

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Claudia Schiller
aus Gera

Tag der mündlichen Prüfung:

**Analyse komplexer Alterationen des MDM4-TP53-MDM2-
Regulationsnetzwerks im humanen hepatozellulären Karzinom basierend auf
hochauflösenden array-basierten Comparativen Genomischen
Hybridisierungen**

Gutachter: Prof. Dr. Stephan Urban
Prof. Dr. Peter Schirmacher

Vorab veröffentlichte und öffentlich präsentierte Teilergebnisse dieser Arbeit:

Journal- & Buchveröffentlichungen:

S. Lukasiak, C. Schiller, P. Oehlschlaeger, G. Schmidtke, P. Krause, D. F. Legler, F. Autschbach, P. Schirmacher, K. Breuhahn, and M. Groettrup
Pro-inflammatory cytokines cause FAT10 up-regulation in cancers of liver and colon
Oncogene. 2008 Oct 9;27(46):6068-74. Epub 2008 Jun 23.

C. Schlaeger*, T. Longerich*, C. Schiller, P. Bewerunge, A. Mehrabi, G. Toedt, J. Kleeff, V. Ehemann, R. Eils, P. Lichter, P. Schirmacher, B. Radlwimmer (** geteilte Erstauthorenschaft*)
Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis
Hepatology. Feb. 2008; 47(2):511-20.

S. Lukasiak, K. Breuhahn, C. Schiller, G. Schmidtke and M. Groettrup
Quantitative analysis of gene expression relative to 18S rRNA in carcinoma samples using the LightCycler instrument and a SYBR GreenI-based assay: determining FAT10 mRNA levels in hepatocellular carcinoma
Methods in Molecular Biology 2008; 429:59-72. – Buchveröffentlichung;

Posterpräsentationen:

T. Longerich*, C. Schiller*, C. Schlaeger*, V. Ehemann, P. Lichter, B. Radlwimmer and P. Schirmacher (** geteilte Erstauthorenschaft*)
Complex dysregulation of the MDM4-TP53-MDM2 regulatory network in human hepatocellular carcinoma
Conference of the International Liver Cancer Association, Chicago 09/2008

F. Bott, D. Gajzer, C. Schiller, C. Schlaeger, B. Radlwimmer, P. Schirmacher, T. Longerich
Role of FGF19-FGFR4 signaling in human Hepatocellular Carcinoma
Conference of the International Liver Cancer Association, Chicago 09/2008

T. Longerich*, C. Schiller*, C. Schlaeger*, P. Bewerunge, A. Mehrabi, R. Eils, P. Lichter, B. Radlwimmer and P. Schirmacher (** geteilte Erstauthorenschaft*)
MDM4 and eEF1A2, new oncogene candidates in human HCC, revealed by high-resolution array-based CGH
Conference of the German Association for the Study of the Liver, Frankfurt/Main 01/2008

T. Longerich*, C. Schiller*, C. Schlaeger, P. Bewerunge, A. Mehrabi, R. Eils, P. Lichter, P. Schirmacher and B. Radlwimmer (** geteilte Erstauthorenschaft*)
Comprehensive genome analysis reveals etiology-dependent and etiology-independent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis
58th Annual Meeting and Postgraduate Course of the American Association for the Study of Liver Diseases - The Liver Meeting 2007, Boston 11/2007

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Abkürzungen	5
1 Einleitung	7
1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom.....	7
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	7
1.1.2 Hepatokarzinogenese.....	11
1.2 Das MDM4 – TP53 – MDM2-Regulationsnetzwerk.....	17
1.2.1 Die „Murine Double Minute“ – MDM – Familie	17
1.2.2 MDM2- und MDM4-abhängige TP53-Regulation.....	19
1.3 Array-basierte Comparative Genomische Hybridisierung (aCGH)	19
2 Zielsetzung	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Chemikalien und Biochemikalien	23
3.2 Enzyme.....	24
3.3 Kits	24
3.4 Antikörper.....	25
3.5 Oligonukleotid- und siRNA-Sequenzen	26
3.6 Zellkulturmedien, Lösungen und Zellkulturzusätze.....	28
3.7 Zelllinien.....	28
3.8 Tumormaterial und Patientendaten.....	29
3.9 Geräte	33
3.10 Software.....	34
3.11 Zellkultur	34
3.11.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen.....	34
3.11.2 Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen	35
3.11.3 Kontaminationsbestimmung	36
3.11.4 <i>small-interfering</i> RNA-Transfektion.....	36
3.11.5 Behandlung mit Inhibitor Nutlin-3	38
3.12 Nukleinsäure-Techniken	38

3.12.1	DNA/RNA/Protein – Isolierung aus Gewebe	38
3.12.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen	40
3.12.3	Isolierung der Gesamt-RNA aus Paraffingewebe	40
3.12.4	Isolierung der Gesamt-DNA.....	41
3.12.5	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	42
3.12.6	c-DNA-Synthese – Reverse Transkription.....	43
3.12.7	Semiquantitative „ <i>realtime</i> “-PCR.....	43
3.12.8	PCR – Polymerasekettenreaktion.....	46
3.12.9	SSCP – „ <i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> “ – Gelanalyse	49
3.12.10	Array CGH-Microarrays	50
3.12.11	Sequenzierung.....	53
3.13	Proteinanalytik.....	55
3.13.1	Isolierung von Gesamtprotein.....	55
3.13.2	Bestimmung der Proteingesamtkonzentration.....	56
3.13.3	Western Blot.....	57
3.13.4	Immunhistochemie an Tissue-Micro-Arrays	58
3.14	Funktionelle Analysen	60
3.14.1	Bestimmung der Zellvitalität – „MTT-Assay“	60
3.14.2	Bestimmung der Proliferation – „BrdU-ELISA“.....	60
3.14.3	Bestimmung der Apoptoserate – „FACS-Analyse“	61
4	Ergebnisse	63
4.1	Bestimmung der Virusätiologie im HCC-Kollektiv	63
4.2	Analyse chromosomaler Alterationen im HCC.....	64
4.3	Expression des Proteins MDM4 im hepatozellulären Karzinom	67
4.4	Funktionelle Analysen	68
4.4.1	siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4.....	68
4.4.2	Effekte der MDM4-siRNA Inhibierung auf Zellvitalität, Proliferation und Apoptose....	69
4.5	Untersuchung des komplexen MDM4-TP53-MDM2-Regulationsnetzwerks <i>in vitro</i>	71
4.5.1	siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4, MDM2 und TP53	71
4.5.2	Proteinexpression nach Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3.....	77
4.5.3	Auswirkungen der Nutlin-3 Behandlung auf die Zellvitalität, den Zellzyklus und die Apoptose.....	78
4.6	<i>tp53</i> -Mutationsanalysen	79
4.6.1	Amplifikation und Überprüfung des <i>tp53</i> -Gens mittels PCR und SSCP-Gelanalyse.....	79
4.6.2	Sequenzierungsanalysen potentieller Mutationskandidaten	80
4.7	Chromosomale Alterationen genomischer Loci von <i>mdm4</i> , <i>tp53</i> und <i>mdm2</i> im humanen HCC	82
4.8	Expressionsanalysen im humanen HCC.....	83
4.8.1	mRNA Expression von MDM4-FL, MDM4-S und MDM2	83

4.8.2	Zusammenhang zwischen mRNA—Expression, —Ratio und klinischen Parametern ...	87
4.8.3	Vergleich der MDM4—MDM2—TP53-Proteinexpression im HCC.....	89
5	Diskussion	94
5.1	Ätiologie-abhängige und –unabhängige Aberrationen im humanen HCC.....	94
5.2	MDM4 – protumorigenes Potential im HCC?	97
5.3	Das Regulationsnetzwerk MDM4-TP53-MDM2	101
5.3.1	MDM – Alterationen und mutationsbedingte TP53 – Dysfunktion.....	102
5.3.2	Bedeutung der MDM4-MDM2-Ratio im HCC.....	104
5.3.3	Kooperation von MDM4 – TP53 – MDM2 <i>in vitro</i>	106
5.3.4	Aktivierung des TP53-Signalweges durch MDM-Antagonisierung.....	109
5.4	<i>tp53</i> -unabhängige protumorigene Effekte von MDM4	110
6	Literatur	113
7	Danksagung.....	126

Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste maligne primäre Lebertumor und zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Auch in den westlichen Industrienationen ist eine steigende Inzidenz der Neuerkrankungen bei gleichzeitig schlechter Prognose zu verzeichnen. Zu den wichtigsten ätiologischen Faktoren gehören chronische Hepatitis B und C Virusinfektionen, sowie chronischer Alkoholabusus und die sog. nicht-alkoholische Steatohepatitis, die im Rahmen eines metabolischen Syndroms auftreten kann.

