PCR plates mit Microseal® 'B' Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Petrischale (Zellpräparationen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (0,1-10µl; 1-20µl; 10-100µl; 101-1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (20µl; 200µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
RNase ZapWipes	Ambion/Life technologies, Darmstadt
Safe Lock Reaktionsgefäße (0,5ml; 1ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Einwegpipetten, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml und 50 ml Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tissue Ruptor® Disposable probes	Qiagen, Hilden
Trans-Blot® Turbo™ PVDF-Membranen, mini und midi Format	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vakuum Filtrationssystem, 500 ml	Tpp, Schweiz
Zellkulturflaschen (75cm ³ und 175cm ³)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber, gelb	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zeta-Probe GT Membrane	Biorad
% Mini-Protean TBE Gel	

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien.

Substanz	Hersteller
Ampicillin	Sigma Aldrich
Bortezomib	Selleckchem
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA
DMEM	Gibco
DMEM (Pulver)	Invitrogen
DPBS	Gibco
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA
IFN- α 2a human	Sigma Aldrich
IFN- γ human	Sigma Aldrich
Ionomycin	Sigma Aldrich
LB-Agar (Pulver)	Sigma Aldrich
LB-Medium (Pulver)	Sigma Aldrich
MG-132	Selleckchem
Milchpulver	Sigma Aldrich
Natriumbicarbonat 7,5 %	Invitrogen
Phosphataseinhibitor (100x)	Thermo Scientific
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetat)	Sigma Aldrich
Proteaseinhibitor (EDTA free)	Roche
Qiazol	Qiagen
SAHA (N-hydroxy-N'-phenyl-octanediamid)	Sigma Aldrich
TBE (10x)	Gibco
TGF- β human	Sigma Aldrich
TGS (10x)	Biorad
Trypsin-EDTA	PAA
PageRuler Prestained Protein adder	Thermo Scientific
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Life Technologies
Lane Marker Sample Buffer	Thermo Scientific
GenePilot 1 kb Plus Ladder	Qiagen
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe/Konzentration
RIPA	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Natrium Deoxycholate, 1 % NP-40, Protease-Inhibitor, Phosphatase-Inhibitor
TBE (10x) Ultra Pure™	Gibco
TBS	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6
TBST	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,6
Genotypisierungspuffer 1	25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA
Genotypisierungspuffer 2	40 mM Tris-HCl, pH 5,5
Stripping buffer	200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 1 % Tween-20, pH 2,2
TGX (10x)	Biorad
Roti@-Histofix 4,5 %	Roth
Hypotonischer Waschpuffer	10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10% NP-40
Extraktionspuffer	20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol

2.1.5 Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
FastAP Thermosensitive Alkaline phosphatase	Thermo Scientific
FastDigest BamHI	Fermentas
FastDigest HindIII	Fermentas
FastDigest KpnI	Fermentas
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Herstellernachweis	Hersteller	Verdünnung im Western Blot
Primäre Antikörper			
PML	PML (H-238) Rabbit pAb	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Sekundäre Antikörper			
anti-rabbit	Goat anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling	1:5.000
Ladungskontrolle			
β-Aktin	β-Aktin (13E5) Rabbit mAb (HRP-Conjugate)	Cell Signaling	1:10.000

2.1.7 Kompetente Zellen

Tabelle 7: Verwendete kompetente Zellen.

Bezeichnung	Hersteller
<i>E. coli</i> K12 JM109 Competent Cells	Sigma

2.1.8 Vektoren

Tabelle 8: Verwendete Vektoren.

Vektor	Hersteller	Antibiotikaresistenz
pGL3-Basic	Promega	Ampicilin
pGL3-Control	Promega	Ampicilin
pRL-SV40	Promega	Ampicilin
pEGFP-C3-PML-I	(Weidtkamp-Peters et al., 2008; Xu et al., 2005)	Kanamycin
pEGFP-C3-PML-II	(Weidtkamp-Peters et al., 2008; Xu et al., 2005)	Kanamycin
pEGFP-C1-PML-III	(Weidtkamp-Peters et al., 2008)	Kanamycin
pEGFP-C1-PML-IV	(Fagioli et al., 1992; Weidtkamp- Peters et al., 2008)	Kanamycin
pEGFP-C1-PML-V	(Weidtkamp-Peters et al., 2008; Xu et al., 2005)	Kanamycin
pEGFP-C1-PML-VI	(Weidtkamp-Peters et al., 2008)	Kanamycin

2.1.9 Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Herstellernachweis	Kulturbedingungen
HepG2	ATCC	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep; 37 °C; 5 % CO ₂
Huh7	ATCC	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep; 37 °C; 5 % CO ₂
Hep3B	DSMZ	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep; 37 °C; 5 % CO ₂

2.1.10 Kits

Tabelle 10: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Herstellernachweis
3' IVT Express Kit	Affimetrix
Amersham ECL Primer Western Blotting detection Reagent	GE Healthcare
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega
GeneTitan® Wash Buffers A and B Module	Affimetrix
GeneTitan™ Hybridization, Wash, and Stain Kit for 3' IVT Arrays	Affimetrix
HotStar Taq Plus Master Mix Kit	Qiagen
LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit	Pierce
miRNAeasy Mini Kit	Qiagen
Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit	Thermo Scientific
Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit	Thermo Scientific
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
RNase A (100 mg/ml; 7000 Units/ml)	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

2.2 Methoden

2.2.1 Humanes Gewebe

Für die Analyse der TRAIL-mRNA-Expression sowie der TRAIL-Promotorsequenz im Lebergewebe von HCC-Patienten wurde Lebergewebe zu Verfügung gestellt welches im Rahmen von Leberteilresektionen oder Lebertransplantationen gewonnen wurde. Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis dazu erteilt, dass Teile ihrer Gewebeproben zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden dürfen. Alle Daten, die im Zusammenhang mit Patientendaten oder -material gewonnen wurden, werden ausschließlich in anonymisierter Form veröffentlicht. Die Vorgehensweisen befinden sich im Einklang mit der revidierten Deklaration von Helsinki von Oktober 2000.

2.2.2 Tiermodell und operative Techniken

2.2.2.1 Verwendete Mausstämme

Der Einfluss der PML-Defizienz wurde in homozygoten Pml^{tm1Ppp} Mäusen (Wang et al., 1998a) mit B6/C3H/129 Mischhintergrund untersucht, die im Folgenden als $PML^{-/-}$ Mäuse bezeichnet werden. Die Untersuchungen zur Auswirkungen von HCV auf die Hepatokarzinogenese erfolgten in homozygoten $Tg(Alb1-HCVN)Sml$ Mäusen mit B6/C3H/129 Mischhintergrund, im Weiteren als $HCV^{+/+}$ Mäuse bezeichnet. In diesen Mäusen erfolgt sowohl eine Expression der Struktur-, als auch der Nicht-Struktur-Proteine des HCV, wodurch eine HCV-Infektion nachgestellt wird (Lerat et al., 2002). Um den Einfluss der PML-Defizienz auf die HCV-assoziierte HCC-Entstehung genauer charakterisieren zu können, wurden aus den oben beschriebenen Mausstämmen Tiere generiert, die sowohl eine homozygote PML-Defizienz aufweisen, als auch die Expression der HCV-Proteine, im Folgenden als $HCV^{+/+}PML^{-/-}$ Mäuse bezeichnet. Um den Einfluss des B6/C3H/129 Mischhintergrundes in die Ergebnisse mit einbeziehen zu können, wurden Mäuse mit demselben Hintergrund als Kontrollen (im Weiteren: Wildtyp, WT) verwendet. Die verwendeten Stämme sind in Tabelle 11 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 11: Verwendete Mausstämme.

	Name	Bezeichnung	Hintergrund	Literatur
Wildtyp	Wildtyp; WT		B6/C3H/129	
Transgen	HCV ^{+/+}	Tg(Alb1-HCVN)Sml	B6/C3H/129	(Lerat et al., 2002)
Transgen	PML ^{-/-}	Pmltm1Ppp	B6/C3H/129	(Wang et al., 1998a)
Transgen	HCV ^{+/+} PML ^{-/-}	Tg(Alb1-HCVN)Sml, Pmltm1Ppp	B6/C3H/129	Zentrales Tierlabor; Universitätsklinikum Essen

Alle Mäuse hatten durchgängig freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Die Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association“ (FELASA) durchgeführt. Die Mäuse am Universitätsklinikum Essen wurden unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet.

2.2.2.2 Organentnahme

Für die Leberentnahme der Versuchstiere erfolgte zunächst eine Narkotisierung der Mäuse mittels Isofluran mit anschließender Tötung der Mäuse durch Genickbruch. Die Leber der Versuchstiere wurde vollständig entnommen und zunächst durch makroskopische Inaugenscheinnahme auf pathologische Veränderungen untersucht. Anschließend erfolgte die Konservierung des Gewebes für Protein- und RNA-Analysen durch Schockfrostung in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80 °C. Das Gewebe für histologische Untersuchungen wurde in PBS-gepuffertem 4,5 %igem Paraformaldehyd fixiert.

2.2.2.3 Histologie

Alle histologischen (Hämatoxylin-Eosin- (H/E)-Färbung) und immunhistologischen (Ki67-Färbung) Untersuchungen wurde von Frau Dorothe Möllmann aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Baba am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Das zuvor für mindestens 24 h in 4,5% Paraformaldehyd fixierte Lebergewebe wurde mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit Xylol durchtränkt, anschließend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Die 1-3µm starke Schnitte wurden mittels Schlittenmikrotom aus den Paraffinblöcken angefertigt und auf Objektträger fixiert.

Die routinemäßig durchgeführte H/E-Färbung färbt verschiedenste Strukturen im Gewebe an. Hierbei wurden alle basophilen Strukturen (z.B. Zellkern/DNA und Ribosomen) blau, alle azidophilen Strukturen (z.B. Zytoplasmaproteine und Mitochondrien) rot gefärbt. Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst mittels Xylol entparaffiniert und mittels absteigender Ethanolreihe rehydriert. Anschließend erfolgte die Färbung zunächst in einer Hämalaun-Lösung und anschließend in der Eosin-Lösung. Abschließend wurden die Schnitte mittels aufsteigender Ethanolreihe dehydriert und in Histomount eingedeckt.

Für die Ki67-Färbung wurden die Schnitte ebenfalls mittels Xylol entparaffiniert und mittels absteigender Ethanolreihe rehydriert. Anschließend wurde die Hintergrundaktivität endogener Peroxidasen mittels H_2O_2 -Inkubation minimiert. Nach dem Blockieren der Schnitte erfolgte die Inkubation mit dem Ki67-spezifischen primären Antikörper. Nach der anschließenden Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-Konjugat) erfolgte die Detektion mittels DAB (3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid) und Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

2.2.2.4 Genotypisierung

Das Gewebe der Schwanzspitze (ca. 2 mm) wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 75 μ L Genotypisierungspuffer 1 bedeckt. Anschließend wurde das Gewebe für 1 h bei 98 °C lysiert. Nach Abkühlen wurden 75 μ L Genotypisierungspuffer 2 dazu gegeben und gemischt. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurden 2 μ L des Überstandes für die nachfolgende PCR verwendet.

Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte unter Verwendung des HotStar Taq Plus Master Mix Kits (Qiagen) und wurde nach Herstellerangaben, mit dem in Tabelle 12 angegebenen Protokoll durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 12: PCR-Protokoll für die Genotypisierung der verwendeten Mausstämme.

Schritt	Temperatur	Zeitintervall	
Primäre Aktivierung der Polymerase	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	35 Zyklen
Primer Annealing	58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	60 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Tabelle 13: PCR-Primer für die Genotypisierung der verwendeten Mausstämme.

Primer	Sequenz	PCR Produkt	Hybridisierungstemperatur
PML-R	ttggacttgcgctactgtc	PML WT: 410 bp PML <i>knockout</i> : 320 bp	58 °C
PML-F1	tttcagtttctgcgctgcc		58 °C
Neo1500	atcgcttctatcgcttcttgacgag		58 °C
NS4b-fwd	tattgcctgacaagaggcagtggttatc	NS4b WT: 410 bp NS4b transgen: 290 bp	58 °C
NS4b-rev	gatgaaattccacatgtgcttgcccag		58 °C
mFas1	tcccttaaacagcagtgctgtg		58 °C
mFas3	tagcaaacttaggcattaacagtg		58 °C

Nach der Amplifikation wurden 3 µL der PCR-Reaktion mit 1 µL Probenpuffer vermischt und auf ein 1 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Nach 1 stündiger Elektrophorese bei 60 Volt wurden die PCR-Produkte bei 312 nm detektiert. Die zu erwartenden Größen sind in Tabelle 13 angegeben.

2.2.3 Zellkulturmodell

2.2.3.1 Verwendete Hepatomzelllinien und deren Kultivierung

Die verwendeten Hepatomzelllinien Huh7, HepG2 und Hep3B sowie die Hepatoblastomzelllinie Huh6 wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FCS unter Verwendung der Antibiotika Penicillin (1 % v/v) und Streptomycin (1 % v/v) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Die Passagierung der Zellen folgte zweimal wöchentlich. Hierfür wurden die Zellen zunächst zweimal mit 10 mL DPBS gewaschen und anschließend mit 2 mL Trypsin-EDTA Lösung durch 5-10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur abgelöst. Darauf folgend wurden die Zellen mit 8 mL Zellkulturmedium verdünnt und in einem Verhältnis von 1:4 in eine neue 75 cm² Zellkulturflaschen mit 12 mL Zellkulturmedium überführt.

2.2.3.2 In vitro Stimulationen von Hepatomzelllinien

Für *in vitro* Analysen wurden die Zelle zunächst wie unter 2.2.3.1 beschrieben gewaschen und abgelöst. Nach Verdünnung der Zellen mit 8 mL Zellkulturmedium wurden die Zellen mittels Neubauer Zählkammer gezählt und in gewünschter Zellzahl in die Zellkulturplatten überführt. Die verwendeten Zellzahlen, wie auch die entsprechenden Gesamtvolumen sind in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellkulturplatte aufgeführt (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete Zellzahlen und Volumina für *in vitro* Experimente

Kulturplatten Formal	Verwendete Zellzahl	Verwendetes Gesamtvolumen
96er Lochplatte	2×10^4	100 μ L
24er Lochplatte	1×10^5	500 μ L
12er Lochplatte	$2,5 \times 10^5$	1 mL
6er Lochplatte	1×10^6	2 mL

2.2.3.3 Transfektion von Hepatomzelllinien mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in Hepatomzelllinien wurden die Zelle zunächst in eine 6er-Lochplatte (vgl. Tabelle 14) ausgesät und bis zur vollständigen Anhaftung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Reaktionsgemisch für die Transfektion wurde aus 2 μ g des zu transfizierenden Plasmids, 200 ng des Kontrollplasmids und 7 μ L des Fugene HD Transfektionsreagenzes (Promega) in einem Gesamtvolumen von 100 μ L Medium (DMEM ohne FCS bzw. Antibiotika) angesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch vollständig zu den Zellen gegeben und diese für mindestens 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für Protein- oder RNA Analysen geerntet (vgl. 2.2.4.3, 2.2.8.1) oder entsprechend den Voraussetzungen des nachfolgenden Assays weiter behandelt.

2.2.3.4 Transfektion von Hepatomzelllinien mit siRNA

Für die RNA-Interferenz-Untersuchungen wurden die Zellen in 12er-Lochplatten ausgesät und nach vollständiger Anhaftung mit fertiger siRNA-Lösung (Qiagen) transfiziert. Die verwendeten siRNAs sind mit den eingesetzten Endkonzentrationen in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Verwendete siRNA Konstrukte für die *in vitro* Transfektion

Gen	Herstellernachweis	Zielsequenz	Eingesetzte Endkonzentration
Kontrolle	Ctrl_AllStars_1	-	25 nM
TRAIL	Hs_TNFSF10_2	AACACAAAGAACGACAA ACAA	25 nM
PML	Hs_PML_4	CTCCAAGATCTAAACCG AGAA	25 nM

2.2.3.5 Luciferase-Assay

Nach Transfektion von Huh7-Zellen mit den angegebenen Reportergenkonstrukten für 24 h, wurden die Zellen zweimal mit 1 mL DPBS (Gibco) gewaschen und mit 300 µL Trypsin-EDTA Lösung (Gibco) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 1 mL aufgefüllt. 50 µL der Zellsuspension wurden in eine 96er-Lochplatte ausgesät, bis zur vollständigen Anhaftung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach anschließender Stimulation der Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µL, wurden die Zellen auf Raumtemperatur abgekühlt und der Assay nach Herstellerangaben (Dual-Go® Luciferase Assay System, Promega) durchgeführt und ausgewertet.

2.2.3.6 Soft-Agar-Assay

Nach Transfektion der Huh7 Zellen für 48 h mit siRNA wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA Verdau abgelöst und gezählt (Neubauer-Zählkammer). Die Platten wurden durch Einbringen von 500 µL 0,5 %igen Basisagar (0,5 % Agar, in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) vorbereitet. Anschließend wurden 1x10⁴ Zellen 500 µL 0,35 %iger Agarose-Lösung (0,4 % Agar, in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und auf den erkalteten Basisagar aufgetragen. Danach wurden die Zellen mit 500 µL Medium überschichtet und für 21 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung inkubiert. Der Mediums Wechsel erfolgte 2-mal wöchentlich. Nach der Färbung mit 0,005 %iger Kristallviolett-Lösung für 1 h wurden die Zellen durch mikroskopisches Auszählen quantifiziert.

2.2.3.7 Migrations-Assay

Nach Transfektion der Huh7-Zellen für 48 h mit siRNA wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA Verdau abgelöst und gezählt (Neubauer-Zählkammer). Anschließend wurden 1×10^4 Zellen in 200 μL FCS- und Antibiotika-freiem Kulturmedium aufgenommen und in das Transwell (8,0 μm Porengröße) überführt. Das Zellkulturmedium in der unteren Kammer (500 μL) enthielt neben 1 %iger Penicillin/Streptomycin-Lösung auch 10 % FCS. Nach 24 stündiger Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 Begasung wurde das Transwell in PBS gewaschen und die Zellen für 2 h mit 500 μL Histofix (Roth) fixiert. Anschließend wurde das Transwell zweimal mit PBS gewaschen und für 15 min mit 0,005 %iger Kristallviolett-Lösung gefärbt. Die nicht-migrierten Zellen im Inneren des Transwells wurden durch sorgfältiges Abwischen der Membran mit einem Wattestäbchen abgelöst, sodass die migrierten Zellen an der Unterseite der Membran durch mikroskopisches Auszählen quantifiziert werden konnten.

2.2.4 Isolation und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.4.1 RNA Isolierung aus humanem Gewebe

Gewebestücke (ca. 30 mg) von explantierten Mäuselebern wurden in 2 mL Qiazol (Qiagen) überführt und mit Hilfe eines Ultra Turrax dispergiert. Darauf folgend wurde das Homogenisat in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 200 μL Chloroform vermischt. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 10000 rpm für 15 min und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 μL Isopropanol, wurde das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin bei 10000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend mit 1 mL Ethanol (75 %) gewaschen und erneut bei 7600 rpm für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde das Pellet in 100 μL H_2O resuspendiert. Zur weiteren Aufreinigung wurden 350 μL RLT-Puffer (RNeasy mini Kit, Qiagen) und 250 μL Ethanol (100 %) zu gegeben und das Gemisch auf eine RNeasy mini Column (RNeasy mini Kit, Qiagen) überführt. Nach 15 sekundiger Zentrifugation bei mindestens 10000 rpm wurde der Durchfluss

verworfen. Dann wurden 500 µL RPE-Puffer (RNeasy mini Kit, Qiagen) auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei mehr als 10000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden erneut 500 µL RPE-Puffer auf die Säule gegeben und für 2 min bei mehr als 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Röhrchen gestellt und bei mehr als 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und die RNA mit 100 µL H₂O durch Zentrifugation bei mehr als 10000 rpm für 1 min eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 RNA Isolierung aus murinem Gewebe

Gewebestücke (ca. 30 mg) von explantierten Mäuselebern wurden in 700 µL kaltem Qiazol (miRNeasy mini Kit, Qiagen) überführt und mit Hilfe eines Ultra Turrax dispergiert. Es erfolgte eine fünfminütige Inkubation des Homogenisats bei Raumtemperatur und anschließender Zugabe und Vermischung mit 200 µL Chloroform. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 10000 rpm für 15 min und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 525 µL Ethanol wurde das Gemisch auf eine RNeasy mini Column (miRNeasy mini Kit, Qiagen) überführt. Nach 15 sekundiger Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Durchfluss verworfen, 350 µL RWT-Puffer (miRNeasy mini Kit, Qiagen) auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei mehr als 10000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden 80 µL DNase Reaktionslösung (10 µL DNase I + 70 µL RDD Buffer; RNase free DNase Set, Qiagen) auf die Membran pipettiert und die Säule für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule erneut mit 350 µL RWT-Puffer gewaschen und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 µL RPE Puffer gewaschen und bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule durch 2 minütige Zentrifugation bei 10000 rpm getrocknet. Die Säule wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 30 µL RNase freiem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 RNA-Isolation aus der Zellkultur

Nach dem Entfernen des Mediums und dem Waschen der Zellen mit DPBS wurden diese mit 350 µL RLT Plus-Puffer (RNeasy mini kit, Qiagen) pro 3,9 cm² Kulturfläche lysiert. Die nachfolgende RNA-Isolierung erfolgte vollständig nach dem im RNeasy mini Kit (Qiagen) angegebenen Protokoll.

2.2.4.4 Isolierung der genomischen DNA aus humanem Gewebe

Gewebestücke (ca. 25 mg) von explantierten Lebern wurden mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke zerteilt und in ein Reaktionsgefäß mit 180 µL ALT Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) überführt. Nach erfolgter Zugabe von 20 µL Proteinase K wurde so lange bei 56 °C inkubiert, bis die Gewebestücke vollständig lysiert waren. Nach Zugabe von 4 µL RNase A wurde für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach dem im QIAamp DNA Mini Kit angegebenen Protokoll (DNA Isolierung aus Gewebe) fortgefahren.

2.2.4.5 Gesamt-DNA-Isolierung aus der Zellkultur

Nach dem Entfernen des Mediums und dem Waschen der Zellen mit DPBS wurden diese mit 200 µL Trypsin-EDTA Lösung gelöst, in 1 mL Medium resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 5000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet anschließend in 200 µL DPBS resuspendiert. Nach Zugabe 20 µL Proteinase K und 4 µL RNase A (Qiagen), wurden 200 µL AL Puffer (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) dazu gegeben und 15 sec gemischt. Die nachfolgende DNA-Isolierung erfolgte vollständig nach dem im (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) angegebenen Protokoll zur Isolierung genomischer DNA aus Blut.

2.2.4.6 Quantitative *real-time* PCR

Experimentelles Vorgehen

Die Quantifizierung der Genexpression der angegebenen Gene erfolgte mittels *One-Step-reverse-Transkriptase-real-time-PCR*. Um Kontaminationen durch genomische DNA ausschließen zu können, wurden die Primer (vgl. Anhang 2) so gewählt, dass

sich die Bindung über die Grenze zwischen zwei Exons erstreckte und somit ein Intron überspannt.

Für eine Reaktion von 15 µL Gesamtvolumen im 96er-Lochplattenformat wurden 2 µL RNA (2.2.4.1, 2.2.4.2, 2.2.4.3) mit einer maximalen Menge von 50 ng eingesetzt. Die weitere Handhabung erfolgte nach Herstellerangaben (QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit, Qiagen). Zur Qualitätskontrolle der RT-PCR Ergebnisse wurden im Anschluss an die Reaktion grundsätzlich primerspezifische Schmelzkurvenprofile der Produkte erstellt (vollständiges Program vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16: Vollständiges RT-PCR Programm der Genexpressionsanalyse mittels QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kits.

Schritt	Temperatur	Zeitintervall	
reverse Transkription	50 °C	10 min	
Primäre Aktivierung der Polymerase	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	10 sec	40 Zyklen
Primer Annealing/Elongation	60 °C	30 sec	
Schmelzkurve	ΔT = -0,5 °C pro min (95 °C – 60 °C)		95 Zyklen

Erstellung von primerspezifischen Eichgeraden

Zur Erstellung der primerspezifischen Eichgeraden wurde zunächst eine RT-PCR Reaktion einer unbehandelten Kontrollprobe wie unter 2.2.4.6 beschrieben mit den spezifischen RT-PCR Primern (vgl. Anhang 2) durchgeführt. Anschließend wurden die primerspezifischen PCR-Produkte aufgereinigt (Qiaquick PCR Purification Kit) und die Konzentration mittels Absorption bei 280 nm bestimmt. Anhand der unten stehenden Formel wurde anschließend die Kopienzahl des primerspezifischen PCR-Produktes pro Volumeneinheit berechnet:

Formel 1: Kopienzahlbestimmung der PCR-Produkte

$$(Formel 1) \quad \text{Kopienzahl} \left[\frac{1}{\mu\text{L}} \right] = \frac{C_{\text{PCR-Produkt}} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right]}{M_{\text{PCR-Produkt}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} \times N_A \times 10^6$$

Nachfolgend wurde eine Verdünnungsreihe der primerspezifischen PCR-Produkte ausgehend von einer maximalen Endkonzentration von 1×10^8 Kopien/Reaktion bis hin

zu einer Minimalkonzentration von 1×10^0 Kopien/Reaktion hergestellt und im Anschluss mit den PCT-Produkt spezifischen Primern mittels quantitativer *real-time* PCR nach Herstellerangaben durchgeführt (QuantiFast SYBR Green PCR Kit). Die Berechnung der Eichkurven erfolgte mittels gerätespezifischer Software (Biorad CFX Manager). Die Achsenabschnitte sowie die Steigungen der so berechneten Eichgeraden sind in Anhang 2 aufgeführt.

Auswertung

Die Auswertung der RT-PCR Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der unter 2.2.4.6 ermittelten Geradengleichungen. Hierfür wurde zunächst die Kopienzahl des primerspezifischen PCR-Produktes der jeweiligen Probe bestimmt:

Formel 2: Kopienzahlbestimmung der RT-PCR-Produkte

$$\text{(Formel 2)} \quad \text{Kopienzahl} = 10^{\left(\frac{\text{Ct} - \text{Achsenabschnitt der Eichgerade}}{\text{Steigung der Eichgerade}}\right)}$$

Anschließend erfolgte die Normierung der Kopienzahl des jeweiligen Zielgens auf die Kopienzahl von β -Aktin. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Genexpression der Zielgene prinzipiell pro 1×10^6 Kopien β -Aktin angegeben:

Formel 3: Bestimmung der Genexpression des Zielgens

$$\text{(Formel 3)} \quad \text{Genexpression}_{\text{Zielgen}} = \frac{\text{Kopienzahl}_{\text{Zielgen}}}{\text{Kopienzahl}_{\beta\text{-Aktin}}} \times 10^6$$

Die Unterschiede innerhalb der Genexpression der Zielgene nach Stimulation der Zellen wurden mit Hilfe der Berechnung des *Fold Change* nach unten stehender Formel ermittelt:

Formel 4: Bestimmung des *Fold Change* nach Stimulation

$$\text{(Formel 4)} \quad \text{Fold Change}_{\text{stimulation}} = \frac{\text{Genexpression}_{\text{stimulation}}}{\text{Genexpression}_{\text{ohne Stimulation}}}$$

2.2.5 Amplifikation der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe

Die Amplifikation der TRAIL-Promotorregion aus genomischer DNA erfolgte unter Verwendung des HotStar Taq Plus Master Mix Kits (Qiagen) und wurde nach Herstellerangaben, mit dem in Tabelle 17 angegebenen Protokoll durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 17: PCR-Protokoll zur Amplifikation der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe.

Schritt	Temperatur	Zeitintervall	
Primäre Aktivierung der Polymerase	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	40 Zyklen
Primer Hybridisierung	60 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Tabelle 18: PCR-Primer zur Amplifikation der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe.

Bezeichnung	Sequenz	PCR Produkt	Hybridisierungstemperatur
TP fw5 TP bw 1/4	cttgacctgacccccgagata cccacagagaaaggaagcag	2317 bp	60 °C

2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der TRAIL-Promotorregion erfolgte in vier Abschnitten mit den in Tabelle 19 angegebenen Primern und wurde von der Firma MWG Operon durchgeführt.

Tabelle 19: PCR-Primer zur Sequenzierung der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe.

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungstemperatur
TP fw3	tccactgccagaaactctga	60 °C
TP fw4	ggcatgttcttctgtaggg	60 °C
TP fw5	cttgacctgacccccgagata	60 °C
TP bw seq	gctactgtgagggtgggaag	60 °C

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die vier Sequenzabschnitte der jeweiligen Proben mittels Alignment (ApE: Another PLasmid Editor) zusammengefügt.

Die nachfolgende Sequenzanalyse erfolgte *in silico* mittels multiplen Alignements (BioEdit), und der Untersuchung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TRANSFAC).

2.2.7 *Electron Mobility Shift Assay (EMSA)*

2.2.7.1 Isolation der Kernproteine

Für die Extraktion der Kernproteine wurden Huh7 Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % in 10 cm² Zellkulturschalen kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit 500 IU/mL IFN- α oder 1000 U/mL IFN- γ in Zellkulturmedium, zusätzlich wurden unbehandelte Huh7 Zellen als Kontrolle mitgeführt. Nach 6 h Inkubation der Zellen wurden diese mittels Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und durch 5 minütige Zentrifugation bei 500 xg geerntet. Die Isolation der Kernproteine erfolgte zunächst durch die Resuspension des Zellpellets in kalter CER I-Lösung. Hierbei wurde das Verhältnis des Zellpelletvolumen zur CER I-: CER II-: NER-Lösung von 20:200:11:100 μ L eingesetzt. Anschließend wurde die Suspension gevortext und 10 v auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe der CER II-Lösung wurde erneut gevortext, für 1 min auf Eis inkubiert, gevortext und die Suspension für 5 min bei 13000 xg und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in kalter NER-Lösung aufgenommen. Anschließend erfolgte eine 40 minütige Resuspension durch abwechselndes vortexen für 15 Sekunden und 10 minütiger Inkubation auf Eis. Abschließend wurde die Lösung für 10 min bei 13000 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.7.2 *Electron mobility shift assay (EMSA)*

Für den EMSA wurden Einzelstrangoligonukleotide synthetisiert (MWG Operon), die einen 49 bp langen Sequenzbereich umspannen mit der GATA-1^{T/T} oder GATA-1^{T/C} Sequenzvariation in der Mitte der Sequenz. Zudem erfolgte die Markierung der Einzelstrangoligonukleotide mit Biotin am 5'-Ende. (GATA-1^{T/T}: 5'BIO-cttaaatgtagactcattacagaTagaaggcaagggcaggaagtgatg-3', reverse: 5'-

catcacttctgcccttgcccttctAtc tgtaaagtacgtctacatttaag-3'; GATA-1^{T/C}: 5'BIO-
cttaaagttagactcatttacagaCagaaggcaaggg caggaagtgatg-3', reverse: 5'-
catcacttctgcccttgcccttctGtctgtaaagtacgtctacatttaag-3'). Für die Ausbildung der
doppelsträngigen Sonden, erfolgte die Inkubation der markierten
Einzelstrangoligonukleotide mit komplementären nicht markierten
Einzelstrangoligonukleotiden für 10 min bei 100 °C unter anschließender langsamer
Abkühlung auf 4 °C.

Der EMSA wurde unter Verwendung von 100 fmol der entsprechenden Biotin-
markierten Sonden mit Hilfe des LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit (Pierce)
durchgeführt. Dabei wurden die unter Tabelle 20 angegebenen Reaktionsbedingungen
verwendet.

Tabelle 20: Reaktionsbedingungen der EMSAs.

	GATA-1 ^{T/T}		GATA-1 ^{T/C}		GATA-1 ^{T/T} - Kernprotein		GATA-1 ^{T/C} - Kernprotein	
	ohne Inhibitor	ohne Inhibitor	ohne Inhibitor	mit Inhibitor	ohne Inhibitor	mit Inhibitor	ohne Inhibitor	mit Inhibitor
Binding buffer	2	2	2	2	2	2	2	2
DNA (10µM)	0	0	0	2	0	2	0	2
bio-DNA (50 nM)	2	2	2	2	2	2	2	2
Kernproteine	0	0	3	3	3	3	3	3
H ₂ O	16	16	13	11	13	11	13	11

Nach 20 minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 5 µL des nicht-denaturierenden
Ladepuffers (LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit) und die Auftragung von 20 µL
des Reaktionsansatzes auf ein 5% Mini-Protean TBE Gel (Biorad). Die SDS-Page
erfolgte bei 100 V für ca. 1 h mit Hilfe des Mini-PROTEIN®Tetra Cell Systems (Biorad).
Parallel erfolgte die Aktivierung der Membran (Biorad) in 0.5x TBE (Gibco) für 15 min.
Der Transfer erfolgte mit Hilfe des TransBlot®TurboTM-System bei 25 V und 1,5 A für
7 min. Anschließend wurde die Membran durch Inkubation im UV-Licht fixiert (E-BOX
VX2 Geldokumentationssystem, PeqLab). Für die Blockierung der Membran erfolgte
eine 15 minütige Inkubation in Blocking Puffer (LightShift® Chemiluminescent EMSA
Kit) gefolgt von der Inkubation mit dem Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroxidase
Konjugat (LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit) mit einer Verdünnung von 1:1000
in Blocking Puffer. Anschließend wurden die Membranen unter Verwendung des
Waschpuffers (LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit) viermal gewaschen und in
Equilibrierungspuffer für 15 min inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Amersham ECL

Primer Western Blotting detection Reagent (Pierce) am Fusion FX-advanced (Vilber Lourmat).

2.2.8 Isolation und Analyse von Proteinen

2.2.8.1 Gesamt-Protein-Isolation aus der Zellkultur

Nach dem Entfernen des Mediums und dem Waschen der Zellen mit kaltem PBS, wurden die Zellen mit 50 μL kaltem RIPA-Puffer pro 9,6 cm^2 Kulturfläche lysiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturfläche abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zelllysate für 5 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bicinchoninsäure- (BCA) Assay. Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurden die Zelllysate (2.2.8.1) auf Eis aufgetaut. Weiterhin wurde eine Konzentrationsreihe mit BSA (0 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL und 2 mg/mL) aus einer 10 mg/mL BSA-Stocklösung (in ddH₂O) hergestellt.

Das Reaktionsgemisch wurde wie nach Herstellerangaben durch Zugabe von einem Teil Reaktionslösung B zu 50 Teilen Reaktionslösung A erzeugt und zu jeweils 200 μL pro Vertiefung einer 96er-Lochplatte verteilt. Dann wurden 2 μL Zelllysate + 8 μL ddH₂O bzw. 10 μL der BSA Konzentrationsreihe hinzu gegeben und der Assay für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 526 nm gemessen und anhand der Absorptionen der Konzentrationsreihe eine Standardgerade berechnet. Die Kalkulation der Probenkonzentration erfolgte durch Einsetzen der Absorptionswerte nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors in die Gleichung.

2.2.8.3 SDS-Page und Westernblot

In der Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE) erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel. Dies erfolgt zunächst durch die Anlagerung von Natriumdodecylsulfat (SDS) an das Proteinerückgrat proportional zur Anzahl der Peptidbindungen. Auf diese Weise wird die proteineigene Polarität überdeckt und die Proteine wandern im elektrischen Feld proportional zu ihrer Größe zur Anode (Weber and Osborn, 1969).

Für die SDS-Page wurden 30 µg des Zelllysates eingesetzt und mit Probenpuffer (Lane Marker Sample buffer) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben sowie die verwendeten Größenstandards (MagicMark, Page Ruler) in die Taschen der Gele (Mini-Protein-TGX precast Gels, Biorad) geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 60 min in TGS-Puffer im Mini-PROTEIN®Tetra Cell System (Biorad).

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran überführt. Hierbei wurde das "semi-dry" Verfahren mit dem TransBlot®Turbo™-System mit den entsprechenden TransBlot®Turbo™Midi PVDF Transferpacks (Biorad) nach Herstellerangaben angewendet. Der Transfer erfolgte bei 2,5 Ampere für 7 min.

Anschließend wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Milchpulver geblockt (5 % Milchpulver in TBST), um die Entstehung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Membran zu minimieren. Die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern erfolgte mit den unter 0 angegebenen Verdünnungen in BSA-Lösung (5 % BSA in TBST) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min mit TBST gewaschen und für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper in BSA-Lösung (5 % BSA in TBST) bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal für 15 min mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Amersham ECL™-Westernblotting Detection Reagent (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Für die Detektion der Beladungskontrolle β-Aktin erfolgte die Inkubation der Membran mit der unter Tabelle 7 angegebenen Verdünnung des Antikörpers in BSA-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur gefolgt von der Detektion.

2.2.9 Klonierung

2.2.9.1 Klonierung der vollständigen TRAIL-Promotorregion aus verschiedenen Hepatomzelllinien

Zunächst erfolgte die Klonierung von Reportergenkonstrukten mit der TRAIL-Promotorregion aus den Hepatomzelllinien HepG2 und Huh7. Hierfür wurde zunächst die TRAIL-Promotorregion aus genomischer DNA der Zelllinien amplifiziert, die verwendeten Primer sind in Tabelle 21 aufgeführt. Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 22 angegebenen Protokoll.

Tabelle 21: PCR-Primer zur Klonierung der TRAIL-Promotorregion aus Hepatomzelllinien.

Bezeichnung	Sequenz	PCR Produkt	Hybridisierungstemperatur
TP fw KpnI	gcgcggtaccggttatcctactcatcttc	1825 bp	60 °C
TP bw HindIII	gcgcaagcttctctgtcagagtctgactgc		

Tabelle 22: PCR-Protokoll zur Klonierung der TRAIL-Promotorregion aus Hepatomzelllinien.

Schritt	Temperatur	Zeitintervall	
Primäre Aktivierung der Polymerase	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	40 Zyklen
Primer Annealing	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Die Aufreinigung der PCR Produkte erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Für den nachfolgenden Restriktionsverdau wurden 200 ng des aufgereinigten PCR-Produktes mit je 1 µL der Restriktionsenzyme KpnI und HindIII sowie 2 µL des FasDigest Buffers in einem Gesamtvolumen von 30 µL geschnitten. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Nach anschließender Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C für 5 min erfolgte erneut eine Aufreinigung (QIAquick PCR-Purification Kit).

Der Restriktionsverdau des Zielvektors pGL3 Basic (Promega) erfolgte ebenfalls bei 37 °C. Hierbei wurde 1 µg des Plasmids mit jeweils 1 µL der Restriktionsenzyme (KpnI und HindIII), 1 µL Alkalischer Phosphatase und 2 µL FasDigest Buffers in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 60 min inkubiert. Nach anschließender

Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C für 20 min wurde erneut eine Aufreinigung (QIAquick PCR-Purification Kit) durchgeführt.

Die Ligation der TRAIL-Promotorregionen in den Zielvektor pGL3Basic erfolgte mittels T4 DNA Ligase. Hierbei wurden 200 ng des linearisierten und dephosphorilierten pGL3 Basic Vektor mit dem fünffachen an Insert (molares Verhältnis 5:1 zum Vektor), 2 µL T4 DNA Ligase Puffer und 1 U T4 DNA Ligase über Nacht in einem Gesamtvolumen von 20 µL bei 4 °C inkubiert und bis zur Transformation in *E. coli* bei -20 °C gelagert.