Zur Identifikation neuer, für die Hepatokarzinogenese relevanter, chromosomaler Veränderungen und protumorigener Kandidatengene, wurde ein Kollektiv von 63 HCCs, das sich zu etwa gleichen Teilen aus o.g. Ätiologien rekrutierte, mittels array-basierter Comparativer Genomischer Hybridisierung (aCGH) analysiert. Kandidatengene wurden mittels Genexpressionsanalyse und funktioneller Assays anschließend weiter charakterisiert. Neben der ätiologie-abhängigen Überexpression des *myc*-Onkogens in virus- und alkohol-induzierten HCCs, wurden chromosomale Zugewinne auf 1q32 in etwa 70 % der HCCs nachgewiesen. Das durch eine minimale Überlappungsregion definierte Kandidatengen *mdm4* zeigte hingegen eine ätiologie-unabhängige Überexpression auf. Funktionelle Analysen nach siRNA-vermittelter Inhibierung der MDM4-Expression zeigten in HCC-Zelllinien eine reduzierte Zellviabilität, beruhend auf verminderter Proliferation und erhöhter Apoptoserate. Dies deutet darauf hin, dass MDM4 im HCC als Onkogen fungieren kann.

MDM4 ist, wie das ihm homologe, in zahlreichen Malignomen überexprimierte MDM2, Teil des MDM4-TP53-MDM2-Regulationsnetzwerks. Die weiteren Analysen dieses Regulationsnetzwerks zeigten, dass die *tp53*-Mutationsfrequenz, wie bereits für westliche HCCs beschrieben, mit 9,1 %, verglichen mit fernöstlichen oder afrikanischen Kollektiven (teilweise >50 %), gering war. Sowohl die proteasomale TP53-Degradation als auch die TP53-abhängige Transkription werden maßgeblich von der Expressionshöhe und dem Verhältnis MDM4-MDM2 beeinflusst. Die Analyse der Expression von MDM4, der Splicevariante MDM4-S und MDM2 auf mRNA- und Proteinebene und zeigte in 2/3 der untersuchten HCCs eine erhöhte MDM4-MDM2-Ratio, was eine prädominant transkriptionelle TP53-Inhibierung in HCCs bedeuten könnte.

In weiteren funktionellen Untersuchungen konnte in TP53-Wildtyp Zellen (HepG2) sowohl nach MDM4, als auch nach MDM2 Inhibierung mittels RNA *interference* eine Reduktion der Zellvitalität verbunden mit einem vergleichbaren Apoptoseanstieg beobachtet werden. Diese Inhibierungen bewirkten jedoch keinen antitumoralen Effekt in *tp53*-mutierten Zellen

(HuH7). Der in HepG2-Zellen nachgewiesene Effekt konnte durch eine Doppelinhibierung mit TP53- und MDM2-siRNA partiell umgekehrt werden, was für MDM4 nicht möglich war. Die simultane Inhibierung von MDM4 und MDM2 verstärkte die in HepG2 beobachteten Effekte.

Ein kompetitiver Inhibitor der MDM2-TP53-Interaktion, Nutlin-3, zeigte in funktionellen Analysen an HepG2-Zellen einen Vitalitätsverlust sowie die Induktion eines Zellzyklusarrests. Dies war verbunden mit einer Stabilisierung der TP53- und einer Induktion der p21-Proteinexpression sowie einer MDM4-Reduktion. Im Gegensatz hierzu wiesen HuH7-Zellen nur einen leichten Vitalitätsverlust verbunden mit einer diskreten Apoptoseinduktion auf, ohne messbaren Einfluss auf die Proteinexpression.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der potentielle Vorteil einer medikamentösen Therapie, die MDM2 zur Zielstruktur hat (z.B. Nutlin-3), maßgeblich vom *tp53*-Mutationsstatus bestimmt wird. Zudem scheint der anti-tumorale Effekt, verglichen mit einer auf MDM4 zielenden Therapie, geringer ausgeprägt. Dies ist möglicherweise durch MDM4-vermittelte TP53-unabhängige protumorigene Effekte begründet, wie Analysen in der TP53-deletierten HCC-Zelllinie Hep3B nahelegen.

Zusammenfassend ist MDM4 eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung neuer pharmakologischer Inhibitoren, die nach entsprechender positiver experimenteller und präklinischer Testung die bislang schlechte Prognose des HCCs verbessern können.

Abstract

The hepatocellular carcinoma (HCC) represents one of the most common cancers worldwide and is the most common type of primary liver cancer. It shows an increasing incidence and the overall prognosis is poor. Different etiologies have been linked to HCC development, such as chronic hepatitis B and C infection, chronic alcohol consumption as well as nonalcoholic steatohepatitis. To identify new etiology-dependent and –independent chromosomal aberrations along with genes related to hepatocarcinogenesis a panel of 63 HCCs including above mentioned etiologies equally distributed was analyzed using array-based comparative genomic hybridization (aCGH). Selected candidate genes were validated by gene expression profiling and functional analyses.

Besides etiology-dependent overexpression of the *myc*-oncogene in virus- and alcohol-induced HCCs we observed a chromosomal gain at 1q32.1 in 70 % of HCCs. The on 1q32.1 located *mdm4*-gene showed etiology-independent overexpression in HCCs. siRNA-mediated silencing of MDM4 expression significantly reduced cell viability, mainly due to decreased proliferation and increased apoptosis suggesting that MDM4 may act as an oncogene in a significant percentage of human HCCs.

MDM4 as well as its homologue MDM2, that has been shown to be overexpressed in numerous cancers, are key regulators of TP53. As previously described for Western HCCs the frequency of *tp53*-mutation was comparably low (9.1 %) in our series compared to HCCs in patients from Asia or sub-Saharan Africa. Both proteasomal TP53-degradation and TP53-dependent transcription rely on the expression level as well as the MDM4-MDM2 ratio. The quantification of the relative expression of MDM4, the splice variant MDM4-S and MDM2 as well as the calculation of their ratios revealed an increased MDM4- MDM2 ratio in 2/3 of HCCs analyzed, implicating that function inhibition of *tp53* in human HCCs occurs mainly via inhibition of TP53-dependent transcriptional activation.

Further functional analyses using RNA *interference* confirmed that inhibition of both MDM4 and MDM2 reduced cell viability and increased apoptosis in *tp53*-wildtype cells (HepG2), whereas these treatments showed no anti-tumoral effect in *tp53*-mutated cells (HuH7). Additionally, the anti-tumoral effects were partially prevented following double inhibition of MDM2- and TP53 in HepG2-cells, whereas double inhibition of MDM4 and TP53 did not prevent the reduction in cell viability due to increased apoptosis. Additionally, double inhibition of MDM2 and MDM4 further increased the effects of the respective single inhibition in HepG2-cells.

Treatment of HepG2-cells with Nutlin-3, a competitive small molecule inhibitor of MDM2-TP53-interaction, decreased cell viability and induced a cell cycle arrest via stabilization of TP53 and stabilization of p21 protein expression, whereas MDM4 expression was decreased. In contrast, this treatment only slightly decreased cell viability and increased the apoptosis rate in HuH7 cells without detectable changes in protein expression of MDM4, TP53, MDM2, and p21. Together, these data suggest that the efficacy of therapeutically targeting MDM2 (i.e. Nutlin-3) depends mainly on the *tp53*-mutation status. Furthermore these results indicate that targeting MDM2 exhibits a lower anti-tumoral potential than MDM4-targeting strategies, which may be due to TP53-independent protumorigenic functions of MDM4 as indicated in functional analysis following MDM4 knockdown in *tp53*-deleted Hep3B-cells.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
aCGH	array-basierte Comparative Genomische Hybridisierung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Brom-desoxy-Uracil
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CGH	Comparative Genomische Hybridisierung
Cot1 DNA	repetitive Sequenz genomischer DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
DOP-PCR	Degenerative Oligonukleotid-Priming PCR
ds	doppelsträngig
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
<i>eef1a2</i>	eukaryotic Translation Elongation Factor 1 alpha 2
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
endogK	endogene Kontrolle
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
FDR	False Discovery Rate
for	forward (vorwärts)
g	Standard Gravitation (9.80616 m/s ²)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis B Virus X-Protein
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
IRS	Immunoreaktiver Score
kb	Kilobasen; 10 ³ bases
LB	Lysogeny Broth
LOH	Loss of Heterozygosity
Mb	Megabasen; 10 ⁶ bases
<i>mdm2</i>	Mouse Double Minute 2 Gen
<i>mdm4</i>	Mouse Double Minute 4 Gen
min	Minute
mRNA	messenger RNA

MW	Mittelwert
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung)
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis (Nicht-alkoholische Steatohepatitis)
nt	Nukleotid(e)
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
q	langer Arm eines Chromosoms
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
rev	reverse (rückwärts)
RIN	RNA Integrity Number
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Sauerstoffradikale (Reaktive Oxygen Species)
rpm	round per minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAM	Significance Analysis of Microarrays
sec	Sekunde
siRNA	small inhibitory RNA
SNP	Single Nucleotid Polymorphismus
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue Microarray
TP53	tumor protein 53 protein (auch p53)
tRNA	transfer RNA
ÜN	über Nacht
UICC	Union Internationale Contre le Cancer (Internationale Union gegen Krebs)
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt zu den häufigsten malignen Krebserkrankungen weltweit und wird in der Mortalitätsstatistik an dritter Stelle gelistet. Auch in den westlichen Industrienationen ist eine steigende Inzidenz der Neuerkrankungen mit bisher schlechter Prognose zu verzeichnen. Das HCC ist sowohl phäno- als auch genotypisch ein heterogener Tumor mit klar definierter Ätiologie. Klinische Symptome treten in der Regel spät auf, so dass die Diagnose häufig erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird [1, 2]. Auf Grund der aggressiven Tumorentwicklung sowie dem schlechten Ansprechen des HCCs auf klassische Therapieansätze mittels Chemotherapeutika oder operative Verfahren ist eine durchschnittliche 5-Jahres Überlebensrate nach Diagnosestellung von nur 3 % zu verzeichnen [3]; somit stellt das HCC ein wichtiges Forschungsgebiet zur Entwicklung einer effektiven Therapie dar.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Unter den verschiedenen primären hepatischen malignen Tumoren, wie beispielsweise dem Gallengangskarzinom, Hepatoblastom oder Hämangiosarkom, ist das HCC mit über 80 % der Fälle der weitaus häufigste [4].

Epidemiologisch zeigt das HCC Unterschiede hinsichtlich der geographischen Verteilung aber auch bezüglich des Auftretens innerhalb verschiedener ethnischer Gruppen. Mit einer etwa vierfach größeren Erkrankungshäufigkeit der Männer im Vergleich zu Frauen lässt sich zudem auch ein Unterschied zwischen den Geschlechtern erkennen [5].

Während ca. 80 % der HCC-Erkrankungen (Inzidenz 93 Fällen / 100.000 Einwohnern) in Entwicklungsgebieten wie Südostasien oder Afrika zu verzeichnen sind, treten in Nordeuropa und Nordamerika jährlich weniger als 6 Neuerkrankungen / 100.000 Einwohner auf (Abb. 1) [6].

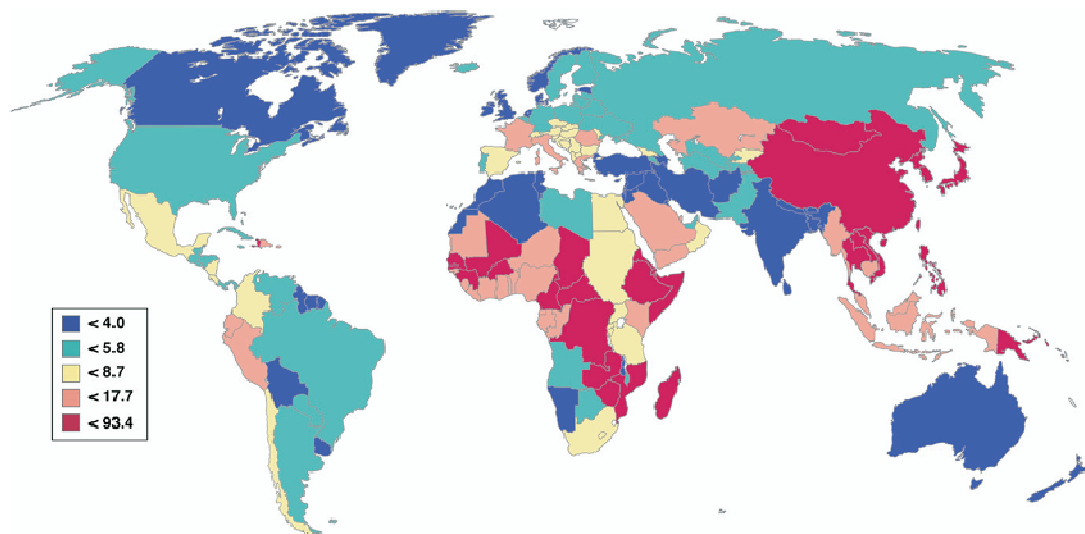


Abb. 1 Weltweite regionale Unterschiede in der Sterblichkeitsrate auf Grund des HCCs, klassifiziert nach alters-standardisierten Sterberaten. Die Raten werden pro 100 000 Personen angegeben (El-Serag 2007 [6]).

Die geographischen Inzidenzunterschiede beruhen im Wesentlichen auf der endemischen Verbreitung der zugrunde liegenden Ätiologien.

Unterschiedliche Grunderkrankungen werden mit der Hepatokarzinogenese in Verbindung gebracht und sind Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms [7].

Insbesondere die endemische Infektion mit dem Hepatitis B- und dem Hepatitis C-Virus (HBV, HCV) erklärt die höheren Inzidenzzahlen des HCCs im südlich der Sahara gelegenen Afrika und in Asien. Der Entwicklung eines HCCs geht dabei eine chronische Virushepatitis voraus, die oft in eine Leberzirrhose mündet [5, 8, 9]. Neben der Schädigung der Hepatozyten durch die zelluläre Immunreaktion, welche die virus-infizierte Zellen zu eliminieren versucht, gefolgt von einer Regeneration des Lebergewebes, spielen auch virale Proteine, wie das HBx und das trunkierte preS2-Protein bei der chronischen Hepatitis B, eine wesentliche pathogenetische Rolle. Das im ringförmigen HBV-Genom kodierte HBx-Protein kann protumorigen wirken, da es u.a. das Tumorsuppressorgen *tp53* hemmt und so die Apoptose sowie die DNA-Reparatur verhindert [10], aber auch die Expression von Wachstumsfaktor-Signaltransduktionsmolekülen wie RAS, RAF, MAPK oder ERK verstärkt [4]. Das preS2/S Protein wirkt durch transkriptionelle trans-Aktivierung protumorigen [11]. Weiterhin ist das HB-Virus in der Lage, sein Genom in das der Wirtszelle zu integrieren [12]

und dadurch Mikrodeletionen hervorzurufen, die wiederum tumorassoziierte Gene, wie z.B. die Telomerase Reverse Transcriptase (*tert*), betreffen können [13]. Der vermehrte Zellumsatz auf Grund der permanenten Hepatozytenschädigung führt zusätzlich zu einer erhöhten Mutationswahrscheinlichkeit, die eine Tumorentwicklung begünstigt [14]. Präventive flächendeckende Impfungen der Bevölkerung gegen HBV sind Maßnahmen, die zu einem Rückgang der HBV-assoziierten HCC Erkrankungen führen [15].