2.2.9.2 Einführung einer Punktmutation in die TRAIL-Promotorregion

Die GATA-1^{T/C} Sequenzvariation wurde mittels gerichteter Punktmutagenese in den TRAIL-Promotor eingeführt. Dies erfolgte mit dem Phusion Site-directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific). Als Templat diente der pGL3 Basic Vector mit der Promotor Region von TRAIL aus Huh7 Zellen. Die PCR erfolgte nach Herstellerangaben mit 5 ng Templat, 0,5 µM Primern, 200 µM dNTPs und einer Polymeraseaktivität von 0,02 U/mL mit dem in Tabelle 23 beschriebenen Protokoll. Die für diese Reaktion verwendeten Primer sind in Tabelle 24 angegeben.

Tabelle 23: PCR-Protokoll für Erstellung von Punktmutationen innerhalb der TRAIL-Promotorregion.

Schritt	Temperatur	Zeitintervall	
Primäre Aktivierung der Polymerase	98 °C	1 min	
Denaturierung	98 °C	30 sec	25 Zyklen
Primer Annealing	66 °C	1 min	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Tabelle 24: PCR-Primer Einführung einer Punktmutation in die GATA-1 Bindungsstelle innerhalb der TRAIL-Promotorregion.

Bezeichnung	Sequenz	Hybridisierungstemperatur
M-TP GATA fw	5'-PHO-aggaaagtgatggtagaccagc	60 °C
M-TP GATA-1 bw	5'-PHO-gcccttgccctctgctgtaaagag	60 °C

Die Zirkulation des linearen PCR-Produktes erfolgte direkt im Anschluss an die PCR-Reaktion mittel Quick T4 DNA Ligase (Phusion Site-directed Mutagenesis Kit). Hierzu

wurden 5 µL des PCR-Produktes eingesetzt und die Reaktion nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.9.3 Erstellung von Reportergenkonstrukten mit repetitiven GATA-1^{T/T} bzw. GATA-1^{T/C} Sequenzvariation

Für die Klonierung der Reportergenkonstrukten mit repetitiver GATA-1^{T/T} bzw. GATA-1^{T/C} Sequenzvariation wurden synthetische DNA-Fragmente verwendet (Anhang 5), die in den pGL3 Basic Vektor eingeführt wurden. Die Synthese der beiden Inserts wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt. Die unter Anhang 5 gezeigten Sequenzen wurden in dem Vektor pMA-RQ zu Verfügung gestellt (Anhang 4). Durch die Flankierung der Inserts mit Bindungsstellen für die Restriktionsenzyme KpnI und HindIII konnten die Inserts aus den Plasmiden isoliert werden. Hierfür wurde zunächst 1 µg des jeweiligen Plasmids mit 1 µL der Restriktionsenzyme KpnI und HindIII und 2 µL des FasDigest Buffers in einem Gesamtvolumen von 30 µL geschnitten. Dies erfolgte bei 37 °C für 30 min. Nach anschließender Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C für 5 min folgte eine Aufreinigung der Inserts mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion (Qiaquick Gel Extraction Kit). Die Ligation in den pGL3 Basic Vektor wurde, wie bereits unter 2.2.9.1 beschrieben, mittels T4 DNA Ligase erreicht.

2.2.10 Transformation in *Escherichia coli* (*E. coli*)

Die Transformation der Ligationsreaktion erfolgte in den Laborstamm *E. coli* K12 JM109. Hierfür wurden zunächst 50 µL Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 µL der jeweiligen Ligationsansätze vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 45 sekündiger Hitzeschock bei 37 °C. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis, wurden 500 µL auf Raumtemperatur gebrachtes S.O.C. Medium zu den Zellen gegeben und diese für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 10000 rpm für 3 min pelletiert, das überschüssige Medium abgenommen und die Zellen erneut in 50 µL S.O.C. Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/mL) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.11 Plasmidisolierung

Nach erfolgreicher Transformation wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 mL LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 rpm für 10 min pelletiert und das Medium abgenommen. Die Plasmidisolierung wurde mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Überprüfung der isolierten Plasmide erfolgte mittels Sequenzierung. Die Sequenzierung erfolgte im DNA-Sequenzierservice des Institutes für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen mit den unten angegebenen Primern (Tabelle 25).

Tabelle 25: Sequenzierprimer für den pGL3 Basic Vektor.

Plasmid	Sequenzierprimer	Sequenz
pGL3 Basic	RVprimer3	ctagcaaaaataggctgtccc
pGL3 Basic	GLprimer2	ctttatgttttgcgcttcca

2.2.12 Mikroarrays

Für die Genexpressionsanalyse aus murinem Lebergewebe erfolgte die Isolation der mRNA bzw. miRNA mit dem unter 2.2.4.2 beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden die Proben für den Affimetrix® miRNA 3.1 Array Plate (Affimetrix) bzw. GeneChip® HT MG-430 PM Array Plate (Affimetrix) mittels 3' IVT Express Kit und GeneTitan™ Hybridization, Wash, and Stain Kit for 3' IVT Arrays (Affimetrix) nach Herstellerangaben vorbereitet. Für die Hybridisierung wurden die GeneTitan® Wash Buffers A and B Module (Affimetrix) verwendet. Die Analyse erfolgte im GeneTitan® Instrument (Affimetrix). Alle Reaktionsschritte nach der Isolation der Nucleinsäuren wurden von Herrn Dr. Martin Trippler und Frau Sabrina Driftmann durchgeführt.

2.2.13 Statistik

2.2.13.1 Statistische Auswertung der Patientendaten

Die numerischen Patientendaten (Genexpression, Laborparameter) sind als Median mit Minimum und Maximum angegeben sowie graphisch als Median mit einem 95 %igem Koinzidenzintervall dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte im Falle des Vergleiches von zwei Gruppen mittels ungepaartem zweiseitigem Student'schen T-Test, unter Verwendung der Welch-Korrektur, zur Einbeziehung unterschiedlicher Varianzen zwischen den Gruppen. Weiterhin wurde der Vergleich der Genexpression zwischen Tumor- und tumorumgebenen Lebergewebe der HCC-Patienten mittels gepaartem zweiseitigen Student'schen T-Test oder Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Untersuchung von Unterschieden zwischen mehr als zwei Gruppen wurde mittels zweifaktorieller ANOVA (*analysis of variance*) durchgeführt. Kategoriale Variablen sind, wenn nicht anders erwähnt, als Anteile in Prozent angegeben. Hierbei erfolgte die statistische Auswertung mittels χ^2 -Test, unter Verwendung der Pearson-Näherung. Die Analyse des Mittleren- oder 10-Jahresüberlebens erfolgte mittels Kaplan-Meier Überlebenskurven, sowie dem Log-Rank-Test mit Welch- oder Mantel-Cox-Korrektur bei dem Vergleich unterschiedlicher Gruppen. Die *Hazard ratio* wurde mittels Cox-Regression bestimmt, wobei der *P*-Wert des Likelihood-Ratio-Tests zur Definierung des Signifikanzniveaus herangezogen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 19 Software (IBM SPSS), Die graphische Darstellung wurde mit Hilfe der Programme SPSS 19 Software (IBM SPSS) und GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) vorgenommen.

2.2.13.2 Statistische Auswertung der *in vitro* Analysen

Falls nicht anderweitig beschrieben, sind die Daten der *in vitro* Analysen als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) oder Standardabweichung von drei unabhängigen Untersuchungen angegeben. Hierbei wurden Unterschiede zwischen zwei Gruppen mittels ungepaartem Student'schen T-Test unter Verwendung der Welch-Korrektur, zur Einbeziehung unterschiedlicher Varianzen zwischen den Gruppen, ermittelt. Die Untersuchungen von Unterschieden zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA (*analysis of variance*) mit nicht-korrigierter Fischer-LSD Analyse durchgeführt. Die oben beschriebenen Analysen, wie auch deren graphische Darstellung erfolgten mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software).

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von TRAIL in der Hepatokarzinogenese

Teile der in diesem Abschnitt dargestellten Daten sind in der Publikation „*TRAIL expression levels in human hepatocellular carcinoma have implications for tumor growth, recurrence and survival.*“ (Piras-Straub, K., Khairzada, K., Trippler, M., Baba, H.A., Kaiser, G.M., Paul, A., Canbay, A., Weber, F., Gerken, G., Herzer, K., 2015. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 136, E154–160. doi:10.1002/ijc.29139) veröffentlicht.

3.1.1 Die TRAIL-Genexpression in HCC-Patienten

Um die Frage zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der TRAIL-Expression und der Entstehung bzw. Entwicklung von HCC besteht, erfolgten Analyse der TRAIL-mRNA-Expression aus dem HCC- oder Lebergewebe von 108 Patienten. Bei Patienten mit HCC wurde neben dem Tumorgewebe (TT) auch das den Tumor umgebene nicht tumoröse Gewebe (TST) analysiert. In beiden Fällen wurde die TRAIL-mRNA-Expression mit der aus Lebergewebe von Patienten die nicht an HCC erkrankten (NTL) verglichen.

Die TRAIL-mRNA-Expression unterscheidet sich im TST nicht signifikant von der im NTL (Abbildung 11), wohingegen eine signifikant ($P \leq 0,0123$) niedrigere TRAIL-mRNA-Expression im Tumorgewebe (TT), im Vergleich zum Tumor umgebene Gewebe (TST), nachgewiesen werden konnte (Abbildung 11).

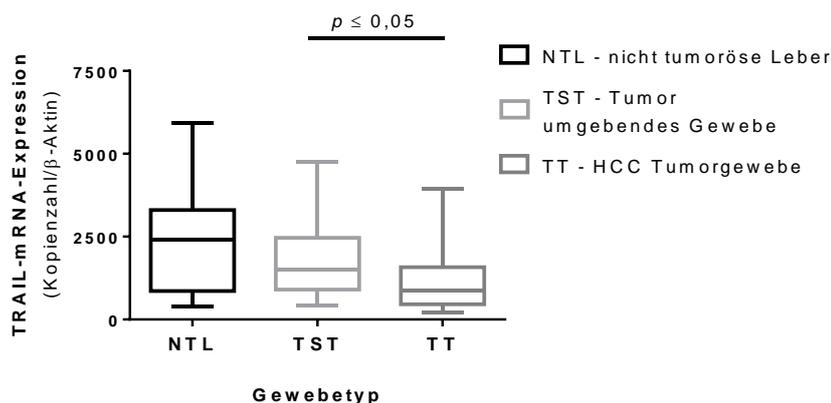


Abbildung 11: TRAIL-mRNA-Expression in Leber- und Tumorgewebe aus HCC-Patienten, sowie aus Lebergewebe von Patienten ohne HCC.

Die TRAIL-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Die TRAIL mRNA-Expression ist als Boxplot mit 95 % Konfidenzintervall für Patienten ohne HCC (NTL), dem Tumor umgebene Lebergewebe (TST) und dem HCC-Gewebe (TT) von HCC-Patienten angegeben. Die statistische Analyse erfolgte zwischen NTL und TST mittels ungepaartem Student'schen T-Test und zwischen TST und TT mittels zweiseitigem gepaartem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

Um zu prüfen, ob die TRAIL-mRNA-Expression mit der dem HCC zu Grunde liegenden Lebererkrankung in Zusammenhang steht, wurde die TRAIL-mRNA-Expression in allen drei Gewebetypen (NTL, TST, TT) hinsichtlich der Ätiologie separiert und differenziert analysiert. Wie in Abbildung 12 dargestellt, ist die TRAIL-mRNA-Expression bei allen Lebererkrankungen im Tumor deutlich niedriger als im umgebenen Gewebe. Patienten mit NASH haben zudem ein signifikant ($P \leq 0,012$) höheres TRAIL-mRNA-Expressionslevel in Patienten ohne HCC (NTL) als in Patienten mit HCC (TST).

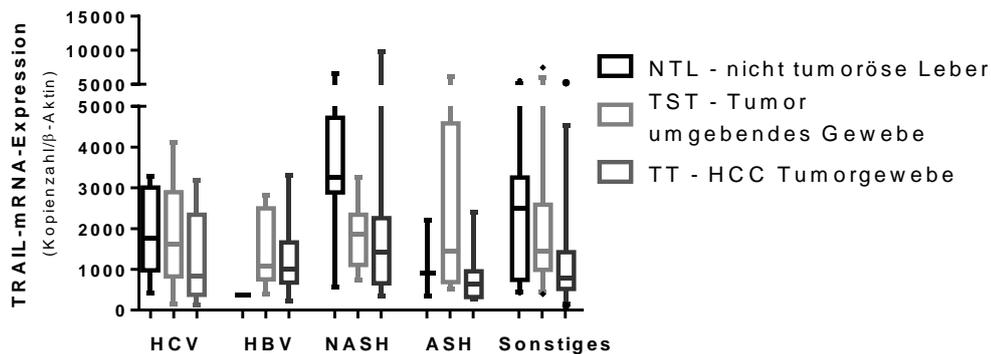


Abbildung 12: TRAIL-mRNA-Expression in Leber- und Tumorgewebe aus HCC-Patienten, sowie aus Lebergewebe von Patienten ohne HCC in Abhängigkeit von der Lebererkrankung.

Die TRAIL-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Die TRAIL mRNA-Expression ist als Boxplot mit 95 % Konfidenzintervall für Patienten ohne HCC (NTL), dem Tumor umgebenen Lebergewebe (TST) und dem HCC-Gewebe (TT) von HCC-Patienten für die verschiedenen Lebererkrankungen (HCV: Hepatitis C; HBV: Hepatitis B; NASH: Nicht-alkoholisch induzierte Steatohepatitis; ASH: Alkoholisch induzierte Steatohepatitis; Sonstiges) angegeben.

Die Analyse der TRAIL-mRNA-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen HCC-spezifischen Parameter (Tumorstadium, Vorhandensein von Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen, der Invasion von Lymphgefäßen oder Venen, dem Differenzierungsgrad des Tumors sowie des Resektionserfolges) ergibt einen signifikanten Zusammenhang der TRAIL-mRNA-Expression mit dem Tumorstadium des HCCs. Wie in Abbildung 13 dargestellt, ist die TRAIL-mRNA-Expression in Tumoren mit fortgeschrittenem Tumorstadium signifikant ($P \leq 0,006$) niedriger als in weniger weit fortgeschrittenen HCC-Tumoren. Es zeigte sich keine Korrelation der TRAIL-mRNA-Expression mit den Leberwerten ALT, AST, GLDH, AP, CHE und Bilirubin oder dem HCC spezifischen Tumormarker AFP (nicht gezeigt).

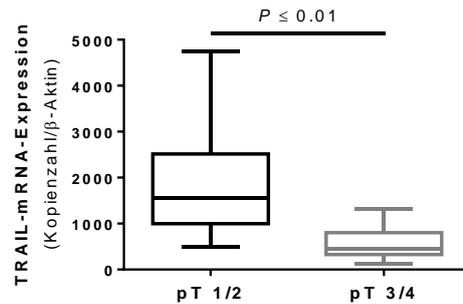


Abbildung 13: mRNA Expression in Tumorgewebe in Abhängigkeit des Tumorstadiums.

Die TRAIL-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Die TRAIL mRNA-Expression ist als Boxplot mit 95 % Konfidenzintervall für Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium (pT 3/4) und weniger weit fortgeschrittenem Tumorstadium (pT 1/2) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ungepaartem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

3.1.2 Der Einfluss von TRAIL auf die Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen

Um den Einfluss der TRAIL-Expression auf die Migrationsfähigkeit und die Fähigkeit zur Kolonienbildung von Hepatomzellen näher zu charakterisieren, erfolgte zunächst eine Verminderung der TRAIL-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi), was nach 48 h zu einer Reduktion der TRAIL-mRNA-Expression um 50 % führte (Abbildung 14).

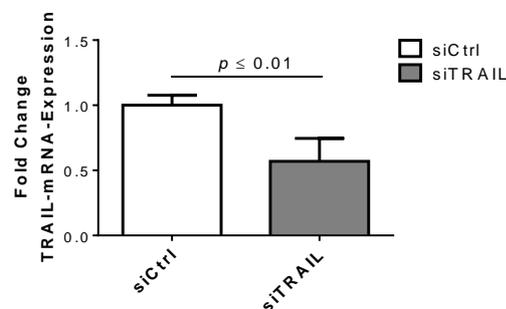


Abbildung 14: Reduktion der TRAIL-mRNA-Expression nach siRNA Behandlung.

Fold Change und Standardabweichung der TRAIL-mRNA-Expression nach 48 stündiger Behandlung der Huh7-Zellen mit 25 nM unspezifischer (siCtrl) oder TRAIL-spezifischer (siTRAIL) siRNA aus drei unabhängigen Experimenten. Die Analyse der TRAIL-mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR und wurde auf β -Aktin normiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ungepaartem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

Die Migrationsfähigkeit von Huh7-Zellen wurde in Abhängigkeit von der TRAIL-Expression mittels *Boyden-Chamber*-Assay analysiert. Die Reduktion der TRAIL-Expression führte zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsfähigkeit. Huh7-Zellen mit verminderter TRAIL-Expression (siTRAIL) zeigen, im Vergleich zu Huh7-Zellen mit normaler TRAIL-Expression (siCtrl), eine 2-fach höhere Migrationsfähigkeit (Abbildung 15).

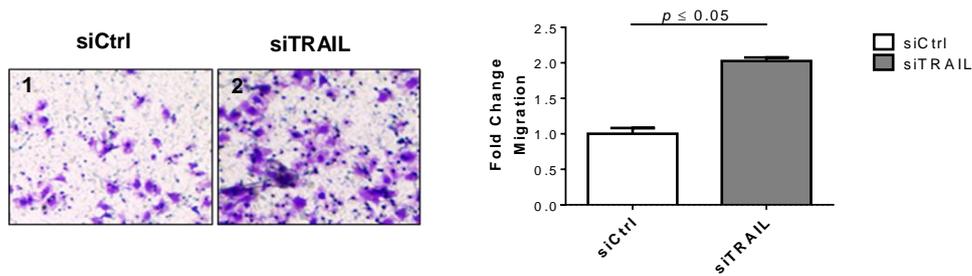


Abbildung 15: Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der TRAIL-Expression.

(Links) Zellmigration von Huh7-Zellen nach 24 stündiger Inkubation im *Boyden-Chamber*-Assay bei vorheriger Behandlung der Zellen mit 25 nM TRAIL-spezifischer siRNA (1: siTRAIL) oder unspezifischer siRNA (2: siCtrl). (Rechts) Fold Change und Standardabweichung der Migrationsfähigkeit von Huh7-Zellen nach 48 stündiger Behandlung mit 25 nM unspezifischer (1, siCtrl) oder TRAIL-spezifischer (2: siTRAIL) siRNA mit anschließend 24 h Inkubation im *Boyden-Chamber*-Assay aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgte durch Auszählung der mit Kristallviolett gefärbten Zellen im Lichtmikroskop. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ungepaartem Student'schen T-Test und einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

Auch die Fähigkeit zur Kolonienbildung der Huh7-Zellen steigt bei verminderter TRAIL-Expression signifikant an. Huh7-Zellen mit reduzierter TRAIL-Expression (siTRAIL) zeigten eine um das 2-fache höhere Anzahl an Kolonien im *Soft-Agar* als Huh7-Zellen mit normaler TRAIL-Expression (siCtrl) (Abbildung 16).

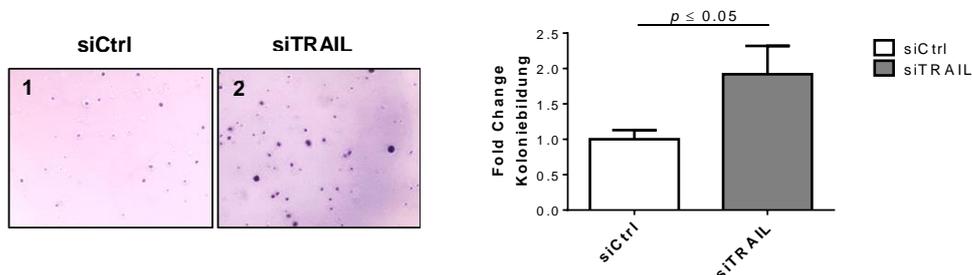


Abbildung 16: Fähigkeit zur Kolonienbildung von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der TRAIL-Expression.

(Links) Kolonienbildung von Huh7-Zellen nach 21 tägiger Inkubation im *Soft-Agar*-Assay bei vorheriger Behandlung der Zellen mit 25 nM TRAIL-spezifischer siRNA (1: siTRAIL) oder unspezifischer siRNA (2: siCtrl). (Rechts) *Fold Change* und Standardabweichung der Fähigkeit zur Kolonienbildung von Huh7-Zellen nach 48 stündiger Behandlung mit 25 nM siCtrl oder siTRAIL nach 21 tägiger Inkubation im *Soft-Agar*-Assay aus zwei unabhängigen Experimenten (B). Die Quantifizierung der Kolonien erfolgte durch mikroskopische Auszählung nach Kristallviolett-Färbung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ungepaartem Student'schen T-Test und einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

3.1.3 TRAIL als möglicher Prädiktor für das Tumorwachstum, die Rezidivierung und das Überleben von HCC-Patienten

Zur Beantwortung der Frage, ob die TRAIL-mRNA-Expression eine Vorhersage des post-operativen *Outcomes* der Patienten erlaubt, wurden die HCC-Rezidivierung und das mediane Überleben analysiert. Wie in Abbildung 17 dargestellt, zeigt sich, dass die TRAIL-mRNA-Expression in Tumoren die im post-operativen Verlauf Rezidivierungen ausbildeten deutlich geringer ist, als in solchen die nach der Transplantation bzw. Resektion tumorfrei blieben.

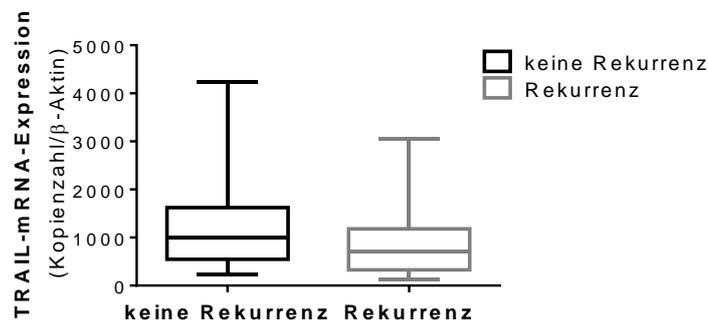


Abbildung 17: mRNA Expression in Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Tumorrezidivierung.

Die TRAIL-mRNA-Expression im HCC-Gewebe wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Die TRAIL mRNA-Expression ist als Boxplot mit 95 % Konfidenzintervall für Patienten mit post-operativ auftretender HCC-Rezidivierung und Patienten die Tumor frei blieben dargestellt.

Um den prädiktiven Wert der TRAIL-mRNA-Expression für das Überleben der Patienten untersuchen zu können, wurde zwischen Patienten unterschieden, die eine niedrigere TRAIL-mRNA-Expression im Tumor als im Tumor umgebenden Gewebe aufwiesen und solchen, deren TRAIL-Expression im Tumor nicht verringert war. Kaplan-Meier-Überlebens Analysen (Abbildung 18) zeigten, dass Patienten bei verringerter TRAIL-mRNA-Expression im Tumor ein generell schlechteres post-operatives Überleben zeigten als bei normaler bzw. erhöhter TRAIL-mRNA-Expression im Tumor.

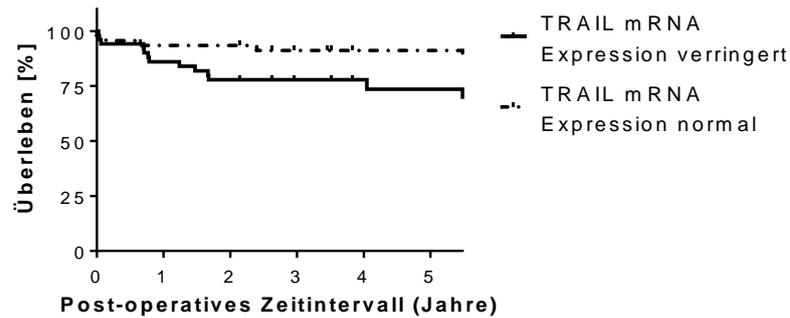


Abbildung 18: 5-Jahres Überleben von Patienten mit verringerter und nicht verringerter TRAIL-mRNA-Expression im Tumor.

Kaplan-Meier-Überlebens-Kurven von Patienten mit verringerter TRAIL-mRNA im Tumor als im Tumor umgebenen Gewebe ($TT < TST$) und Patienten mit gleichbleibender oder höherer TRAIL-mRNA-Expression im Tumor als im Tumor umgebenen Gewebe ($TT \geq TST$). Die statistische Analyse erfolgte mittels Log-rank-Test mit Welch-Korrektur, wobei ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt wurde.

Die TRAIL-Expression ist also in einem großen Anteil der Patienten im HCC-Tumorgewebe vermindert, was einen Einfluss auf das Wachstum und die postoperative Tumorrekurrenz des HCCs zu haben scheint.

3.2 Regulation der TRAIL-Genexpression

3.2.1 *In silico* Analysen der TRAIL-Promotorsequenz aus HCC-Patienten

Um die Ursache der unter 3.1 beschriebenen verringerten TRAIL-Expression im HCC zu identifizieren, erfolgten Sequenzanalysen des humanen TRAIL-Promotors aus humanem HCC-Gewebe. Hierfür wurde der TRAIL-Promotor zunächst aus genomischer DNA der Leber mittels PCR amplifiziert und anschließend im Bereich von -1717 bis -1, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt vollständig sequenziert. Dabei wurde das Tumorgewebe (TT) von 87 sowie das Tumor umgebene Gewebe (TST) von 48 HCC-Patienten verwendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der veröffentlichten TRAIL-Promotorsequenz verglichen und hinsichtlich auftretender Sequenzvariationen untersucht (Abbildung 9, Anhang 3). Zu Beginn der *in silico* Analysen erfolgte eine vollständigen Erfassung aller mutmaßlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Bereich der TRAIL-Promotorsequenz zwischen -1717 bis -1, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt mittels PROMO und TRANSFAC 8.3 (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002), hierfür wurde die im Jahr 2012 veröffentlichte Sequenz des humanen TRAIL-Promotors zu Grunde gelegt,

welche in Anhang 3 aufgeführt ist. Es wurden insgesamt 684 mutmaßliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen von insgesamt 77 verschiedenen humanen Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche in Anhang 6 tabellarisch aufgeführt sind. Auf Grund dieser Komplexität erfolgte die eigentliche Sequenzanalyse in drei Teilabschnitten.

Zunächst wurden paarweisen Alignments aller Sequenzen mit der veröffentlichten TRAIL-Promotorsequenz vorgenommen (Flicek et al., 2012), sodass alle auftretenden Sequenzveränderungen einzeln erfasst werden konnten. Ein beispielhaftes Alignment ist in Abbildung 19 dargestellt und zeigt Sequenzvariationen an drei Positionen des TRAIL-Promotors auf. Die erste Sequenzvariation an Position -1453 (ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt) des TRAIL-Promotors zeigt eine Variation zwischen den Nucleobasen Thymin oder Cytosin. Die zweite Sequenzvariation befindet sich an Position -1136 und beinhaltet die Nucleobasen Adenin oder Guanin und die dritte Sequenzvariation an Position -966 des TRAIL-Promotors zeigt die Nucleobasen Adenin oder Cytosin (Abbildung 19, schwarze Umrandung).

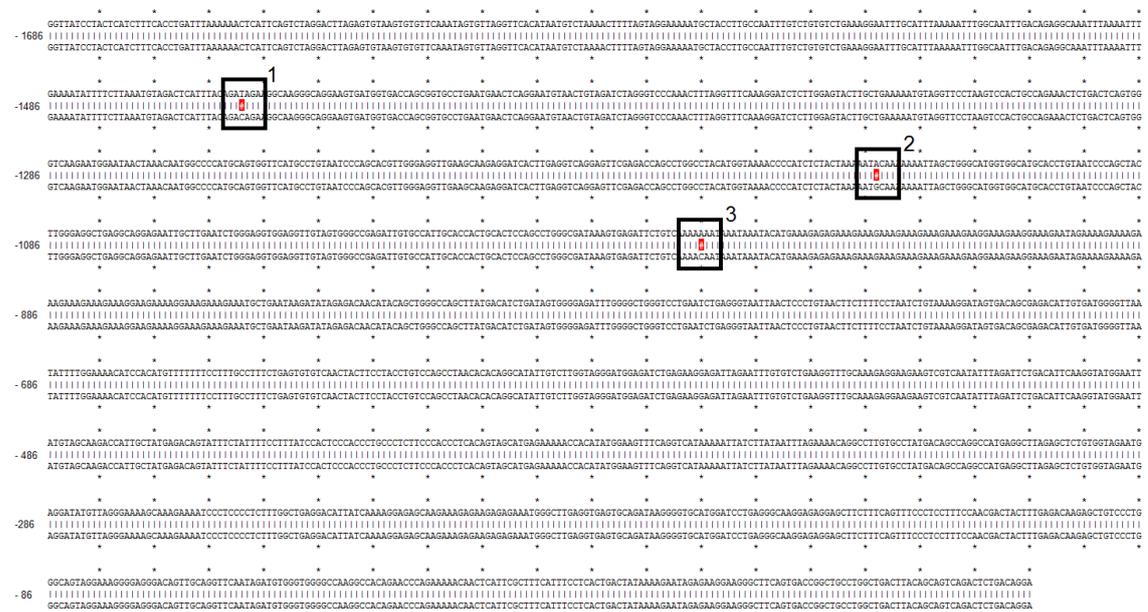


Abbildung 19: Beispielhaftes Alignment der humanen TRAIL-Promotorsequenz.

Alignment der Sequenz des humanen TRAIL-Promotors aus dem Tumorgewebe eines HCC-Patienten (untere Sequenz) mit der veröffentlichten Sequenz (oben) zur Veranschaulichung der gefundenen Sequenzinhomogenitäten. Kasten 1: Sequenzvariation zwischen Thymin und Cytosin an Position -1453; Kasten 2: Sequenzvariation zwischen Adenin und Guanin an Position -1136; Kasten 3: Sequenzvariation zwischen Adenin und Cytosin an Position -966 ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt des humanen TRAIL-Promotors. Das Alignment wurde mit Hilfe des Computerprogrammes ApE durchgeführt.

Im zweiten Schritt der Sequenzanalyse wurden multiple Alignments durchgeführt, die es ermöglichten alle Sequenzen parallel miteinander zu vergleichen, um die Frequenz der identifizierten Sequenzvariationen zu ermitteln.

In Abbildung 20 sind die multiplen Alignments von 20 TT-Sequenzen exemplarisch für die Sequenzabschnitte in den Bereichen der oben beschriebenen Sequenzvariationen dargestellt. Es zeigt sich, dass alle drei beobachteten Sequenzvariationen mit einer häufigen Frequenz sowohl in den TT- als auch den TST-Sequenzen zu beobachten sind. Für die erste zu beobachtenden Sequenzvariation -1453T/C ist für 69 % der Sequenzen an Position -1453 ein Thymin und für 31 % der Sequenzen ein Cytosin an dieser Position zu beobachten (Abbildung 20 A). Hinsichtlich der Sequenzvariation -1136A/G an Position -1136 zeigt sich in 57 % der Fälle ein Adenin wohin gegen 43 % der Fälle ein Guanin an dieser Position aufweisen (Abbildung 20 B). Bei der dritten zu beobachtenden Sequenzvariation -966A/C zeigt sich ein Anteil von 80 % mit Adenin und 20 % mit Cytosin an Position -966 (Abbildung 20 C) des humanen TRAIL-Promotors.

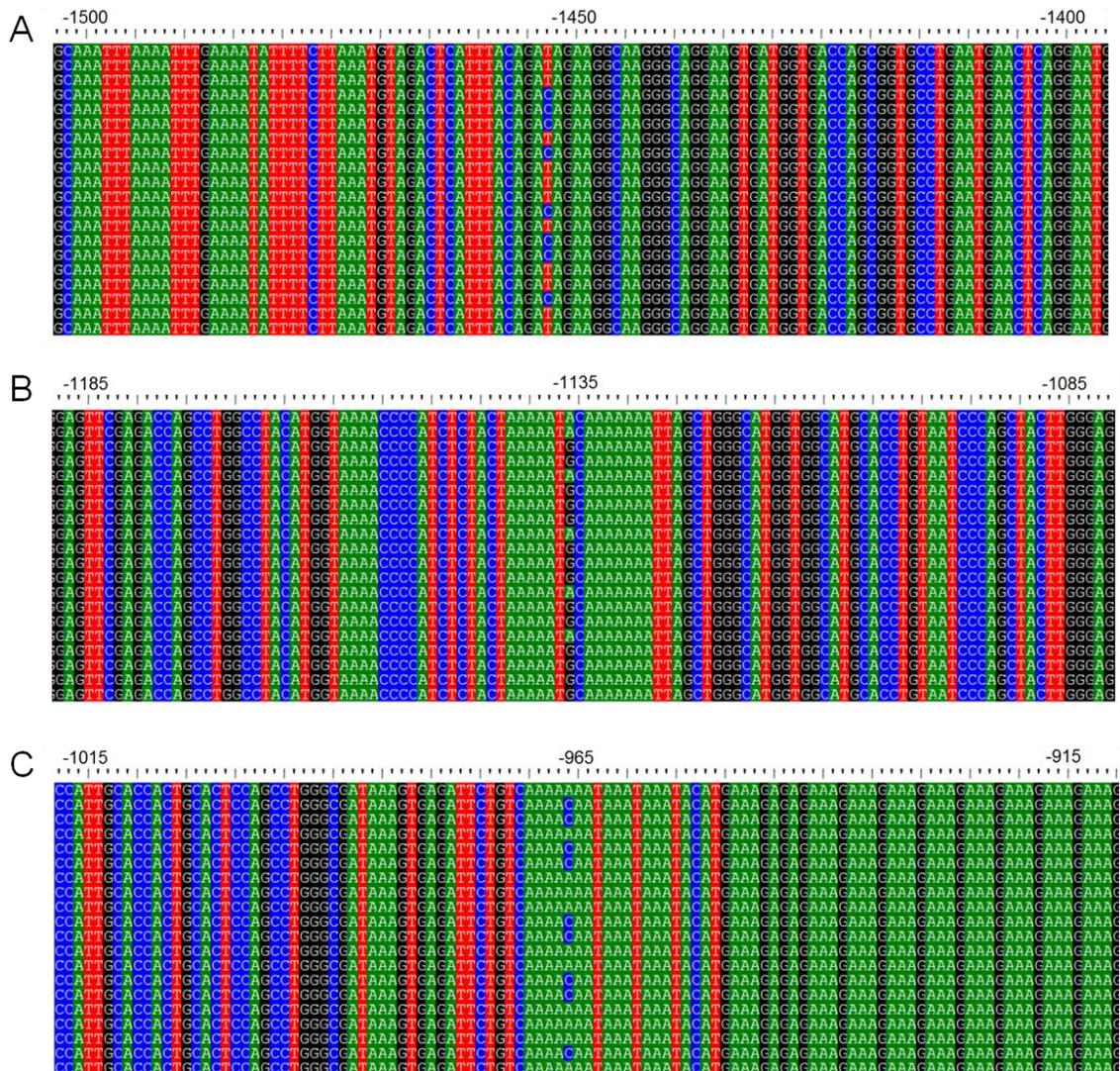


Abbildung 20: Multiple Alignments von 20 TT-Sequenzen.

Die multiplen Alignments der 20 TT-Sequenzen wurden für die drei Sequenzvariationen einzeln durchgeführt. Hierbei wurden 100 bp lange Abschnitte der TRAIL-Promotorregion mit der beobachteten Sequenzvariation von 20 TT-Geweben miteinander verglichen. (A) Multiples Alignment des TRAIL-Promotorabschnittes mit der Sequenzvariation zwischen T und C an Position -1453 (B) Multiples Alignment des TRAIL-Promotorabschnittes mit der Sequenzvariation zwischen A und G an Position -1136. (C) Multiples Alignment des TRAIL-Promotorabschnittes mit der Sequenzvariation zwischen A und C an Position -966 ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt des humanen TRAIL-Promotors. Zur besseren Veranschaulichung sind die Nucleobasen farblich wie folgt markiert: A: grün; T: rot; G: schwarz; C: blau. Die paarweisen Alignments wurden mit Hilfe des Computerprogrammes BioEdit durchgeführt.

Im dritten und letzten Schritt der *in silico* Analyse wurden die Sequenzbereiche mit identifizierten Sequenzvariationen zunächst auf ihre Eindeutigkeit untersucht und anschließend erneut mittels PROMO und TRANSFAC 8.3 (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002) analysiert, um den Einfluss der Sequenzvariationen auf das Vorhandensein von Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu untersuchen.

Die Chromatogramme (Abbildung 21) der Sequenzen zeigten für alle drei Sequenzvariationen eindeutige Unterschiede an der identifizierten Nucleobasenposition, die nicht auf heterozygote Allel-Verteilungen zurückzuführen sind. Während das Chromatogramm im Bereich der ersten Sequenzvariation eindeutig zeigt, dass in einigen Patienten die Nucleobase Thymin an Position -1453 (Abbildung 21 A) vorkommt, zeigen andere Patienten (Abbildung 21 B) die Nucleobase Cytosin an dieser Position. Auch für die Sequenzen im Bereich der zweiten und dritten Sequenzvariationen zeigen sich eindeutige Unterschiede zwischen den Chromatogrammen der Sequenzen mit der Nucleobase Adenin oder Guanin an Position -1136 (Abbildung 21 C/D) bzw. der Nucleobase Adenin oder Cytosin an Position -966 (Abbildung 21 E/F).

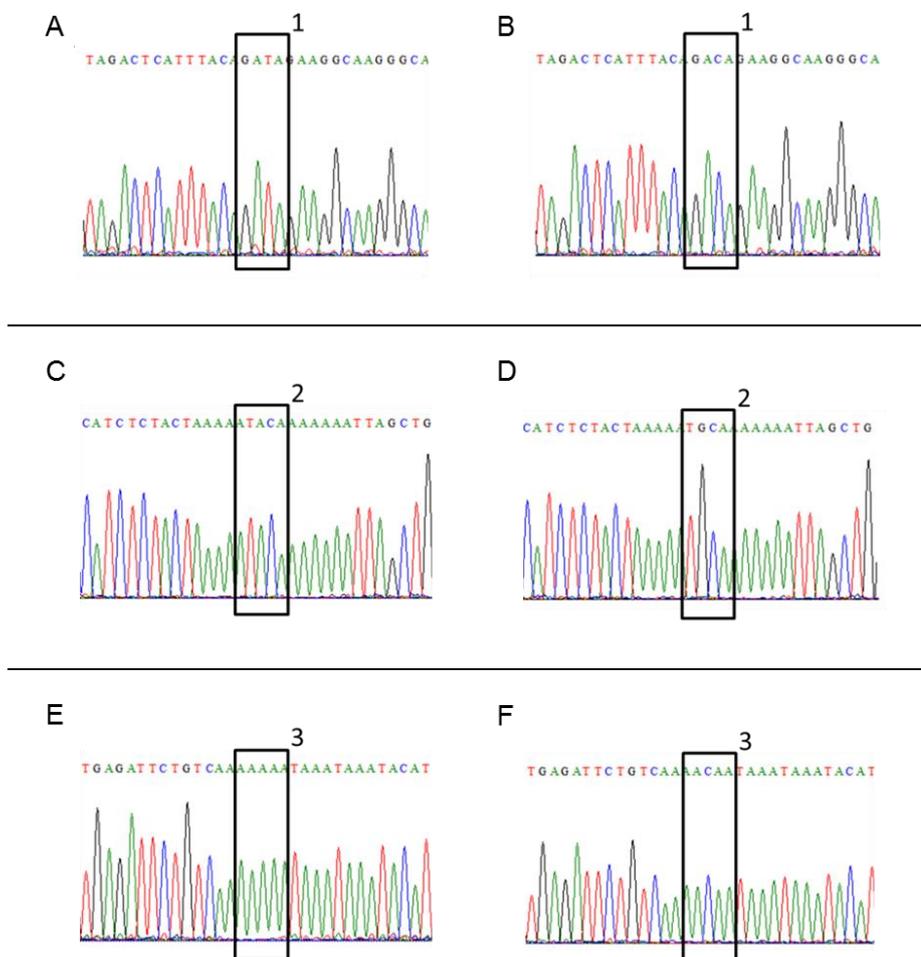


Abbildung 21: Chromatogramme der detektierten Sequenzvariationen.