Trotz eines vergleichsweise geringeren HBV-Infektionsrisikos in den Industriestaaten gegenüber dem asiatischen Raum, ist ein Anstieg der HCC Neuerkrankungen zu verzeichnen, wobei hier vor allem HCV-Infektionen als viraler Risikofaktor wirken [16-18]. Auf molekularer Ebene werden bei der chronischen Infektion mit dem zur Familie der *Flaviviridae* gehörende Hepatitis-C-Virus das „Core-Polypeptid“ [19] sowie das nicht-Strukturprotein NS5A [20] mit der HCC Entwicklung in Verbindung gebracht.

Anders als das HBV besitzt HCV nur ein sog. „plus strand“-RNA Genom (= mRNA), das sich nicht in das Wirtsgenom integrieren kann. Das HCV-Genom kodiert ein 3010 Aminosäuren großes Polypeptid, welches durch zelluläre und virale Proteasen zu mehreren kleineren Polyproteinen, wie den nicht-Struktur- (z.B. NS2, NS3, NS4A, NS5B), Core- und den Hüllproteinen (E1 und E2) prozessiert wird [21]. Sowohl die Struktur- als auch die nicht-Strukturproteine sind in der Lage das wirtseigene Immunsystem durch die Interaktion mit unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- α Rezeptor (TNF α R) zu umgehen [22], während das Coreprotein einen Einfluss auf die Funktion der dendritischen Zellen und somit auf die T-Zell-Aktivierung ausübt [23]. Der überwiegende Anteil (>80 %) der Infektionen mit dem einzelsträngigen RNA-Virus verläuft chronisch und führt über eine chronischen Hepatitis oft zur Leberzirrhose [24].

Starker Alkoholmissbrauch ist besonders in den USA und Europa eine weitere Ursache für eine HCC-Entwicklung. Alkoholgenuss von mehr als 80 g pro Tag über 10 Jahre hinweg, erhöht die Wahrscheinlichkeit an einem HCC zu erkranken um das fünf- bis siebenfache [25]. Direkte karzinogene Effekte der Alkoholverbindungen sind nicht bekannt. Alkohol verändert jedoch die intestinale Barriere so, dass Endotoxine der darmsiedelnden Mikroorganismen direkt in die Blutbahn und die Leber gelangen können, wo sie eine Induktion der

Immunreaktion, im Speziellen der sogenannten Kupffer-Zellen, bewirken. Die aktivierten Kupffer-Zellen, spezialisierte Makrophagen der Leber, setzen verschiedene Chemokine und Zytokine (TNF- α , Interleukin-1 β (IL1 β), Interleukin-6 und Prostaglandin E2) frei. Diese steuern die Apoptose von Hepatozyten, inflammatorische Reaktionen und die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) [26]. Erhöhte ROS Level führen zu oxidativem Stress, der offenbar eine wichtige Rolle in der alkoholinduzierten Hepatokarzinogenese spielt [27]. ROS sind in der Lage mit Proteinen, Lipiden oder DNA zu interagieren und so zur Deaktivierung, Degradation oder Akkumulation von Mutationen (bspw. *tp53*-Mutationen), beizutragen [28]. Oxidativer Stress kann somit in HCC-relevante Signalwege, wie die ‚*Signal-Transducer-and-Activator-of-Transkription-1*‘ (STAT1)-vermittelte Aktivierung des IFN γ -Signalweges eingreifen und durch die Reduktion des STAT1 die IFN γ -vermittelte proteasomale Proteindegredation und die Antigenpräsentation verhindern [29]. Daneben führt die chronischen Zellschädigung zur Selektion protumorigener Mutationen, zur Fibrose und letztlich zur Zirrhose [30, 31].

Global betrachtet ist die Kontamination von Nahrungsmitteln (Mais, Reis oder Erdnüssen) durch die Mycotoxine des Pilzes *Aspergillus flavus* und die damit verbundene Aflatoxin-B1 (AFB₁)-Belastung eine wichtige Ursache für die HCC Entstehung [32, 33]. Das Toxin ist in der Lage an die DNA zu binden und z.B. spezifische Mutationen im Codon 249 des *tp53*-Gens zu verursachen [34, 35]. Eine häufig anzutreffende HBV-Koexposition erhöht das HCC-Risiko weiter (~30-fach) [36, 37].

Wohlstandserkrankungen der westlichen Länder wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ II tragen zur Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) bei, die sich zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) entwickeln kann, zu einer chronischen Leberschädigung führt und damit offenbar ebenfalls die Bildung eines HCCs begünstigt [9, 38]. Die genauen Mechanismen für die Entwicklung einer NASH sind noch nicht geklärt, aber es gibt Hinweise auf eine Bedeutung von Insulinresistenz, oxidativem Stress und Entzündungsmediatoren [39]. Neben Umweltfaktoren zieht man auch eine genetische Variabilität für die NASH-Entstehung in Betracht. So tragen Gen-Polymorphismen des Lipid-

Stoffwechsels, Insulin-Signalweges, der Entzündung und des oxidativen Stresses wahrscheinlich zur Pathogenese der NASH bei [40, 41].

Genetische Stoffwechselerkrankungen wie die genetische Hämochromatose und seltener der α_1 -Antitrypsin-Mangel aber auch Autoimmunhepatitiden und idiopathische biliäre Erkrankungen erhöhen ebenfalls geringfügig das Risiko einer HCC-Entwicklung.

1.1.2 Hepatokarzinogenese

1.1.2.1 Morphologie und allgemeine molekulare Mechanismen

Die Hepatokarzinogenese ist ein Prozess der sich schrittweise ausgehend von einer chronischen Leberschädigung, oft mit der Entwicklung einer Leberzirrhose, über die Entstehung prämaligener Vorläuferläsionen bis hin zum klinisch manifestierten HCC fortsetzt. Diese Entwicklung erklärt, dass zwischen dem Auftreten der chronischen Lebererkrankung und der Manifestation eines HCCs in der Regel eine Latenz von Jahren oder oft sogar Jahrzehnten liegt (Abb. 2) [42, 43].

Die Zirrhose ist charakterisiert durch die Umwandlung der normalen Leberarchitektur in strukturgeschädigtes Regenerationsgewebe, das in eine fibröse Matrix eingelagert ist. Durch phänotypische Veränderungen und erhöhte Zellproliferation bilden sich sogenannte Dysplastische Foci, welche, solange der Durchmesser $< 0,1$ cm beträgt, als früheste morphologisch abgrenzbare prä maligne Läsionen angesehen werden. Bereits in diesem frühen Stadium, lassen sich die ersten HCC-typischen Veränderungen, zum Beispiel im Kern-Zytoplasma-Verhältnis, erkennen [44]. Durch weiteres Wachstum entwickeln sich aus diesen Foci sogenannte Dysplastische Knoten. Diese Läsionen zeigen ein klonales Wachstum und sind bereits makroskopisch erkennbar. Histologisch zeigen sie einige Merkmale des HCCs, wie eine gesteigerte Kern-Zytoplasma-Relation oder eine zytoplasmatische Basophilie. Es sind jedoch hier noch keine definitiven Zeichen einer malignen Transformation zu sehen, welche erst im weiteren Verlauf der Tumorprogression auftreten. Malignität lässt sich histologisch eindeutig durch interstitielle Invasion oder Gefäßinvasion, ausgeprägte trabekuläre Strukturstörungen und intra- oder extrahepatischer Metastasierung erkennen [45]. Im Verlauf der weiteren Tumorentwicklung bilden sich typischerweise zunächst „frühe“

HCCs, die sich häufig mit einer Größe von < 2 cm, einem häufig hohen Differenzierungsgrad und langsamem Wachstum von fortgeschrittenen HCCs unterscheiden [46].

Ein durch molekulare Umstrukturierung der Zelle hervorgerufener Eingriff in intrazelluläre Signalwege betrifft eine Vielzahl von Molekülen, welche wiederum Einfluss auf Proliferation, Apoptose, genomische Stabilität oder Zelldifferenzierung ausüben. Trotz dem die HCC-Entstehung komplexe molekulare Mechanismen umfasst, die noch nicht vollständig verstanden sind, ist es gelungen einzelne Hauptregulatoren (z.B. TP53) und Signalwege (z.B. WNT/ β -Catenin Signalweg) zu identifizieren.

Die maligne Transformation der Hepatozyten auf molekularer Zellebene wird durch die inflammatorischen Veränderungen, Immunreaktionen und durch Sauerstoffradikale ausgelöste DNA-Schädigungen hervorgerufen. Eine Aktivierung zellulärer Onkogene (z.B. c-MYC) bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. Retinoblastom-1 (RB-1)), Überexpression von Wachstums- und Angiogenesefaktoren (z.B. HGF) als auch eine erhöhte Telomeraseaktivität tragen zur Tumorgenese bei [36, 47].

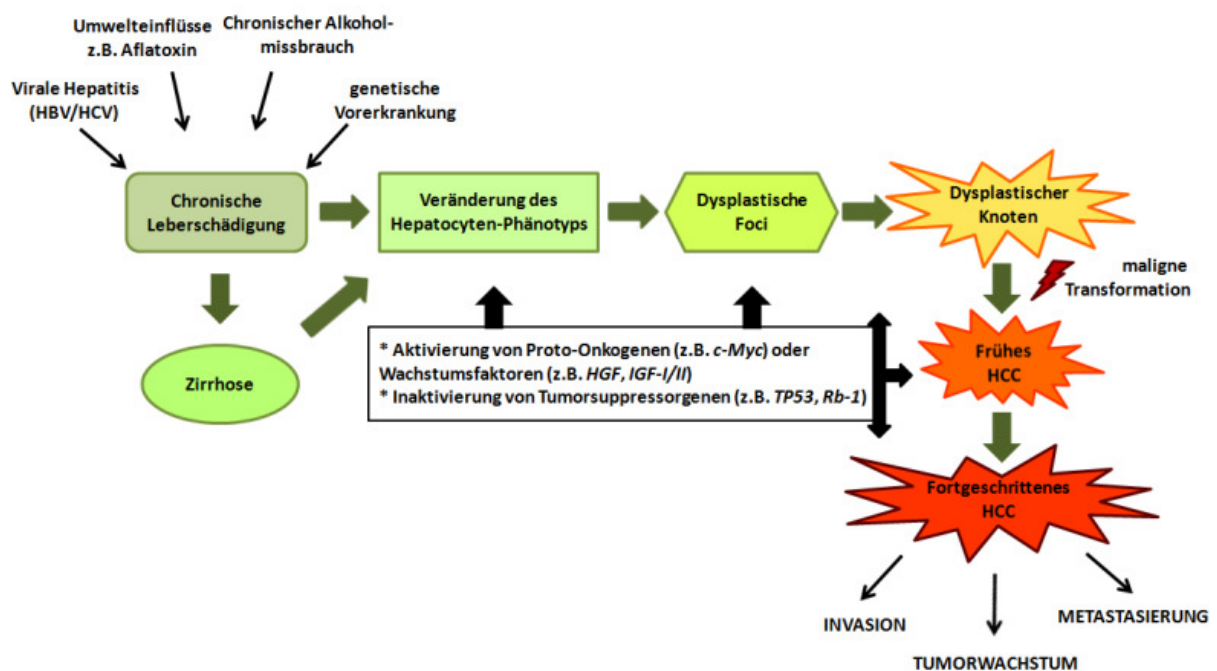


Abb. 2 Schematische Darstellung der Abläufe in der humanen Hepatokarzinogenese

Die Telomerverkürzung führt zu einer Aktivierung der DNA-Reparatursysteme, wodurch es zu einer Fusionierung von Telomerenenden mit „einer kritischer Länge“ kommen kann. Tritt

eine Zelle mit solchen fehlerhaften Chromosomen in den Zellzyklus ein, kann es während der Mitose zu Chromosomenstrangbrüchen kommen. Gleichmaßen kann eine Telomerasereaktivierung zu chromosomalen Zugewinnen oder Verlusten beitragen, die bei vielen HCCs zu beobachten sind [48, 49].

1.1.2.2 Chromosomale Instabilität im HCC

Ein wesentliches Merkmal des humanen hepatozellulären Karzinoms ist die chromosomale Instabilität. Unter Verwendung konventioneller und Comparativer Genomischer Hybridisierungsanalysen (CGH) konnten rekurrente Gewinne auf 1q, 6p, 8q, 17q und 20q sowie Verluste auf 1p, 4q, 8p, 13q, 16q und 17p identifiziert werden. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Häufigkeiten dieser Alterationen im HCC (Tab. 1).

Tab. 1 Häufigkeiten ausgewählter chromosomaler Alterationen im HCC (nach Moinzadeh 2005 [50])

Chromosom	Zugewinn [%]	Chromosom	Verlust [%]
1q	57,1	1p	15,4
6p	22,3	4q	34,3
8q	46,6	8p	38,0
17q	22,2	13q	26,2
20q	18,6	16q	35,9
		17p	32,1

Orte chromosomaler Verluste werden als potentielle Kandidatengenregionen für Tumorsuppressorgene angesehen, während Zugewinne zu einer Anreicherung protumorigener Faktoren wie Onkogenen oder Wachstumsfaktoren führen können [51]. Einigen chromosomalen Regionen konnten spezifische tumorrelevante Gene zugeordnet werden, wie beispielsweise Tumorsuppressorgene auf 17p (*tp53*), 13q (*rb-1*), 16q (*E-cadherin*) oder 16q (*insulin-like growth factor 2 receptor*). Die auf Chromosom 1q (z.B. *cox-2*) oder 8q (z.B. *c-myc*) identifizierten Gene werden dagegen durch Zugewinne überexprimiert, was auf einen protumorigenen Charakter schließen lässt.

Eine CGH-Metaanalyse zur Hepatokarzinogenese konnte in Vorarbeiten chromosomale Verluste auf 4q, 16q, 13q und 8p mit einer HBV-Ätiologie assoziieren. HCV-induzierte HCCs zeigten dagegen typischerweise keine Verluste dieser Chromosomenarme [50, 52]. Für einzelne dieser Chromosomenarme (siehe oben) konnten Kandidatengene identifiziert werden [53], für den HBV-assoziierten 4q-Verlust gelang dies jedoch nicht. In Einzelfällen wurde berichtet, dass der 4q-Arm an chromosomalen Translokationen beteiligt sei [54, 55]. Der genomische Verlust auf 8p dagegen scheint mit der Tumorprogression im HCC assoziiert zu sein [56].

1.1.2.3 Dysregulation tumorassoziierter Signalkaskaden

Die Dysregulation einzelner tumorrelevanter Gene wie *tp53* oder *β-catenin* kann im Rahmen der Hepatokarzinogenese zu Modifikationen ganzer Signalwege führen.

Der Retinoblastom-1 (RB-1) Signalweg

Als Zellzyklusregulator reguliert das Tumorsuppressorgen *rb-1* den Eintritt der Zelle in die Zellteilung, insbesondere wird der Übergang von der G₁- in die S-Phase kontrolliert. In der aktiven nicht-phosphorylierten Form, fungiert RB-1 als Transkriptionsrepressor für die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie wodurch die Zelle im Zellzyklusarrest gehalten wird [57, 58]. Eine fehlende oder reduzierte Expression des *rb-1* Gens, führt zu einer gesteigerten Aktivierung der E2F-Transkriptionsfaktoren und damit zu einer erhöhten Proliferationsrate. Die Aktivität des RB-1-Proteins wird durch cyclinabhängige Kinasen („*cyclin dependent kinase*“ – CDK) über Phosphorylierung geregelt, die wiederum von spezifischen Inhibitoren, wie p16^{INK4A}, p21^{CIP1} oder p27^{KIP1}, inaktiviert werden können [59]. Erfolgt eine Hyperphosphorylierung des RB-1-Proteins, wird die Transkriptionsrepression aufgehoben und es kommt zur DNA-Synthese gefolgt von einer Zellzyklus-Progression.

Studien belegen, dass in der Mehrheit der HCCs der Funktionsverlust des RB-1 mit dem Verlust des Genlocus 13q14 assoziiert ist [60], spezifische Mutationen des Gens wurden bisher jedoch nicht beschrieben [61]. Vielmehr scheint eine epigenetische Promotorhypermethylierung bei der RB-1-Inaktivierung im HCC eine Rolle zu spielen. ätiologie-abhängige Unterschiede sind nur unzulänglich untersucht. Eine Studie konnte

jedoch gehäuft epigenetische RB-1-Alterationen in alkoholischen HCCs im Vergleich zu HCV-induzierten HCCs aufzeigen [62].