Exemplarische Darstellung der Chromatogramme der drei Sequenzvariationen mit der häufiger auftretenden (links: A, C, E) und der weniger häufig auftretenden Nucleobase (rechts: B, D, F) an der entsprechenden Position. (A/B) Exemplarische Darstellung der ersten Sequenzvariation (schwarzer Kasten 1) zwischen T und C an Position -1453. (C/D) Exemplarische Darstellung der zweiten Sequenzvariation (schwarzer Kasten 2) zwischen A und G an Position -1136. (E/F) Exemplarische Darstellung der dritten Sequenzvariation (schwarzer Kasten 3) zwischen A und C an Position -966. Die Chromatogramme wurden mit Hilfe des Computerprogrammes BioEdit dargestellt.

Nachfolgend wurden 150 bp lange Abschnitte, im Bereich der detektierten Sequenzvariationen, mit beiden zu beobachtenden Nukleotiden mittels PROMO und TRANSFAC 8.3 (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002) analysiert, um den Einfluss der Sequenzvariationen auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen auszuarbeiten.

Die Analyse der TRAIL-Promotorsequenz im Bereich der ersten detektierten Sequenzvariation zeigte bei den Sequenzen mit einem Thymin an Position -1453 des TRAIL-Promotors eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor GATA-1 auf, die in den Sequenzen mit einem Cytosin an dieser Position nicht vorhanden ist. Weiterhin zeigte sich, bei einem Adenin an Position -1136 des humanen TRAIL-Promotors, eine Bindungsstelle für den humanen Transkriptionsfaktor HOXD9/10, die bei einem Guanin an dieser Position nicht zu detektieren ist. Die Analyse des TRAIL-Promotors im Bereich der dritten detektierten Sequenzvariation zeigte weder bei den Sequenzen mit einem Adenin noch bei den Sequenzen mit einem Cytosin an Position -966 eine Bindungsstelle für einen humanen Transkriptionsfaktor auf, sodass diese Sequenzvariation im Verlauf der nachfolgenden Untersuchungen nicht näher charakterisiert wurde. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammen gefasst.

Tabelle 26: Zusammenfassung der beschriebenen Sequenzvariationen.

Sequenz- variation	Position	Bezeichnung	Nukleobase 1		Nukleobase 2	
			Sequenz	Transkriptions- faktor	Sequenz	Transkriptions- faktor
1	-1453	GATA-1 ^{T/C}	GATA	GATA-1	GACA	-
2	-1136	HOXD9/10 ^{A/G}	TAC	HOXD9/10	TGC	-
3	-966	-966 ^{A/C}	AAAAT	-	ACAAT	-

3.2.2 Korrelation zwischen den Sequenzvariationen und der TRAIL-Genexpression in HCC-Patienten

Um festzustellen, ob die zuvor ermittelten Sequenzvariationen im humanen TRAIL-Promotor Unterschiede in der TRAIL-mRNA-Expression nach sich ziehen, wurden die TRAIL-mRNA-Expression in HCC-Patienten mit den detektierten Sequenzvariationen korreliert. Hierbei wurde sowohl der Einfluss der Sequenzvariation an Position -1453 innerhalb der GATA-1 Bindungsstelle, als auch der Einfluss der Sequenzvariation

innerhalb der HOXD9/10 Bindungsstelle an Position -1136 auf die TRAIL-Expression analysiert (Tabelle 27).

Tabelle 27: TRAIL-mRNA-Expression in Gewebe von HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz an Position -1453 bzw. an Position -1136 des humanen TRAIL-Promotors.

Die TRAIL-mRNA-Expression in Gewebe mit der jeweiligen Sequenzvariation ist als Median mit dem Bereich und der Anzahl der Patienten angegeben und wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 verwendet.

	TRAIL-mRNA-Expression (Kopienzahl/ β -Aktin)	TRAIL-mRNA-Expression (Kopienzahl/ β -Aktin) Bereich	N	P
GATA-1 ^{T/T}	1712	223-9823	34	0,045
GATA-1 ^{T/C}	1324	406-2396	15	
HOXD9/10	1670	223-9823	28	0,347
HOXD9/10A/G	1351	320-3300	21	

Der Vergleich der TRAIL-Expression in Abhängigkeit von der Nukleobase an Position -1453 innerhalb der GATA-1 Bindungsstelle des TRAIL-Promotors zeigt, dass Patienten mit einem Thymin an dieser Position und somit einer intakten GATA-1 Bindungsstelle, eine signifikant höhere TRAIL-mRNA-Expression aufweisen als Patienten, die auf Grund eines Cytosin an dieser Position nicht über eine GATA-1 Bindungsstelle verfügen (Tabelle 27, Abbildung 22).

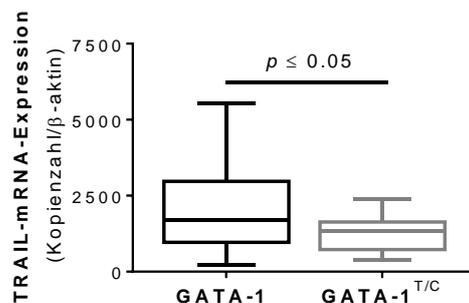


Abbildung 22: TRAIL-mRNA-Expression in Gewebe von HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz an Position -1453 des humanen TRAIL Promotor.

Die TRAIL-mRNA-Expression im HCC-Gewebe wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Die TRAIL-mRNA-Expression ist als Boxplot mit 95 % Konfidenzintervall für Patienten mit intakter und defekter GATA-1 Bindungsstelle durch die Sequenzvariation -1453T/C an Position -1453 des humanen TRAIL-Promotors dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test und Einbeziehung des Signifikanzniveaus von $P \leq 0,05$.

Die weiterführende Analyse zeigt, dass der Verlust der GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor durch die GATA-1^{T/C} Sequenzvariation eine signifikante

Korrelation zum Differenzierungsgrad des Tumors aufzeigt (Abbildung 23). Patienten mit fortgeschrittenerem HCC zeigen eine schlechte Differenzierung und in diesem Zusammenhang einen signifikant ($P \leq 0,05$) höheren Anteil an der deletierten GATA-1 Bindungsstelle (48 %) als Patienten mit gut differenzierten Tumor (14 %).

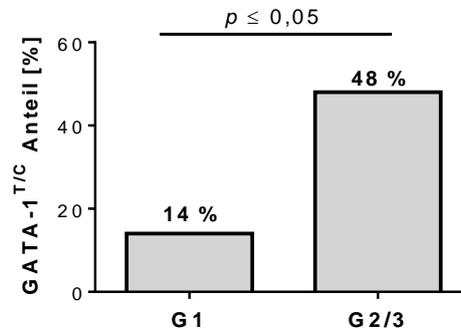


Abbildung 23: Grading der HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz der GATA-1 Bindungsstelle innerhalb des humanen TRAIL-Promotors.

Die Korrelation des Anteils an GATA-1^{T/C} Sequenzvariationen mit dem Tumorgrading ist dargestellt als der Anteil der Patienten mit einer deletierten GATA-1 Bindungsstelle. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels χ^2 -Test mit Pearson-Näherung und Einbeziehung des Signifikanzniveaus von $P \leq 0,05$.

Beim Vergleich der TRAIL-Expression in Abhängigkeit von der Nukleobase an Position -1136 innerhalb der HOXD9/10 Bindungsstelle des TRAIL-Promotors, ergab sich kein Zusammenhang (Tabelle 27). Die TRAIL-Expression in Patienten mit einem Adenin an Position -1136 und somit einer intakten HOXD9/10 Bindungsstelle unterscheidet sich nicht von der in Patienten, die wegen des Guanins an dieser Position nicht über diese Transkriptionsfaktorbindungsstelle verfügen (Abbildung 24).

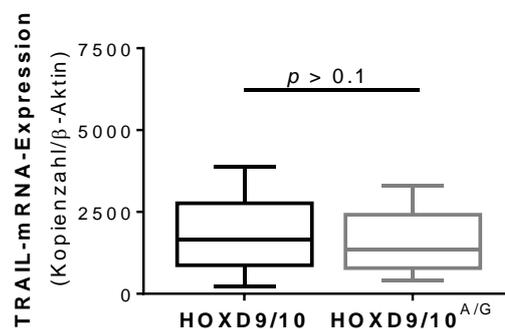


Abbildung 24: TRAIL-mRNA-Expression in Gewebe von HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz an Position -1136 des humanen TRAIL-Promotors.

Die TRAIL-mRNA-Expression im HCC-Gewebe wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Die TRAIL-mRNA-Expression ist als Boxplot mit 95 % Konfidenzintervall für Patienten mit intakter und defekter HOXD9/10 Bindungsstelle durch die Sequenzvariation an Position -1136 bp dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test und Einbeziehung des Signifikanzniveaus von $P \leq 0,05$.

3.2.3 Der Einfluss der HOXD9/10 Bindungsstelle auf die Regulation der TRAIL-Expression

Um zu untersuchen ob die in Patienten beobachteten Sequenzvariationen auch in bekannten Hepatomzelllinien zu beobachten sind, erfolgte die Sequenzanalyse der humanen Hepatomzelllinien Huh7 und HepG2.

Das Alignment der TRAIL-Promotorregionen (Abbildung 25) ergab für beide Zelllinien kaum Unterschiede innerhalb des untersuchten Sequenzbereiches. Sowohl Huh7 Zellen als auch HepG2 Zellen tragen an Position -1453 die Nukleobase Thymin, weisen also eine intakte GATA-1 Bindungsstelle auf. Weiterhin befindet sich an Position -966 für beide Zelllinien, wie für den Großteil der HCC-Gewebe, die Nukleobase Adenin. Im Bereich der HOXD9/10 Bindungsstelle an Position -1136 zeigten sich Zelllinien spezifische Unterschiede. In HepG2 Zellen ist eine intakte HOXD9/10 Bindungsstelle mit dem Nukleotid Adenin an Position -1136 zu beobachten, während Huh7 Zellen mit einem Guanin an dieser Position nicht über eine solche Transkriptionsfaktorbindungsstelle im TRAIL-Promotor verfügen. Weiterhin zeigte sich, dass im TRAIL-Promotor aus Huh7 Zellen ein 20 bp langes Segment innerhalb des repetitiven GAAA-Bereiches (Position -546 - -564) fehlt.

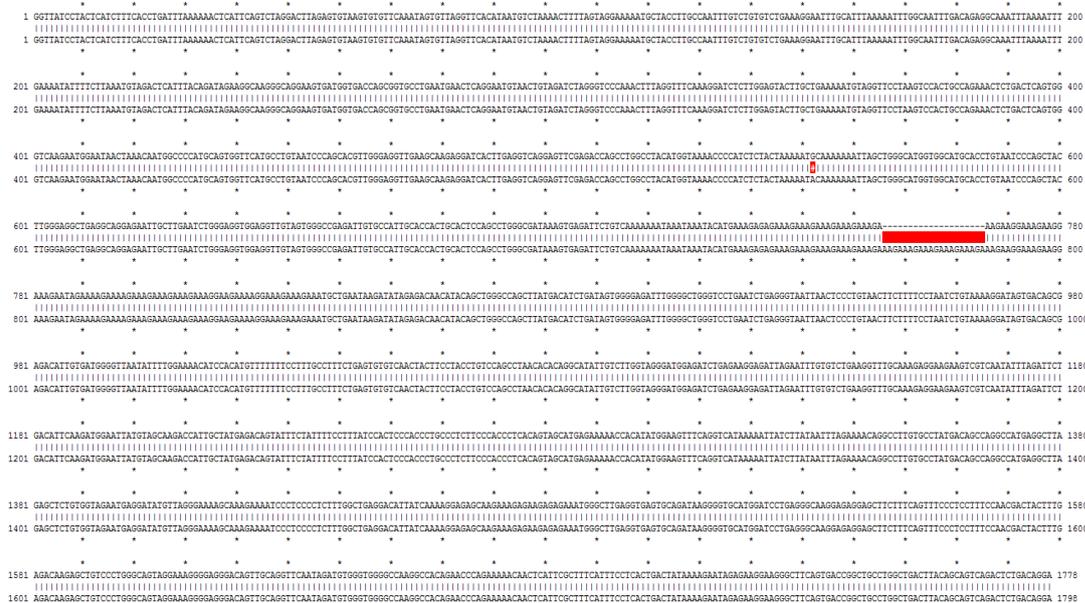


Abbildung 25: Alignment der TRAIL-Promotorregion aus den Hepatomzelllinien Huh7 und HepG2.

Alignment der Sequenz des humanen TRAIL-Promotors aus HepG2 Zellen (untere Sequenz) mit der Sequenz von Huh7 Zellen (oben). Das Alignment wurde mit Hilfe des Computerprogrammes ApE durchgeführt.

Um die Bedeutung dieser Sequenzunterschiede für die Induzierbarkeit und somit die Funktionalität des TRAIL-Promotors weiter aufklären zu können, wurden die TRAIL-Promotorregionen aus Huh7- und HepG2-Zellen mit Hilfe von Reporter-genassays genauer charakterisiert. Hierfür erfolgte zunächst die Klonierung der in Abbildung 26 und Abbildung 27 exemplarisch dargestellten Reporter-genkonstrukte durch Ligation des TRAIL-Promotors unterschiedlichen Ursprungs in den Luciferase basierten Reporter-genvektor pGL3. Anschließend erfolgte die Charakterisierung durch Transfektion der Konstrukte in Huh7 Zellen und anschließender Induktion des TRAIL-Promotors durch *Interferon-alpha* (IFN- α), *Interferon-gamma* (IFN- γ) oder *Suberoylanilide Hydroxamsäuren* (SAHA).



Abbildung 26: Reporter-genkonstrukt der TRAIL-Promotorregion.

Dargestellt ist das aus dem pGL3 Basic aufgebaute Luciferase-Reporter-genkonstrukt mit dem Bereich von -1717 - -1, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt, der humanen TRAIL-Promotorregion. Die verschiedenen Reporter-genkonstrukte wurden durch Verwendung der genomischen DNA aus den Hepatomzelllinien HepG2 und Huh7 kloniert.

Während nach der Behandlung mit IFN- α , sowohl in Huh7- als auch in HepG2-Zellen, eine um das Fünffache erhöhte Induktion der Luciferaseaktivität beobachtet werden konnte, zeigte sich für die Induktion des TRAIL-Promotors mit IFN- γ für beide Zelllinien nur eine zweifach erhöhte Aktivität. Auch die Behandlung der Zellen mit SAHA führte, unabhängig des Ursprunges vom TRAIL-Promotor, zu einer einheitlichen Induktion der Promotor-Aktivität um das Fünffache im Vergleich zur basalen TRAIL-Promotor Aktivität (Abbildung 27).

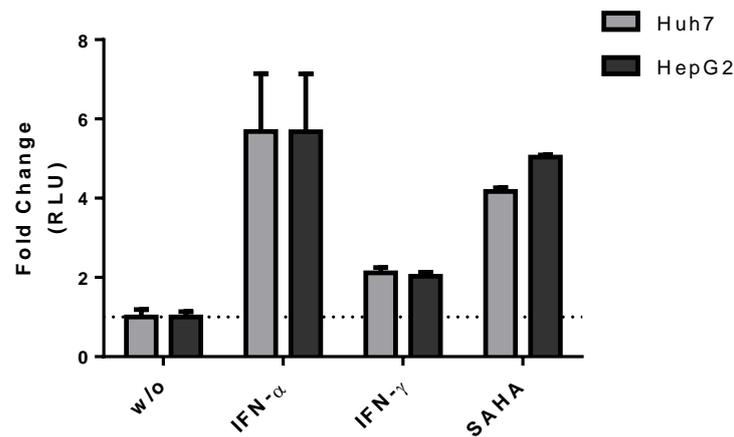


Abbildung 27: Induzierbarkeit des humanen TRAIL-Promotors verschiedener Hepatomzelllinien.

Dargestellt ist die Induzierbarkeit des humanen TRAIL-Promotors aus den Hepatomzelllinien Huh7 und HepG2 als *Fold Change* des Mittelwerts und der Standardabweichung des RLU nach Transfektion mit den entsprechenden TRAIL-Promotor Konstrukten und 6 stündiger Behandlung mit 500 IU/mL IFN- α , 1000 IU/mL IFN γ oder 20 μ M SAHA. Die Analyse erfolgte mittels Luciferase-Assay mit anschließender Normierung auf unbehandelte transfizierte Zellen (w/o). Die statistische Auswertung erfolgte nach zweiseitigem Student'schem T-Test mit einem Korrekturfaktor α von 5 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 ($^{**} P \leq 0,01$).

Weder der Basenaustausch von Adenin nach Guanin und der damit einhergehende Verlust der HOXD9/10 Bindungsstelle, noch der Verlust des 20 bp langen repetitiven GAAA-Segmentes (Position -546 - -564) führt also zu einer Veränderung der Induzierbarkeit des TRAIL-Promotors und bedingt somit keine Beeinträchtigung der Funktionalität des TRAIL-Promoters.

3.2.4 Der Einfluss der GATA-1 Bindungsstelle auf die Regulation der TRAIL-Expression

Um die Bedeutung der GATA-1 Bindungsstelle für die Funktionalität des humanen TRAIL-Promotors genauer zu untersuchen, wurde ein weiteres Reportergenkonstrukt hergestellt, bei dem die GATA-1 Bindungsstelle des TRAIL-Promotors aus Huh7 Zellen mittels gerichteter Punktmutagenese zerstört wurde; die so erhaltenen Konstrukte unterschieden sich somit ausschließlich in der Nukleobase an Position -1453 innerhalb der GATA-1 Bindungsstelle des TRAIL-Promotors (Abbildung 28). Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft.

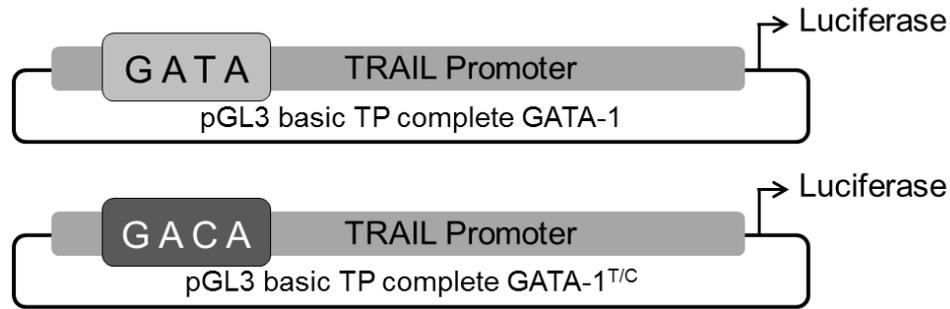


Abbildung 28: Reporter-genkonstrukte der TRAIL-Promotorregion aus Huh7 Zellen mit GATA-1^{T/T} bzw. mit GATA-1^{T/C} Bindungsstellenvariation.

Die Induzierbarkeit des TRAIL-Promotors mit defekter GATA-1 Bindungsstelle ist deutlich reduziert im Vergleich zu der des TRAIL-Promotors mit intakter GATA-1 Bindungsstelle (Abbildung 29). Nach 6 stündiger Behandlung mit IFN- α ist die TRAIL-Promotor Aktivität bei intakter GATA-1 Bindungsstelle um das Fünffache höher als in der unbehandelten Kontrolle, wohingegen die TRAIL-Promotor Aktivität bei defekter Bindungsstelle lediglich um das Zweifache gesteigert werden kann. Auch die Induzierbarkeit des TRAIL-Promotors mit IFN- γ oder SAHA ist bei defekter GATA-1 Bindungsstelle deutlich niedriger als bei intakter GATA-1 Bindungsstelle (Abbildung 29).

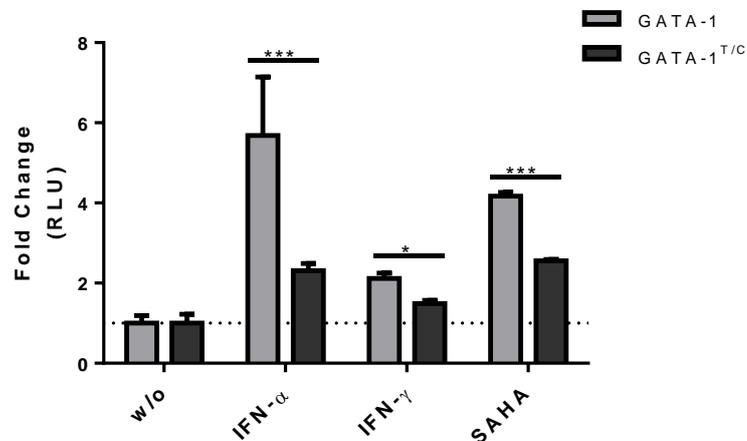


Abbildung 29: Induzierbarkeit der Reporter-genkonstrukte der TRAIL-Promotorregion mit funktionelle GATA-1^{T/T} bzw. mit GATA-1^{T/C} Bindungsstellenvariation.

Dargestellt ist die Induzierbarkeit des humanen TRAIL-Promotors aus der Hepatomzelllinie Huh7, mit intakter GATA-1 Bindungsstelle bzw. GATA-1^{T/C} Bindungsstellenvariation als Mittelwert und Standardabweichung des RLU nach Transfektion mit den entsprechenden TRAIL-Promotor Konstrukten und 6 stündiger Behandlung mit 500 IU/mL IFN- α , 1000 IU/mL IFN- γ oder 20 μ M SAHA. Die Analyse erfolgte mittels Luciferase-Assay mit anschließender Normierung auf unbehandelte transfizierte Zellen (w/o). Die statistische Auswertung erfolgte nach zweiseitigem Student'schem T-Test mit einem Korrekturfaktor α von 5 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 ($P \leq 0,01$).

3.2.5 Die Funktionalität der GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor und deren Einfluss auf die TRAIL-Genexpression

Um den Zusammenhang zwischen dem Verlust der GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor durch die Sequenzvariation an Position -1453 und der Dysregulation der TRAIL-Expression weiter auszuarbeiten, wurde die GATA-1 Bindungsstelle auf ihre Funktionalität untersucht. Hierfür wurden zunächst Reporter-genkonstrukte erstellt, die entweder acht hintereinander gereihete Sequenzabschnitte mit der GATA-1^{T/T} oder der GATA-1^{T/C} Bindungsstellenvariation aufwiesen (Abbildung 30). Die für die Ligation in den pGL3 Reporter-genvektor verwendeten Sequenzen wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert und sind in Anhang 5 aufgeführt.

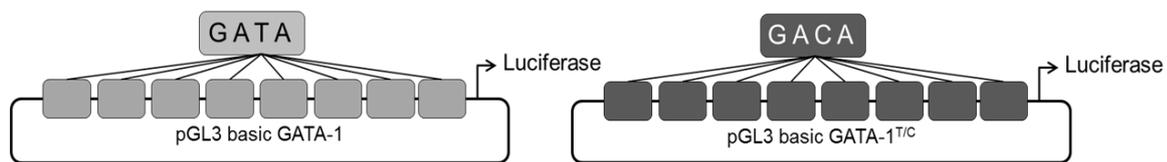


Abbildung 30: Reporter-genkonstrukte zur Untersuchung der Funktionalität der GATA-1 Bindungsstelle mit acht Wiederholungen der GATA-1^{T/T} oder der GATA-1^{T/C} Sequenzvariation.

Nach der Transfektion der Huh7 Zellen mit den Reporter-genkonstrukten erfolgte die Induktion der Luciferaseaktivität durch die Behandlung der Zellen mit den bereits unter 3.2.4 verwendeten Substanzen IFN- α , IFN- γ , sowie SAHA.

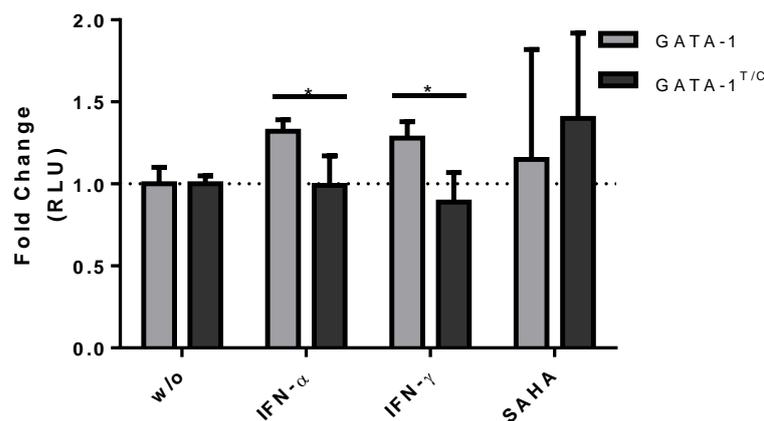


Abbildung 31: Induzierbarkeit der GATA-1 Bindungsstelle.

Dargestellt ist die Induzierbarkeit der Reporter-genkonstrukte mit repetitiver GATA-1 Bindungsstelle bzw. der GATA-1^{T/C} Bindungsstellenvariation als Mittelwert und Standardabweichung des RLU nach Transfektion in Huh7 Zellen 6 stündiger Behandlung mit IFN- α (500 IU/mL), IFN- γ (1000 IU/mL) und SAHA (20 nM). Die Analyse erfolgte mittels Luciferase-Assay mit anschließender Normierung auf unbehandelte transfizierte Zellen (w/o). Die statistische Auswertung erfolgte nach zweiseitigem Student'schem T-Test mit einem Korrekturfaktor α von 5 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 ($P \leq 0,01$).

Hierbei zeigte sich, dass die Induzierbarkeit der Reportergenkonstrukte mit repetitiver GATA-1^{T/C} Bindungsstellenvariation signifikant geringer ist als mit der repetitiven GATA-1^{T/T} Sequenz. Das Reportergenkonstrukt mit repetitiver GATA-1^{T/T} Sequenz ist sowohl durch IFN- α als auch durch IFN- γ signifikant ($P \leq 0,05$) induzierbar. Das Reportergenkonstrukt mit der repetitiven GATA-1^{T/C} Bindungsstellenvariation hingegen lässt sich jedoch weder durch IFN- α noch durch IFN- γ induzieren. Die Induktion der Luciferaseaktivität mit SAHA zeigt keine signifikante Unterschiede zwischen den beiden Reportergenkonstrukten (Abbildung 31).

Weiterführend wurde der Einfluss der Bindungsstellenvariation auf die Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren näher charakterisiert. Hierfür wurden *Electron mobility shift* Assays mit den unter Abbildung 32 dargestellten Sonden durchgeführt.

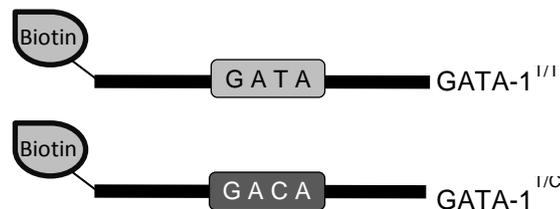


Abbildung 32: Schematische Darstellung der GATA-1 Sonden des *Electron mobility shift* Assays.

Zunächst wurde die Bindungsaffinität der Sonden mit Kernproteinen von unbehandelten Huh7 Zellen analysiert. Weiterhin wurde diese mit den Bindungseigenschaften der Sonden mit Kernproteinen von IFN- α oder IFN- γ stimulierten Huh7 Zellen verglichen.

Die Inkubation der Kernproteine von Huh7 Zellen mit der GATA-1^{T/T} Sonde führte zur Ausbildung eines spezifischen Bindungsmusters mit drei unterschiedlichen Bandenshifts (Abbildung 33, Bande 3, 7 und 11) im Vergleich zur Sonde alleine (Abbildung 33, Bande 1). Die Spezifität der Bandenmuster wurden sowohl für die GATA-1^{T/T}- als auch die GATA-1^{T/C}-Sonde durch die Zugabe von kompetitiven Inhibitoren aus den entsprechenden unmarkierten Oligonukleotiden in 200-fachem Überschuss überprüft (Abbildung 33, GATA-1^{T/T}-Sonde: Bande 4, 8, und 12; GATA-1^{T/C}-Sonde: Bande 6, 10 und 14).

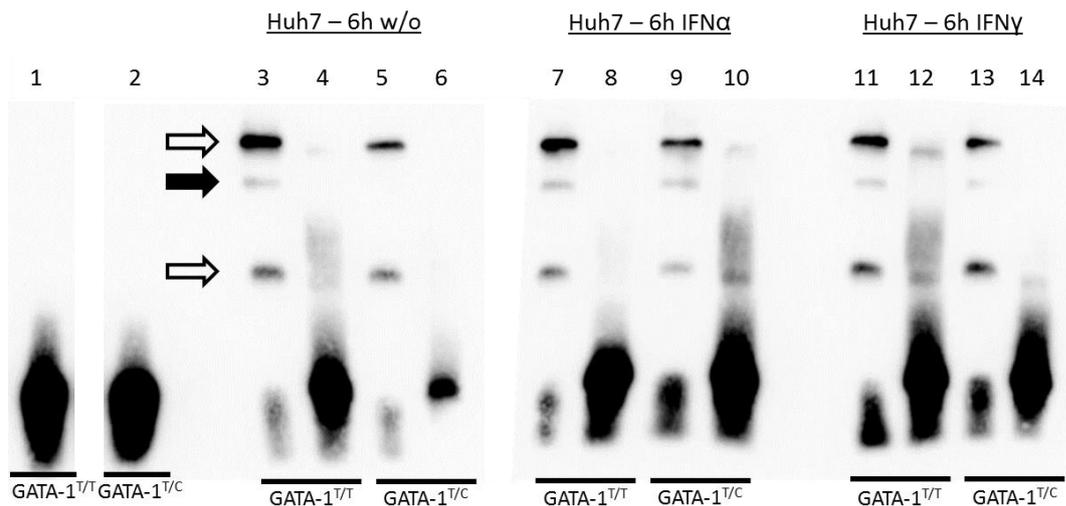


Abbildung 33: *Electron mobility shift Assays* mit den Biotin-markierten GATA-1^{T/T} bzw. GATA-1^{T/C} Sonden.

Dargestellt sind die *Electron mobility shift Assays* der GATA-1^{T/T}- und GATA-1^{T/C}-Sonden mit Kernproteinen von Huh7 Zellen. Die Kernproteine wurden aus Huh7 Zellen isoliert, die entweder für 6 h mit 500 IU/mL IFN- α oder 1000 IU/mL IFN- γ stimuliert wurden oder unbehandelt waren. Bande 1: GATA-1^{T/T}-Sonde ohne Kernproteine; Bande 2: GATA-1^{T/C}-Sonde ohne Kernproteine; Bande 3: GATA-1^{T/T}-Sonde mit Kernproteine von unbehandelten Huh7 Zellen; Bande 4: GATA-1^{T/T}-Sonde mit Kernproteine von unbehandelten Huh7 Zellen und 100-fachen Überschuss der unmarkierten kompetitiven Oligonukleotide; Bande 5: GATA-1^{T/C}-Sonde mit Kernproteinen von unbehandelten Huh7 Zellen; Bande 6: GATA-1^{T/C}-Sonde mit Kernproteinen von unbehandelten Huh7 Zellen und 100-fachen Überschuss der unmarkierten kompetitiven Oligonukleotide; Bande 7: GATA-1^{T/T}-Sonde mit Kernproteinen von Huh7 Zellen die für 6 h mit 500 IU/mL IFN- α behandelt wurden; Bande 8: GATA-1^{T/T}-Sonde mit Kernproteinen von Huh7 Zellen die für 6 h mit 500 IU/mL IFN- α behandelt wurden unter Zugabe des 100-fachen Überschusses der unmarkierten kompetitiven Oligonukleotide; Bande 9: GATA-1^{T/C}-Sonde mit Kernproteinen von Huh7 Zellen die für 6 h mit 500 IU/mL IFN- α behandelt wurden; Bande 10: GATA-1^{T/C}-Sonde mit Kernproteine von Huh7 Zellen die für 6 h mit 500 IU/mL IFN- α behandelt wurden unter Zugabe des 100-fachen Überschusses der unmarkierten kompetitiven Oligonukleotide; Bande 11: GATA-1^{T/T}-Sonde mit Kernproteinen von Huh7 Zellen die für 6 h mit 1000 IU/mL IFN- γ behandelt wurden; Bande 12: GATA-1^{T/T}-Sonde mit Kernproteinen von Huh7 Zellen die für 6 h mit 1000 IU/mL IFN- γ behandelt wurden unter Zugabe des 100-fachen Überschusses der unmarkierten kompetitiven Oligonukleotide; Bande 13: GATA-1^{T/C}-Sonde mit Kernproteinen von Huh7 Zellen die für 6 h mit 1000 IU/mL IFN- γ behandelt wurden; Bande 14: GATA-1^{T/C}-Sonde mit Kernproteinen von Huh7 Zellen die für 6 h mit 1000 IU/mL IFN- γ behandelt wurden unter Zugabe des 100-fachen Überschusses der unmarkierten kompetitiven Oligonukleotide.

Das Bindungsmuster der GATA-1^{T/C} Sonde zeigte deutliche Unterschiede zu dem der GATA-1^{T/T} Sonde (Abbildung 33, Pfeile). Zudem konnten auch Unterschiede der Bindungsmuster in Abhängigkeit von der Behandlung der Huh7 Zellen beobachtet werden. Das Bindungsmuster der GATA-1^{T/C} Sonde zeigte unabhängig von der Behandlung der Huh7 Zellen weniger intensive Bandenshifts als die GATA-1^{T/T} Sonde (Abbildung 33, Bande 5, 9 und 13). Zudem konnte beobachtet werden, dass die GATA-1^{T/C} Sonde bei der Reaktion mit unbehandelten Huh7 Zellen einen Bandenshift weniger ausbildet, als die GATA-1^{T/T} Sonde (Abbildung 33, schwarzer Pfeil).

3.3 Die Rolle des Tumorsuppressorproteins PML in der Hepatokarzinogenese

3.3.1 Die PML-Expression im HCC

Um den Einfluss des Tumorsuppressors PML auf die Regulation der TRAIL-Expression analysiert zu können erfolgten zunächst die Analyse der PML-mRNA-Expression im HCC. Dies erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Untersuchungen zur TRAIL-Expression in HCC-Patienten (3.1). Auch hier wurde neben dem Tumorgewebe (TT) das den Tumor umgebene nicht tumoröse Gewebe (TST) sowie das Lebergewebe von Patienten die nicht an HCC erkrankten (NTL) hinsichtlich der PML-mRNA-Expression analysiert.

Die PML-mRNA-Expression unterscheidet sich, anders als die TRAIL-Expression, bereits zwischen NTL und TST der HCC-Patienten. Wobei die PML-mRNA-Expression im Gewebe von Patienten ohne HCC (NTL) signifikant ($P \leq 0,002$) höher ist als im nicht tumorösen Gewebe der HCC-Patienten (TST). Weiterhin zeigte sich, dass sich die PML-mRNA-Expression im Tumorgewebe (TT) nicht weiter vom tumorumgebenen Gewebe (TST) unterscheidet (Abbildung 34).

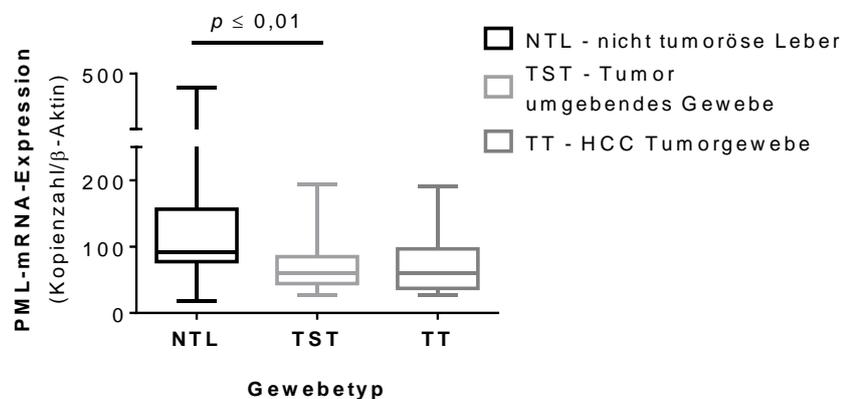


Abbildung 34: PML-mRNA-Expression in Leber- und Tumorgewebe aus HCC-Patienten, sowie aus Lebergewebe von Patienten ohne HCC.

Die PML-mRNA-Expression im Gewebe wurde mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und auf β -Aktin normiert. Die PML-mRNA-Expression ist als Boxplot mit 95 % Konfidenzintervall für Patienten ohne HCC (NTL), dem Tumor umgebenen Lebergewebe (TST) und dem HCC-Gewebe (TT) von HCC-Patienten angegeben. Die statistische Analyse erfolgte zwischen NTL und TST mittels ungepaartem Student'schen T-Test und zwischen TST und TT mittels zweiseitigem gepaartem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Herzer et al., 2013) konnten mittels immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass die PML-Protein-Expression im HCC-Gewebe deutlich geringer ausfällt als im tumorumgebenen Gewebe und das

diese Beobachtung unabhängig von der dem HCC zu Grunde liegenden Lebererkrankung ist. In den nachfolgenden Analysen sollte untersucht werden, ob die verringerte PML-Protein-Expression im HCC-Gewebe möglicherweise auf Proteindegradationsprozesse zurückzuführen ist und ob dies durch die spezifische Inhibition des Proteasoms unterbunden werden kann. Hierfür wurden die Hepatomzellen HepG2 und Hep3B mit dem Proteasominhibitor MG-132 behandelt und im zeitabhängigen Verlauf hinsichtlich ihrer PML-Protein-Expression analysiert.

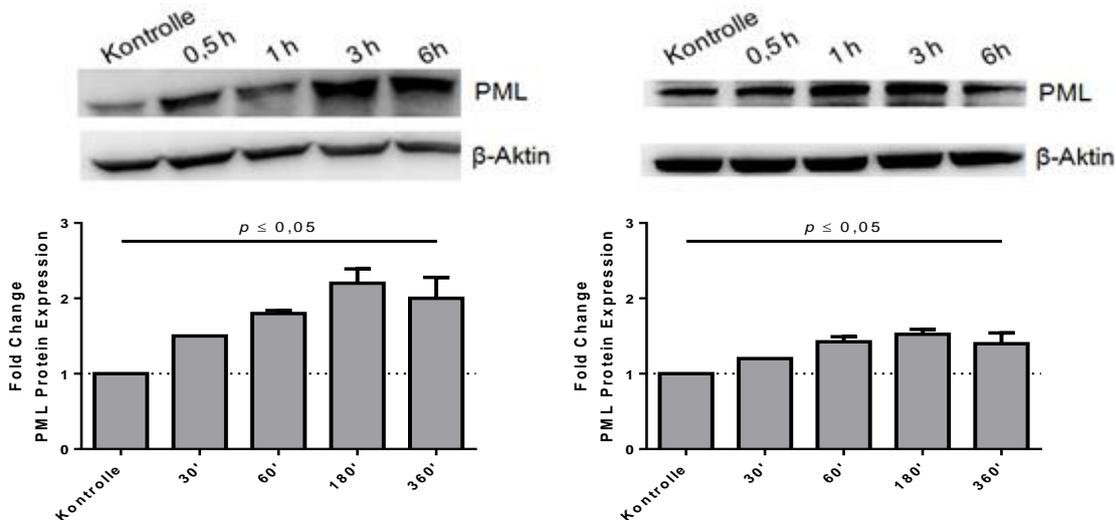


Abbildung 35: Einfluss des Proteasominhibitors MG-132 auf die PML Protein Expression. HepG2 (A) und Hep3B (B) Zellen wurden für 0,5, 1, 3 und 6 h mit 1 μ M des Proteasominhibitors MG-132 behandelt. Anschließend wurde das Gesamtprotein isoliert und 30 μ g mittels SDS-Page und Westernblot auf die PML Proteinexpression analysiert (oben). Die nachfolgende densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageJ, von 2 unabhängigen Experimenten, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA unter Verwendung eines Signifikanzniveaus von $P \leq 0,05$. β -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet.

Für beide Zelllinien zeigte sich eine konstante Zunahme der PML-Protein-Expression in Abhängigkeit vom Behandlungszeitraum mit MG-132. Bereits 1 Stunde nach MG-132-Behandlung zeigte sich sowohl in HepG2 als auch in Hep3B Zelllinien eine deutliche Zunahme der PML-Protein-Expression um das 1,5-fache und stieg in HepG2 Zellen nach 3 stündiger Behandlung auf das 2-fache weiter an (Abbildung 35).

3.3.2 Einfluss von PML auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass mit einer niedrigeren PML-Protein-Expression eine deutlich höhere Proliferationsaktivität sowie eine deutlich verringerte Apoptoserate im Lebergewebe einhergeht (Herzer et al., 2013). Um in diesem Zusammenhang den Einfluss von PML auf die Entstehung und Entwicklung eines HCCs genauer zu untersuchen, wurden die Migrationsfähigkeit und die Fähigkeit zur Kolonienbildung von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der PML-Expression analysiert. Hierfür erfolgte zunächst die Transfektion der Huh7 Zellen mit PML-spezifischer siRNA, was nach 48 h zu einer 40 %igen Reduktion der PML-mRNA-Expression führte (Abbildung 36).

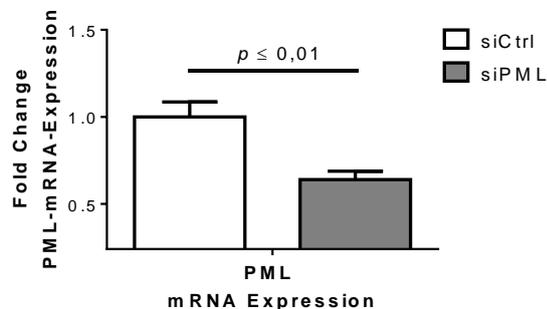


Abbildung 36: Reduktion der PML-mRNA-Expression nach siRNA Behandlung.

Fold Change und Standardabweichung der PML-mRNA-Expression nach 48 stündiger Behandlung der Huh7-Zellen mit 25 nM unspezifischer (siCtrl) oder PML-spezifischer (siPML) siRNA aus drei unabhängigen Experimenten. Die Analyse der TRAIL-mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR und wurde auf β -Aktin normiert. Die statistische Auswertung erfolgte nach zweiseitigem Student'schem T-Test mit einem Korrekturfaktor α von 5 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 ($P \leq 0,01$).

Die Migrationsfähigkeit von Huh7-Zellen wurde in Abhängigkeit von der PML-Expression mittels *Boyden-Chamber*-Assay analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit unspezifischer (siCtrl) oder PML-spezifischer (siPML) siRNA behandelt und anschließend untersucht. Die Reduktion der PML-Expression führt zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsfähigkeit. Huh7-Zellen mit verminderter PML-Expression (siPML) zeigen eine 1,6-fach höhere Migrationsfähigkeit (Abbildung 37) als Huh7-Zellen mit normaler PML-Expression (siCtrl).

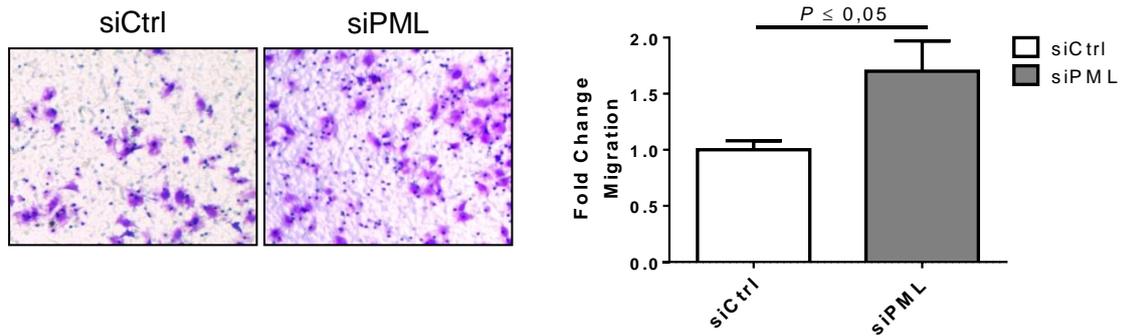


Abbildung 37: Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der PML Expression.

(Links) Migrierte Huh7-Zellen nach 24 stündiger Inkubation im Boyden-Chamber-Assay bei vorheriger Behandlung der Zellen mit 25 nM PML-spezifischer siRNA (siPML) oder unspezifischer siRNA (siCtrl). (Rechts) *Fold Change* und Standardabweichung der Migrationsfähigkeit von Huh7-Zellen nach 48 stündiger Behandlung mit 25 nM siCtrl oder siPML und 24 h Inkubation im Boyden-Chamber-Assay aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgte durch Auszählung der mit Kristallviolett gefärbten Zellen im Lichtmikroskop. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ungepaartem Student'schem T-Test und einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$

Auch die Fähigkeit zur Kolonienbildung steigt bei Verminderung der PML-Expression signifikant an. Huh7-Zellen mit verminderter PML-Expression (siPML) bilden eine 2-fach höhere Anzahl an Kolonien im *Soft-Agar* als Huh7-Zellen mit normaler PML-Expression (siCtrl) (Abbildung 38).

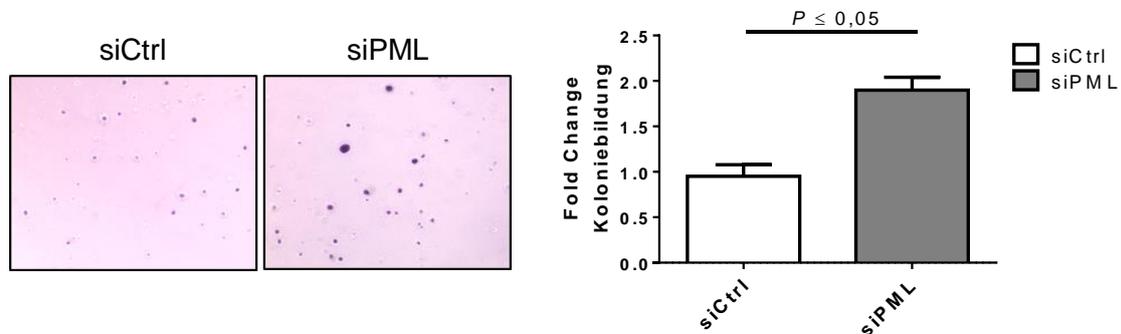


Abbildung 38: Fähigkeit zur Kolonienbildung von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der PML Expression.

(Links) Koloniebildung von Huh7-Zellen nach 21 tägiger Inkubation im Soft-Agar-Assay bei vorheriger Behandlung der Zellen mit 25 nM PML spezifischer siRNA (siPML) oder unspezifischer siRNA (siCtrl). (Rechts) *Fold Change* und Standardabweichung der Fähigkeit zur Kolonienbildung von Huh7-Zellen nach 48 stündiger Behandlung mit 25 nM siCtrl oder siPML nach 21 tägiger Inkubation im Soft-Agar-Assay aus zwei unabhängigen Experimenten (B). Die Quantifizierung der Kolonien erfolgte durch mikroskopische Auszählung nach Kristallviolett-Färbung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ungepaartem Student'schem T-Test und einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

3.3.3 Einfluss von PML auf die TRAIL-Expression

Der Einfluss von PML auf die TRAIL-Expression wurde ebenfalls nach RNAi Analysen mittel quantitativer *real-time* PCR untersucht. Hierbei zeigten Huh7-Zellen mit verminderter PML-Expression (siPML) eine signifikante Reduktion der TRAIL-mRNA-Expression von 25 % (Abbildung 39) im Vergleich zu Huh7-Zellen mit normaler PML-Expression (siCtrl).

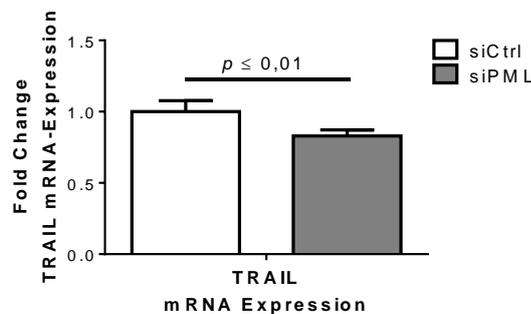


Abbildung 39: Einfluss von PML auf die TRAIL-Expression

Fold Change und Standardabweichung der TRAIL-mRNA-Expression nach 48 stündiger Behandlung der Huh7-Zellen mit 25 nM unspezifischer (siCtrl) oder PML-spezifischer (siPML) siRNA aus drei unabhängigen Experimenten. Die Analyse der TRAIL-mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht und wurde auf β -Aktin normiert. Die statistische Auswertung erfolgte nach zweiseitigem Student'schem T-Test mit einem Korrekturfaktor α von 5 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 ($^{**} P \leq 0,01$).

Um auszuschließen, dass die Verminderung der TRAIL-Expression auf unspezifische Wechselwirkungen der siPML zurück zu führen ist, wurden Huh7-Zellen mit PML-Expressionsplasmiden transfiziert und nach 24 h hinsichtlich der TRAIL-Expression untersucht. Die dabei verwendeten PML-Expressionsplasmide (2.1.8) wurden von Dr. T. Hofmann (DKFZ Heidelberg) zu Verfügung gestellt und kodieren für verschiedene Isoformen von humanem PML. Wie in Abbildung 40 deutlich wird, steigt die PML-mRNA-Expression bereits 24 h nach der Transfektion der Zellen mit allen PML-Expressionsplasmiden im Vergleich zu den mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen, deutlich an.

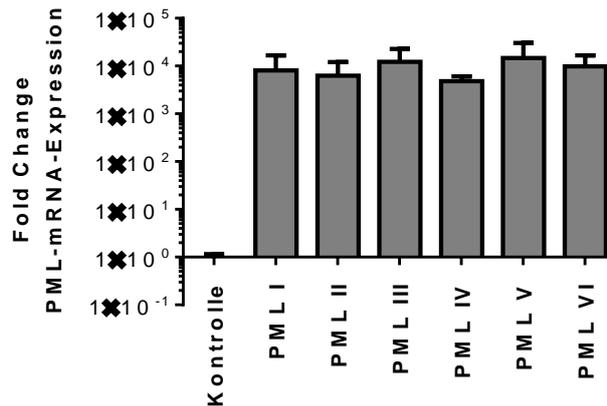


Abbildung 40: Induktion der PML-Expression nach Transfektion der Zellen mit den verschiedenen PML-Expressionsplasmiden.

(Oben) *Fold Change* und Standardabweichung der PML-mRNA-Expression 24 h nach der Transfektion der Huh7-Zellen mit den verschiedenen PML-Expressionsplasmiden aus drei unabhängigen Experimenten. Die Analyse der PML-mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR und wurde auf β -Aktin normiert. Die Normierung erfolgte auf Huh7-Zellen die mit dem Kontrollvektor pRL-SV40 transfiziert wurden.

Die Analyse der TRAIL-Expression 24 h nach Transfektion der Huh7-Zellen mit den PML-Expressionsplasmiden zeigte, dass die TRAIL-Expression in Abhängigkeit von der überexprimierten PML-Isoform unterschiedlich stark ansteigt (Abbildung 41).

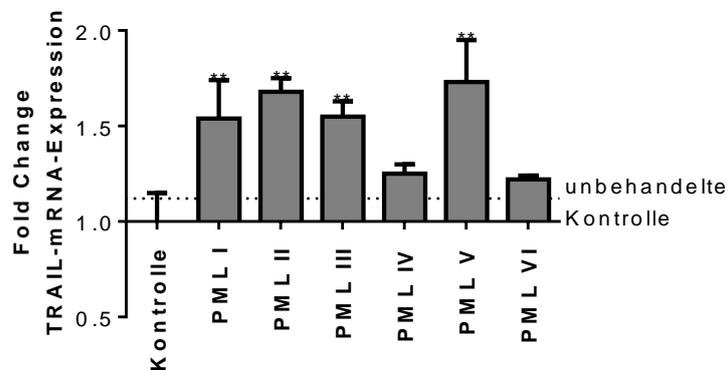


Abbildung 41: Einfluss der PML-Isoformen auf die TRAIL-Expression.

(Oben) *Fold Change* und Standardabweichung der TRAIL-mRNA-Expression 24 h nach der Transfektion der Huh7-Zellen mit den verschiedenen PML-Expressionsplasmiden aus drei unabhängigen Experimenten. Die Normierung erfolgte auf Huh7 -Zellen die mit dem Kontrollvektor pRL-SV40 transfiziert wurde. Die Analyse der TRAIL-mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR und wurde auf β -Aktin normiert. Die statistische Auswertung erfolgte nach zweiseitigem Student'schem T-Test mit einem Korrekturfaktor α von 5 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 (** $P \leq 0,01$).

Zusätzlich zu den beschriebenen RNAi-Analysen wurde der Einfluss von PML auf die TRAIL-Expression in murinem Lebergewebe analysiert. Dafür wurde die TRAIL-Expression in Lebergewebe aus PML-defizienten Mäusen ($PML^{-/-}$) mit der TRAIL-Expression in Lebergewebe von Wildtyp Mäuse mittels mRNA Transkriptomanalyse verglichen. Die hierbei verwendeten Mausstämme sind unter 2.2.2.1 und 3.3.3 genauer

beschrieben. Bei PML-Defizienz zeigt sich eine signifikante ($P \leq 0,05$) Reduktion der TRAIL-mRNA Expression um 50 % im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Abbildung 42).

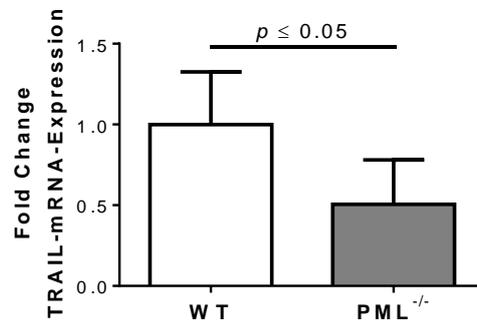


Abbildung 42: TRAIL-mRNA Expression in PML^{-/-} bzw. Wildtyp Mäusen.

Fold Change und Standardabweichung der TRAIL-mRNA-Expression in Lebergewebe von 12 Monate alten Wildtyp (WT) bzw. PML-defizienten(PML^{-/-}) Mäusen. Die Analyse der TRAIL-mRNA-Expression erfolgte mittels mRNA-Transkriptomanalyse, die statistische Auswertung erfolgte nach zweiseitigem Student'schem T-Test mit einem Korrekturfaktor α von 5 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 ($P \leq 0,01$).

3.3.4 Der Einfluss von PML auf die HCV-assoziierte Hepatokarzinogenese

3.3.4.1 PML-Defizienz und HCV - Die Leberkarzinogenese der Maus im Langzeitmodell

Es ist bereits bekannt, dass sowohl eine PML-Defizienz, als auch die Expression der HCV-Proteine die induzierte Hepatokarzinogenese begünstigen und dass dieser Effekt durch die Kombination beider Faktoren weiter gesteigert werden kann (Herzer et al., 2012). Um zu untersuchen, ob die PML-Defizienz oder die Expression der HCV-Proteine auch die natürliche, nicht induzierte Hepatokarzinogenese begünstigen kann, erfolgten *in vivo* Analysen mit Hilfe eines Mausmodells. Die verwendeten Mausstämme sind in Tabelle 11 zusammengefasst und unter 2.2.2 genauer beschrieben.

Tabelle 28: Versuchsgruppen für das natürliche Karzinogenesemodell.

	Name	Tier- anzahl	Gewicht	Alter (Monaten)	Mäuse mit Leber- schädigung	Leber- schädigung (Anzahl)
Wildtyp	WT	10	39,5 ± 5,4	15 ± 1	-	-
Transgen	HCV+/+	10	40,3 ± 5,3	19 ± 2	-	-
Transgen	PML-/-	10	33,1 ± 2,7	17 ± 5	1	Fettleber (1)
Transgen	HCV+/+ PML-/-	10	38,5 ± 5,2	14 ± 3	5	Fettleber (2), Zirrhose (2), HCC (4)

Zehn Mäuse jeder Gruppe wurden über einen Zeitraum von mindestens 12 Monaten beobachtet. Anschließend wurden die Mäuse getötet und auf Veränderungen des Gewichtes und die Entstehung von Leberschädigungen untersucht (Tabelle 28).

Die Analyse des Phänotyps zum Zeitpunkt der Organentnahme zeigte, dass sich weder HCV^{+/+} Mäuse noch HCV^{+/+}PML^{-/-} hinsichtlich ihres Körpergewichtes von WT Mäusen unterschieden, wohingegen PML^{-/-} Mäuse ein verringertes Körpergewicht zeigten als WT Mäuse (Tabelle 28).

Durch die makroskopische Untersuchung und die anschließende H/E-Färbung des Lebergewebes ergaben sich je nach Genotyp deutlich unterschiedliche Ergebnisse. Die Lebern der WT Mäuse waren sowohl makroskopisch als auch in der H/E-Färbung gänzlich unauffällig (Abbildung 43 A). Auch die Lebern von 12 Monate alten HCV^{+/+} Mäusen zeigten keine pathologischen Veränderungen auf (Abbildung 43 B). Die Untersuchung des Lebergewebes von PML^{-/-} Mäusen zeigte ebenfalls in fast allen Mäusen (90 %) eine unauffällige Gewebestruktur, wohingegen in einem der Mäuse (10 %) eine leichte Verfettung des Gewebes beobachtet werden konnte (Abbildung 43 C).

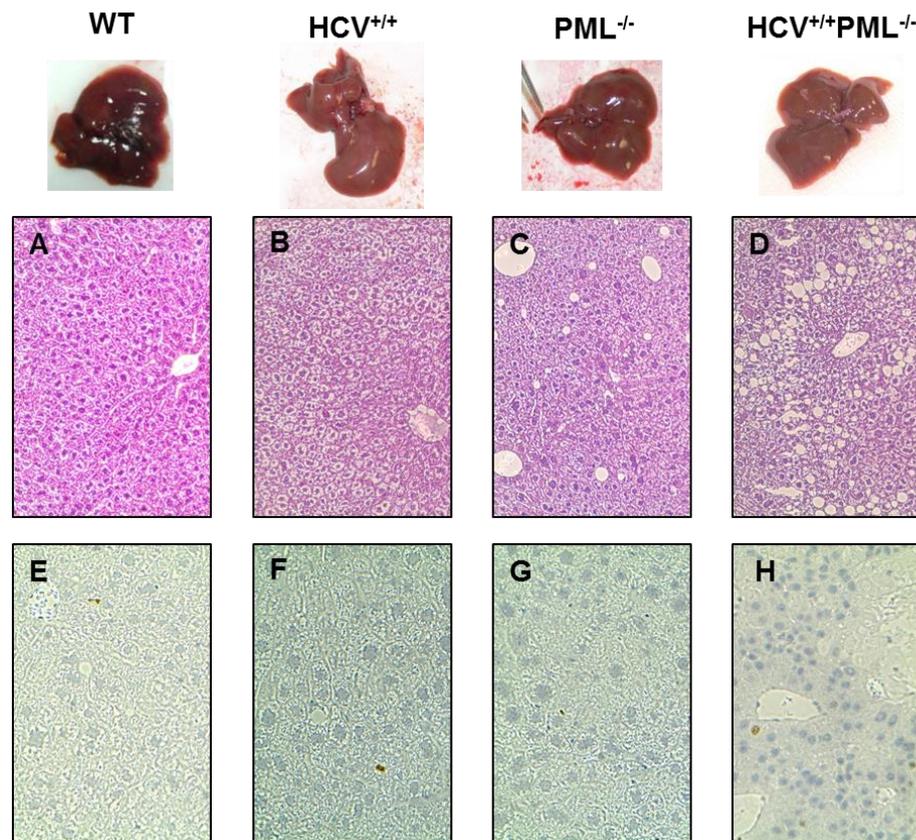


Abbildung 43: Histologische Untersuchung der Lebern von 12 Monate alten WT, HCV^{+/+}, PML^{-/-} oder HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen.

Das Lebergewebe von 12 Monate alter WT, HCV^{+/+}, PML^{-/-} oder HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen wurde entnommen, fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Anschließend wurde Hämatoxylin-Eosin (H/E)-Färbungen (A-D) und Ki67-Färbungen (E-H) durchgeführt. Die gefärbten Schnitte sind in 40-facher Vergrößerung dargestellt.

Bei der Betrachtung der HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse zeigte sich in 50 % der Mäuse eine pathologisch unauffällige Leber, in 10 % der Mäuse jedoch eine deutliche Leberzellverfettung (Abbildung 43 D). Diese Mäuse zeigten jedoch, ebenso wie HCV^{+/+} und PML^{-/-} Mäuse keinerlei Veränderungen in der Proliferationsaktivität des Lebergewebes im Vergleich zu WT Mäusen (Abbildung 43 E-H). In den anderen 40 % der HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse zeigten sich deutliche pathologische Veränderungen in Form von Lebertumoren (Abbildung 44). Diese bildeten sich in erster Linie auf dem Boden einer Leberzellverfettung (10 %) oder Leberzirrhose (20 %). Es konnte jedoch auch in 10 % der Mäuse bereits bei der makroskopischen Betrachtung eine Tumorentwicklung festgestellt werden, bei der sich nach der H/E-Färbung eine ansonsten pathologisch unauffällige Leber zeigte (Abbildung 44 C, E). Die nachfolgende Ki67-Färbung des Gewebes zeigte einen Anstieg der Proliferationsaktivität im Tumorgewebe (TT: Abbildung 44 F) im Vergleich zum tumorumgebenen Gewebe (TST: Abbildung 44 D) sowie dem Lebergewebe von gesunden HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen (NTL: Abbildung 44 B).

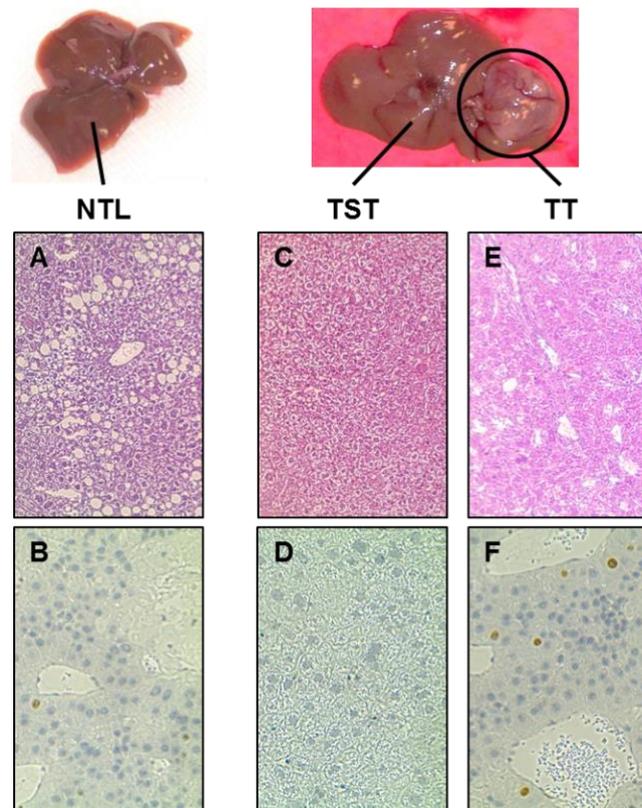


Abbildung 44: Immunhistologische Untersuchung von tumorfreen und tumortragenden $HCV^{+/+}PML^{-/-}$ Mäusen.

Das Lebergewebe von 12 Monate $HCV^{+/+}PML^{-/-}$ Mäusen mit und ohne Tumorausbildung wurde entnommen, fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Anschließend wurde Hämatoxylin-Eosin (H/E)-Färbungen (A, C, E) und Ki67-Färbungen (B, D, F) durchgeführt. Die gefärbten Schnitte sind in 40-facher Vergrößerung dargestellt.

3.3.4.2 PML-Defizienz und HCV – Genetische Veränderungen im Mausmodell

Um Einblicke in die molekularen Veränderungen zu gewinnen, die durch die PML-Defizienz und die Expression der HCV-Proteine hervorgerufen werden, erfolgten Transkriptomanalysen der mRNA und miRNA des Lebergewebes von Mäusen aller vier Stämme (WT, $HCV^{+/+}$, $PML^{-/-}$, $HCV^{+/+}PML^{-/-}$). Die nachfolgende Analyse der mRNA Arrays, in die ausschließlich Mäuse ohne Leberschädigung mit einbezogen wurden, konnten 94 Gene identifiziert werden, die in mindestens einem der transgenen Mausstämmen ($HCV^{+/+}$, $PML^{-/-}$, $HCV^{+/+}PML^{-/-}$) signifikant ($P \leq 0,05$) anders exprimiert werden als in WT Mäusen und zudem einen Variationskoeffizienten CV (*coefficient of variation*) $<0,25$ aufwiesen (Abbildung 45).

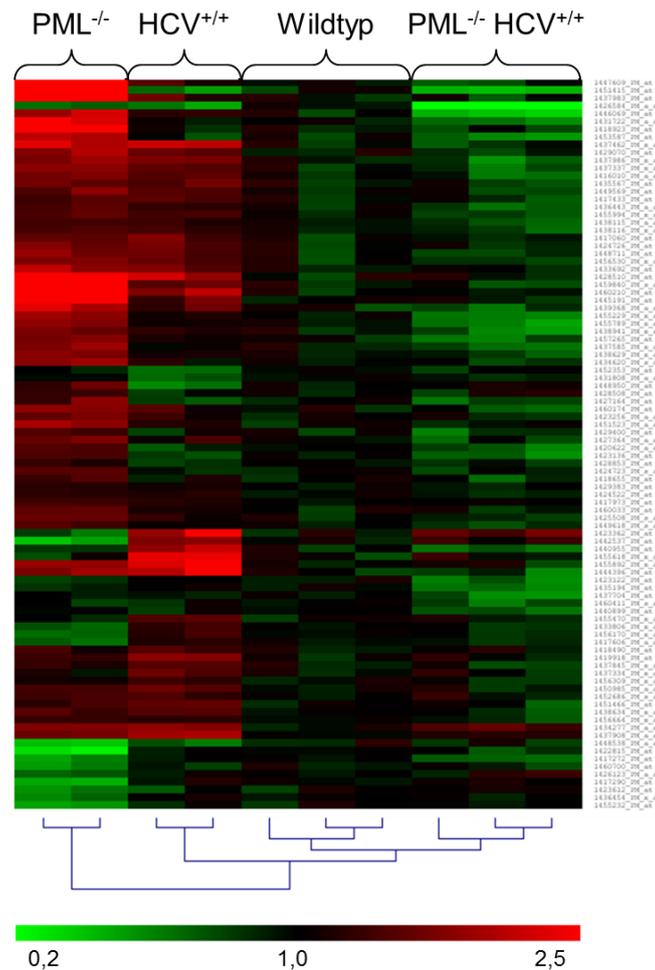


Abbildung 45: Heat Map der mRNA Transkription.

Dargestellt sind die *Fold Changes* der mRNA Expression von WT, HCV^{+/+}, PML^{-/-} sowie HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen nach der Normierung auf die gemittelte mRNA Expression in WT Mäusen. Der Variationskoeffizienten (*coefficient of variation*) zwischen den Mäusen eines Stammes betrug CV <0,25. Es sind nur Gene dargestellt die in mindestens einem der transgenen Mausstämmen (HCV^{+/+}, PML^{-/-}, HCV^{+/+}PML^{-/-}) signifikant anders exprimiert werden als in WT Mäusen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$. Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte mittels MeV 4.9.0:

Das Expressionsmuster von PML^{-/-} Mäuse zeigte in der hierarchischen Clusteranalyse den größten Unterschied zu dem von WT Mäusen. Von den 94 identifizierten Genen zeigen 74 % eine signifikante Veränderung zwischen WT und PML^{-/-} Mäusen. Von diesen 70 Genen wurden 20 % geringer und 80 % stärker exprimiert als in WT Mäusen. Die Analyse der HCV^{+/+} Mäuse zeigte, dass 33 % dieser 94 Gene eine signifikant andere Expression erfahren als in WT Mäusen, wobei auch hier ein Großteil der Gene (84 %) stärker exprimiert wurde. Die Betrachtung der HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse zeigt nur eine geringe Veränderung des Expressionsmusters im Vergleich zum WT. Es zeigte sich nur für 11 % der 94 Gene eine signifikante Veränderung, wobei diese zum Großteil (80 %) in einer Verminderung der Expression im Vergleich zu WT

Mäusen resultierte. Die genaue Anzahl der verminderten Gene, sowie die Minima und Maxima der *Fold Change* sind in Tabelle 29 angegeben.

Tabelle 29: *Fold Change* der mRNA-Expression der transgenen Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen.

Die maximale und minimale Veränderung der hepatische mRNA Expression ist als *Fold Change* zur zu WT Mäusen dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05 ermittelt.

	<i>Fold Change</i>	Signifikant anders als der WT, % (n)	Niedrigere Expression als WT [%]	Höhere Expression als WT [%]
PML ^{-/-}	0,27 - 27	74 (70)	20	80
HCV ^{+/+}	0,55 - 2,4	33 (31)	16	84
HCV ^{+/+} PML ^{-/-}	0,07 - 1,5	11 (10)	80	20

Neben der Genexpression der Mäuse wurde zusätzlich die miRNA-Expression untersucht. Auch hier wurden zunächst nur Mäuse der transgenen Mausstämme (HCV^{+/+}, PML^{-/-}, HCV^{+/+}PML^{-/-}) ohne Leberschädigung mit WT Mäusen verglichen. Es konnten 20 miRNAs identifiziert werden, die in mindestens einem der drei transgenen Stamme einem signifikanten ($P \leq 0,05$) Unterschied zeigten als WT Mäuse (Tabelle 30).

Tabelle 30: miRNA Expression der transgenen Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen.

Die hepatische miRNA Expression ist als *Fold Change* zu WT Mäusen dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05 ermittelt.

	PML ^{-/-}		HCV ^{+/+}		HCV ^{+/+} PML ^{-/-}	
	<i>Fold Change</i> zum Wildtyp	<i>P</i>	<i>Fold Change</i> zum Wildtyp	<i>P</i>	<i>Fold Change</i> zum Wildtyp	<i>P</i>
miRNA 465c-1	1.1	0.784	1.5	0.411	2.0	0.021
miRNA 465c-2	1.1	0.727	1.5	0.391	1.9	0.040
let-7i	0.7	0.043	0.6	0.017	0.8	0.071
miRNA 106a	0.4	0.038	0.5	0.005	0.6	0.074
miRNA 106b	0.6	0.312	0.8	0.336	0.6	0.048
miRNA 1196	1.8	0.047	1.5	0.491	0.9	0.376
miRNA 139	0.6	0.275	0.5	0.121	0.6	0.026
miRNA 146a	0.3	0.030	0.4	0.119	0.5	0.107
miRNA 192	0.8	0.201	0.8	0.037	0.9	0.277
miRNA 193	0.7	0.028	1.1	0.785	1.2	0.455
miRNA 1947	0.8	0.531	1.2	0.768	2.1	0.033
miRNA 195	0.7	0.343	0.6	0.009	1.0	0.693
miRNA 199a-1/2	0.3	0.091	0.2	0.002	0.5	0.049
miRNA 199b	0.5	0.119	0.3	0.024	0.6	0.113
miRNA 23a	0.7	0.033	0.7	0.044	0.9	0.156
miRNA 24-1/2	0.6	0.033	0.8	0.183	0.8	0.188
miRNA 25	0.6	0.237	0.6	0.249	0.4	0.016
miRNA 29a	0.6	0.012	0.6	0.264	0.9	0.528
miRNA 3102	3.3	0.047	2.0	0.356	0.6	0.484
miRNA 455	0.9	0.722	1.4	0.459	1.5	0.045

Beim Vergleich des miRNA Expressionsmusters zeigte sich für PML^{-/-} Mäusen ein signifikanter Unterschied des Expressionslevels in 45 % der identifizierten miRNAs, von denen 78 % ein vermindertes und 22 % ein erhöhtes Expressionslevel aufweisen im Vergleich zu WT Mäusen. In HCV^{+/+} Mäusen zeigte sich eine Veränderung der miRNA Expression in 35 % der zuvor identifizierten miRNAs, wobei hier ausschließlich eine Erhöhung des Expressionslevels im Vergleich zu WT Mäusen zu beobachten war. Bei der Analyse des miRNA Expressionslevels in HCV^{+/+}PML^{-/-} zeigte sich eine signifikante Veränderung in 40 % der 20 zuvor identifizierten miRNAs, die zu gleichen Teilen in einer Erhöhung bzw. Verminderung der miRNA Expression im Vergleich zu WT Mäusen resultiert.

3.3.4.3 PML-Defizienz und HCV – Genetische Veränderungen der Hepatokarzinogenese

Um die molekularen Mechanismen der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese weiter aufklären zu können, wurden Transkriptomanalysen der mRNA und miRNA von HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen durchgeführt, bei denen zum Einen keine pathologischen Veränderungen der Lebern zu beobachten waren (NTL) und solcher HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse, die einen Tumor ausbildeten, wobei hier sowohl das Tumorgewebe (TT) als auch das tumorumgebene Gewebe (TST) analysiert wurde (Abbildung 46).

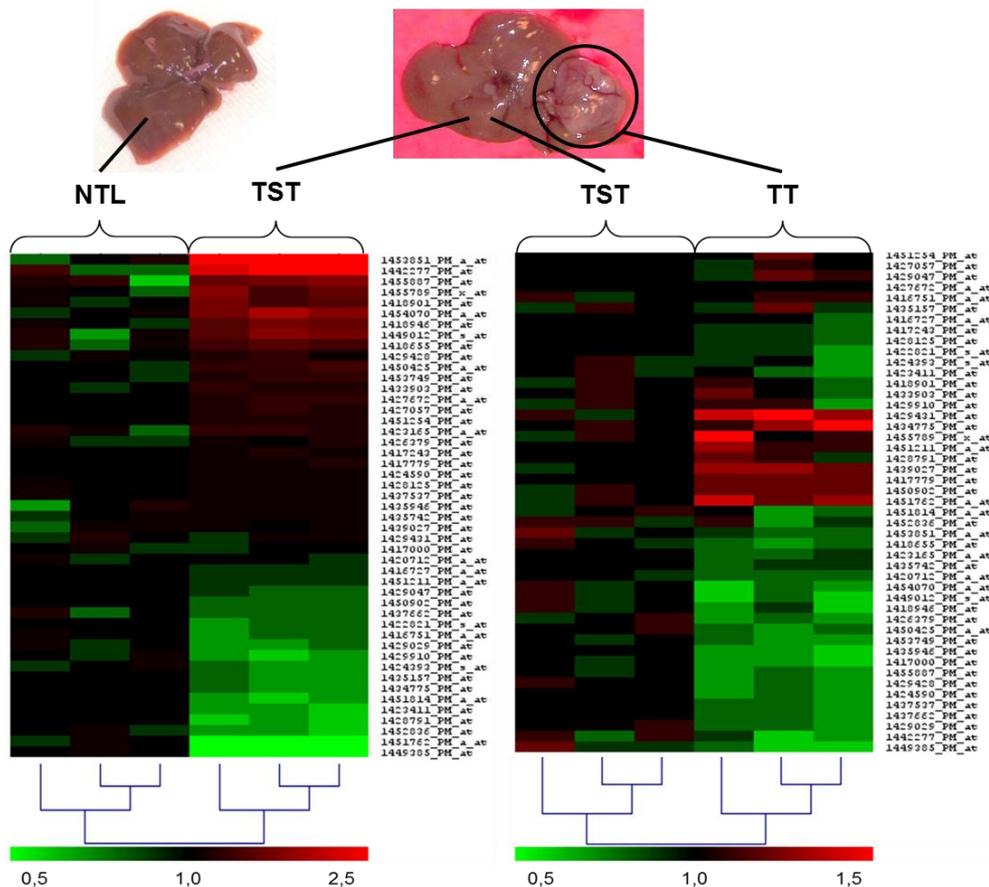


Abbildung 46: Heat Map der mRNA Expression von tumorfreien und tumortragenden HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen.

Dargestellt sind die *Fold Changes* der mRNA Expression von HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen. Hierbei wurde zum Einen das Expressionslevel von tumorfreien (NTL) HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen mit dem tumorumgebenen Gewebe (TST) der tumortragenden HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse verglichen (links), die mRNA Expression wurde auf das gemittelte Expressionslevel der NTL normiert. Weiterhin wurde das Expressionslevel im Tumor (TT) und dem tumorumgebenen Gewebe (TST) der tumortragenden HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen miteinander verglichen (rechts). Hierbei ist das mRNA Expressionslevel auf die gemittelte Expression im tumorumgebenen Gewebe (TST) normiert. Der Variationskoeffizienten (*coefficient of variation*) in den einzelnen Gruppen betrug CV <0,25. Es sind nur Gene dargestellt, die in mindestens einem der beiden Vergleiche (NTL – TST; TST - TT) einen signifikanten Unterschied zeigen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$. Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte mittels MeV 4.9.0:

Es wurden 47 Gene identifiziert, die entweder einen signifikanten ($P \leq 0,01$) Unterschied zwischen dem NTL und dem TST der HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse (30 Gene) oder einen signifikanten ($P \leq 0,01$) Unterschied zwischen dem TST und dem TT (20 Gene) der HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse mit Tumor zeigten, auch hierbei wurden nur solche Gene mit in die Analyse einbezogen, die einen Variationskoeffizienten CV <0,25 aufweisen (Tabelle 31).

Tabelle 31: Fold Change der mRNA-Expression bei tumortragenden und tumorfreien HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen.

Die maximale und minimale Veränderung der hepatische mRNA-Expression ist als *Fold Change* dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,01 ermittelt.

	<i>Fold Change</i>	$P \leq 0,01$, % (n)	NTL < TST/ TST < TT [%]	NTL > TST/ TST > TT [%]
NTL – TST	0,4 – 7,9	64 (30)	53	47
TST - TT	0,6 - 1,4	42 (20)	20	80

Für die Analyse der miRNA Expression wurde ebenfalls HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse in die Untersuchung mit einbezogen, die keinen pathologischen Hintergrund der Leber zeigten (NTL), sowie solche mit Tumorausbildung, wobei bei diesen Mäusen ebenfalls das tumorumgebene (TST) sowie das Tumorgewebe (TT) untersucht wurde.

Tabelle 32: miRNA Expression bei tumortragenden und tumorfreien HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäusen.
Die hepatische miRNA Expression ist als *Fold Change* dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student'schen T-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05 ermittelt.