Der WNT/ β -Catenin Signalweg

Der evolutionär hoch konservierte „*Wingless*“ (WNT)-Signalweg ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Motilität, Zell-Zell Interaktionen und Proliferation beteiligt [63]. Neben Survivin (Anti-Apoptose), c-MYC (Proliferation), Metalloproteinasen (z.B. MMP-7; Invasion) und Vascular Endothelial Growth Factor (Angiogenese) gehört auch Cyclin-D1 zu den Zielgenen dieses protumorigenen Signalwegs [64].

In Abwesenheit der ca. 19 bekannten WNT-Glycoproteinen ist der WNT-Signalweg inaktiv und zytoplasmatische β -Catenin Level können effizient durch einen Multiproteinkomplex, bestehend aus Adenomatous Polyposis Coli (APC), Axin 1 und 2 sowie Serin-Threonin-Glycogen-Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β), reguliert werden. Physiologisch wird β -Catenin im Exon 3 von GSK3 β phosphoryliert, wodurch es vom Ubiquitin-Proteasom System erkannt und degradiert wird.

Durch die Bindung der spezifischen Liganden an den sogenannte „*Frizzled*“-Rezeptor (FZDR) wird die WNT-Signalkaskade initialisiert, wodurch nun das Protein Dishevelled (DSH) phosphoryliert wird, welches seinerseits GSK3 β inhibiert und damit den zytoplasmatischen β -Catenin-Degradationskomplexes hemmt. In Folge dessen wird β -Catenin nicht mehr abgebaut, sondern akkumuliert im Zytoplasma und es kommt zur nukleären Translokation. Im Zellkern komplexiert das Protein als essentieller Ko-Faktor mit den Transkriptionsfaktoren der T-Zell-Faktor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF) - Familie und führt so zur Aktivierung zahlreicher onkogener Zielgene, wie z.B. *cyclin D1*, *c-myc* oder *c-jun*. [65, 66].

β -catenin Mutationen und erhöhte nukleäre Expression sind in 17-40 % der humanen HCC belegt. Protumorigene Mutationen im *β -catenin*-Gen führen zum Verlust der Phosphorylierungsstellen, wodurch die Ubiquitin-abhängige Degradation verhindert wird. Daneben existieren verschiedene weitere protumorigene Alterationen, wie Mutationen von *axin 1* (5-14 %) oder *axin 2* (3–10 %), die zu einer Anreicherung des β -Catenin in den Zellen führen können [67-69].

Der TP53-Signalweg

Das Tumorsuppressorgen *tp53* agiert als zentraler Koordinator der zellulären Antwort auf Stresssignale, die durch DNA Schäden, Überexpression von Onkogenen oder limitierten Metaboliten wie z.B. Sauerstoff induziert werden. Der Transkriptionsfaktor TP53 reguliert direkt oder indirekt wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellzyklusarrest (z.B. Aktivierung des Zellzyklusinhibitors $p21^{CIP1}$), DNA-Reparatur, Apoptose (z.B. Stimulation von BAX) oder Seneszenz. Ein Funktionsverlust kann deshalb ein Überleben und die Proliferation von Zellen mit akkumulierten Defekten bewirken. Dies erklärt die nahezu essentielle Bedeutung einer strukturellen bzw. funktionellen Inaktivierung von TP53 in der Tumorentstehung und – progression [69, 70].

Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *tp53* kann sowohl durch Deletion, Mutation, Methylierung oder gezielte Aktivierung von Inhibitoren in der Tumorgenese beobachtet werden [35, 71]. Etwa die Hälfte aller Malignome weisen einen Funktionsverlust durch Mutationen im *tp53*-Gen auf, im HCC werden ca. $\frac{1}{3}$ der Mutationen durch Aflatoxin B1 induziert [42]. Insgesamt lassen sich weltweit in 29 % und in etwa 10 % der nordeuropäischen HCCs *tp53*-Mutationen nachweisen [72]. Weiterhin kann eine funktionelle Inaktivierung des TP53_{Wildtyp(WT)} durch die Bindung viraler Proteine wie dem HBxAg des Hepatitis B Virus verursacht werden [73].

Aber nicht nur der Verlust des TP53 (sog. „*loss of function*“) sondern auch ein tumorigen wirkender Funktionszugewinn (sog. „*gain of function*“) konnte innerhalb des HCCs beobachtet werden [74]. Diese „*gain of function*“ Mutationen scheinen mit Tumorgröße, Enddifferenzierungsgrad [75], Proliferation [76] und gesteigerter Invasivität [77] zu korrelieren.

Da TP53 auf die unterschiedlichsten Ebenen zellulärer Prozesse Einfluss nimmt, unterliegen Funktion und Stabilität strengen Regulationsmechanismen. Zu den Hauptregulatoren gehört das „*Murine Double Minute 2*“ (MDM2)-Protein, welches unter normalen Zellbedingungen als E3 Ubiquitin-Ligase über eine Ubiquitinierung für die Degradation des TP53 sorgt und so das TP53-Level innerhalb der Zelle niedrig hält [78, 79]. Die Interaktion von MDM2 mit einem weiteren „*Murine Double Minute*“-Protein (MDM4) führt zur MDM2 Stabilisierung, zusätzlich

ist MDM4 in der Lage an die TP53-Transaktivierungsdomäne zu binden. Beide Mechanismen unterstützen die Negativregulation von TP53 [80]. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Autodegradation von MDM2, zusätzlich erfolgt eine MDM2-vermittelte Degradation von MDM4 und somit die TP53 Aktivierung. Letzteres kann nun als Transkriptionsfaktor verschiedene Zielgene (neben p21 auch MDM2) aktivieren und Reparaturmechanismen oder Apoptose vermitteln. Über einen negativen Feedback Mechanismus bewirkt die Hochregulation von MDM2 wieder eine Inaktivierung des TP53 [81, 82].

1.2 Das MDM4 – TP53 – MDM2-Regulationsnetzwerk

1.2.1 Die „Murine Double Minute“ – MDM – Familie

Die Mitglieder der MDM-Proteinfamilie gehören zu den Schlüsselregulatoren des Tumorsuppressorgens *tp53*. MDM2, ein zu den E3 Ubiquitin-Ligase Proteinen gehörendes Molekül, wurde erstmals in spontan transformierten murinen 3T3-DM Zellen (BALB/3T3 Zelllinie) identifiziert [83, 84]. In den folgenden Jahren konnte das onkogene Potential, initial durch den Nachweis von Genamplifikationen, in unterschiedlichen Malignomen, wie Hepatoblastomen, Osteosarkomen, pankreatischen Tumoren oder Leukämien nachgewiesen werden [85, 86]. Im HCC zeigten einige Studien ein heterogenes Bild, wobei immunhistologisch eine Hochregulierung zwischen 26 % und 59 % der untersuchten HCCs gesehen wurde [87-89]. Eine MDM2-Überexpression in HCCs ohne *tp53*-Mutation korrelierte dabei in einzelnen Studien mit einer gesteigerten Invasivität und schlechteren Prognose [77, 90].

In den letzten Jahren wurde ein weiteres Mitglied der MDM-Familie – das “*Mouse Double Minute 4 Homolog*“-Gen (*mdm4*, *mdmX* oder *hdmX*) – identifiziert [91]. In einigen Tumorentitäten, wie Lungen-, Colon- oder Mammakarzinomen [69], Glioblastomen [92] oder Retinoblastomen [93], konnten *mdm4*-Amplifikationen und Überexpressionen nachgewiesen werden, wobei i.d.R. ein wildtypisches TP53 vorlag. Das strukturell mit MDM2 verwandte MDM4 bildet über die, bei beiden Proteinen vorhandene hochkonservierte C-terminale RING-Finger Domäne, Heterodimere mit MDM2 und führt so zu dessen Stabilisierung [80].

MDM4 ist ein primär zytoplasmatisches Protein ohne eigenes nukleäres Lokalisierungssignal (NLS), das aber über die RING-Finger-Domäne mit MDM2 komplexiert und so auch in den Nukleus transportiert werden kann (Abb. 3).