	TT - TST		TST - NTL	
	<i>Fold Change</i> TT/TST	<i>P</i>	<i>Fold Change</i> TST/NTL	<i>P</i>
miRNA 465c-1	1.2	0.273	0.6	0.008
miRNA 465c-2	1.2	0.284	0.6	0.025
let-7i	1.1	0.873	1.6	0.015
miRNA 106a	1.0	0.140	1.1	0.010
miRNA 106b	0.7	0.154	2.6	0.022
miRNA 1196	1.0	0.969	2.9	0.036
miRNA 139	0.9	0.827	0.8	0.034
miRNA 146a	1.2	0.594	0.5	0.006
miRNA 192	0.5	0.030	1.4	0.124

Es konnten 8 miRNAs identifiziert werden, die einen signifikanten ($P \leq 0,05$) Unterschied zwischen dem TST und dem NTL aus HCV^{+/+}PML^{-/-} zeigten. Mit dem Vergleich des TT und des TST der tumortragenden HCV^{+/+}PML^{-/-} Mäuse konnte eine miRNA identifiziert werden, die im Tumorgewebe signifikant verringert (50 %) exprimiert wird, im Vergleich zum umgebenen Gewebe (Tabelle 32).

3.4 Medizinische Parameter zur Prognose der Tumorrezidivrate und des Überlebens von HCC-Patienten nach einer Lebertransplantation

Für die retrospektiven Analysen zur Beurteilung der Leberwerte als Prädiktoren für die Tumorrezidivrate und das post-operative Überleben von HCC-Patienten nach Lebertransplantation wurden 175 Patienten, die zwischen Januar 2000 und Dezember 2013 auf Grund eines HCCs lebertransplantiert wurden, retrospektiv analysiert. Dabei wurden sowohl demografische Daten, Patientencharakteristika als auch klinikopathologische Parameter der Patienten in die Untersuchung einbezogen.

Teile der in diesem Abschnitt dargestellten Daten sind in der Publikation „*Glutamate dehydrogenase and alkaline phosphatase as very early predictors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation.*“ (Piras-Straub, K., Khairzada, K., Gerken, G., Saner, F., Treckmann, J., Paul, A., Canbay, A., Herzer, K., 2015. *Digestion* 91, 117–127. doi:10.1159/000370212) veröffentlicht.

Die Mehrzahl der untersuchten Patienten war männlich (74 %) und wurde innerhalb der MILAN-Kriterien (93 %) transplantiert. Zum Zeitpunkt der Transplantation wiesen die Patienten einen mittleren *Model for End-stage Liver Disease score* (MELD-Score) von 14 (6 - 40) auf und waren zum Großteil unter 60 Jahre (79 %) alt. Alle in diese Untersuchung einbezogenen Parameter und deren Einfluss auf die Tumorrezidivrate und das Überleben der Patienten sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Tabelle 33: HCC-Rekurrenz, mittleres Überleben und Hazard Ratio der HCC-Patienten.
Übersicht über die HCC-Rekurrenz (χ^2 -Test nach Pearson), das mittlere Überleben (Log-Rank-Test) sowie die Hazard Ratio (Cox-Regression) in Abhängigkeit von Tumor- oder Patientencharakteristika bzw. der laborchemischen Parameter. Es wurde ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ festgelegt.

	Patienten n (%)	Rekurrenz	P (χ^2 -test)	Mittleres Überleben (Monate)	P (Log-Rank)	COEF β (95% CI)	P (Cox Regression)	Hazard Ratio
Geschlecht								
Männlich	129 (74)	22 %	0.843	95	0.589		0.590	1
Weiblich	45 (26)	24 %		100		-0.166 (-0.335 – 0.190)		0.85
Alter								
< 60 Jahre	110(70)	27 %	0.045	103	0.079		0.082	1
> 60 Jahre	36(30)	13 %		80		0.486 (-0.027 – 0.449)		1.63
Tumor Stadium								
pT I-II	110(75)	19 %	0.0004	108	0.001		0.001	1
pT III-IV	36(25)	49 %		67		0.871 (0.145 – 0.612)		2.39
Tumor-Grading								
G= 1-2	152(87)	21 %	0.107	100	0.286		0.290	1
G= 3	22(13)	36 %		63		0.386 (-0.143 – 0.478)		1.47
HCC-Rekurrenz								
Nein	133(77)	-	-	115	0.0001		0.00001	1
Ja	40(23)			51		1.406 (0.382 – 0.839)		4.08
Ätiologie								
HBV	27(16)	19 %		119				1
ASH	29(17)	10 %	0.219	94	0.163	0.811 (-0.034 – 0.739)	0.074	2.25
HCV	78(45)	26 %		94		0.839 (-0.076 – 0.805)	0.105	2.32
NASH	7(4)	29 %		33		1.408 (0.005 – 1.218)	0.048	4.09
Other	33(19)	30 %	-	95	-	-	-	-
MILAN-Kriterien								
Innerhalb	162(93)	23 %	0.855	98	0.721		0.721	1
Außerhalb	12(7)	25 %		42		0.214 (-0.418 – 0.604)		1.24
BMI								
< 30 kg/m ²	138(82)	24 %	0.807	99	0.350		0.352	1
≥ 30 kg/m ²	31(18)	23 %		85		0.302 (-0.145 – 0.408)		1.35
α-Fetoprotein								
AFP < 10 IU/mL	69(44)	17 %		104				1
AFP 10 - 100 IU/mL	49(31)	18 %	0.036	112	0.024	-0.341 (-0.463 – 0.166)	0.356	0.71
AFP 100 - 400 IU/mL	20(13)	40 %		76		0.459 (-0.140 – 0.538)	0.250	1.58
AFP > 400 IU/mL	20(13)	40 %		59		0.742 (0.007 – 0.638)	0.045	2.10
Alanin Aminotransferase								
ALT < 35 U/L	64(38)	23 %	0.956	100	0.849		0.849	1
ALT > 35 U/L	104(62)	24 %		96		0.053 (-0.213 – 0.259)		1.05
Aspartat Aminotransferase								
AST < 35 U/L	52(31)	17 %	0.204	100	0.681		0.681	1
AST > 35 U/L	117(69)	26 %		98		0.122 (-0.200 – 0.306)		1.13
Alkalische Phosphatase								
AP < 100 U/L	41(28)	19 %	0.391	114	0.003		0.008	1
AP > 100 U/L	106(72)	25 %		88		1.260 (0.143 – 0.951)		3.52
Gamma-glutamyl- Transpeptidase								
gGT < 35 U/L	21(13)	29 %	0.583	84	0.943		0.943	1
gGT > 35 U/L	142(87)	23 %		98		0.027 (-0.316 – 0.340)		1.03
Glutamat Dehydrogenase								
GLDH < 10 U/L	82(75)	15 %	0.039	103	0.547		0.548	1
GLDH > 10 U/L	28(25)	32 %		91		0.229 (-0.226 – 0.425)		1.26
Serum Cholinesterase Aktivität								
CHE < 4.9 U/L	74(67)	20 %	0.930	96	0.672		0.510	1
CHE 4.9 – 11.9 U/L	30(27)	20 %		84		-0.286 (-0.492 – 0.244)	0.499	0.75
CHE > 11.9 U/L	7(6)	14 %		110		-0.499 (-0.845 – 0.412)		0.61
Bilirubin								
Bilirubin < 1.2 mg/dL	88(52)	26 %	0.431	100	0.849		0.849	1
Bilirubin > 1.2 mg/dL	80(48)	21 %		96		0.023 (-0.210 – 0.255)		1.05
Immunsuppressive Therapie								
Tacrolimus	76(55)	25 %		87		0.393 (-0.237 – 1.024)	0.221	2.47
Tacrolimus + CellCept	29(21)	17 %		67		0.429 (-0.247 – 1.105)	0.214	2.68
Cyclosporin A	14(10)	29 %	0.326	117	0.289	0.143 (-0.574 – 0.861)	0.696	1.39
Cyclosporin A + CellCept	7(5)	0 %		133		-0.278 (-1.326 – 0.769)	0.602	0.53
Everolimus	13(9)	8 %		91				1

3.4.1 Prädiktoren für die Tumorrekurrenz des HCCs

In 23 % der HCC-Patienten zeigte sich ein post-operatives Tumorrezidiv. Dabei waren mehr als die Hälfte (52 %) dieser HCC-Rezidive bereits innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation zu beobachten, wohingegen sich mehr als 36 Monate nach der Transplantation kaum noch HCC-Rezidive entwickelten (Abbildung 47).

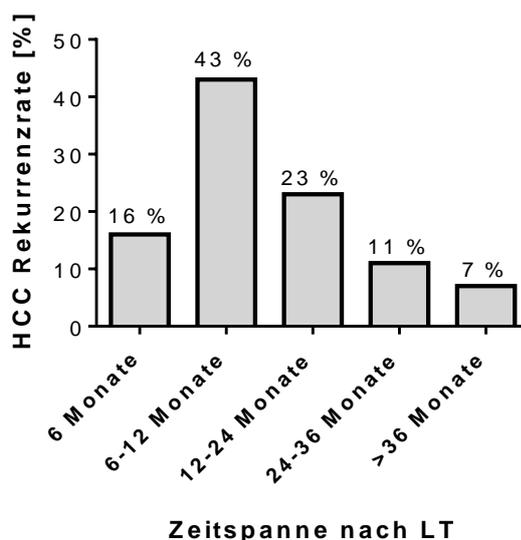


Abbildung 47: Zeitliches Auftreten der HCC-Rekurrenz nach Lebertransplantation.
HCC-Rekurrenzzisiko der Patienten im post-operativen Zeitverlauf.

Bei einem Großteil der Patienten führte mit einem Anteil von 61 % eine virale Hepatitis (vorwiegend Hepatitis C) zu einer HCC-Entstehung. Weitere Krankheiten, die ein HCC zur Folge haben, sind zum Einen mit 19 % die nutritiv toxische Alkoholzirrhose und zum Anderen mit 5 % eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Daneben gibt es noch andere Lebererkrankungen die nur in seltenen Fällen zu einem HCC führen (Hämochromatose, Autoimmune Erkrankungen, Morbus Wilson, Primär biliäre Zirrhose oder unbekannte Ursachen). Es zeigte sich, dass NASH-Patienten nicht nur das größte Risiko (29 %) einer post-operativen Tumorrekurrenz, sondern auch ein deutlich schlechteres mittleres Überleben (33 Monate) aufweisen verglichen mit Patienten mit anderen Lebererkrankungen (Tabelle 33).

Bei der Identifikation neuer prognostischer Marker wurden zunächst die Serum-Level verschiedener Leberwerte und Tumormarker (Tabelle 33) auf Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne post-operativer HCC-Rekurrenz analysiert. Hierbei zeigte sich, dass Patienten ohne post-operativer HCC-Rekurrenz sowohl signifikant niedrigere prä-

operative Glutamat Dehydrogenase (GLDH)- als auch Alkalische Phosphatase (AP)-Werte aufwiesen (Abbildung 48).

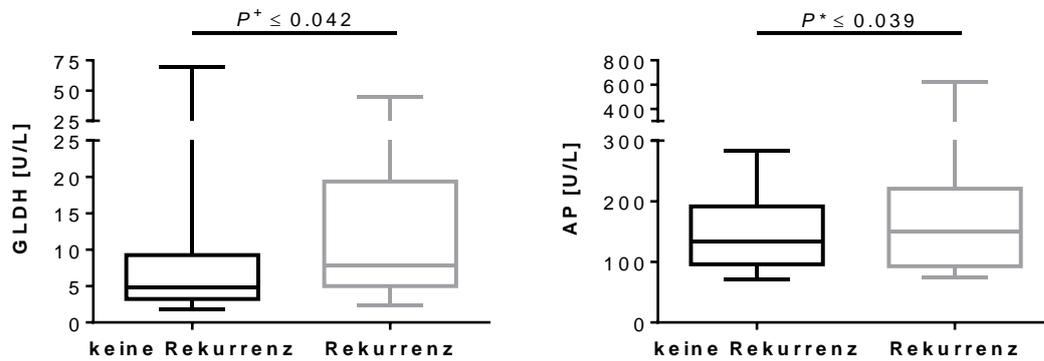


Abbildung 48: Serum-Level der HCC-Patienten vor Lebertransplantation.

Boxplot mit 95 %igem Konfidenzintervall der prä-operativen GLDH-Werte (links) oder AP-Werte (rechts) von HCC-Patienten mit und ohne post-operativer Tumorrekurrenz. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem Student'schen T-Test mit Welch Korrektur (+) bzw. Mann-Whitney-U-Test mit Pearson-Näherung (+), wobei ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt wurde.

Bei einer genaueren Betrachtung der Patienten hinsichtlich ihrer GLDH- und AP-Werte zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit einer post-operativen HCC Rekurrenz in Patienten mit einem GLDH-Wert > 10 U/L signifikant höher ist als in Patienten mit einem GLDH-Wert < 10 U/L (Abbildung 49 links). Auch bei Patienten mit einem AP-Wert < 140 U/L bestand eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit eine post-operative HCC-Rekurrenz zu entwickeln als Patienten mit einem AP-Wert > 140 U/L (Abbildung 49 rechts).

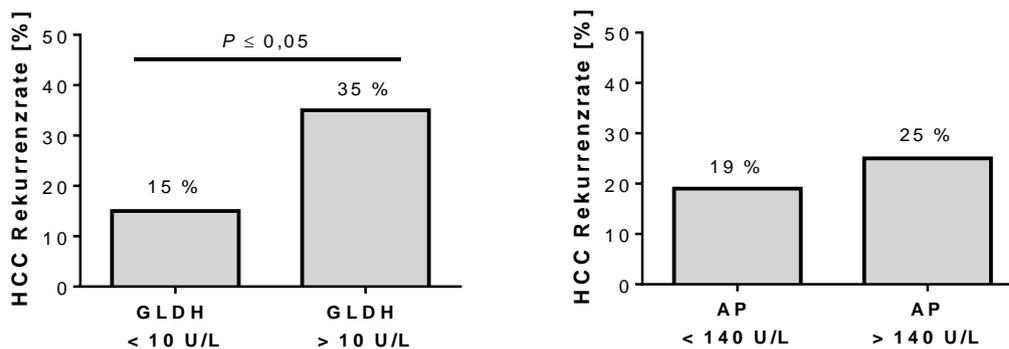


Abbildung 49: HCC-Rekurrenzzrate der Patienten in Abhängigkeit von den prä-operativen GLDH- und AP-Werten.

HCC-Rekurrenzzisiko der Patienten in Abhängigkeit des (links) prä-operativen GLDH-Wertes oder (rechts) AP-Wertes. Die statistische Analyse erfolgte mittels χ^2 -Test mit Pearson-Näherung, wobei ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt wurde.

Die Bedeutung der verschiedenen Leberwerte als Prädiktoren für die Rekurrenzwahrscheinlichkeit der Patienten wird durch multivariate Analysen weiter

verdeutlicht. Hierbei ergab die Kombination des Tumorstadiums mit den prä-operativen Serum Level des Tumormarkers α -Fetoprotein (AFP) mit denen der AP und der GLDH einen weitaus besseren prädiktiven Zusammenhang ($P \leq 0,002$).

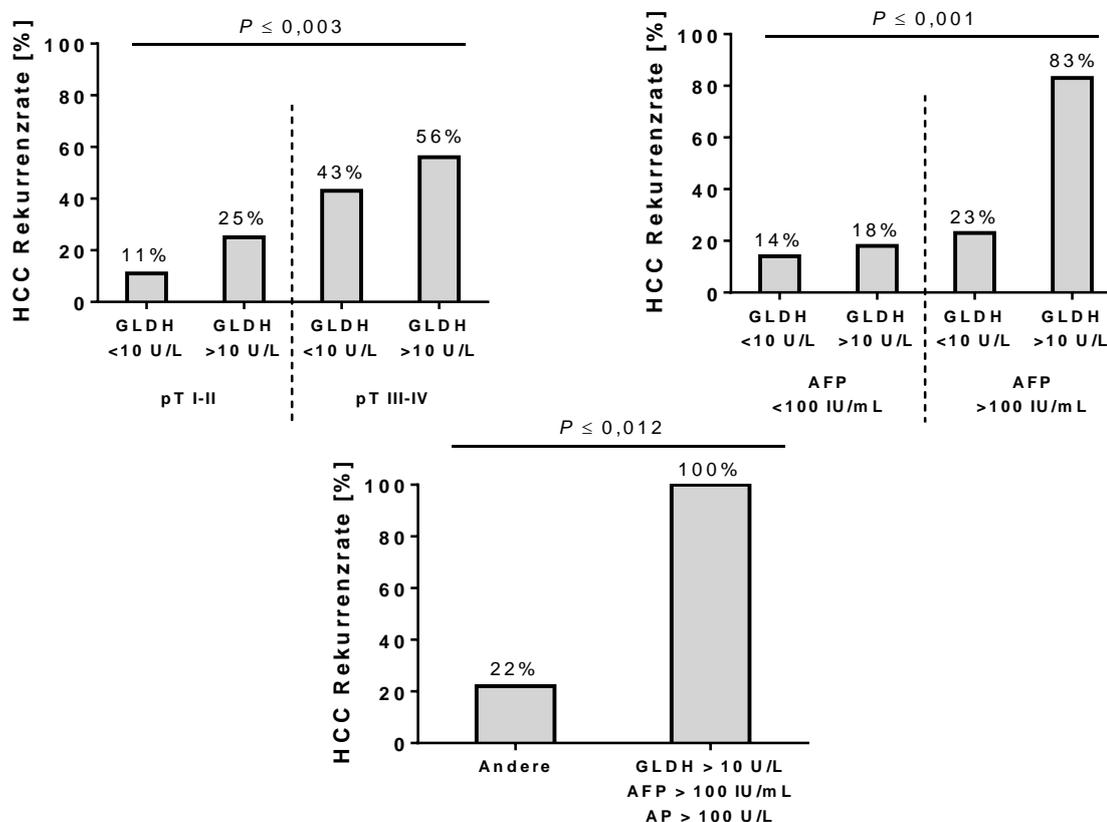


Abbildung 50: Multivariate Analyse zur HCC-Rekurrenz.

HCC-Rekurrenzzisiko der Patienten in Abhängigkeit von zwei oder mehr Parametern. HCC-Rekurrenzzisiko der Patienten in Abhängigkeit des prä-operativen GLDH- Wertes und des Tumorstadiums (Oben links) oder AFP-Wertes (Oben rechts) sowie des prä-operativen GLDH- Wertes und des Tumorstadiums und des AFP-Wertes (unten). Die statistische Analyse erfolgte mittels χ^2 -Test mit Pearson-Näherung, wobei ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt wurde.

Bei Berücksichtigung der GLDH-Level der Patienten in Kombination mit dem Tumorstadium (Abbildung 50 oben links) zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit der HCC-Rekurrenz von beiden Parametern. Patienten mit kleinen Tumoren (pT I-II) und unauffälligen GLDH-Level zeigten eine HCC-Rekurrenzwahrscheinlichkeit von nur 11 %, wohingegen erhöhte GLDH-Level mit einem Rekurrenzzisiko von 25 % einhergehen. Der Einfluss der GLDH auf die HCC-Rekurrenz ist bei Patienten mit fortgeschritteneren Tumorstadien (pT III-IV) noch deutlicher. Hier steigt die Rekurrenzwahrscheinlichkeit von 43 %, in Patienten mit niedrigen GLDH-Leveln, auf 56 %, in Patienten mit erhöhten GLDH-Leveln an ($P \leq 0,003$).

Die Kombination der AFP- und GLDH-Werte führte zu einer offensichtlichen Verbesserung der Vorhersage (Abbildung 50 oben rechts). Patienten, die zum

Zeitpunkt der Transplantation nur Auffälligkeiten in keinem oder nur einem dieser beiden Werte zeigten, entwickelten in 14 %-23 % der Fälle eine HCC-Rekurrenz, wohingegen Patienten mit erhöhten AFP- und AP-Werten in 83 % der Fälle ein HCC-Rezidiv ausbildeten ($P \leq 0,001$). Die genaueste Vorhersage in Hinblick auf die Entwicklung einer HCC-Rekurrenz ließ sich durch die Kombination der GLDH-, AFP- und AP-Werte zum Zeitpunkt der Transplantation erreichen (Abbildung 50 unten). Hierbei zeigten Patienten, die bei keinem oder nur in einem Teil der Laboruntersuchungen erhöhte Werte hatten (Abbildung 50 unten: Andere) eine Rekurrenzwahrscheinlichkeit von 22 %, wohingegen 100 % der Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation Auffälligkeiten in allen drei Laborparametern zeigten (GLDH > 10 U/L, AFP > 100 IU/mL, AP > 100 U/L) eine HCC-Rekurrenz ausbildeten ($P \leq 0,012$).

3.4.2 Prädiktoren für das post-operative Überleben der HCC-Patienten

Beim Vergleich des mittleren post-operativen Überlebens der Patienten sowie dem Hazard Ratio für Mortalität zwischen Patienten mit einem GLDH-Wert < 10 U/L und einem GLDH-Wert > 10 U/L zeigt sich kein Unterschied (Tabelle 33).

Der Vergleich zwischen Patienten mit normwertigen AP-Werten (< 100 U/L) und erhöhten AP-Werten (> 100 U/L) vor der Lebertransplantation zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich des mittleren post-operativen Überlebens (Abbildung 51). Patienten mit einem normwertigen AP-Wert hatten ein mittleres Überleben von 114 Monaten sowie ein 10-Jahres Überleben von 84 %, wohingegen Patienten mit AP-Werten > 100 U/L ein um 2 Jahre verkürztes mittleres Überleben (88 Monate) mit einem 10-Jahres-Überleben von nur 43 % aufwiesen. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse durch die Hazard Ratio zeigte für Patienten mit einem prä-operativen AP-Wert > 100 U/L ein um den Faktor 3,52 erhöhtes Mortalitätsrisiko als für Patienten mit normwertigen AP-Werten vor der Lebertransplantation (Abbildung 51 links).

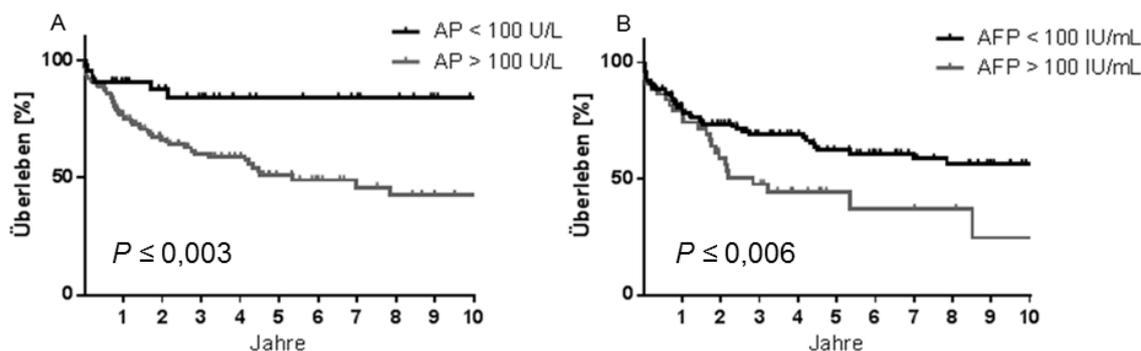


Abbildung 51: Einfluss des Alkalischen Phosphatase-Levels von HCC-Patienten auf das Überleben nach Lebertransplantation.

Kaplan-Meier Überlebenskurven der HCC-Patienten in Abhängigkeit des prä-operativen AP-Wertes (A) oder des AFP-Wertes (B). Die statistische Analyse erfolgte mittels Log-rank-Test mit Welch-Korrektur, wobei ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt wurde.

Die Analyse des Tumormarkers AFP hinsichtlich des Einflusses auf die HCC-Rekurrenz und das Überleben der Patienten nach der Lebertransplantation zeigt, dass Patienten die bereits einen AFP-Wert > 100 IU/mL aufwiesen ein signifikant erhöhtes Risiko haben eine Tumorrekurrenz auszubilden (40 %) als Patienten mit normwertigen oder nur leicht erhöhten AFP-Werten (19 %) vor Transplantation (Tabelle 33). Bei Betrachtung des *Outcomes* der HCC-Patienten nach Transplantation zeigte sich, dass Patienten mit einem AFP-Wert > 100 IU/mL ein signifikant schlechteres mittleres Überleben aufweisen (108 Monate) als Patienten mit einem AFP-Wert < 100 IU/mL (70 Monate), was sich auch in einem deutlich schlechteren 10-Jahres Überleben (AFP < 100 IU/mL: 56 %; AFP > 100 IU/mL: 25 %) und einem um den Faktor 2,17 erhöhtem Hazard Ratio widerspiegelt (Tabelle 34, Abbildung 51 rechts).

Tabelle 34: Überleben und Hazard Ratios der HCC-Patienten unter Berücksichtigung der AP- und AFP-Werte vor der Lebertransplantation.

Übersicht über das mittlere Überleben (Log-Rank-Test) sowie die Hazard Ratio (Cox-Regression) der HCC-Patienten in Abhängigkeit des Tumorstadiums, des prä-operativen AP- bzw. des AFP-Levels vor der Transplantation, sowie die Kombination derselben. Es wurde ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ festgelegt.

	Patienten n (%)	Mittleres Überleben (Monate)	P (Log-Rank)	COEF β (95% CI)	P (Cox Regression)	Hazard Ratio
<u>α-fetoprotein - alcalic phosphatases</u>						
AFP < 100 IU/mL / AP < 100 U/L	25 (19)	118				1
AFP > 100 IU/mL / AP < 100 U/L	13 (10)	92	0.001	0.963 (-0.360 – 1.196)	0.292	2.62
AFP < 100 IU/mL / AP > 100 U/L	71 (54)	102		1.314 (-0.060 – 1.201)	0.076	3.72
AFP > 100 IU/mL / AP > 100 U/L	23 (17)	52		2.241 (0.327 – 1.620)	0.003	9.40

Auch hinsichtlich der Vorhersage des post-operativen Überlebens der Patienten lässt sich durch die Kombination verschiedener Laborwerte eine Verbesserung erreichen. Patienten die prä-operativ sowohl einen AP-Wert < 100 U/L als auch einen AFP-Wert < 100 IU/mL aufwiesen, zeigten ein mittleres Überleben von 118 Monaten mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 85 %. Dahingegen hatten Patienten, die einen dieser beiden Werte oberhalb des entsprechenden Schwellenwertes aufwiesen, ein mittleres Überleben zwischen 92 (AFP > 100 IU/mL) und 102 Monaten (AP > 100 U/L) und eine 10-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 65 % (AFP > 100 IU/mL) bzw. 52 % (AP > 100 U/L). Patienten mit beiden Werten oberhalb dieses Schwellenwertes (AFP > 100 IU/mL und AP > 100 U/L) zeigten ein signifikant geringeres mittleres Überleben von nur noch 52 Monaten und ein 10-Jahres-Überleben von unter 17 % (Tabelle 34, Abbildung 52), was sich in einer 9,4-fach erhöhten Hazard Ratio für Mortalität widerspiegelt.

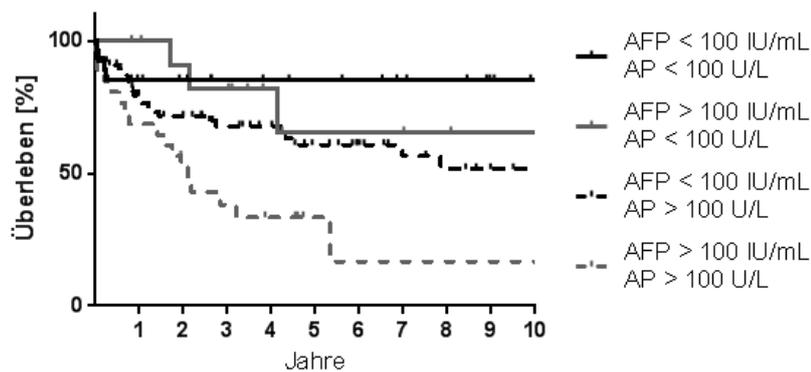


Abbildung 52: Einfluss der prä-operativen AP- und AFP-Werte der HCC-Patienten auf das post-operative Überleben nach Lebertransplantation.

Kaplan-Meier Überlebenskurven der HCC-Patienten in Abhängigkeit des prä-operativen AP- sowie AFP-Wertes. Die statistische Analyse erfolgte mittels Log-rank-Test mit Welch-Korrektur, wobei ein Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt wurde.

4 Diskussion

4.1 Die verminderte Expression von TRAIL im HCC hat Einfluss auf das Tumorwachstum, die Rezurrenz und das Überleben der Patienten

Das TRAIL-Rezeptor-Liganden-System spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Lebererkrankungen (Herr et al., 2007; Sträter et al., 2002), was zu einer genaueren Betrachtung der TRAIL-induzierten Apoptose in Zusammenhang mit der Hepatokarzinogenese geführt hat. Die Expression der TRAIL-Rezeptoren steht dabei sowohl mit der Prognose des HCCs als auch mit der Entwicklung von Tumorrezidiven in Zusammenhang (Cayón et al., 2008; Takeda et al., 2001b).

Die Eigenschaft von TRAIL, in Tumorzellen Apoptose auszulösen unter gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes, ließ ein therapeutisches Potenzial von TRAIL vermuten (Cha et al., 1999). Es wurden zum Einen Antikörpern gegen die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 entwickelt (Johnstone et al., 2008; Stagg et al., 2008), zum Anderen wurde TRAIL als vielversprechendes Additiv oder als alternative therapeutische Strategie diskutiert (Falschlehner et al., 2009).

Der Ausfall der TRAIL-induzierten Apoptose in Tumorzellen durch den Verlust der TRAIL-Rezeptoren oder der TRAIL-Rezeptor-Liganden-Interaktionen hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren (McCarthy et al., 2005b; Walczak, 2013). Hierbei zeigten Untersuchungen an TRAIL-defizienten Mäusen vor allem einen verstärkenden Einfluss auf die Progression der Tumorerkrankungen (Grosse-Wilde et al., 2008). *In vitro* Studien konnten auch die Bedeutung des TRAIL-Liganden für die Apoptose in Hepatomzellen aufzeigen (Herzer et al., 2005a), die genaue Rolle von TRAIL bei der Entstehung und Entwicklung des HCCs wurde bisher jedoch nicht untersucht. Auch wurde die Bedeutung von TRAIL als prognostischer Indikator im Zusammenhang mit dem HCC bisher noch nicht näher betrachtet.

Die in diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen eine signifikant geringere TRAIL-Expression im HCC-Gewebe verglichen mit dem tumorumgebenen Gewebe. Die TRAIL-Expression in Lebergewebe von Patienten, die kein HCC hatten, zeigten dabei das gleiche Level wie im tumorumgebenen Lebergewebe der HCC-Patienten (3.1.1, Abbildung 11). Dies führte zu der Annahme, dass der Verlust der TRAIL-Expression die Tumorentwicklung unterstützt. Bei separater Betrachtung der Patienten

hinsichtlich ihrer Lebererkrankung zeigte sich, dass nur NASH-Patienten Unterschiede zwischen dem NTL der nicht-HCC-Patienten und dem tumorumgebenen Lebergewebe der HCC-Patienten aufwiesen. Die TRAIL-Expression in NASH-Patienten mit HCC ist dabei signifikant geringer im Vergleich zu NASH-Patienten ohne Tumor. Zwei vorherige Studien konnten in diesem Zusammenhang zwar eine erhöhte Expression der TRAIL-Rezeptoren bei NASH nachweisen (Cayón et al., 2008; Farrell et al., 2009) wobei der TRAIL-Ligand jedoch nicht näher untersucht wurde. Im Gegenteil dazu zeigten Patienten mit verringerter TRAIL-Expression eine Prädisposition für HCC, vor allem in Kombination mit den präkarzinogenen Bedingungen der NASH. Durch das ohnehin schon erhöhte Risiko der NASH-Patienten für die Entwicklung eines HCCs auch weit vor der Entwicklung einer Leberzirrhose (Ertle et al., 2011), würden NASH-Patienten mit verminderter TRAIL-Expression von der Behandlung mit TRAIL-induzierenden Substanzen wie beispielsweise IFN profitieren, um die Entstehung eines HCC zu vermeiden (Guo et al., 2004; Llovet and Bruix, 2008; Merchant et al., 2004). Auch wenn angenommen wird, dass ein Großteil der primären Lebertumore auf dem Boden chronischer Lebererkrankungen und Zirrhosen entsteht (Schattenberg et al., 2011), könnte der Verlust der TRAIL-Expression in einen allgemeinen Prozess involviert sein der zu Lebererkrankungen führt.

Patienten mit anderen Lebererkrankungen zeigten keinen so deutlichen Unterschied der TRAIL-Expression zwischen dem Lebergewebe der Patienten mit und ohne HCC. Der Unterschied zwischen dem Tumor und dem tumorumgebenen Lebergewebe der HCC-Patienten ist jedoch unabhängig von der zu Grunde liegenden Lebererkrankung. Es ist allgemein bekannt, dass chronische Infektionen mit viralen Hepatitiden (HBV, HCV) den größten Risikofaktor für die HCC-Entstehung darstellen und für 80 % der weltweiten HCC-Erkrankungen verantwortlich sind. Hierbei wird angenommen, dass die HCC-Entstehung durch virale Hepatitiden auf Grund der Kombination von zwei verschiedenen Mechanismen ausgelöst wird (Herzer et al., 2007). Zum Einen führt die Infektion mit viralen Hepatitiden zu einer vermehrten Lyse der Hepatozyten sowie der Stimulation der Mitose, was weitere Ereignisse auslöst, die zu einer Transformation der Leberzellen führen können. Zum Anderen ist eine erhöhte Fluktuation der Hepatozyten zu beobachten, was über die Aktivierung von Faktoren der Leberregeneration vermittelt wird.

Präliminierte Analysen legen nahe, dass die Infektion humaner Hepatomzellen mit HCV-Replikon zu einer Sensibilisierung der Zellen hinsichtlich der TRAIL-induzierten Apoptose führt. Die in dieser Arbeit dargestellte Reduktion der TRAIL-Expression in HCV-assoziierten HCCs bestätigt die Hypothese, dass der Verlust der TRAIL-

Expression einen Vorteil für das Tumorwachstum darstellt. Der Verlust von TRAIL in einem fortgeschritteneren Stadium des HCCs könnte zudem ein zunehmend aggressives Wachstum des Tumors bedingen. In diesem Zusammenhang unterstützen die hier beschriebenen Ergebnisse die Hypothese, dass der Verlust der TRAIL-Expression nicht nur die Bildung eines HCCs begünstigt, sondern vor allem die Tumorprogression fördert, da es zu einer Störung der auto- sowie parakrinen Induktion der Apoptose kommt. Diese Überlegungen werden durch Studien bestätigt, die eine Assoziation von TRAIL mit der Immun-vermittelten Tumor-Surveillance untersucht haben (Ohira et al., 2006; Takeda et al., 2002). Der protektive Effekt von TRAIL konnte zum Teil auf tumorinfiltrierende NK Zellen zurückgeführt werden, da bei Abwesenheit von TRAIL oder NK-Zellen Tumore mit Sensitivität zu TRAIL-vermittelter Apoptose zunahm. Weiterhin zeigte sich, dass die Gabe von TRAIL-neutralisierenden Antikörpern die Bildung von Sarcomen begünstigte, was bestätigt, dass der Verlust der TRAIL-Expression die Tumorprogression begünstigen kann.

Die Korrelation der TRAIL-Expression mit Charakteristika des HCCs zeigen die klinische Relevanz der unter 3.1.1 beschriebenen Ergebnisse auf. Die TRAIL-Expression ist nicht nur mit der Tumorgroße bzw. Ausdehnung des HCCs assoziiert, sondern zeigt auch eine signifikante Korrelation mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (3.1.1, Abbildung 13). Daher scheint Lebergewebe mit einer gestörten oder verminderten TRAIL-Expression eine Umgebung zu schaffen, die einen klaren Wachstumsvorteil für die Progression des HCCs darstellt. Diese Überlegungen werden auch dahingegen bestätigt, dass eine Verminderung der TRAIL-Expression in Hepatomzellen zu einer Erhöhung der Migrationsfähigkeit führt (3.1.2, Abbildung 15). Die Untersuchung der klinischen Relevanz der TRAIL-Expression zeigt den prognostischen Wert des TRAIL-Expressionslevels im Tumor für das *Outcome* der Patienten auf. Die TRAIL-Expression eignet sich daher als Prädiktor für die Wahrscheinlichkeit der HCC-Rekurrenz und auch das Überleben der Patienten (3.1.3, Abbildung 17, Abbildung 18). Eine normale TRAIL-Expression im HCC scheint einen positiven Effekt auf die Tumorerkrankung und somit auch auf das post-operativen Überleben der Patienten das zu haben. Weiterführend könnten daher Patienten mit geringer TRAIL-Expression von Therapien profitieren, die zu einer Induktion der TRAIL-Expression führen (Colombo et al., 2013; Herr et al., 2007; Llovet and Bruix, 2008).

4.2 Eine Sequenzvariation in der GATA-1 Bindungsstelle des humanen TRAIL-Promotors führt zu einer Dysregulation der TRAIL-Expression.

Die Entstehung und Entwicklung eines HCCs ist mit verschiedenen genetischen Veränderungen verbunden. Neben Chromosomenabberation (Hoshida et al., 2010), Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie p53, Ras oder c-Met (*hepatocyte growth factor*) (Boix et al., 1994; Oda et al., 1992; Tsuda et al., 1989) spielt auch der Verlust der Heterozygotität (Weinberg, 1995; Zhang et al., 1994) sowie die Mikrosatelliten-Instabilität (Salvucci et al., 1999) eine wichtige Rolle bei dieser Entwicklungen. Die meist individuelle Kombination dieser Ereignisse oder auch die Beobachtung von multiallelen Deletionen macht das HCC zu einer komplizierten Erkrankung.

Neben diesen pathogenen Veränderungen, die meist im Verlauf der Krankheitsprozesse auftreten, spielen auch SNPs (*single nucleotide polymorphism*) bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. SNPs sind Einzelnukleotid-Variationen innerhalb des Genoms die einer heterogenen Verteilung unterliegen und deren Allelvariationen häufiger als 1 % vorkommen (Berthier et al., 2005). SNPs in kodierenden Bereichen der DNA können zu strukturellen und teilweise auch funktionellen Veränderungen der betroffenen Proteine führen (Al-Haggag et al., 2012; Kimchi-Sarfaty et al., 2007) oder durch die Einführung oder Zerstörung von Stoppcodons das Expressionsmuster der Proteine verändern (Cordovado et al., 2012). Es hat sich zum Einen gezeigt, dass eine große Anzahl an Erkrankungen mit dem Auftreten von SNPs assoziiert ist (Chang and Kan, 1979; Hamosh et al., 1992; Ingram, 1956), zum Anderen aber auch ein Zusammenhang von SNPs mit dem Metabolismus verschiedenster Substanzen besteht (Goldstein, 2001; Lee, 2004; Yanase et al., 2006). So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass SNPs des *IL28B* Gens die Wirksamkeit der IFN- α basierten HCV-Therapie beeinflussen können (Thomas et al., 2009).

Weiterführende Analysen konnten auch einen Einfluss von SNPs auf die Entstehung und Entwicklung eines HCCs nachweisen (Jin et al., 2011; Wang et al., 2013; Xu et al., 2013), wobei auch Auswirkungen auf das Überleben der Patienten zu beobachten waren (Sümbül et al., 2012). So zeigte sich, dass ein SNP im Osteopontin Promotor von HCC-Patienten nicht nur einen entscheidenden Einfluss für die Osteopontinexpression an sich, sondern auch auf die Progression des Tumors und das Überleben der Patienten hatte (Dong et al., 2013).