Obwohl MDM4 keine Ubiquitin-Ligase Aktivität aufweist, kristallisierte es sich als wichtiger funktioneller Negativregulator von TP53 heraus, wobei abhängig vom MDM4/MDM2-Verhältnis die Transkription durch Heterodimerisierung an die TP53-DNA-Bindungsdomäne verhindert wird [82, 94].

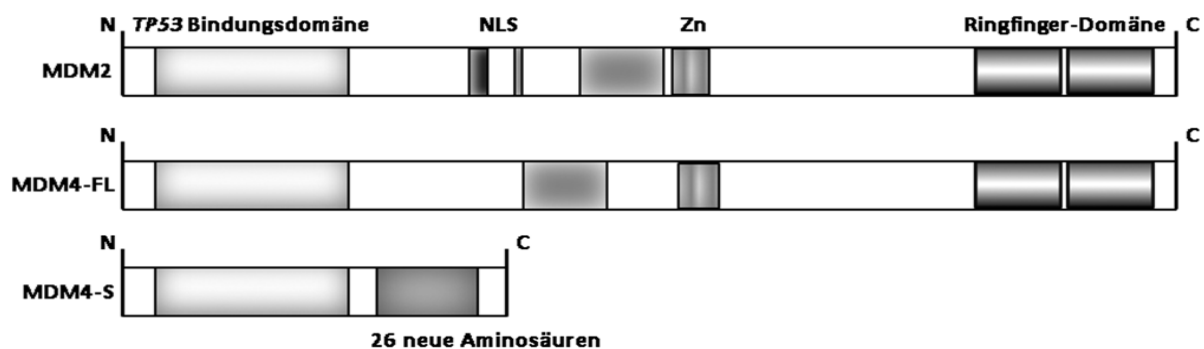


Abb. 3 Domänenstruktur der Proteine MDM2, MDM4-FL und MDM4-S. MDM2 und MDM4-FL besitzen sowohl eine N-terminale TP53-Bindungsdomäne, Zink-Finger-Domäne (Zn) und eine C-terminale Ringfinger-Domäne, MDM2 hat zusätzlich ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS). Das MDM4-S-Protein besteht nur noch aus der TP53-Bindungsdomäne und 26 neuen Aminosäuren.

Während für MDM2 eine große Zahl unterschiedlicher Splicevarianten identifiziert und auch charakterisiert wurden [95], konnten bisher nur wenige MDM4-Spliceformen gefunden und ihnen eindeutige Eigenschaften zugeordnet werden [96]. Hierzu gehört die Splicevariante *mdm4-Short* (*mdm4-S*) [95]. Ihr fehlt Exon 6, weshalb ein Frameshift im Leseraster entsteht, der zu einem vorzeitigen Stopcodon und damit zu einem verkürzten Protein führt. Das MDM4-S Protein besteht deshalb nur noch aus dem N-terminalen die TP53-Bindungsdomäne enthaltenden Proteinfragment sowie 26 „neuen“ Aminosäuren und hat eine höhere TP53-Affinität als das Vollängenprotein [97]. Durch die fehlende RING-Domäne kann das Protein nicht mehr mit MDM2 interagieren, ist vor der MDM2-vermittelten Degradation geschützt und weist möglicherweise so eine höhere Stabilität auf (Abb. 3) [98].

1.2.2 MDM2- und MDM4-abhängige TP53-Regulation

Die TP53-Regulation durch MDM2 und MDM4 ist ein komplexes Wechselspiel, das noch nicht in allen Details untersucht und verstanden ist. Jedes der drei Proteine kann die Stabilität des anderen beeinflussen. Man nimmt an, dass das relative Verhältnis von MDM4 zu MDM2 eine kritische Rolle für das TP53-Proteinlevel innerhalb der Zelle spielt. In normalen Zellen mit einem 1:1 Verhältnis der beiden Proteine unterliegt TP53 dem MDM2-vermittelten proteasomalen Abbau. In diesem Fall partizipieren beide MDM-Familien-Mitglieder durch gegenseitige Stabilisierung an der TP53-Inaktivierung, wobei noch nicht vollständig klar ist, ob dies unabhängig oder synergistisch erfolgt.

Im Fall zellulären Stresses kommt es zur Autodegradation von MDM2, somit zu einem MDM4-Anstieg und einer Verschiebung des MDM4:MDM2-Verhältnisses zugunsten MDM4, wodurch dessen TP53-transkriptionshemmende Wirkung begünstigt wird [98]. Um eine korrekte TP53-Antwort unter Stress zu gewährleisten, ist die Regulation der MDM4-Expression daher ebenso wichtig [82]. Unterschiedliche Mechanismen der MDM4-Regulation sind bekannt, aber nicht vollständig verstanden. MDM4 wird nach DNA-Schädigung an verschiedenen Stellen phosphoryliert und nachfolgend effizient degradiert, wobei u.a. auch eine durch den „*ADP-ribosylation factor*“ (ARF) vermittelte MDM2-abhängige Ubiquitinisierung über die RING Domäne notwendig ist. MDM2 kann dadurch als TP53- aber auch MDM4-Regulator fungieren [99-101].

1.3 Array-basierte Comparative Genomische Hybridisierung (aCGH)

Die Comparative Genomische Hybridisierung wurde 1992 für die Identifizierung von bis dahin unbekanntem Amplifikationsregionen in primären Blasen Tumoren und in Tumorzelllinien entwickelt [102]. Zunächst verwendete man eine einfarbige *in situ* Hybridisierung, stellte aber wenig später fest, dass geringe DNA-Zugewinne oder -Verluste nur unzuverlässig detektiert werden konnten. Mit der Verwendung einer zwei-Farben-Strategie konnte die Methode erheblich verbessert werden [103]. Wesentliche Vorteile der CGH-Analyse gegenüber anderer Detektionstechniken, wie beispielsweise der Fluoreszenz *in*

situ Hybridisierung (FISH), liegen in der Möglichkeit das gesamte Genom in einem Durchgang unter Verwendung zahlreicher DNA-Proben zu überprüfen. Zudem ist das zur Verfügung stehende Material oft limitiert und diese Untersuchungsmethode ermöglicht das Arbeiten mit wenigen Picogramm (pg) DNA aus paraffinisierendem oder gefrorenem Gewebe, so dass auch kleinste Tumorpartikel untersucht werden können. Hierzu wird mittels der sog. „*Degenerative Oligonucleotide-Priming*“-PCR (DOP-PCR) die DNA vor der Markierung und Hybridisierung ohne Sequenzverlust vervielfältigt [104, 105].

Konventionelle CGH-Untersuchungen besitzen eine geringe Ortsauflösung von etwa 10-20 Mb [106], wodurch potentielle strukturelle chromosomale Aberrationen, wie balancierte Chromosomentranslokationen, Inversionen oder Ringchromosomen der Detektion entgehen können. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, entwickelte man in der Gruppe um Prof. Dr. Peter Lichter eine hochauflösende, Mikroarray-basierende CGH-Methode, die zunächst als Matrix-basierte CGH und später als array-basierte CGH (aCGH) bezeichnet wurde [107-109]. Dieses Verfahren ermöglichte nun eine hochauflösende Diskriminierung von Aberrationen zum Teil bis auf das Einzelgen-Niveau. Durch Verwendung dieser Technologie wurden bereits erfolgreich neue Kandidatengene in B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen, Pankreaskarzinomen und Hirntumoren identifiziert [110-113].

Für die aCGH wird normale genomische DNA enzymatisch in kleinere Fragmente geschnitten. Anschließend werden diese Fragmente in, „*bacterial artificial chromosomes*“ (BACs) genannte, Vektoren kloniert. Diese mit genomischen Fragmenten ausgestatteten BAC Klone werden mittels DOP-PCR amplifiziert und durch einen Spotting-Roboter auf Epoxysilan beschichtete Objektträger aufgebracht (Abb. 4).

Die genomische gesamt-DNA der zu untersuchenden Tumore, sowie die gesamt-DNA eines normalen diploiden Kontrollpools werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf dem BAC-Mikroarray ko-hybridisiert. Die Unterschiede in der DNA-Kopien Anzahl werden über die Ausprägung der Fluoreszenzintensität beider Fluorochromfarbstoffe und der daraus resultierenden differentiellen Verhältnisse bestimmt.