In diesem Kontext erfolgte die Analyse der Nukleotidsequenz des humanen TRAIL-Promotors um zu untersuchen, ob die unter 3.1.1 dargestellte Verminderung der TRAIL-Expression im HCC mit Sequenzvariationen innerhalb der Promotorregion in Zusammenhang steht. Wie unter 3.2.1 beschrieben zeigen sich in der hier dargestellten Analyse drei Sequenzvariationen innerhalb der TRAIL-Promotorregion, die sowohl im Tumorgewebe als auch im tumorumgebenen Lebergewebe der HCC-Patienten zu beobachten sind. Die an Position -1453 beobachtete Sequenzvariation -1453T/C ist mit einer Häufigkeitsverteilung von 69/31 % zu beobachten, die Sequenzvariation -1136A/G zeigt eine Verteilung von 57/43 % und die Sequenzvariation -966A/C zeigt eine Frequenz von 80/20 % innerhalb des dargestellten Patientenkollektivs (Abbildung 20).

Die durchgeführten *in silico* Analysen ergaben weder eine Übereinstimmung einer Transkriptionsfaktorbindungsstelle mit dem einen noch mit dem anderen der beiden Allele der Sequenzvariation -966A/C des humanen TRAIL-Promotors. Aus diesem Grund wurde diese Sequenzvariation in den nachfolgenden Analysen nicht weiter berücksichtigt, da ein Zusammenhang mit der Fragestellung hinsichtlich Sequenzvariationen in regulatorischen Bereichen des TRAIL-Promotors nicht gegeben ist. Es ist bekannt, dass SNPs in nicht-kodierenden Bereichen der DNA eine Rolle bei der Regulation der Chromatinstruktur spielen können (Huang et al., 2012) und so einen Einfluss auf das Krebsrisiko darstellen (Li et al., 2014), sodass es von Interesse sein könnte, die diagnostische Funktionalität dieser Sequenzvariation für die Prognose des HCCs oder anderer Lebererkrankungen näher zu untersuchen.

Bei der genaueren Untersuchung der Sequenzvariation -1136A/G zeigte sich, dass diese innerhalb einer HoxD9/10 Bindungsstelle liegt, die im Falle des A-Allels intakt ist und im Falle des G-Allels eine Deletion dieser Bindungsstelle aufweist. Die Korrelation der TRAIL-Expression im Lebergewebe der HCC-Patienten mit dieser Sequenzvariation zeigt, dass kein Zusammenhang zwischen der -1136A/G Sequenzvariation und der Expression von TRAIL im Lebergewebe zu beobachten ist. Die genauere Untersuchung dieser Bindungsstelle in *in vitro* Analysen konnte diese Beobachtung bestätigen und zeigen, dass die Funktionalität des humanen TRAIL-Promotors keinen Funktionalitätsunterschied zwischen den Allelen der -1136A/G Sequenzvariation aufweist (3.2.3, Abbildung 27).

Die Sequenzvariation -1453T/C im humanen TRAIL-Promotor ist innerhalb einer GATA-1 Bindungsstelle lokalisiert, wobei es im Falle des C-Allels zu einer Deletion dieser Transkriptionsfaktorbindungsstelle kommt. Die Betrachtung der TRAIL-

Expression in Abhängigkeit von der Sequenz innerhalb dieser GATA-1 Bindungsstelle zeigt, dass die TRAIL-Expression im Lebergewebe von HCC-Patienten zwischen beiden Allelen der -1453T/C Sequenzvariation signifikant unterschiedlich ist (3.2.2, Tabelle 27). Es zeigt sich, dass der Verlust der GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor durch die GATA-1^{T/C} Sequenzvariation zu einer verminderten Expression von TRAIL führt (3.2.2, Abbildung 22). Diese Überlegung lässt den Schluss zu, dass die GATA-1^{T/C} Sequenzvariation für eine verminderte Expression von TRAIL im HCC verantwortlich ist, was die Anfälligkeit für Tumorerkrankungen erhöhen könnte. Diese Überlegungen lassen sich durch die in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro* Untersuchungen bestätigen. Es zeigt sich, dass die Deletion der GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor durch die Einführung einer Punktmutation, mit dem Ergebnis der in Patienten zu beobachtenden GATA-1^{T/C} Sequenzvariation, zu einer Beeinträchtigung der TRAIL-Regulation führt (3.2.4). Die Deletion der GATA-1 Bindungsstelle führt bei der IFN-vermittelten TRAIL-Expression zu einer deutlichen Abnahme der Induzierbarkeit des humanen TRAIL-Promotors, mit der Konsequenz der bereits unter 4.1 beschriebenen verminderten TRAIL-vermittelten Apoptoseinduktion. Die wesentliche Expression von TRAIL erfolgt auf der Oberfläche von Immunzellen (Halaas et al., 2000; Ho et al., 2011; Modur et al., 2002; van Grevenynghe et al., 2011), vor allem im Zusammenhang mit der IFN-vermittelten Immunantwort (Gong and Almasan, 2000), sodass eine Störung der IFN-vermittelten TRAIL-Induktion und damit der Verlust der Tumor-Surveillance durch Sequenzvariationen innerhalb des TRAIL-Promotors einen entscheidende Vorteil für die Tumorentwicklung darstellen würde (Fanger et al., 1999). Diese Überlegungen werden durch die Korrelation des Differenzierungsgrads des HCCs mit der Deletion dieser GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor weiter bestätigt. Im Patienten zeigt sich, dass der Verlust der GATA-1 Bindungsstelle im humanen TRAIL-Promotor mit einer fortgeschritteneren Tumorerkrankung, also einem schlechteren Differenzierungsgrad des HCCs korreliert (3.2.2, Abbildung 23). Der unter 4.1 bereits beschriebene Einfluss von TRAIL auf die Progression des HCCs sowie auf das Migrationsverhalten von Hepatomzellen zeigt in diesem Zusammenhang auch, dass eine verminderte TRAIL-Expression zu einer unkontrollierten Proliferation führen kann, was wiederum die Entstehung und vor allem aber die Entwicklung und Progression des Tumors unterstützen würde.

4.3 Der Verlust des Tumorsuppressors PML im HCC begünstigt die (HCV-assoziierte) Hepatokarzinogenese und ist bei der Regulation der TRAIL-Expression von entscheidender Bedeutung.

Das PML-Protein ist ein Tumorsuppressor (Chen et al., 2012), der durch die Modulation der p53-Acetylierung und Aktivierung (Pearson et al., 2000) und der Beteiligung an Rb-Protein-abhängigen Mechanismen (Bischof et al., 2002; Mallette et al., 2004) ein wichtiger Regulator der zellulären Seneszenz ist, und zudem durch die Inhibition des Akt-mTOR-Signalwegs (Bernardi et al., 2006; Trotman et al., 2006) auch bei der Regulation der Neoangiogenese beteiligt ist. PML-NBs sind zudem an der Regulation von DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (Dellaire et al., 2006; Dellaire and Bazett-Jones, 2004). PML-defiziente Mäuse weisen daher nicht nur eine erhöhte Sensitivität für die induzierte Karzinogenese auf (Wang et al., 1998a, 1998b), sondern sind auch anfälliger für bakterielle Infektionen (Lunardi et al., 2011).

Die Protein-Expression von PML ist in einer Vielzahl von Tumoren unterschiedlichster Entität vermindert (Gurrieri et al., 2004), was durch unsere bisherigen Untersuchungen (Herzer et al., 2013) auch für das HCC bestätigt werden kann. Die Verminderung der PML-Expression im HCC ist dabei nicht durch genregulatorische Mechanismen zu erklären, da kein Unterschied der PML-mRNA-Expression im Tumor- und tumorumgebenen Lebergewebe der HCC-Patienten zu beobachten ist (Abbildung 34). Die hier dargestellten Ergebnisse ergänzen diese Beobachtungen und zeigen zudem, dass die Inhibition des Proteasoms zu einer Anreicherung des PML-Proteins führte (Abbildung 35), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die verminderte PML-Expression im HCC durch eine verstärkte Degradation des Proteins über Proteasom-abhängige Mechanismen hervorgerufen wird.

In Migrationsassays hat sich gezeigt, dass eine verminderte PML-Expression nicht nur zu einer Erhöhung des Karzinogenesepotentials (Abbildung 38) sondern auch zu einem erhöhten Migrationsverhalten der Hepatomzellen führt (Abbildung 37). Diese Beobachtungen decken sich mit klinischen Daten, die zeigen konnten, dass eine Verminderung der PML-Expression im HCC zum Einen zu einer Erhöhung der Proliferationsrate und zum Anderen zu einer verminderten Apoptose führt (Herzer et al., 2013). Diese Ergebnisse ergänzen vorausgehende Studien zum Einfluss von PML auf das Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen (Reineke et al., 2010) und bestätigen daher die Tumorsuppressor-Funktion des PMLs. Der unter 3.3.3

beschriebene Einfluss von PML auf die TRAIL-Expression der Leber, vor allem auch in Hepatomzellen, zeigt, dass PML nicht nur in Zusammenhang mit einer IFN- α vermittelten TRAIL-Expression Einfluss auf die Apoptose-Regulation nimmt (Crowder et al., 2005; Herzer et al., 2009), sondern diese auch vollkommen unabhängig von äußeren Stimuli beeinflussen kann. Die Tatsache, dass eine verminderte Expression von PML im HCC zu einer Reduktion der TRAIL-Expression führt (Abbildung 39, Abbildung 42), lässt vermuten, dass der unter 4.1 diskutierte Zusammenhang der TRAIL-Expression mit der Progression des HCCs mit einer Beteiligung von PML einhergeht. Diese Schlussfolgerungen werden durch eine Studie zum Mammakarzinom gestützt, die zeigen konnte, dass die PML-Expression mit der Tumorrekurrenz, der Anzahl an p53-Mutationen sowie der Prognose korreliert (Carracedo et al., 2012).

Wie bereits unter 4.1 näher erläutert wurde, spielt die HCV-Infektion eine wesentliche Rolle bei der Entstehung eines HCCs (Moudgil et al., 2013). Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigen den direkten Einfluss von HCV auf die Entstehung und Entwicklung eines HCCs, auch wenn noch weitere Faktoren, wie beispielsweise eine chronische Inflammation beteiligt zu sein scheinen (Washburn et al., 2011). Die Expression des HCVcore-Proteins steht ebenfalls mit der Entstehung von HCC in Zusammenhang (Moriya et al., 1998) und wird durch den direkten Zusammenhang zwischen der Aktivität von PML und der Interaktion des HCVcore-Proteins mit den PML-NBs bestätigt (Herzer et al., 2005b). Die aus dieser Interaktion resultierende Inhibition der PML-Funktionalität kann die Entstehung eines HCCs begünstigen. Neueste Studien bestätigen in diesem Zusammenhang den Einfluss von PML auf die HCV-Replikation (Kuroki et al., 2013) und zeigen so neue Mechanismen auf, durch die PML die Progression der HCV-Erkrankung beeinflussen könnte. Wie bereits zuvor beschrieben, führen sowohl die PML-Defizienz als auch die Expression der HCV-Proteine an sich bereits zu einer Zunahme der chemisch induzierten Hepatokarzinogenese, was durch die Kombination dieser onkogenen Bedingungen noch weiter gesteigert werden kann (Herzer et al., 2012). In diesem Zusammenhang geben die unter 3.3.4 dargestellten Untersuchungen einen tieferen Einblick in die molekularen Zusammenhänge der HCV-assoziierte Hepatokarzinogenese. Anders als bei der chemisch induzierten Hepatokarzinogenese entwickelten weder PML-defiziente noch HCV-transgene Mäuse innerhalb von 12 Monaten spontane Lebertumore (Tabelle 28). Im Gegensatz dazu zeigen die hier dargestellten Langzeituntersuchungen, dass die Kombination der PML-Defizienz mit der Expression der HCV-Proteine in 40 % der Mäuse in einer spontanen Hepatokarzinogenese resultiert, was die Vermutung stützt, dass HCV bei der neoplastischen Formation eine

Rolle spielt (McGivern and Lemon, 2011) und dies über einen PML-vermittelten Mechanismus erfolgt.

Diese Überlegungen werden durch die unter 3.3.4 beschriebenen Genexpressionsanalysen weiter gestützt. Die große Ähnlichkeit der Genexpressionsmuster in Lebern von HCV-transgenen und PML-defizienten Mäusen (Abbildung 45) zeigt, dass die karzinogene Wirkung von HCV unter anderem darauf zurück zu führen sein könnte, dass es die natürliche Funktionalität von PML und somit auch dessen tumorsuppressive Aktivität inhibiert. Diese Überlegungen werden zum Einen durch frühere Arbeiten bestätigt, die zeigen konnten, dass die Interaktion des HCVcore-Proteins mit PML zu einer Inhibition der PML-vermittelten Apoptose von Hepatomzellen führt (Herzer et al., 2005b). Zum Anderen kommt es in HCV-transgene Mäuse mit gleichzeitiger PML-Defizienz durch die Kombination dieser beiden onkogenen Situationen nicht zu einer Addition sondern zu einer Verminderung der beobachteten Effekte, sodass sich das Genexpressionsmuster der Lebern dieser Mäuse wieder deutlich dem Genexpressionsmuster von WT- Mäusen annähert. Zusammenfassend kann daher davon ausgegangen werden, dass die Transformationsaktivität und somit auch onkogene Funktion von HCV über PML-vermittelte Mechanismen verläuft (Moriya et al., 1998; Ray et al., 1996).

Die in Abbildung 46 und Tabelle 32 dargestellten Ergebnisse zeigen bereits vor der Entwicklung von Lebertumoren eine Vielzahl von genetischen Veränderungen in der Leber. Die Genexpressionsprofile der Lebern von gesunden HCV-transgenen PML-defizienten Mäusen (NTL) und dem tumorumgebenen Gewebe der tumortragenden Mäuse (TST) zeigen deutliche Unterschiede im Bereich der Immunantwort (z.B. miRNA 146a), Veränderungen in metabolischen Signalwegen (z.B. Cholin Kinase A) sowie verschiedenen Zellzyklusprozessen (z.B. *Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45* γ). Dadurch, dass diese Unterschiede zwischen dem tumorumgebenen Gewebe der tumortragenden Mäuse und dem Lebergewebe der gesunden Mäuse zu beobachten sind, also bereits vor der Entwicklung des Gewebes zum Tumor auftreten, stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen zu einer karzinogenese fördernden Milieu innerhalb der Leber beitragen. Diese Überlegungen werden durch die direkte Verbindung zwischen der Immunantwort und der Entstehung bzw. Entwicklung von Tumoren bekräftigt (Balkwill and Mantovani, 2001; O'Byrne and Dalgleish, 2001), sowie den in Verbindung mit der Karzinogenese häufig zu beobachtenden Veränderungen in metabolischen Stoffwechselwegen (Levin and Gevers, 1981a, 1981b). Kommt es aber, beispielsweise im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen oder DNA-Schäden, zu Fehlregulationen von Zellzyklusproteinen, könnte dies in einer

erhöhten Fluktuation der Leberzellen resultieren, was wiederum die Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen unterstützt (Levrero, 2006). Diese Überlegungen werden durch Untersuchungen gestützt, die zeigen konnten, dass inflammatorische Reaktionen durch virale Transaktivierung oder andere Leberschäden zu einer Veränderung von epigenetischen Mechanismen führen können, sodass es, wie am Beispiel des IGF-2, zu einer Veränderung des Methylierungsmusters kommt (Feitelson et al., 2004). Daraus könnte, wie im Falle des IGF-2, eine Überexpression und somit eine erhöhte Proliferation (Schirmacher et al., 1992) mit gleichzeitiger Apoptoseinhibition (Lund et al., 2004) resultieren, was wiederum die HCC-Entstehung begünstigen kann (Cariani et al., 1988).

Die unter 3.3.4.3 dargestellten Veränderungen des Genexpressionsprofils zwischen dem Tumorgewebe (TT) und dem tumorumgebenen Gewebe der Mäuse (TST) bestätigen die Komplexität der genetischen Veränderungen, die im Verlauf der HCC-Entstehung zu beobachten sind (Chung et al., 2002; Kim and Wang, 2003; Staib et al., 2003; Wang et al., 2002). Diese regulatorischen Veränderungen sind unter anderem für Gene innerhalb der Zellzyklusregulation (N- α -Acetyltransferase 25) oder Apoptoseinduktion (miRNA 192) zu beobachten (Feng et al., 2011; Starheim et al., 2008). Dabei zeigen sich zum Einen Veränderungen in Genen oder miRNAs deren onkogene Funktionen bereits für andere Tumorentitäten als das HCC bekannt sind (Deshpande et al., 2013), zum Anderen aber auch Veränderungen der Expression von Genen, die bisher nicht mit pathologischen oder karzinogenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden konnten. Diese hier neu identifizierten Gene können als mögliche Marker für die HCC-Diagnose, aber auch als Prädiktoren für das Therapieansprechen oder *Outcome* der Patienten in Betracht gezogen werden (Chang et al., 2011; Ma et al., 2014; Quetglas et al., 2014; Scaggiante et al., 2014).

4.4 Die prä-operativen Glutamatdehydrogenase- und Alkalische Phosphatase-Werte eignen sich als unabhängige Prädiktoren für die Rezidivrate und das Überleben von HCC-Patienten nach der Lebertransplantation.

Der pathologische Status des HCCs korreliert mit dem Risiko der HCC-Rezidivrate und damit auch dem post-operativen Überleben der Patienten nach einer Lebertransplantation. Die bis dato sehr schlechte Überlebenschance der Patienten, die aufgrund eines HCCs lebertransplantiert wurden, konnte durch die Einführung der MILAN-Kriterien deutlich verbessert werden. Hierbei konnte ein 5-Jahresüberleben von mehr als 70 % erreicht werden (Bruix et al., 2011, 2005; EASL-EORTC, 2012; Kudo et al., 2011), was den zu erwartenden Überlebensraten von Patienten entspricht, die aufgrund einer Leberzirrhose ohne HCC lebertransplantiert werden (Figueras et al., 1997). Die Evaluation der Patienten anhand dieser Kriterien ermöglicht somit eine gute Auswahl der Kandidaten, die von einer Lebertransplantation profitieren würden. Obwohl die Einführung der MILAN-Kriterien auch zu einer Verringerung der Häufigkeit der HCC-Rezidivrate geführt hat, gibt es immer mehr Anzeichen dafür, dass eine Vielzahl von Patienten fälschlicherweise von dieser kurativen Therapie ausgeschlossen wurden, da sie aufgrund der Nichterfüllung der Kriterien nicht für eine Lebertransplantation zugelassen wurden (Lai and Lerut, 2014). Eine Multicenter Studie hat in diesem Zusammenhang die Überlebenschance von Patienten nach der Lebertransplantation aufgrund von HCC, auch bei Ausweitung der MILAN-Kriterien, untersucht und konnte zeigen, dass bei Einhaltung der so genannte "rule of up to seven" (HCC mit einem Score von 7, berechnet aus der Summe der Tumore und der Spannweite des größten Tumors in cm) das 5-Jahresüberleben der Patienten bis zu 70 % erreichen konnte (Gugenheim et al., 2013). Die anschließende Entwicklung des *Metroticket* ermöglicht die Berechnung der 5-Jahresüberlebenschance der Patienten auf der Basis von morphologischen und pathologischen Parametern (Anzahl der Tumore, Spannweite des größten Knotens sowie der Status der vaskulären Invasion) des Tumors (Lei et al., 2013; Raj et al., 2011). Bisher erfolgte jedoch keine Analyse zur Aussagekraft der Leberwerte der Patienten für die Vorhersage der post-operativen Tumorrezidivrate oder des Überlebens der Patienten nach der Lebertransplantation. Die hier dargestellte Analyse zeigt, dass der größte Anteil der HCC-Rezidive bereits in den ersten 12 Monaten nach der Lebertransplantation diagnostiziert wird, wobei die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung eines HCC-Rezidives im zeitlichen Verlauf immer

geringer wird und mehr als 24 Monate nach der Transplantation kaum noch Bedeutung hat (Abbildung 47). Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Untersuchungen überein, die zeigen konnten, dass mehr als 5 Jahre nach der Transplantation kaum noch mit einer HCC-Rekurrenz zu rechnen ist (Roayaie et al., 2004), was die Überlegung zulässt, ob eine Verlängerung der Patientenkontrolle auf 3 Jahre nach der Transplantation begrenzt werden kann und zu einer Verbesserung des Überlebens der Patienten führt (Castroagudín et al., 2012). Das hohe Risiko der frühen HCC-Rekurrenz ist möglicherweise mit der hohen Dosis an immunosuppressiven Therapeutika zu diesem Zeitpunkt assoziiert. Die HCC-Rekurrenz könnte also nicht ausschließlich mit tumor- oder patientenspezifischen Parametern assoziiert sein, sondern auch mit der Wahl der immunosuppressiven Therapie nach der Transplantation im Zusammenhang stehen. Obwohl bekannt ist, dass die post-operative immunosuppressive Therapie der Patienten mit der Tumorentwicklung korreliert, gibt es nur wenige Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der unterschiedlichen immunosuppressiven Therapie auf die HCC-Rekurrenz nach der Lebertransplantation (Castroagudín et al., 2011; Schnitzbauer et al., 2011). Die hier dargestellten Untersuchungen konnten zeigen, dass Patienten mit einer mTOR-Inhibitor basierten immunosuppressiven Therapie (Everolimus) nach der Transplantation eine geringere Inzidenz zur Rekurrenzentwicklung zeigten, als Patienten mit einer Calcineurin-Inhibitor basierten Therapie (Cyclosporin A oder Tacrolimus). Da Everolimus erst seit November 2012 als immunosuppressive Therapie nach der Lebertransplantation zugelassen ist, kann bisher nur eine geringe Patientengruppe mit diesem Therapieregime analysiert werden, sodass eine allgemeine Interpretation der Ergebnisse nur bedingt möglich ist. In der hier dargestellten Patientenkohorte führt die Kombination der Calcineurin-Inhibitor basierten Therapie mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) zu einer verringerten Häufigkeit der HCC-Rekurrenz. Durch gegenteilige Beobachtungen in vorherigen Untersuchungen (Vivarelli et al., 2010) wäre eine genauere Analyse an größeren Fallzahlen zur Aufklärung des MMF-Einflusses auf die Entwicklung der HCC-Rekurrenz notwendig.

Auch wenn die HCV-Infektion immer noch die häufigste Indikation zur Lebertransplantation darstellt und auch die häufigste Ursache für die Entstehung eines HCCs ist (Bozorgzadeh et al., 2007; Waki et al., 2011), wird es durch die Entwicklung der neuen hochpotenten HCV-Therapien in diesem Zusammenhang zu einem Umbruch kommen (Muir, 2014). Zusätzlich nimmt der Anteil an NASH-bedingter Lebertransplantationen stetig zu (Wong et al., 2014). Neben der hohen Mortalitätsrate und post-operativen Komplikationen der NASH-Patienten (Heuer et al., 2012), zeigen

diese auch eine zunehmende Inzidenz bzgl. der HCC-Entstehung. Dabei stellt die hohe Inzidenz an HCCs in nicht-zirrhatischen Lebern ein großes Problem dar (Ertle et al., 2011). In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Anteil der NASH als zu Grunde liegende Lebererkrankungen bei Patienten mit Rezurrenz am höchsten ist, sondern auch, dass NASH-Patienten das höchste Rezurrenzrisiko haben (Tabelle 33). Durch metabolische Veränderungen im Bereich der Insulinsensitivität, der Fettsäureoxidation sowie dem Lipidmetabolismus könnten NAFLD-Patienten nicht nur eine erhöhte Anfälligkeit für die Entstehung und Entwicklung eines HCC aufweisen, sondern auch für die Ausbildung einer post-operativen Tumorreurrenz (Bechmann et al., 2012). Durch die geringe Anzahl an NASH-Patienten in dem hier dargestellten Patientenkollektiv, sollten diese Überlegungen an einer größeren Anzahl von Patienten näher betrachtet werden.

Die Analyse des Tumormarkers AFP und auch die des Tumorstadiums zeigen einen unabhängigen Zusammenhang mit der Entstehung eines HCC-Rezidivs sowie der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Diese Ergebnisse bestätigen die Schlussfolgerungen anderer Studien (Dumitra et al., 2013; Grät et al., 2014; Wan et al., 2014), die eine AFP-Konzentration von mehr als 400 IU/L sowohl als Schwellenwert für die Diagnose eines HCCs als auch für die Vorhersage der HCC-Rezurrenz und dem Überleben der Patienten beschreiben. Im hier gezeigten Patientenkollektiv konnte bereits eine signifikant höhere Rezurrenzwahrscheinlichkeit nachgewiesen werden, wenn die Patienten ein AFP-Level von 100 IU/mL überschritten. Dieser Schwellenwert des AFPs zum Zeitpunkt der Lebertransplantation führt zudem zu einer deutlichen Verschlechterung des 10-Jahresüberlebens der HCC-Patienten (3.4, Tabelle 33).

In der hier vorgestellten Kohorte zeigt sich, dass Patienten mit post-operativer Tumorreurrenz signifikant höhere AP- und GLDH-Werte zum Zeitpunkt der Transplantation aufwiesen, als Patienten die im post-operativen Verlauf keine Rezurrenz hatten (Abbildung 48). Im Umkehrschluss ergab sich zudem ein Zusammenhang des prä-operativen GLDH-Wertes mit der Wahrscheinlichkeit der Tumorreurrenz (Abbildung 49) sowie eine Korrelation des prä-operativen AP-Wertes mit dem Überleben der Patienten nach der Transplantation (Abbildung 51). Die aus diesen Beobachtungen entwickelten Vorhersagemodelle ermöglichten sowohl eine genauere Prognose der Tumorreurrenz sowie eine Vorhersage des post-operativen Überlebens der Patienten nach der Lebertransplantation. Die Kombination der prä-operativen GLDH- und AFP-Werte zeigen eine Rezurrenzwahrscheinlichkeit von 83 % bei gleichzeitiger Erhöhung beider Parameter, wohingegen die gleichzeitige Verwendung der GLDH in Kombination mit dem Tumorstadium nur zu einer

Vorhersage von 56 % der Rezidive führt (Abbildung 50). Die Kombination der prä-operativen GLDH-, AFP- und AP-Werte zeigt das beste Ergebnis. Die Erhöhung aller drei Parameter zum Zeitpunkt der Transplantation erlaubte eine Vorhersage der post-operativen Tumorrezidivrate in 100 % der Fälle (Abbildung 50), was zu dem Schluss führt, dass die Einbeziehung dieser Werte der Patienten, zusätzlich zu den morphologischen Kriterien, für die Selektion der Patienten für die Lebertransplantation sinnvoll wäre. Aktuelle Studien zeigen, dass hohe GLDH-Werte im Serum der Patient vor allem in Lebererkrankungen mit vornehmlicher Nekrose der Hepatozyten auftreten, wie beispielsweise toxischer Leberschädigung oder hypoxischen Lebererkrankungen (O'Brien et al., 2002). Weiterhin kann der GLDH-Wert in der Klinik zur Unterscheidung von akuter viraler Hepatitis, akuter toxischer Lebernekrose oder akuten hypoxischen Lebererkrankungen eingesetzt werden (Schomaker et al., 2013) und die Einschätzung des HCC-Risikos vorhersagen (Wan et al., 2014). Die hier dargestellten Ergebnisse ermöglichen auch eine Vorhersage des post-operativen Überlebens der HCC-Patienten nach der Lebertransplantation. Die Einbeziehung der prä-operativen AP-Werte erlaubt eine bessere Unterscheidung zwischen Patienten, die für eine Lebertransplantation geeignet erscheinen und solchen, die möglicherweise eher von einer palliativen Therapie profitieren würden.

Die wohl-überlegte Auswahl von Patienten die von einer Lebertransplantation profitieren würden, stellt den Schlüssel für den Erfolg dieser Therapie dar. Auch wenn die Anzahl und Größe der Tumore eine gute Vorhersage des Transplantationserfolges erlaubt, spielt auch die Morphologie und das Entwicklungsstadium des Tumors eine entscheidende Rolle hinsichtlich des Verhaltens des Tumors (Roayaie and Roayaie, 2014). Umso wichtiger ist es, neue Parameter, die eine Selektion der Patienten für die Lebertransplantation ermöglichen, zu etablieren. Hierbei sollte vor allem die einfache Erfassung der Parameter, was im hier dargestellten Fall gegeben ist, im Vordergrund stehen, wobei auch eine Limitierung durch die Spezifität und Sensitivität bei der HCC-Detektion berücksichtigt werden muss. Die Kombination dieser Parameter mit den morphologischen Kriterien führt dann zu einer verbesserten Prognose und somit auch sinnvollerer Auswahl an Patienten, die von einer Lebertransplantation profitieren würden. Doch obwohl diese Vorhersagemodelle hinsichtlich des Überlebens der Patienten immer besser und genauer werden, stellt sich die ethische Frage in wie weit diese zur Selektion der Patienten eingesetzt werden können, da es keine vertretbare Antwort auf die Frage gibt, ab wann die Überlebensrate in Zusammenhang mit der Heilungswahrscheinlichkeit des Patienten und dem herrschenden Organmangel einen für die Lebertransplantation akzeptablen Wert unterschreitet.

4.5 Ausblick

Der Zusammenhang der TRAIL-Expression im HCC mit der Rezidivierung und auch dem Überleben der Patienten macht deutlich, dass TRAIL als prognostischer Marker für die klinische Anwendung näher in Betracht gezogen werden sollte. In diesem Kontext ist es sinnvoll Methoden zu etablieren, die eine Quantifizierung der TRAIL-Expression aus dem Serum der Patienten ermöglichen und so die Ermittlung von spezifischen Schwellenwerten der TRAIL-Expression in Abhängigkeit des pathologischen Stadiums und auch der dem HCC zu Grunde liegenden Lebererkrankung zulassen. In diesem Zusammenhang sollte auch eine Ausweitung der Patientenkohorte angestrebt werden, um die Datenqualität auch in Bezug auf die prognostische Aussage der prä-operativen ALP- und AP-Werte hinsichtlich des Überlebens bzw. der HCC-Rezidivierung nach der Lebertransplantation zu verbessern.

Um die *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich der migrationshemmenden Eigenschaften von TRAIL weiter auszuarbeiten, könnten *in vivo* Analysen mit immundefizienten Mäusen genauere Aussagen darüber liefern in wie weit TRAIL das kanzerogene Potential von Hepatomzellen verstärken kann. Zudem könnte die Modulation des Immunsystems durch TRAIL induzierende Substanzen, wie beispielsweise IFN- α , dazu verwendet werden um neue therapeutische Strategien zur HCC-Vorsorge oder auch Therapie zu entwickeln.

Um die klinischen Implikationen der -1453 T/C Sequenzvariation im TRAIL Promotor zu konkretisieren, soll die bestehende Patientenkohorte erweitert werden und ein Zusammenhang mit der Ätiologie der Lebererkrankung, dem Therapieansprechen sowie dem *Outcome* der Patienten und der Rezidivierungswahrscheinlichkeit untersucht werden.

Die hier dargestellten Genexpressionsanalysen verdeutlichen die Komplexität, die in Zusammenhang mit der Entstehung und auch Entwicklung des HCCs zu beobachten ist. Durch die weiterführende Untersuchung der hier identifizierten Gene oder miRNAs können die dabei ablaufenden Mechanismen weiter charakterisiert werden und so einen Aufschluss über die Entstehung und Progression des HCCs geben.

5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen neue Mechanismen auf, die bei der Entstehung und Entwicklung des HCCs von entscheidender Bedeutung sind.

Es wurde leberspezifische Laborparameter identifiziert, die als prognostische Marker für die Tumorrekurrenz und das Überleben von HCC-Patienten nach einer Lebertransplantation verwendet werden können. Die Kombination der prä-operativen AP- bzw. GLDH-Werte der HCC-Patienten mit den AFP-Werten zum Zeitpunkt der Transplantation ermöglicht eine sehr genaue Vorhersage der Tumorrekurrenz. Die Kombination der AP- und AFP-Werte erlaubt zudem eine Prognose des post-operativen Überlebens der Patienten, sodass die Auswahl der Patienten, die für eine Lebertransplantation in Frage kommen möglicherweise in Zukunft noch stärker anhand ihrer medizinischen Vorteile ausgewählt werden könnten.

Darüber hinaus ist auch das Expressionslevel des Tumorsuppressors TRAIL im HCC als prognostischer Marker für die post-operative Tumorrekurrenz und das *Outcome* der Patienten geeignet. Eine Verminderung der TRAIL-Expression erhöht zudem die Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen, was die Entstehung und auch Entwicklung eines HCC maßgeblich beeinflussen kann. Die Verminderung der TRAIL-Expression im HCC ist auf die Sequenzvariation -1453T/C innerhalb des TRAIL-Promoters zurückzuführen. Die Nukleobase an dieser Position ist entscheidend für die Funktionalität der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor GATA-1. Die TRAIL-Expression in HCC-Gewebe ist ohne diese GATA-1 Bindungsstelle signifikant geringer als in Patienten die diese Bindungsstelle besitzen. In nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen konnten gezeigt werden, dass der Verlust der GATA-1 Bindungsstelle zu einer verminderten Funktionalität des TRAIL-Promotors führt, vor allem in Zusammenhang mit der IFN-vermittelten Induktion der TRAIL-Expression.

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Expression des Tumorsuppressors PML über proteosomale Degradationsprozesse reguliert wird. Eine Verminderung der PML-Expression führt sowohl in der murinen Leber als auch in humanen Hepatomzellen zu einer Reduktion der TRAIL-Expression, was wiederum die Migrationsfähigkeit in humanen Hepatomzellen beeinflusst. Darüber hinaus führt eine PML-Defizienz mit gleichzeitiger Expression der HCV-Proteine zu einer verstärkten Lebertumorentstehung in Mäusen. Die Genarrayanalysen zeigen zudem weitere Ansatzpunkte auf, um die molekularen Mechanismen der HCV-assoziierten HCC-Entstehung weiter zu charakterisieren.

6 Summary

The herein presented results reveal novel insights into mechanisms affecting the development and growth of human HCC.

Clinical parameters were established with the potential to predict the risk of HCC recurrence as well as patients' survival after liver transplantation. The combination of AP- and GLDH-values with AFP-levels at time of liver transplantation allows an accurate prediction of tumor recurrence. Furthermore, the combination of AP- and AFP values enables the prognosis of HCC patients as to whether a patient would benefit from this treatment or rather not.

In addition the expression level of the tumor suppressor protein TRAIL serve as a predictive marker for the risk of HCC recurrence and the outcome for HCC patients after liver transplantation. TRAIL-expression levels are a landmark feature of human HCC, significantly influencing the migration potential of hepatoma cells and the development and progression of HCC.

Impairment of TRAIL-expression has been shown to be caused by a sequence variation between thymine and cytosine at position -1453 in the human TRAIL promoter. The functionality of the GATA-1 transcription factor binding site in this position depends on the presence of the nucleobase thymine. HCC tissue with this 'loss of function' GATA-1^{T/C} sequence variation is characterized by a significantly lower TRAIL expression than tissue which comprises an intact GATA-1^{T/T} binding site. In vitro analyses reveal an impaired function of the GATA-1^{T/C}-containing human TRAIL promoter with respect to migration and responsiveness to cytokines.

Supplementing previous work from our lab on the tumor suppressor protein PML, it became now apparent that PML-expression is intimately connected with the TRAIL-expression and, consecutively, with the migration potential of human hepatoma cells. Moreover, PML-deficiency does, in conjunction with hepatitis C viral proteins, sensitize liver cells in an oncogenic way to tumor development in mice. Further analyses by gene expression arrays identified additional indicators for the more detailed characterisation of molecular mechanisms involved in the development of HCV-associated hepatocarcinogenesis.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Haggar, M., Madej-Pilarczyk, A., Kozlowski, L., Bujnicki, J.M., Yahia, S., Abdel-Hadi, D., Shams, A., Ahmad, N., Hamed, S., Puzianowska-Kuznicka, M., 2012. A novel homozygous p.Arg527Leu LMNA mutation in two unrelated Egyptian families causes overlapping mandibuloacral dysplasia and progeria syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 20, 1134–1140. doi:10.1038/ejhg.2012.77
- Allen, J.E., El-Deiry, W.S., 2012. Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol. Ther.* 13, 1143–1151. doi:10.4161/cbt.21354
- Amarapurkar, D.N., Dharod, M., Gautam, S., Patel, N., 2013. Risk of development of hepatocellular carcinoma in patients with NASH-related cirrhosis. *Trop Gastroenterol* 34, 159–163.
- Archambeaud, I., Auble, H., Nahon, P., Planche, L., Fallot, G., Faroux, R., Gournay, J., Samuel, D., Kury, S., Féray, C., 2014. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with non-viral cirrhosis: the importance of prior obesity. *Liver Int.* doi:10.1111/liv.12767
- Avila, M.A., Berasain, C., Sangro, B., Prieto, J., 2006. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25, 3866–3884. doi:10.1038/sj.onc.1209550
- Azahri, N.S.M., Di Bartolo, B.A., Khachigian, L.M., Kavurma, M.M., 2012. Sp1, acetylated histone-3 and p300 regulate TRAIL transcription: mechanisms of PDGF-BB-mediated VSMC proliferation and migration. *J. Cell. Biochem.* 113, 2597–2606. doi:10.1002/jcb.24135
- Azahri, N.S.M., Kavurma, M.M., 2013. Transcriptional regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3617–3629. doi:10.1007/s00018-013-1264-x
- Baetu, T.M., Kwon, H., Sharma, S., Grandvaux, N., Hiscott, J., 2001. Disruption of NF-kappaB signaling reveals a novel role for NF-kappaB in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression. *J. Immunol.* 167, 3164–3173.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Bechmann, L.P., Hannivoort, R.A., Gerken, G., Hotamisligil, G.S., Trauner, M., Canbay, A., 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* 56, 952–964. doi:10.1016/j.jhep.2011.08.025
- Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M.C., Rafii, S., Pandolfi, P.P., 2006. PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 442, 779–785. doi:10.1038/nature05029

- Bernardi, R., Pandolfi, P.P., 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 1006–1016. doi:10.1038/nrm2277
- Bernardi, R., Papa, A., Pandolfi, P.P., 2008. Regulation of apoptosis by PML and the PML-NBs. *Oncogene* 27, 6299–6312. doi:10.1038/onc.2008.305
- Berthier, M.-T., Houde, A., Côté, M., Paradis, A.-M., Mauriège, P., Bergeron, J., Gaudet, D., Després, J.-P., Vohl, M.-C., 2005. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. *J. Lipid Res.* 46, 237–244. doi:10.1194/jlr.M400135-JLR200
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G., Dejean, A., 2002. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J.* 21, 3358–3369. doi:10.1093/emboj/cdf341
- Bismuth, H., Chiche, L., Adam, R., Castaing, D., Diamond, T., Dennison, A., 1993. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Ann. Surg.* 218, 145–151.
- Blum, H.E., Spangenberg, H.C., 2007. Hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Iran Med* 10, 361–371. doi:07103/AIM.0015
- Boix, L., Rosa, J.L., Ventura, F., Castells, A., Bruix, J., Rodés, J., Bartrons, R., 1994. c-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 19, 88–91.
- Bozorgzadeh, A., Orloff, M., Abt, P., Tsoulfas, G., Younan, D., Kashyap, R., Jain, A., Mantry, P., Maliakkal, B., Khorana, A., Schwartz, S., 2007. Survival outcomes in liver transplantation for hepatocellular carcinoma, comparing impact of hepatitis C versus other etiology of cirrhosis. *Liver Transpl.* 13, 807–813. doi:10.1002/lt.21054
- Bruix, J., Sherman, M., American Association for the Study of Liver Diseases, 2011. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53, 1020–1022. doi:10.1002/hep.24199
- Bruix, J., Sherman, M., Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases, 2005. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42, 1208–1236. doi:10.1002/hep.20933
- Calle, E.E., Teras, L.R., Thun, M.J., 2005. Obesity and Mortality. *New England Journal of Medicine* 353, 2197–2199. doi:10.1056/NEJM200511173532020
- Cariani, E., Lasserre, C., Seurin, D., Hamelin, B., Kemeny, F., Franco, D., Czech, M.P., Ullrich, A., Brechot, C., 1988. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res.* 48, 6844–6849.

- Carracedo, A., Weiss, D., Leliaert, A.K., Bhasin, M., de Boer, V.C.J., Laurent, G., Adams, A.C., Sundvall, M., Song, S.J., Ito, K., Finley, L.S., Egia, A., Libermann, T., Gerhart-Hines, Z., Puigserver, P., Haigis, M.C., Maratos-Flier, E., Richardson, A.L., Schafer, Z.T., Pandolfi, P.P., 2012. A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 122, 3088–3100. doi:10.1172/JCI62129
- Castroagudín, J.F., Molina-Pérez, E., Ferreiro-Iglesias, R., Abdulkader, I., Otero-Antón, E., Tomé, S., Varo-Pérez, E., 2012. Late recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: is an active surveillance for recurrence needed? *Transplant. Proc.* 44, 1565–1567. doi:10.1016/j.transproceed.2012.05.007
- Castroagudín, J.F., Molina-Pérez, E., Ferreiro-Iglesias, R., Varo-Pérez, E., 2011. Strategies of immunosuppression for liver transplant recipients with hepatocellular carcinoma. *Transplant. Proc.* 43, 711–713. doi:10.1016/j.transproceed.2011.01.090
- Cayón, A., Crespo, J., Guerra, A.R., Pons-Romero, F., 2008. [Gene expression in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis]. *Rev Esp Enferm Dig* 100, 212–218.
- Chang, J.C., Kan, Y.W., 1979. beta 0 thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2886–2889.
- Chang, S.-H., Suh, K.-S., Yi, N.-J., Lee, K.-H., Kim, B.-Y., Jang, J.-J., 2011. Predicting the prognosis of hepatocellular carcinoma using gene expression. *J. Surg. Res.* 171, 524–531. doi:10.1016/j.jss.2010.05.023
- Chan, J., Prado-Lourenco, L., Khachigian, L.M., Bennett, M.R., Bartolo, B.A.D., Kavurma, M.M., 2010. TRAIL Promotes VSMC Proliferation and Neointima Formation in a FGF-2-, Sp1 Phosphorylation-, and NFκB-Dependent Manner. *Circulation Research* 106, 1061–1071. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206029
- Cha, S.S., Kim, M.S., Choi, Y.H., Sung, B.J., Shin, N.K., Shin, H.C., Sung, Y.C., Oh, B.H., 1999. 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* 11, 253–261.
- Chelbi-Alix, M.K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M.H., Venturini, L., Stadler, M., Pavlovic, J., Degos, L., de Thé, H., 1995. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9, 2027–2033.
- Chen, L., Shi, Y., Jiang, C.-Y., Wei, L.-X., Wang, Y.-L., Dai, G.-H., 2011. Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 37, 513–520. doi:10.1016/j.ejso.2011.01.023
- Chen, R.-H., Lee, Y.-R., Yuan, W.-C., 2012. The role of PML ubiquitination in human malignancies. *J. Biomed. Sci.* 19, 81. doi:10.1186/1423-0127-19-81

- Chen, Y.L., Law, P.-Y., Loh, H.H., 2005. Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5, 575–589.
- Chung, E.J., Sung, Y.K., Farooq, M., Kim, Y., Im, S., Tak, W.Y., Hwang, Y.J., Kim, Y.I., Han, H.S., Kim, J.-C., Kim, M.K., 2002. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol. Cells* 14, 382–387.
- Cillo, U., Vitale, A., Grigoletto, F., Farinati, F., Brolese, A., Zanusi, G., Neri, D., Boccagni, P., Srsen, N., D'Amico, F., Ciarleglio, F.A., Bridda, A., D'Amico, D.F., 2006. Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *J. Hepatol.* 44, 723–731. doi:10.1016/j.jhep.2005.12.015
- Clarke, N., Jimenez-Lara, A.M., Voltz, E., Gronemeyer, H., 2004. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *EMBO J.* 23, 3051–3060. doi:10.1038/sj.emboj.7600302
- Clavien, P.-A., Lesurtel, M., Bossuyt, P.M.M., Gores, G.J., Langer, B., Perrier, A., OLT for HCC Consensus Group, 2012. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol.* 13, e11–22. doi:10.1016/S1470-2045(11)70175-9
- Colombo, M., Raoul, J.-L., Lencioni, R., Galle, P.R., Zucman-Rossi, J., Bañares, R., Seehofer, D., Neuhaus, P., Johnson, P., 2013. Multidisciplinary strategies to improve treatment outcomes in hepatocellular carcinoma: a European perspective. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 25, 639–651. doi:10.1097/MEG.0b013e32835e33bb
- Cordovado, S.K., Hendrix, M., Greene, C.N., Mochal, S., Earley, M.C., Farrell, P.M., Kharrazi, M., Hannon, W.H., Mueller, P.W., 2012. CFTR mutation analysis and haplotype associations in CF patients. *Mol. Genet. Metab.* 105, 249–254. doi:10.1016/j.ymgme.2011.10.013
- Crowder, C., Dahle, Ø., Davis, R.E., Gabrielsen, O.S., Rudikoff, S., 2005. PML mediates IFN-alpha-induced apoptosis in myeloma by regulating TRAIL induction. *Blood* 105, 1280–1287. doi:10.1182/blood-2004-04-1614
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., Goodwin, R.G., 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813–820.
- Dellaire, G., Bazett-Jones, D.P., 2004. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26, 963–977. doi:10.1002/bies.20089
- Dellaire, G., Ching, R.W., Dehghani, H., Ren, Y., Bazett-Jones, D.P., 2006. The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J. Cell. Sci.* 119, 1026–1033. doi:10.1242/jcs.02816

- Deshpande, S.D., Putta, S., Wang, M., Lai, J.Y., Bitzer, M., Nelson, R.G., Lanting, L.L., Kato, M., Natarajan, R., 2013. Transforming growth factor- β -induced cross talk between p53 and a microRNA in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes* 62, 3151–3162. doi:10.2337/db13-0305
- Di Maio, M., Daniele, B., Gallo, C., Perrone, F., 2008. Re: Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1557; author reply 1557–1558. doi:10.1093/jnci/djn341
- Dong, Q.-Z., Zhang, X.-F., Zhao, Y., Jia, H.-L., Zhou, H.-J., Dai, C., Sun, H.-J., Qin, Y., Zhang, W.-D., Ren, N., Ye, Q.-H., Qin, L.-X., 2013. Osteopontin promoter polymorphisms at locus -443 significantly affect the metastasis and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57, 1024–1034. doi:10.1002/hep.26103
- Dumitra, T.C., Dumitra, S., Metrakos, P.P., Barkun, J.S., Chaudhury, P., Deschênes, M., Paraskevas, S., Hassanain, M., Tchervenkov, J.I., 2013. Pretransplantation α -fetoprotein slope and milan criteria: strong predictors of hepatocellular carcinoma recurrence after transplantation. *Transplantation* 95, 228–233. doi:10.1097/TP.0b013e31827743d7
- EASL-EORTC, 2012. clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 56, 908–943. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001
- El-Assal, O.N., Yamanoi, A., Ono, T., Kohno, H., Nagasue, N., 2001. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 1299–1305.
- El-Serag, H.B., 2011. Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 365, 1118–1127. doi:10.1056/NEJMra1001683
- El-Serag HB, Mason AC, 2000. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the united states. *Arch Intern Med* 160, 3227–3230. doi:10.1001/archinte.160.21.3227
- El-Serag, H.B., Richardson, P.A., Everhart, J.E., 2001. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States veterans. *Am J Gastroenterol* 96, 2462–2467. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.04054.x
- El-Serag, H.B., Rudolph, K.L., 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132, 2557–2576. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061
- Ertle, J., Dechêne, A., Sowa, J.-P., Penndorf, V., Herzer, K., Kaiser, G., Schlaak, J.F., Gerken, G., Syn, W.-K., Canbay, A., 2011. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int. J. Cancer* 128, 2436–2443. doi:10.1002/ijc.25797

- Fagioli, M., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Venturini, L., Mencarelli, A., Simeone, A., Acampora, D., Grignani, F., Pelicci, P.G., 1992. Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene* 7, 1083–1091.
- Fanger, N.A., Maliszewski, C.R., Schooley, K., Griffith, T.S., 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Exp. Med.* 190, 1155–1164.
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J.E., Roselló, L., Albà, M.M., Messeguer, X., 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 31, 3651–3653.
- Farrell, G.C., Larter, C.Z., 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99–S112. doi:10.1002/hep.20973
- Farrell, G.C., Larter, C.Z., Hou, J.Y., Zhang, R.H., Yeh, M.M., Williams, J., dela Pena, A., Francisco, R., Osvath, S.R., Brooling, J., Teoh, N., Sedger, L.M., 2009. Apoptosis in experimental NASH is associated with p53 activation and TRAIL receptor expression. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 443–452. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.05785.x
- Feitelson, M.A., Pan, J., Lian, Z., 2004. Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy. *Surg. Clin. North Am.* 84, 339–354. doi:10.1016/S0039-6109(03)00226-3
- Feng, S., Cong, S., Zhang, X., Bao, X., Wang, W., Li, H., Wang, Z., Wang, G., Xu, J., Du, B., Qu, D., Xiong, W., Yin, M., Ren, X., Wang, F., He, J., Zhang, B., 2011. MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 39, 6669–6678. doi:10.1093/nar/gkr232
- Figueras, J., Jaurrieta, E., Valls, C., Benasco, C., Rafecas, A., Xiol, X., Fabregat, J., Casanovas, T., Torras, J., Baliellas, C., Ibañez, L., Moreno, P., Casais, L., 1997. Survival after liver transplantation in cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma: a comparative study. *Hepatology* 25, 1485–1489. doi:10.1002/hep.510250629
- Fingas, C.D., Altinbas, A., Schlattjan, M., Beilfuss, A., Sowa, J.-P., Sydor, S., Bechmann, L.P., Ertle, J., Akkiz, H., Herzer, K., Paul, A., Gerken, G., Baba, H.A., Canbay, A., 2013. Expression of apoptosis- and vitamin D pathway-related genes in hepatocellular carcinoma. *Digestion* 87, 176–181. doi:10.1159/000348441

- Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., Gil, L., Gordon, L., Hendrix, M., Hourlier, T., Johnson, N., Kähäri, A.K., Keefe, D., Keenan, S., Kinsella, R., Komorowska, M., Koscielny, G., Kulesha, E., Larsson, P., Longden, I., McLaren, W., Muffato, M., Overduin, B., Pignatelli, M., Pritchard, B., Riat, H.S., Ritchie, G.R.S., Ruffier, M., Schuster, M., Sobral, D., Tang, Y.A., Taylor, K., Trevanion, S., Vandrovcova, J., White, S., Wilson, M., Wilder, S.P., Aken, B.L., Birney, E., Cunningham, F., Dunham, I., Durbin, R., Fernández-Suarez, X.M., Harrow, J., Herrero, J., Hubbard, T.J.P., Parker, A., Proctor, G., Spudich, G., Vogel, J., Yates, A., Zadissa, A., Searle, S.M.J., 2012. Ensembl 2012. *Nucl. Acids Res.* 40, D84–D90. doi:10.1093/nar/gkr991
- Forner, A., Llovet, J.M., Bruix, J., 2012. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379, 1245–1255. doi:10.1016/S0140-6736(11)61347-0
- GLOBOCAN 2012 - International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012. *CANCERmondial - GLOBOCAN 2012 (IARC)*.
- Goddard, A.D., Borrow, J., Freemont, P.S., Solomon, E., 1991. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 254, 1371–1374.
- Goddard, A.D., Borrow, J., Solomon, E., 1992. A previously uncharacterized gene, PML, is fused to the retinoic acid receptor alpha gene in acute promyelocytic leukaemia. *Leukemia* 6 Suppl 3, 117S–119S.
- Goldstein, J.A., 2001. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 52, 349–355.
- Gong, B., Almasan, A., 2000. Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 747–752. doi:10.1006/bbrc.2000.3872
- Gossard, A.A., Lindor, K.D., 2014. Hepatocellular carcinoma: Low risk of HCC in patients who have PSC and cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 276–277. doi:10.1038/nrgastro.2014.47
- Grąt, M., Kornasiewicz, O., Lewandowski, Z., Hołówko, W., Grąt, K., Kobryń, K., Patkowski, W., Zieniewicz, K., Krawczyk, M., 2014. Combination of morphologic criteria and α -fetoprotein in selection of patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation minimizes the problem of posttransplant tumor recurrence. *World J Surg* 38, 2698–2707. doi:10.1007/s00268-014-2647-3
- Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., Fanger, N.A., 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189, 1343–1354.

- Grosse-Wilde, A., Voloshanenko, O., Bailey, S.L., Longton, G.M., Schaefer, U., Csernok, A.I., Schütz, G., Greiner, E.F., Kemp, C.J., Walczak, H., 2008. TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J. Clin. Invest.* 118, 100–110. doi:10.1172/JCI33061
- Gugenheim, J., Bredt, L.C., Iannelli, A., Decaens, T., Roudot-Thoraval, F., Meyer, C., Durand, F., Bernard, P.-H., Boillot, O., Sulpice, L., Calmus, Y., Hardwigsen, J., Ducerf, C., Pageaux, G.-P., Dharancy, S., Chazouilleres, O., Cherqui, D., Duvoux, C., Hadni-Bresson, S., 2013. Recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma according to up-to-seven criteria. *Hepatology* 60, 799–806. doi:10.5754/hge12997
- Guo, F., Sigua, C., Tao, J., Bali, P., George, P., Li, Y., Wittmann, S., Moscinski, L., Atadja, P., Bhalla, K., 2004. Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res.* 64, 2580–2589.
- Gurrieri, C., Capodiecì, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 2004. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 269–279.
- Halaas, O., Vik, R., Ashkenazi, A., Espevik, T., 2000. Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* 51, 244–250.
- Hamosh, A., King, T.M., Rosenstein, B.J., Corey, M., Levison, H., Durie, P., Tsui, L.C., McIntosh, I., Keston, M., Brock, D.J., 1992. Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly---Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 245–250.
- Han, Z., Bhalla, K., Pantazis, P., Hendrickson, E.A., Wyche, J.H., 1999. Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl-2 and caspases and correlates with the activation of Bid. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1381–1389.
- Hemming, A.W., Reed, A.I., Langham, M.R., Fujita, S., van der Werf, W.J., Howard, R.J., 2002. Hepatic vein reconstruction for resection of hepatic tumors. *Ann. Surg.* 235, 850–858.
- Herr, I., Schemmer, P., Büchler, M.W., 2007. On the TRAIL to therapeutic intervention in liver disease. *Hepatology* 46, 266–274. doi:10.1002/hep.21740
- Herzer, K., Carbow, A., Sydor, S., Sowa, J.-P., Biesterfeld, S., Hofmann, T.-G., Galle, P.-R., Gerken, G., Canbay, A., 2012. Deficiency of the promyelocytic leukemia protein fosters hepatitis C-associated hepatocarcinogenesis in mice. *PLoS ONE* 7, e44474. doi:10.1371/journal.pone.0044474

- Herzer, K., Ganten, T.M., Schulze-Bergkamen, H., Grosse-Wilde, A., Koschny, R., Krammer, P.H., Walczak, H., 2005a. Transforming growth factor beta can mediate apoptosis via the expression of TRAIL in human hepatoma cells. *Hepatology* 42, 183–192. doi:10.1002/hep.20757
- Herzer, K., Grosse-Wilde, A., Krammer, P.H., Galle, P.R., Kanzler, S., 2008. Transforming growth factor-beta-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression and apoptosis in hepatoma cells requires functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1. *Mol. Cancer Res.* 6, 1169–1177. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0073
- Herzer, K., Hofmann, T.G., Teufel, A., Schimanski, C.C., Moehler, M., Kanzler, S., Schulze-Bergkamen, H., Galle, P.R., 2009. IFN-alpha-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves promyelocytic leukemia protein and TRAIL independently of p53. *Cancer Res.* 69, 855–862. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2831
- Herzer, K., Sprinzl, M.F., Galle, P.R., 2007. Hepatitis viruses: live and let die. *Liver Int.* 27, 293–301. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01422.x
- Herzer, K., Straub, K., Simon, F., Khairzada, K., Beilfuss, A., Paul, A., Weber, F., Gerken, G., Canbay, A., 2013. Die proteasomale Degradation des Tumorsuppressors PML fördert die HCC-Entwicklung. Presented at the Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Hattingen.
- Herzer, K., Weyer, S., Krammer, P.H., Galle, P.R., Hofmann, T.G., 2005b. Hepatitis C virus core protein inhibits tumor suppressor protein promyelocytic leukemia function in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 65, 10830–10837. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0880
- Heuer, M., Kaiser, G.M., Kahraman, A., Banysch, M., Saner, F.H., Mathé, Z., Gerken, G., Paul, A., Canbay, A., Treckmann, J.W., 2012. Liver transplantation in nonalcoholic steatohepatitis is associated with high mortality and post-transplant complications: a single-center experience. *Digestion* 86, 107–113. doi:10.1159/000339344
- Hofmann, T.G., Will, H., 2003. Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ.* 10, 1290–1299. doi:10.1038/sj.cdd.4401313
- Hoshida, Y., Toffanin, S., Lachenmayer, A., Villanueva, A., Minguez, B., Llovet, J.M., 2010. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin. Liver Dis.* 30, 35–51. doi:10.1055/s-0030-1247131

- Ho, T.-C., Chen, S.-L., Shih, S.-C., Chang, S.-J., Yang, S.-L., Hsieh, J.-W., Cheng, H.-C., Chen, L.-J., Tsao, Y.-P., 2011. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) promotes tumor cell death by inducing macrophage membrane tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Biol. Chem.* 286, 35943–35954. doi:10.1074/jbc.M111.266064
- Huang, V., Place, R.F., Portnoy, V., Wang, J., Qi, Z., Jia, Z., Yu, A., Shuman, M., Yu, J., Li, L.-C., 2012. Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic Acids Res.* 40, 1695–1707. doi:10.1093/nar/gkr934
- Hubackova, S., Krejcikova, K., Bartek, J., Hodny, Z., 2012. Interleukin 6 signaling regulates promyelocytic leukemia protein gene expression in human normal and cancer cells. *J. Biol. Chem.* 287, 26702–26714. doi:10.1074/jbc.M111.316869
- Hu, T.-H., Huang, C.-C., Lin, P.-R., Chang, H.-W., Ger, L.-P., Lin, Y.-W., Changchien, C.-S., Lee, C.-M., Tai, M.-H., 2003. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97, 1929–1940. doi:10.1002/cncr.11266
- Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A., de Vos, A.M., 1999. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell* 4, 563–571.
- Hymowitz, S.G., O'Connell, M.P., Ultsch, M.H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A.M., Kelley, R.F., 2000. A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39, 633–640.
- Ingram, V.M., 1956. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* 178, 792–794.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., Maul, G.G., 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* 147, 221–234.
- Ito, Y., Monden, M., Takeda, T., Eguchi, H., Umeshita, K., Nagano, H., Nakamori, S., Dono, K., Sakon, M., Nakamura, M., Tsujimoto, M., Nakahara, M., Nakao, K., Yokosaki, Y., Matsuura, N., 2000. The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 82, 1211–1217. doi:10.1054/bjoc.1999.1065
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Jin, F., Xiong, W.-J., Jing, J.-C., Feng, Z., Qu, L.-S., Shen, X.-Z., 2011. Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 1095–1104. doi:10.1007/s00432-010-0970-0

- Johnstone, R.W., Frew, A.J., Smyth, M.J., 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 782–798. doi:10.1038/nrc2465
- Jonas, S., Bechstein, W.O., Steinmüller, T., Herrmann, M., Radke, C., Berg, T., Settmacher, U., Neuhaus, P., 2001. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 33, 1080–1086. doi:10.1053/jhep.2001.23561
- Kavurma, M.M., Bennett, M.R., 2008. Expression, regulation and function of trail in atherosclerosis. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1441–1450. doi:10.1016/j.bcp.2007.10.020
- Kavurma, M.M., Schoppet, M., Bobryshev, Y.V., Khachigian, L.M., Bennett, M.R., 2008. TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 7754–7762. doi:10.1074/jbc.M706927200
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Okumura, K., Yagita, H., 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J. Immunol.* 163, 1906–1913.
- Kemp, T.J., Moore, J.M., Griffith, T.S., 2004. Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation. *J. Immunol.* 173, 892–899.
- Kikuchi, S., Miyagishi, R., Fukazawa, T., Yabe, I., Miyazaki, Y., Sasaki, H., 2005. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 167, 170–174. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.06.021
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.-W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M., 2007. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525–528. doi:10.1126/science.1135308
- Kim, J.W., Wang, X.W., 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, 363–369.
- Kirshner, J.R., Karpova, A.Y., Kops, M., Howley, P.M., 2005. Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target. *J. Virol.* 79, 9320–9324. doi:10.1128/JVI.79.14.9320-9324.2005
- Kubicka, S., Rudolph, K.L., Hanke, M., Tietze, M.K., Tillmann, H.L., Trautwein, C., Manns, M., 2000. Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver* 20, 312–318.

- Kudo, M., Izumi, N., Kokudo, N., Matsui, O., Sakamoto, M., Nakashima, O., Kojiro, M., Makuuchi, M., HCC Expert Panel of Japan Society of Hepatology, 2011. Management of hepatocellular carcinoma in Japan: Consensus-Based Clinical Practice Guidelines proposed by the Japan Society of Hepatology (JSH) 2010 updated version. *Dig Dis* 29, 339–364. doi:10.1159/000327577
- Kulik, L.M., Carr, B.I., Mulcahy, M.F., Lewandowski, R.J., Atassi, B., Ryu, R.K., Sato, K.T., Benson, A., Nemcek, A.A., Gates, V.L., Abecassis, M., Omary, R.A., Salem, R., 2008. Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 47, 71–81. doi:10.1002/hep.21980
- Kuribayashi, K., Krigsfeld, G., Wang, W., Xu, J., Mayes, P.A., Dicker, D.T., Wu, G.S., El-Deiry, W.S., 2008. TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biol. Ther.* 7, 2034–2038.
- Kuroki, M., Ariumi, Y., Hijikata, M., Ikeda, M., Dansako, H., Wakita, T., Shimotohno, K., Kato, N., 2013. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 592–597. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.108
- Lai, Q., Lerut, J.P., 2014. Hepatocellular cancer: how to expand safely inclusion criteria for liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 19, 229–234. doi:10.1097/MOT.0000000000000085
- Lallemand-Breitenbach, V., de Thé, H., 2010. PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000661. doi:10.1101/cshperspect.a000661
- Lau, W.-Y., Lai, E.C.H., 2008. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. *HBPD INT* 7, 237–257.
- Lee, C.R., 2004. CYP2C9 genotype as a predictor of drug disposition in humans. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26, 463–472.
- Lee, S.H., Shin, M.S., Lee, H.S., Bae, J.H., Lee, H.K., Kim, H.S., Kim, S.Y., Jang, J.J., Joo, M., Kang, Y.K., Park, W.S., Park, J.Y., Oh, R.R., Han, S.Y., Lee, J.H., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., 2001. Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum. Pathol.* 32, 250–256. doi:10.1053/hupa.2001.22769
- Lei, J.-Y., Wang, W.-T., Yan, L.-N., 2013. “Metroticket” predictor for assessing liver transplantation to treat hepatocellular carcinoma: a single-center analysis in mainland China. *World J. Gastroenterol.* 19, 8093–8098. doi:10.3748/wjg.v19.i44.8093
- Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.-Y., Weinman, S.A., Lemon, S.M., 2002. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122, 352–365.

- Levin, L., Gevers, W., 1981a. Metabolic alterations in cancer. Part I. Carbohydrate metabolism. *S. Afr. Med. J.* 59, 518–521.
- Levin, L., Gevers, W., 1981b. Metabolic alterations in cancer. Part II. Protein and fat metabolism. *S. Afr. Med. J.* 59, 553–556.
- Levrero, M., 2006. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25, 3834–3847. doi:10.1038/sj.onc.1209562
- Li, G., Pan, T., Guo, D., Li, L.-C., 2014. Regulatory Variants and Disease: The E-Cadherin -160C/A SNP as an Example. *Mol Biol Int* 2014, 967565. doi:10.1155/2014/967565
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491–501. doi:10.1016/S0092-8674(00)81590-1
- Lin, H.-K., Bergmann, S., Pandolfi, P.P., 2004. Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature* 431, 205–211. doi:10.1038/nature02783
- Li, Q., Xu, B., Fu, L., Hao, X.S., 2006. Correlation of four vascular specific growth factors with carcinogenesis and portal vein tumor thrombus formation in human hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 25, 403–409.
- Llovet, J.M., 2005. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* 40, 225–235. doi:10.1007/s00535-005-1566-3
- Llovet, J.M., Brú, C., Bruix, J., 1999. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin. Liver Dis.* 19, 329–338. doi:10.1055/s-2007-1007122
- Llovet, J.M., Bruix, J., 2008. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48, 1312–1327. doi:10.1002/hep.22506
- Llovet, J.M., Burroughs, A., Bruix, J., 2003. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362, 1907–1917. doi:10.1016/S0140-6736(03)14964-1
- Lunardi, A., Gaboli, M., Giorgio, M., Rivi, R., Bygrave, A., Antoniou, M., Drabek, D., Dzierzak, E., Fagioli, M., Salmena, L., Botto, M., Cordon-Cardo, C., Luzzatto, L., Pelicci, P.G., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., 2011. A Role for PML in Innate Immunity. *Genes Cancer* 2, 10–19. doi:10.1177/1947601911402682
- Lund, P., Schubert, D., Niketeghad, F., Schirmacher, P., 2004. Autocrine inhibition of chemotherapy response in human liver tumor cells by insulin-like growth factor-II. *Cancer Lett.* 206, 85–96. doi:10.1016/j.canlet.2003.10.018
- Luo, H., Pan, Y., Hao, X., Cao, X., 2014. [Effect of siRNA targeting PML-RARa fusion gene on activity of the acute promyelocytic leukemia cell line NB4]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 31, 850–854.

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490.
- Maarifi, G., Chelbi-Alix, M.K., Nisole, S., 2014. PML control of cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 551–561. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.04.008
- Ma, L., Chua, M.-S., Andrisani, O., So, S., 2014. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World J. Gastroenterol.* 20, 333–345. doi:10.3748/wjg.v20.i2.333
- Mallette, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.-F., Moiseeva, O., Ferbeyre, G., 2004. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23, 91–99. doi:10.1038/sj.onc.1206886
- Mariani, S.M., Krammer, P.H., 1998. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 1492–1498. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1492::AID-IMMU1492>3.0.CO;2-X
- Marin, H.L., Furth, E.E., Olthoff, K., Shaked, A., Soulen, M.C., 2009. Histopathologic outcome of neoadjuvant image-guided therapy of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* 18, 169–176.
- Marsh, J.W., Dvorchik, I., Bonham, C.A., Iwatsuki, S., 2000. Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome? *Cancer* 88, 538–543.
- Mazzaferro, V., Llovet, J.M., Miceli, R., Bhoori, S., Schiavo, M., Mariani, L., Camerini, T., Roayaie, S., Schwartz, M.E., Grazi, G.L., Adam, R., Neuhaus, P., Salizzoni, M., Bruix, J., Forner, A., De Carlis, L., Cillo, U., Burroughs, A.K., Troisi, R., Rossi, M., Gerunda, G.E., Lerut, J., Belghiti, J., Boin, I., Gugenheim, J., Rochling, F., Van Hoek, B., Majno, P., Metroticket Investigator Study Group, 2009. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 10, 35–43. doi:10.1016/S1470-2045(08)70284-5
- McCarthy, M.M., Sznol, M., DiVito, K.A., Camp, R.L., Rimm, D.L., Kluger, H.M., 2005a. Evaluating the expression and prognostic value of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 5188–5194. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0158
- McCarthy, M.M., Sznol, M., DiVito, K.A., Camp, R.L., Rimm, D.L., Kluger, H.M., 2005b. Evaluating the expression and prognostic value of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 5188–5194. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0158

- McGivern, D.R., Lemon, S.M., 2011. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene* 30, 1969–1983. doi:10.1038/onc.2010.594
- Merchant, M.S., Yang, X., Melchionda, F., Romero, M., Klein, R., Thiele, C.J., Tsokos, M., Kontny, H.U., Mackall, C.L., 2004. Interferon gamma enhances the effectiveness of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonists in a xenograft model of Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 64, 8349–8356. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1705
- Messeguer, X., Escudero, R., Farré, D., Núñez, O., Martínez, J., Albà, M.M., 2002. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18, 333–334.
- Mittal, S., El-Serag, H.B., 2013. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J. Clin. Gastroenterol.* 47 Suppl, S2–6. doi:10.1097/MCG.0b013e3182872f29
- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M., Milbrandt, J., 2002. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 277, 47928–47937. doi:10.1074/jbc.M207509200
- Moinzadeh, P., Breuhahn, K., Stützer, H., Schirmacher, P., 2005. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis. *Br. J. Cancer* 92, 935–941. doi:10.1038/sj.bjc.6602448
- Mongkolsapaya, J., Grimes, J.M., Chen, N., Xu, X.N., Stuart, D.I., Jones, E.Y., Screaton, G.R., 1999. Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1048–1053. doi:10.1038/14935
- Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., Koike, K., 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.* 4, 1065–1067. doi:10.1038/2053
- Moudgil, V., Redhu, D., Dhanda, S., Singh, J., 2013. A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 32, 165–175.
- Muir, A.J., 2014. The rapid evolution of treatment strategies for hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 628–635; quiz 636. doi:10.1038/ajg.2014.66
- Muratani, M., Gerlich, D., Janicki, S.M., Gebhard, M., Eils, R., Spector, D.L., 2002. Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat. Cell Biol.* 4, 106–110. doi:10.1038/ncb740

- Newsom-Davis, T., Prieske, S., Walczak, H., 2009. Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 14, 607–623. doi:10.1007/s10495-009-0321-2
- Nisole, S., Stoye, J.P., Saïb, A., 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 799–808. doi:10.1038/nrmicro1248
- O'Brien, P.J., Slaughter, M.R., Polley, S.R., Kramer, K., 2002. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab. Anim.* 36, 313–321.
- O'Byrne, K.J., Dalglish, A.G., 2001. Infection and cancer. *Lancet* 358, 156. doi:10.1016/S0140-6736(01)05370-3
- Oda, T., Tsuda, H., Scarpa, A., Sakamoto, M., Hirohashi, S., 1992. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 52, 6358–6364.
- Ohira, M., Ohdan, H., Mitsuta, H., Ishiyama, K., Tanaka, Y., Igarashi, Y., Asahara, T., 2006. Adoptive transfer of TRAIL-expressing natural killer cells prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Transplantation* 82, 1712–1719. doi:10.1097/01.tp.0000250935.41034.2d
- Okuda, K., Ohtsuki, T., Obata, H., Tomimatsu, M., Okazaki, N., Hasegawa, H., Nakajima, Y., Ohnishi, K., 1985. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 56, 918–928.
- Onyemelukwe, C.G., Nirodi, C., West, C.E., 1980. Aflatoxin B1 in hepatocellular carcinoma. *Trop Geogr Med* 32, 237–240.
- Ozanne, B.W., Spence, H.J., McGarry, L.C., Hennigan, R.F., 2007. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene* 26, 1–10. doi:10.1038/sj.onc.1209759
- Pal, R., Gochhait, S., Chattopadhyay, S., Gupta, P., Prakash, N., Agarwal, G., Chaturvedi, A., Husain, N., Husain, S.A., Bamezai, R.N.K., 2011. Functional implication of TRAIL -716 C/T promoter polymorphism on its in vitro and in vivo expression and the susceptibility to sporadic breast tumor. *Breast Cancer Res. Treat.* 126, 333–343. doi:10.1007/s10549-010-0900-5
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V.M., 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815–818.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Ciocce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G., 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207–210. doi:10.1038/35018127
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., Ashkenazi, A., 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271, 12687–12690.

- Pons, F., Varela, M., Llovet, J.M., 2005. Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 7, 35–41. doi:10.1080/13651820410024058
- Quetglas, I.M., Moeini, A., Pinyol, R., Llovet, J.M., 2014. Integration of genomic information in the clinical management of HCC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28, 831–842. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.004
- Raj, A., McCall, J., Gane, E., 2011. Validation of the “Metroticket” predictor in a cohort of patients transplanted for predominantly HBV-related hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 55, 1063–1068. doi:10.1016/j.jhep.2011.01.052
- Ray, R.B., Lagging, L.M., Meyer, K., Ray, R., 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J. Virol.* 70, 4438–4443.
- Reineke, E.L., Liu, Y., Kao, H.-Y., 2010. Promyelocytic leukemia protein controls cell migration in response to hydrogen peroxide and insulin-like growth factor-1. *J. Biol. Chem.* 285, 9485–9492. doi:10.1074/jbc.M109.063362
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G., Ballabio, A., 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20, 2140–2151. doi:10.1093/emboj/20.9.2140
- Roayaie, K., Roayaie, S., 2014. Liver transplant for hepatocellular cancer: very small tumors, very large tumors, and waiting time. *Clin Liver Dis* 18, 603–612. doi:10.1016/j.cld.2014.05.013
- Roayaie, S., Schwartz, J.D., Sung, M.W., Emre, S.H., Miller, C.M., Gondolesi, G.E., Krieger, N.R., Schwartz, M.E., 2004. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplant: patterns and prognosis. *Liver Transpl.* 10, 534–540. doi:10.1002/lt.20128
- Salomoni, P., Pandolfi, P.P., 2002. The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108, 165–170.
- Salvucci, M., Lemoine, A., Saffroy, R., Azoulay, D., Lepère, B., Gaillard, S., Bismuth, H., Reynès, M., Debuire, B., 1999. Microsatellite instability in European hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 18, 181–187. doi:10.1038/sj.onc.1202279
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., Ogasawara, K., 2001. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN- α / β . *Eur. J. Immunol.* 31, 3138–3146. doi:10.1002/1521-4141(200111)31:11<3138::AID-IMMU3138>3.0.CO;2-B
- Scaggiante, B., Kazemi, M., Pozzato, G., Dapas, B., Farra, R., Grassi, M., Zanconati, F., Grassi, G., 2014. Novel hepatocellular carcinoma molecules with prognostic and therapeutic potentials. *World J. Gastroenterol.* 20, 1268–1288. doi:10.3748/wjg.v20.i5.1268

- Schattenberg, J.M., Schuchmann, M., Galle, P.R., 2011. Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 Suppl 1, 213–219. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06582.x
- Schirmacher, P., Held, W.A., Yang, D., Chisari, F.V., Rustum, Y., Rogler, C.E., 1992. Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res.* 52, 2549–2556.
- Schnitzbauer, A.A., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., 2011. Influence of immunosuppressive drugs on the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: a gap between basic science and clinical evidence. *Transplantation* 91, 1173–1176. doi:10.1097/TP.0b013e318215e72b
- Schomaker, S., Warner, R., Bock, J., Johnson, K., Potter, D., Van Winkle, J., Aubrecht, J., 2013. Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicol. Sci.* 132, 276–283. doi:10.1093/toxsci/kft009
- Sedger, L.M., Glaccum, M.B., Schuh, J.C.L., Kanaly, S.T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R., Gliniak, B., 2002. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 32, 2246–2254. doi:10.1002/1521-4141(200208)32:8<2246::AID-IMMU2246>3.0.CO;2-6
- Sedger, L.M., Shows, D.M., Blanton, R.A., Peschon, J.J., Goodwin, R.G., Cosman, D., Wiley, S.R., 1999. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J. Immunol.* 163, 920–926.
- Shin, E.C., Shin, J.S., Park, J.H., Kim, J.J., Kim, H., Kim, S.J., 1998. Expression of Fas-related genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett.* 134, 155–162.
- Siegel, A.B., Zhu, A.X., 2009. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link. *Cancer* 115, 5651–5661. doi:10.1002/cncr.24687
- Sotiropoulos, G.C., Drühe, N., Sgourakis, G., Molmenti, E.P., Beckebaum, S., Baba, H.A., Antoch, G., Hilgard, P., Radtke, A., Saner, F.H., Nadalin, S., Paul, A., Malagó, M., Broelsch, C.E., Lang, H., 2009. Liver transplantation, liver resection, and transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: which is the best oncological approach? *Dig. Dis. Sci.* 54, 2264–2273. doi:10.1007/s10620-008-0604-4

- Stagg, J., Sharkey, J., Pommey, S., Young, R., Takeda, K., Yagita, H., Johnstone, R.W., Smyth, M.J., 2008. Antibodies targeted to TRAIL receptor-2 and ErbB-2 synergize in vivo and induce an antitumor immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16254–16259. doi:10.1073/pnas.0806849105
- Staib, F., Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Wang, X.W., Harris, C.C., 2003. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum. Mutat.* 21, 201–216. doi:10.1002/humu.10176
- Starheim, K.K., Arnesen, T., Gromyko, D., Rynningen, A., Varhaug, J.E., Lillehaug, J.R., 2008. Identification of the human N(alpha)-acetyltransferase complex B (hNatB): a complex important for cell-cycle progression. *Biochem. J.* 415, 325–331. doi:10.1042/BJ20080658
- Stock, P., Monga, D., Tan, X., Micsenyi, A., Loizos, N., Monga, S.P.S., 2007. Platelet-derived growth factor receptor-alpha: a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1932–1941. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0720
- Sümbül, A.T., Akkız, H., Bayram, S., Bekar, A., Akgöllü, E., Sandıkçı, M., 2012. p53 codon 72 polymorphism is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in the Turkish population: a case-control study. *Mol. Biol. Rep.* 39, 1639–1647. doi:10.1007/s11033-011-0903-2
- Tabrizian, P., Roayaie, S., Schwartz, M.E., 2014. Current management of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 20, 10223–10237. doi:10.3748/wjg.v20.i30.10223
- Takahashi, M., Saito, H., Okuyama, T., Miyashita, T., Kosuga, M., Sumisa, F., Yamada, M., Ebinuma, H., Ishii, H., 1999. Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J. Hepatol.* 31, 315–322.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., Okumura, K., 2001a. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* 7, 94–100. doi:10.1038/83416
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., 2002. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* 195, 161–169.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., Okumura, K., 2001b. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell. Immunol.* 214, 194–200. doi:10.1006/cimm.2001.1896

- Teufel, A., Marquardt, J.U., Galle, P.R., 2012. Novel insights in the genetics of HCC recurrence and advances in transcriptomic data integration. *J. Hepatol.* 56, 279–281. doi:10.1016/j.jhep.2011.05.035
- Teufel, A., Weinmann, A., Centner, C., Piendl, A., Lohse, A.W., Galle, P.R., Kanzler, S., 2009. Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. *World J. Gastroenterol.* 15, 578–582.
- Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O’Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., Goedert, J.J., Kirk, G.D., Donfield, S.M., Rosen, H.R., Tobler, L.H., Busch, M.P., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., Carrington, M., 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461, 798–801. doi:10.1038/nature08463
- Thomas, M.B., Abbruzzese, J.L., 2005. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 8093–8108. doi:10.1200/JCO.2004.00.1537
- Trabzuni, D., Famulski, K.S., Ahmad, M., 2000. Functional analysis of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine. *Biochem. J.* 350 Pt 2, 505–510.
- Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey, T.J., Zentella, A., Albert, J.D., 1986. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234, 470–474.
- Trotman, L.C., Alimonti, A., Scaglioni, P.P., Koutcher, J.A., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 2006. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* 441, 523–527. doi:10.1038/nature04809
- Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Yoshida, T., Terada, M., 1989. Low incidence of point mutation of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in human hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 196–199.
- Uwaifo, A.O., Bababunmi, E.A., 1984. Liver carcinogenesis in tropical Africa. *IARC Sci. Publ.* 59–88.
- Van Grevenynghe, J., Cubas, R.A., Noto, A., DaFonseca, S., He, Z., Peretz, Y., Filali-Mouhim, A., Dupuy, F.P., Procopio, F.A., Chomont, N., Balderas, R.S., Said, E.A., Boulassel, M.-R., Tremblay, C.L., Routy, J.-P., Sékaly, R.-P., Haddad, E.K., 2011. Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J. Clin. Invest.* 121, 3877–3888. doi:10.1172/JCI59211
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., Ashkenazi, A., 2005. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Biol. Chem.* 280, 40599–40608. doi:10.1074/jbc.M509560200

- Vivarelli, M., Dazzi, A., Zanello, M., Cucchetti, A., Cescon, M., Ravaioli, M., Del Gaudio, M., Lauro, A., Grazi, G.L., Pinna, A.D., 2010. Effect of different immunosuppressive schedules on recurrence-free survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transplantation* 89, 227–231. doi:10.1097/TP.0b013e3181c3c540
- Waki, K., Sugawara, Y., Tamura, S., Mieno, M.N., Yamashiki, N., Kadowaki, T., Kokudo, N., 2011. Outcome of liver transplantation for recipients with hepatitis B and hepatitis C virus coinfection: analysis of the UNOS data. *Transplantation* 92, 809–814. doi:10.1097/TP.0b013e31822d4dc3
- Walczak, H., 2013. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008698. doi:10.1101/cshperspect.a008698
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C., Lynch, D.H., 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5, 157–163. doi:10.1038/5517
- Wang, Q., Ji, Y., Wang, X., Evers, B.M., 2000. Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 466–471. doi:10.1006/bbrc.2000.3512
- Wang, Q., Zhou, Y., Weiss, H.L., Chow, C.-W., Evers, B.M., 2011. NFATc1 regulation of TRAIL expression in human intestinal cells. *PLoS ONE* 6, e19882. doi:10.1371/journal.pone.0019882
- Wang, X.W., Hussain, S.P., Huo, T.-I., Wu, C.-G., Forgues, M., Hofseth, L.J., Brechot, C., Harris, C.C., 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 181-182, 43–47.
- Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., 1998a. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 279, 1547–1551.
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., Pandolfi, P.P., 1998b. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat. Genet.* 20, 266–272. doi:10.1038/3073
- Wang, Z., Wu, J., Zhang, G., Cao, Y., Jiang, C., Ding, Y., 2013. Associations of miR-499 and miR-34b/c Polymorphisms with Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma: An Evidence-Based Evaluation. *Gastroenterol Res Pract* 2013, 719202. doi:10.1155/2013/719202
- Wan, P., Zhang, J., Long, X., Li, Q., Xu, N., Zhang, M., Chen, X., Han, L., Xia, Q., 2014. Serum levels of preoperative α -fetoprotein and CA19-9 predict survival of hepatic carcinoma patients after liver transplantation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 26, 553–561. doi:10.1097/MEG.000000000000070

- Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., Su, L., 2011. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* 140, 1334–1344. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.001
- Weber, K., Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.
- Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T.G., Schwanitz, G., Hoischen, C., Maul, G., Dittrich, P., Hemmerich, P., 2008. Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J. Cell. Sci.* 121, 2731–2743. doi:10.1242/jcs.031922
- Weinberg, R.A., 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.
- Whittaker, S., Marais, R., Zhu, A.X., 2010. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 29, 4989–5005. doi:10.1038/onc.2010.236
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673–682.
- Wong, R.J., Cheung, R., Ahmed, A., 2014. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology* 59, 2188–2195. doi:10.1002/hep.26986
- Wörns, M.-A., Schuchmann, M., Weinman, A., Galle, P., 2007. Molekulare Pathogenese des Leberzellkarzinoms. *Gastroenterologe* 12–19.
- Wu, W.-S., Xu, Z.-X., Hittelman, W.N., Salomoni, P., Pandolfi, P.P., Chang, K.-S., 2003. Promyelocytic leukemia protein sensitizes tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting the NF-kappaB survival pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 12294–12304. doi:10.1074/jbc.M211849200
- Xu, Y., Li, L., Xiang, X., Wang, H., Cai, W., Xie, J., Han, Y., Bao, S., Xie, Q., 2013. Three common functional polymorphisms in microRNA encoding genes in the susceptibility to hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Gene* 527, 584–593. doi:10.1016/j.gene.2013.05.085
- Xu, Z.-X., Zou, W.-X., Lin, P., Chang, K.-S., 2005. A role for PML3 in centrosome duplication and genome stability. *Mol. Cell* 17, 721–732. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.014
- Yanase, K., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y., 2006. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein-therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Lett.* 234, 73–80. doi:10.1016/j.canlet.2005.04.039

- Yan, X., Xu, L., Qi, J., Liang, X., Ma, C., Guo, C., Zhang, L., Sun, W., Zhang, J., Wei, X., Gao, L., 2009. sTRAIL levels and TRAIL gene polymorphisms in Chinese patients with fatty liver disease. *Immunogenetics* 61, 551–556. doi:10.1007/s00251-009-0389-4
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., Perussia, B., 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* 188, 2375–2380.
- Zhang, X.D., Nguyen, T., Thomas, W.D., Sanders, J.E., Hersey, P., 2000. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett.* 482, 193–199.
- Zhang, X., Xu, H.J., Murakami, Y., Sachse, R., Yashima, K., Hirohashi, S., Hu, S.X., Benedict, W.F., Sekiya, T., 1994. Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 54, 4177–4182.

8 Anhang

Anhang 1: Okuda Staging System.

Faktoren zur Klassifizierung der Erkrankung

Tumor Größe > 50 % der Leber

Aszites

Albumin < 3 g/dL

Bilirubin > 3 mg/dL

Stadium I keine genannten Faktoren

Stadium II 1-2 genannte Faktoren

Stadium III 3-4 genannte Faktoren

Anhang 2: RT-PCR Primer mit numerischer Darstellung der spezifischen Eichkurven.

Gen	Herstellernachweis/Sequenz	Achsenabschnitt der Eichgerade	Steigung der Eichgerade
TRAIL	Hs_TNFSF10_1_SG (Quantitect Primer Assay Qiagen)	38,79	-3,48
PML	Hs_PML_2_SG (Quantitect Primer Assay Qiagen)	36,98	-3,41
ACTB	fwd. tccctggagaagagctacga rev. agcactgtgtggcgtacag	33,24	-3,06

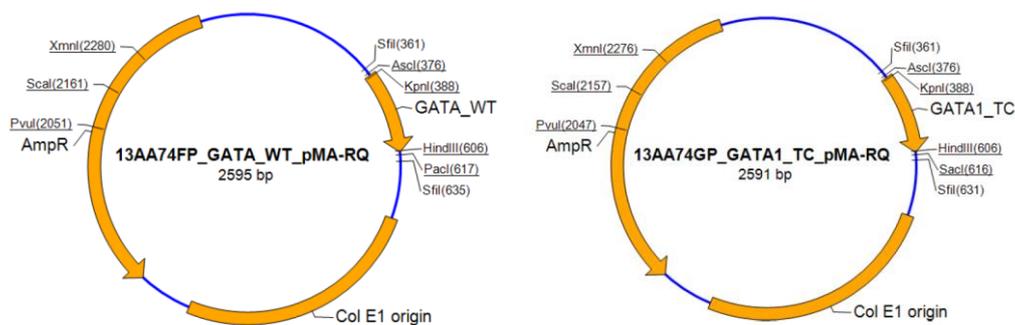
Anhang 3: DNA-Sequenz des humanen TRAIL Promotors

DNA-Sequenz des humanen TRAIL Promotors

```

GGTTATCCTACTCATCTTTACCTGATTTAAAAAACTCATTGAGTCTAGGACTTAGAGTGTAAGTGTG
TTCAAATAGTGTTAGGTTACACATAATGTCTAAAACCTTTAGTAGGAAAAATGCTACCTTGCCAATTTGT
CTGTGTCTGAAAGGAATTTGCATTTAAAAATTTGGCAATTTGACAGAGGCAAATTTAAAATTTGAAAAT
ATTTTCTTAAATATAGACTCATTACAGATAGAAGGCAAGGGCAGGAAGTGATGGTGACCAGCGGTG
CCTGAATGAACTCAGGAATGTAAGTGTAGATCTAGGGTCCCAAACCTTTAGGTTTCAAAGGATCTCTTG
GAGTACTTGCTGAAAAATGTAGGTTCCCTAAGTCCACTGCCAGAACTCTGACTCAGTGGGTCAAGAA
TGGAATAACTAAACAATGGCCCCATGCAGTGGTTCATGCCTGTAATCCCAGCACGTTGGGAGGTTGA
AGCAAGAGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCTACATGGTAAAACCCCATCTC
TACTAAAAATACAAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCATGCACCTGTAATCCCAGCTACTTGGGAGG
CTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAATCTGGGAGGTGGAGGTTGTAGTGGGCCGAGATTGTGCCATTGC
ACCACTGCACTCCAGCCTGGGCGATAAAGTGAGATTCTGTCAAAAAATAAATAAATACATGAAAGA
GAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
GAAAGAATAGAAAAGAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
GATATAGAGACAACATACAGCTGGGCCAGCTTATGACATCTGATAGTGGGGAGATTTGGGGCTGGG
TCCTGAATCTGAGGGTAATTAACCTCCCTGTAACCTTTTCTAATCTGTAAGGATAGTGACAGCG
AGACATTGTGATGGGGTTAATATTTTGGAAAACATCCACATGTTTTTTTCTTTGCCTTTCTGAGTGTG
TCAACTACTTCCCTACCTGTCCAGCCTAACACACAGGCATGTTGTCTTGGTAGGGATGGAGATCTGAG
AAGGAGATTAGAATTTGTGTCTGAAGGTTTGCAAAGAGGAAGAAGTCGTAATATTTAGATTCTGACA
TTCAAGATGGAATTATGTAGCAAGACCATTGCTATGAGACAGTATTTCTATTTTCTTTATCCACTCCC
ACCCTGCCCTCTTCCCACCCTCACAGTAGCATGAGAAAAACCACATATGGAAGTTTCAGGTCATAAAA
AATTATCTTATAATTTAGAAAACAGGCCTTGTGCCTATGACAGCCAGGCCATGAGGCTTAGAGCTCT
GTGGTAGAATGAGGATATGTTAGGGAAAAGCAAAAGCAAAGAAAATCCCTCCCCTCTTTGGCTGAGG
ACATTATCAAAGGAGAGCAAGAAAGAGAAGAGAGAAAATGGGCTTGAGGTGAGTGCAGATAAGGGG
TGCATGGATCCTGAGGGCAAGGAGAGGAGCTTCTTTTCCCTCCTTTCCAACGACTACTTTGA
GACAAGAGCTGTCCCTGGGCAGTAGGAAAGGGGAGGGACAGTTGCAGGTTCAATAGATGTGGGTG
GGGCCAAGGCCACAGAACCCAGAAAAACAACCTATTTCGCTTTTCAATTCCTCACTGACTATAAAAGAA
TAGAGAAGGAAGGGCTTCAGTGACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGA

```

Anhang 4: Plasmidkarten der synthetischen pMA-RQ Vektoren.

Anhang 5: DNA Sequenz der Inserts zur Klonierung der Reportergenkonstrukte mit der repetitiven GATA-1^{T/T} bzw. der GATA-1^{T/C} Variation.

DNA-Sequenz der repetitiven GATA-1^{T/T} Sequenzvariation

TGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGAAGGGCGCGCCAGGTACCTTTACAGATAGATAAGACACGA
CTTATTTTACAGATAGATAAGACACGACTTATTTTACAGATAGATAAGACACGACTTATTTTACAGATAG
ATAAGACACGACTTATTTTACAGATAGATAAGACACGACTTATTTTACAGATAGATAAGACACGACTTA
TTTTACAGATAGATAAGACACGACTTATTTTACAGATAGATAAGACACGACTTATAAGCTTATTAATTA
CAACCTGGGCCTCATGGGCCTTCGGCTC

DNA-Sequenz der repetitiven GATA-1^{T/C} Sequenzvariation

TGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGAAGGGCGCGCCAGGTACCTTTACAGACAGATAAGACACGA
CTTATTTTACAGACAGATAAGACACGACTTATTTTACAGACAGATAAGACACGACTTATTTTACAGACA
GATAAGACACGACTTATTTTACAGACAGATAAGACACGACTTATTTTACAGACAGATAAGACACGACTT
ATTTTACAGACAGATAAGACACGACTTATTTTACAGACAGATAAGACACGACTTATAAGCTTGAGCTCC
AGCTGGGCCTCATGGGCCTTCGGCTC

Anhang 6: Hypothetische Transkriptionsfaktorbindungsstellen im TRAIL Promotor laut TRANSFAC 8.3.

NAME	Anzahl der Bindungsstellen	NAME	Anzahl der Bindungsstellen	NAME	Anzahl der Bindungsstellen
AP-1	9	GR-alpha	5	POU2F2	11
AP-2alphaA	6	GR-beta	5	YY1	4
AR	9	HIF-1	9	PPAR-alpha:RXR-alpha	11
ATF3	8	HNF-1A	8	PR A	7
C/EBPalpha	7	HNF-1B	9	PR B	7
C/EBPbeta	4	HNF-1C	9	PU.1	13
c-Ets-1	7	HNF-3alpha	8	PXR-1:RXR-alpha	8
c-Ets-2	9	HOXD10	10	RAR-alpha1	13
c-Fos	10	HOXD9	10	RAR-beta	10
c-Jun	7	Ik-1	13	RBP-Jkappa	12
c-Myb	8	IRF-1	9	RelA	11
COUP-TF1	13	IRF-2	6	RXR-alpha	7
CTF	12	LEF-1	8	SRY	9
E2F-1	8	MAZ	13	STAT1beta	10
EBF	11	MEF-2A	11	STAT4	6
Egr-3	13	NF-1	8	STAT5A	13
ELF-1	13	NF-AT1	9	T3R-beta1	9
Elk-1	9	NF-AT1	10	TBP	10
ENKTF-1	8	NF-AT2	10	TCF-4	10
ER-alpha	5	NFI/CTF	8	TCF-4E	7
ETF	11	NF-kappaB1	11	TFIID	7
FOXP3	6	NF-Y	8	TFII-I	6
GATA-1	6	p53	7	USF2	10
GATA-2	9	Pax-5	7	VDR	9
GATA-3	12	PEA3	9	XBP-1	6
GR	7	POU2F1	11		

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFP	alpha-Fetoprotein
AIH	Autoimmunhepatitis
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase (früher GPT)
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
ASH	Alkoholisch induzierte Steatohepatitis (<i>alcoholic steatohepatitis</i>)
AST	Aspartat-Aminotransferase (früher GOT)
AST	Aspartat-Aminotransferase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	zu mRNA komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHE	Cholinesterase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag (day)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	Epeidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	extracellular regulated MAP-kinase
et al.	und andere (<i>et alteri</i>)
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
G	Guanin
g (k,m,µ,n,p)	Gramm (kilo, milli, mikro, nano, piko)
gGT	gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
h	Stunde (hour)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin

Hep3B	Humane Hepatomzelllinie Hep3B
HepG2	Humane Hepatomzelllinie HepG2
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
Huh7	Humane Hepatomzelllinie HuH7
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alpha
IFN- β	Interferon beta
IL	Interleukin
IRES	Internal ribosomal entry site
IRF	Interferon regulatory factor
ISRE	Interferon sensitive response element
IU	Internationale Einheiten (international units)
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l (m, μ)	Liter (milli, mikro)
LDH	Laktatdehydrogenase (Leberenzym)
Lsg.	Lösung
LT	Lebertransplantation
LTR	Leberteilresektion
m (k,m, μ ,n,p)	Meter (kilo, milli, mikro, nano, piko)
M (m, μ ,n,p)	Molar (milli, mikro, nano, piko) = mol / l
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche oder Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Nicht alkoholische Fettlebererkrankung (<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NASH	nicht-alkoholisch induzierte Steatohepatitis (<i>non-alcoholic steatohepatitis</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NF κ B	<i>nuclear faktor kappa B</i>
NS	Nicht-Strukturproteine
OP	Operation
NTL	Gewebe aus einer Leber ohne Tumor
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamide Gelelektrophorese
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS (T)	Phosphatgepufferte Salzlösung (Tween) (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)

Abkürzungsverzeichnis

PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration [H ⁺]
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
Rb	Retinoblastom-Protein
RBV	Ribavirin
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	Relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid (Verinostat®)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>Standard error of mean</i>)
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
t	Zeitpunkt (<i>time</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS (T)	Tris-gepufferte Salzlsg. (Tween) (<i>Tris-buffered saline</i>)
Tnf- α	<i>Tumor-necrosis-factor alpha</i>
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TST	HCC umgebenes, nicht tumoröses Lebergewebe
TT	HCC-Gewebe
Tween20	Polyoxyethylen-(20)sorbitolmonolaurat
U	<i>unit</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (%)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
W	Watt
w/o	Unbehandelte Kontrolle (<i>without</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (%) (<i>weight in volume</i>)
WT	Wildtyp
x	fach
x g	Vielfaches der Gravitation, Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Inzidenz (oben: blau) und Mortalität (unten: rot) des hepatozellulären Karzinoms pro 100.000.	1
Abbildung 2: Ätiologie und Pathogenese des HCC.	3
Abbildung 3: <i>Barcelona-Clinic-Liver-Cancer</i> (BCLC)-Stadieneinteilung und Therapieempfehlung bei Patienten mit HCC.	4
Abbildung 4: Diversität der molekularen Pathogenese des HCCs.	6
Abbildung 5: Signalwege mit Assoziation zur Entstehung und Progression von HCC... ..	7
Abbildung 6: Kristallstruktur von homotrimerem TRAIL.	10
Abbildung 7: TRAIL-Rezeptoren.	11
Abbildung 8: Der TRAIL-Signalweg.	12
Abbildung 9: Promotorregion des humanen TRAIL-Gens.	14
Abbildung 10: Zelluläre Funktionen von PML.	16
Abbildung 11: TRAIL-mRNA-Expression in Leber- und Tumorgewebe aus HCC- Patienten, sowie aus Lebergewebe von Patienten ohne HCC.	49
Abbildung 12: TRAIL-mRNA-Expression in Leber- und Tumorgewebe aus HCC- Patienten, sowie aus Lebergewebe von Patienten ohne HCC in Abhängigkeit von der Lebererkrankung.	50
Abbildung 13: mRNA Expression in Tumorgewebe in Abhängigkeit des Tumorstadiums.	51
Abbildung 14: Reduktion der TRAIL-mRNA-Expression nach siRNA Behandlung.	51
Abbildung 15: Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der TRAIL- Expression.	52
Abbildung 16: Fähigkeit zur Kolonienbildung von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der TRAIL-Expression.	52
Abbildung 17: mRNA Expression in Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Tumorrekurrenz.	53
Abbildung 18: 5-Jahres Überleben von Patienten mit verringerter und nicht verringerter TRAIL-mRNA-Expression im Tumor.	54
Abbildung 19: Beispielhaftes Alignment der humanen TRAIL-Promotorsequenz.	55
Abbildung 20: Multiple Alignments von 20 TT-Sequenzen.	57
Abbildung 21: Chromatogramme der detektierten Sequenzvariationen.	58
Abbildung 22: TRAIL-mRNA-Expression in Gewebe von HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz an Position -1453 des humanen TRAIL Promotor.	60

Abbildung 23: Grading der HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz der GATA-1 Bindungsstelle innerhalb des humanen TRAIL-Promotors.	61
Abbildung 24: TRAIL-mRNA-Expression in Gewebe von HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz an Position -1136 des humanen TRAIL-Promotors.....	61
Abbildung 25: Alignment der TRAIL-Promotorregion aus den Hepatomzelllinien Huh7 und HepG2.	62
Abbildung 26: Reporterengenkonstrukt der TRAIL-Promotorregion.....	63
Abbildung 27: Induzierbarkeit des humanen TRAIL-Promotors verschiedener Hepatomzelllinien.	64
Abbildung 28: Reporterengenkonstrukte der TRAIL-Promotorregion aus Huh7 Zellen mit GATA-1 ^{T/T} bzw. mit GATA-1 ^{T/C} Bindungsstellenvariation.....	65
Abbildung 29: Induzierbarkeit der Reporterengenkonstrukte der TRAIL-Promotorregion mit funktionelle GATA-1 ^{T/T} bzw. mit GATA-1 ^{T/C} Bindungsstellenvariation.	65
Abbildung 30: Reporterengenkonstrukte zur Untersuchung der Funktionalität der GATA-1 Bindungsstelle mit acht Wiederholungen der GATA-1 ^{T/T} oder der GATA-1 ^{T/C} Sequenzvariation.	66
Abbildung 31: Induzierbarkeit der GATA-1 Bindungsstelle.	66
Abbildung 32: Schematische Darstellung der GATA-1 Sonden des <i>Electron mobility shift Assays</i>	67
Abbildung 33: <i>Electron mobility shift Assays</i> mit den Biotin-markierten GATA-1 ^{T/T} bzw. GATA-1 ^{T/C} Sonden.	68
Abbildung 34: PML-mRNA-Expression in Leber- und Tumorgewebe aus HCC-Patienten, sowie aus Lebergewebe von Patienten ohne HCC.	69
Abbildung 35: Einfluss des Proteasominhibitors MG-132 auf die PML Protein Expression.....	70
Abbildung 36: Reduktion der PML-mRNA-Expression nach siRNA Behandlung.....	71
Abbildung 37: Migrationsfähigkeit von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der PML Expression.....	72
Abbildung 38: Fähigkeit zur Kolonienbildung von Hepatomzellen in Abhängigkeit von der PML Expression.	72
Abbildung 39: Einfluss von PML auf die TRAIL-Expression.....	73
Abbildung 40: Induktion der PML-Expression nach Transfektion der Zellen mit den verschiedenen PML-Expressionsplasmiden.	74
Abbildung 41: Einfluss der PML-Isoformen auf die TRAIL-Expression.....	74
Abbildung 42: TRAIL-mRNA Expression in PML ^{-/-} bzw. Wildtyp Mäusen.	75

Abbildung 43: Histologische Untersuchung der Lebern von 12 Monate alten WT, HCV ^{+/+} , PML ^{-/-} oder HCV ^{+/+} PML ^{-/-} Mäusen.	77
Abbildung 44: Immunhistologische Untersuchung von tumorfreien und tumortragenden HCV ^{+/+} PML ^{-/-} Mäusen.	78
Abbildung 45: Heat Map der mRNA Transkription.	79
Abbildung 46: Heat Map der mRNA Expression von tumorfreien und tumortragenden HCV ^{+/+} PML ^{-/-} Mäusen.	82
Abbildung 47: Zeitliches Auftreten der HCC-Rekurrenz nach Lebertransplantation.	87
Abbildung 48: Serum-Level der HCC-Patienten vor Lebertransplantation.	88
Abbildung 49: HCC-Rekurrenzzrate der Patienten in Abhängigkeit von den prä-operativen GLDH- und AP-Werten.	88
Abbildung 50: Multivariate Analyse zur HCC-Rekurrenz.	89
Abbildung 51: Einfluss des Alkalischen Phosphatase-Levels von HCC-Patienten auf das Überleben nach Lebertransplantation.	91
Abbildung 52: Einfluss der prä-operativen AP- und AFP-Werte der HCC-Patienten auf das post-operative Überleben nach Lebertransplantation.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	21
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	22
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien.	23
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 5: Verwendete Enzyme.....	24
Tabelle 6: Verwendete Antikörper.	24
Tabelle 7: Verwendete kompetente Zellen.....	25
Tabelle 8: Verwendete Vektoren.	25
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.....	25
Tabelle 10: Verwendete Kits.....	26
Tabelle 11: Verwendete Mausstämme.	28
Tabelle 12: PCR-Protokoll für die Genotypisierung der verwendeten Mausstämme. ..	30
Tabelle 13: PCR-Primer für die Genotypisierung der verwendeten Mausstämme.....	30
Tabelle 14: Verwendete Zellzahlen und Volumina für <i>in vitro</i> Experimente.....	31
Tabelle 15: Verwendete siRNA Konstrukte für die <i>in vitro</i> Transfektion	32
Tabelle 16: Vollständiges RT-PCR Programm der Genexpressionsanalyse mittels Quantifast SYBR Green RT-PCR Kits.....	36
Tabelle 17: PCR-Protokoll zur Amplifikation der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe.	38
Tabelle 18: PCR-Primer zur Amplifikation der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe.	38
Tabelle 19: PCR-Primer zur Sequenzierung der TRAIL-Promotorregion aus humanem Lebergewebe.	38
Tabelle 20: Reaktionsbedingungen der EMSAs.	40
Tabelle 21: PCR-Primer zur Klonierung der TRAIL-Promotorregion aus Hepatomzelllinien.....	43
Tabelle 22: PCR-Protokoll zur Klonierung der TRAIL-Promotorregion aus Hepatomzelllinien.....	43
Tabelle 23: PCR-Protokoll für Erstellung von Punktmutationen innerhalb der TRAIL- Promotorregion.	44
Tabelle 24: PCR-Primer Einführung einer Punktmutation in die GATA-1 Bindungsstelle innerhalb der TRAIL-Promotorregion.....	44
Tabelle 25: Sequenzierprimer für den pGL3 Basic Vektor.	46
Tabelle 26: Zusammenfassung der beschriebenen Sequenzvariationen.	59

Tabelle 27: TRAIL-mRNA-Expression in Gewebe von HCC-Patienten in Abhängigkeit von der Sequenz an Position -1453 bzw. an Position -1136 des humanen TRAIL-Promotors.	60
Tabelle 28: Versuchsgruppen für das natürliche Karzinogenesemodell.	76
Tabelle 29: <i>Fold Change</i> der mRNA-Expression der transgenen Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen.	80
Tabelle 30: miRNA Expression der transgenen Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen. .	81
Tabelle 31: <i>Fold Change</i> der mRNA-Expression bei tumortragenden und tumorfreien HCV ^{+/+} PML ^{-/-} Mäusen.	83
Tabelle 32: miRNA Expression bei tumortragenden und tumorfreien HCV ^{+/+} PML ^{-/-} Mäusen.	84
Tabelle 33: HCC-Rekurrenz, mittleres Überleben und Hazard Ratio der HCC-Patienten.	86
Tabelle 34: Überleben und Hazard Ratios der HCC-Patienten unter Berücksichtigung der AP- und AFP-Werte vor der Lebertransplantation.	91

Formeln

Formel 1: Kopienzahlbestimmung der PCR-Produkte	36
Formel 2: Kopienzahlbestimmung der RT-PCR-Produkte.....	37
Formel 3: Bestimmung der Genexpression des Zielgens.....	37
Formel 4: Bestimmung des <i>Fold Change</i> nach Stimulation	37

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen

Piras-Straub, K., Khairzada, K., Trippler, M., Baba, H.A., Kaiser, G.M., Paul, A., Canbay, A., Weber, F., Gerken, G., and Herzer, K. (2015). *TRAIL expression levels in human hepatocellular carcinoma have implications for tumor growth, recurrence and survival.* Int. J. Cancer J. Int. Cancer 136, E154–160. doi:10.1002/ijc.29139.

Piras-Straub, K., Khairzada, K., Gerken, G., Saner, F., Treckmann, J., Paul, A., Canbay, A., and Herzer, K. (2015). *Glutamate Dehydrogenase and Alkaline Phosphatase as Very Early Predictors of Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation.* Digestion 91, 117–127. doi:10.1159/000370212.

Poster und Abstracts

Straub K, Khairzada K, Simon F, Trippler M, Gerken G, Paul A, Weber F, Herzer K. (2012). *Decreased TRAIL expression is a dominant feature of human HCC.* Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg-Essen, Essen.

Herzer K, Straub K, Simon F, Khairzada K, Beilfuss A, Paul A, Weber F, Gerken G, Canbay A. (2013). *Die proteasomale Degradation des Tumorsuppressors PML fördert die HCC-Entwicklung.* Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Hattingen.

Straub K, Khairzada K, Simon F, Trippler M, Paul A, Weber F, Gerken G, Herzer K. (2013). *Verringerte TRAIL Expression als dominante Eigenschaft des humanen HCC.* Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Hattingen.

Straub K, Simon F, Khairzada K, Beilfuss A, Gerken G, Canbay A, Paul A, Weber F, Herzer K. (2013) *HCC development is supported by proteasomal degradation of the tumor suppressor PML.* The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam.

Straub K, Khairzada K, Gerken G, Herzer K. (2013) *Decreased TRAIL expression is a dominant feature of human HCC.* American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Washington, DC.

Piras-Straub K, Canbay A, Khairzada K, Gerken G, Paul A, Herzer K. (2013). *HCC Rekurrenz nach Lebertransplantation*. Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg-Essen, Essen.

Ecker E-M, Walker A, Piras-Straub K, Singer B, Trippler M, Gerken G, Paul A, Timm J, Herzer K. (2013) *Einfluss von mTor-Inhibitoren auf die HCV-Replikation in vitro*. Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg-Essen, Essen.

Piras-Straub K, Khairzada K, Kaiser GM, Weber F, Paul A, Gerken G, Herzer, K. (2014). *Eine Sequenzvariation in der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors GATA ist verantwortlich für eine verminderte TRAIL Expression beim humanen HCC*. Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg-Essen, Essen.

Frey A, Ecker E-M, Piras-Straub K, Trippler M, Singer B, Walker A, Hofmann T, Gerken G, Herzer K. (2015) Everolimus beeinflusst die HCV-Replikationsaktivität. Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg-Essen, Essen.

Ecker E-M, Frey A, Piras-Straub K, Walker A, Singer B, Paul A, Gerken G, Herzer K. (2014) *Der Einsatz von m-TOR-Inhibitoren beeinflusst die HCV-Reinfektion nach Lebertransplantation*. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Mannheim.

Piras-Straub K, Khairzada K, Paul A, Canbay A, Gerken G, Herzer, K. (2015). *Eine Sequenzvariation in der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors GATA ist verantwortlich für eine verminderte TRAIL Expression beim humanen HCC*. Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), München.

Frey A, Ecker E-M, Piras-Straub K, Trippler M, Singer B, Walker A, Hofmann T, Gerken G, Herzer K. (2015) Everolimus beeinflusst die HCV-Replikationsaktivität. Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), München.

Vorträge

Straub K, Khairzada K, Simon F, Trippler M, Paul A, Weber F, Gerken G, Herzer K. (2013). *Decreased TRAIL expression is a dominant feature of human HCC*. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Nürnberg.

Piras-Straub K, Weber F, Khairzada K, Simon F, Kaiser GM, Trippler M, Gerken G, Herzer K. (2014). *Eine reduzierte TRAIL-Expression charakterisiert das humane HCC.* Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig.

Piras-Straub K, Herzer K. (2014) *Transkriptionelle Regulation des Apoptose-Inducers TRAIL im HCC.* Winterseminar der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Pichl.

Frey A, Ecker E-M, Piras-Straub K, Walker A, Singer B, Hofmann T, Trippler M, Gerken G, Herzer K. (2014) *Die Expression des Tumorsuppressors PML beeinflusst die HCV-Replikationsaktivität in vitro.* Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig.

Ecker E-M, Frey A, Piras-Straub K, Singer B, Trippler M, Paul A, Gerken G, Walker A, Herzer K. (2014) *Der Einsatz von m-TOR-Inhibitoren beeinflusst die HCV-Reinfektion nach Lebertransplantation.* Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig.

Piras-Straub, K., Canbay, A., Khairzada, K., Kaiser, G. M., Gerken, G., Paul, A., Herzer, K. (2014). *Prädiktoren für Rezidiv und Überleben nach Lebertransplantation bei HCC.* Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig.

Auszeichnungen

Posterpreise:

Herzer K, Straub K, Simon F, Khairzada K, Beilfuss A, Paul A, Weber F, Gerken G, Canbay A. (2013). *Die proteasomale Degradation des Tumorsuppressors PML fördert die HCC-Entwicklung.* Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Hattingen.

Piras-Straub K, Khairzada K, Kaiser GM, Weber F, Paul A, Gerken G, Herzer, K. (2014). *Eine Sequenzvariation in der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors GATA ist verantwortlich für eine verminderte TRAIL Expression beim humanen HCC.* Forschungstag der medizinischen Fakultät Duisburg-Essen, Essen.

Stipendien:

Straub K, Simon F, Khairzada K, Beilfuss A, Gerken G, Canbay A, Paul A, Weber F, Herzer K. (2013) *HCC development is supported by proteasomal degradation of the tumor suppressor PML*. The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam.

Piras-Straub, K., Canbay, A., Khairzada, K., Kaiser, G. M., Gerken, G., Paul, A., Herzer, K. (2014). *Prädiktoren für Rezidiv und Überleben nach Lebertransplantation bei HCC*. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig.

Sonstige Qualifikationen

Erlaubnis zur Durchführung tierexperimenteller Arbeiten nach FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), Kategorie B, zertifiziert nach GVSOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society for Laboratory Animal Science)

Kenntnisse zur Durchführung statistischer Analysen mittels IBM SPSS Statistics

Im Zuge der Promotion erfolgte die Betreuung folgender Studenten, die an der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie in der Arbeitsgruppe für klinische und experimentelle Transplantationshepatologie beschäftigt waren:

- In der Zeit von Februar 2013 bis Dezember 2013 erfolgte die Betreuung der Labortätigkeit von Frau Eva-Maria Ecker, die im Rahmen ihrer medizinischen Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe beschäftigt ist.
- In der Zeit von April 2014 bis September 2014 erfolgte die Betreuung von Herrn Alexander Dudziak, der seine Bachelorarbeit mit dem Thema „Auswirkungen neuer HCV-Therapeutika auf die TRAIL- und PML-Expression in Hepatomzelllinien“ in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt hat.

Mitgestaltung und –organisation des Arbeitsgruppenseminars der Arbeitsgruppe für „klinische und experimentelle Transplantationshepatologie“ unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. K. Herzer.

Danksagung

Da die hier dargestellte Arbeit in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie sowie der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie durchgeführt wurde, möchte ich einmal Herrn Prof. Dr. Gerken, dem ärztlichen Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie sowie Herrn Prof. Dr. Paul, dem ärztlichen Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie für die Bereitstellung ihrer wissenschaftlichen Laboratorien und der finanziellen Unterstützung danken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Kerstin Herzer. Zunächst möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Aber vor allem möchte ich Ihr für die Ideen und Anregungen danken, die die Entwicklung der Projekte immer weiter vorangetrieben haben und dazu geführt haben, dass es niemals zu einem Stillstand kam, ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen. Ich möchte auch Danke sagen für ihre Begleitung auf diesem wichtigen Abschnitt meines wissenschaftlichen Werdeganges und für das Vertrauen, dass mir im Verlauf der letzten Jahre entgegengebracht wurde, es war eine schöne Zeit.

Ein weiterer großer Dank geht an meine Kollegin und Freundin Frau Khaleda Khairzada, die gemeinsam mit mir in dieser Arbeitsgruppe angefangen hat und ohne die ich das eine oder andere Mal verzweifelt wäre. Natürlich möchte ich ihr auch für die Unterstützung im Labor und die Erhebung der Patientendaten danken. Auch meiner Kollegin Alexandra Frey möchte ich für die Bereitschaft danken über alles mit mir zu diskutieren und auch dafür, dass sie die enorme Aufgabe übernommen hat, dafür zu sorgen, dass sich keine unendlich langen Sätze in dieser Arbeit wiederfinden. Auch möchte ich bei meinen Kolleginnen Khaleda Khairzada, Alexandra Frey und Sabrina Driftmann für die praktische und vor allem moralische Unterstützung danken.

Ein großer Dank geht auch an alle Mitarbeiter der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, insbesondere aber meinen Laborkollegen (Herr Martin Schlattjan, Frau Dr. Svenja Sydor, Frau Dr. Catherine Real, Frau Sabrina Driftmann, Frau M. Beste, Frau Alexandra Frey, Herr Thomas Schreiter, Herr Sami Jafoui, Frau Melanie Werner, Herr Dr. Jan-Peter Sowa, Frau Dr. Ruth Bröring und Herr Dr. Martin Trippler, Frau Khaleda Khairzada), den Mitarbeitern aus der Lebertransplantationsambulanz (Frau Angela Papadopolous-Köhn, Frau Katharina Willuweit, Frau Nessrin Omirate, Frau Jacqueline Zmudzinski, Frau Claudia Mank, Frau Uta Hindeberger) und den

Kolleginnen des Studienbüros (Frau Anne Achterfeld und Frau Anne Hörster) für die immerwährende Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Ein weiterer besonderer Dank geht an unsere Kooperationspartner, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Baba und Frau Möllmann (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Essen) für die Anfertigung der Gewebeschnitte und die Durchführung der histologischen und immunhistologischen Färbungen.
- Den Mitarbeitern der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie insbesondere für die Bereitstellung des Patientenmaterials danken.
- Herrn Dr. Hofmann vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg für die Bereitstellung der PML-Expressionsplasmide.
- Herrn Dr. Martin Trippler und Frau Sabrina Driftmann für die Durchführung der mRNA- und miRNA-Arrays.
- Dem ganzen Team des Zentralen Tierlabors, vor allem aber Herrn Geiermann, für die Betreuung unserer Mäuse und auch die Bereitwilligkeit für ständige Hilfestellungen.

Ich danke meiner Mutter für die immerwährende Unterstützung, die man niemals in Worte fassen kann und für das Verständnis der letzten Wochen, dass ich nicht immer für sie da sein konnte. Ein weiterer besonderer Dank geht an meine beste Freundin Jacqueline Wolf, die trotz der großen Entfernung über alles im Bilde war und mich immer wieder motiviert hat, wenn es gerade einmal nicht so gut lief. Auch allen anderen Freunden und Bekannten möchte ich für das Verständnis danken, dass ich viel zu wenig Zeit hatte, ich verspreche, das wird sich ändern.

Die größte Dankbarkeit empfinde ich jedoch gegenüber meiner Familie. Ich danke meinem Mann Rafaele dafür dass er seit vielen Jahren immer für mich da ist. Ich danke ihm auch für sein wissenschaftliche Unverständnis, dass ein ums andere Mal dazu geführt hat, die Perspektive zu verändern und nicht immer alles so schwer zu nehmen. Auch möchte mich bei ihm und auch bei Philippe für das Verständnis bedanken, nicht immer da gewesen zu sein, auch wenn ich zu Hause war; glaubt mir, ich habe mich bemüht. Ohne euch zwei und vor allem dich Rafa, wäre ich niemals so weit gekommen!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Molekulare Mechanismen der HCC-Entstehung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Katja Piras-Straub befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. med. Kerstin Herzer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Katja Piras-Straub

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Katja Piras-Straub