Die höhere Sensitivität (durchschnittliche Genom-weite Auflösung von 0,4 Mb) dieser Methode ermöglicht nun das Aufspüren und die Identifizierung neuer tumorrelevanter Kandidatengene.

2 Zielsetzung

Das HCC gilt mit etwa 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr als fünft-häufigstes humanes Malignom mit steigender Inzidenz, vor allem in den westlichen Industrieregionen, wie den USA und Europa, und geht einher mit einer schlechten Prognose für den Patienten. Zu den wichtigsten ätiologischen Faktoren gehören chronische Hepatitis B und C Infektionen sowie chronischer Alkoholabusus und die sogenannte nicht-alkoholische Steatohepatitis, die im Rahmen eines metabolischen Syndroms auftreten kann.

Ziel der Arbeit war es basierend auf genomischen Alterationen Kandidatengene zu identifizieren, die zukünftig einer zielgerichteten Therapie zugänglich sein können.

Mittels hochauflösender array-basierter Comparativer Genomischer Hybridisierung sollten hierfür ätiologie-abhängige und –unabhängige genomische Alterationen in einem ätiologisch definierten und validierten Kollektiv von 63 HCCs charakterisiert und potentielle Kandidatengene eingegrenzt werden. Durch die Identifizierung minimaler Überlappungsregionen sollten Kandidatengene identifiziert und mittels Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene (real-time RT-PCR) und auf Proteinebene (Westernblot, Immunhistologie) validiert werden.

Derart selektionierte Kandidatengene sollten weiterhin funktionell unter Verwendung von geeigneten Standard-HCC-Zelllinien (z.B. Hep3B, HuH-7, HepG2) durch siRNA-vermittelte Inhibierung validiert werden, um so die mögliche Rolle des Gens im Rahmen der Tumorphathogenese zu überprüfen. Unterschiedliche Techniken (Vitalität: MTT-Assay, Apoptose: FACS, Proliferation: BrdU-ELISA, Zellzyklusverteilung: FACS) sollten für die Analyse der funktionellen Auswirkungen dieser Modifikationen herangezogen werden. Hierdurch sollte die protumorigene Effektorfunktion analysiert und die im zellulären Kontext beteiligten Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert werden, um einen Einblick in die protumorigene Wechselwirkung zu erlangen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Biochemikalien

2-Mercaptoethanol (Thioethylene Glycol)	Sigma-Aldrich, München
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
Betaine (Trimethylglycine)	Sigma-Aldrich, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
BSA (Bovine-Serum-Albumin)	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	Applichem, Darmstadt
ChemMate Antibody Diluent S2022	DakoCytomation, Hamburg
Chloroform, pro Analysis	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltes Wasser	Ambion, Austin, USA
Einwegpipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
	Greiner, Nürtingen
	AbImed, Langenfeld
Ethanol, <i>pro analysis</i>	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,5 M, pH 8,0	Applichem, Darmstadt
Eukitt® Quick-Hardening Mounting Medium	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Applichem, Darmstadt
Glycerin (87 % w/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidinisothiocyanat (GITC)	Sigma-Aldrich, München
	Applichem, Darmstadt
<i>Kaisers Glyceringelatine</i>	Merck, Darmstadt
Microcon YM-30 spin-columns	Millipore, Schwalbach
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Normalserum	DakoCytomation, Hamburg
Nutlin-3	Calbiochem/Merck, Darmstadt
PAA (Poly-Acryl-Amid)	Serva, Heidelberg
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1, pH 8,0	Sigma-Aldrich, München
Plastikware Zellkultur	Greiner, Nürtingen
	Falcon, Heidelberg
	Nunc™, Wiesbaden

Target Retrieval Solution, High pH (pH 9,9)
 Tris
 Tween-20
 ultraPure™ RNase/DNase freies Wasser
 Vollentsalztes Wasser für Lösungen
 (Reinstwassersystem Ultra Clear/Integra)
 Zelllysepuffer

TPP, Basel, Schweiz
 DakoCytomation, Hamburg
 Roth, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, München
 Invitrogen, Karlsruhe
 SG Wasseraufbereitung und
 Regenerierstation, Barsbüttel
 Cell Signaling/NE-Biolabs, Frankfurt

3.2 Enzyme

DNaseI
 Enzyme und Puffer und dNTPs
 Proteaseinhibitor
 Proteinase K
 RNasin N2511

Invitrogen, Karlsruhe
 MBI Fermentas, St. Leon-Rot
 Sigma, Deisenhofen
 Invitrogen, Karlsruhe
 Promega, Mannheim

3.3 Kits

Absolut SYBR Green ROX mix
 Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit
 BioPrime DNA-Labeling System
 Blood & Cell Culture DNA Kit
 DAB Peroxidase Substrate Kit
 DNA –Extraktion Puregen/Gentra
 ECL plus Western Blotting Detektionssystem
 EnVision + System HRP mouse/rabbit
 Filme (Western Blotting)

 High Pure PCR Product Purification Kit
 NucleoSpin™ RNA II
 RNA 6000 LabChip Kit
 Streptavidin/Biotin Blocking Kit
 SuperScript™III One-Step RT-PCR, Platinum® Taq
 TaqMan SYBR® Green-Master Mix

ABgene, Epsom, UK
 Applied Biosystem, Darmstadt
 Invitrogen, Karlsruhe
 Qiagen, Hilden
 Vector Laboratories, Burlingame/USA
 Qiagen, Hilden
 Amersham Bioscience, Freiburg
 DakoCytomation, Hamburg
 Kodak, Stuttgart
 Roche, Mannheim
 Roche, Mannheim
 Macherey-Nagel, Düren
 Agilent Technology, Palo Alto/USA
 Vector Laboratories, Burlingame/USA
 Invitrogen, Karlsruhe
 BioRAD, München

Vectastain® ABC Standard Kit	Vector Laboratories, Burlingame/USA
VenorGeM, Mycoplasma-Detektions Kit	Minerva Biolabs, Berlin
Vitalitäts-Test (MTT-Test)	M2128, Sigma, Deisenhofen
Western Lightning-Plus-ECL	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim

3.4 Antikörper

Tab. 2 Erstantikörper

Antigen	Produkt/Hersteller	Ig Klasse	Eingesetzte Verdünnung	
			WB	IHC
β-Aktin	Ab-1/MP Biomedicals, USA	Maus monoklonal	1:10000	
eEF1A2	05-235/Upstate	Maus monoklonal	1:5000- 1:8000	1:1500
HBc	NCL-HBcAg-506/Novocastra	Maus monoklonal		1:10
HBs	1044/341/Novocastra	Maus monoklonal		1:10
M30	2140322/Roche	Maus monoklonal		1:10
MDM2	sc-965/Santa Cruz Biotechnology	Maus monoklonal	1:200	
MDM2	Novocastra	Maus monoklonal		
MDM4	NP-002384/Aviva Sys	Kaninchen polyklonal	1:5000- 1:8000	
MDM4/HdmX- IHC	IHC-00108/Bethyl	Kaninchen polyklonal		1:100
MIB-1 (Ki67)	M7240/Dako	Maus monoklonal		1:75
p21	sc-6246/Santa Cruz Biotechnology	Maus monoklonal	1:200	
p21	BD Pharmingen	Maus monoklonal		1:20
TP53	554293/BD Pharmingen	Maus monoklonal	1:10000	
TP53	M7001/Dako	Maus monoklonal		1:40

Tab. 3 Zweitantikörper

Antigen	Produkt/Hersteller	Ig Klasse	Eingesetzte Verdünnung	
			WB	IHC
anti Kaninchen (HRP-gekoppelt)	#7074/Cell Signaling		1:2500	
anti Maus (HRP-gekoppelt)	#7076/Cell Signaling		1:2500	
anti Kaninchen (Biotin-gekoppelt)	E0432 / Dako	Ziege polyklonal		1:2000
Anti Maus (Biotin-gekoppelt)	E0354 / Dako	Kaninchen polyklonal		1:2000

3.5 Oligonukleotid- und siRNA-Sequenzen

Die Synthese der Primer für die PCR und die semiquantitative „*realtime*“-PCR wurde von der Firma Thermo Electron Corporation (Ulm) durchgeführt. Um eine Kontamination der cDNA durch eventuell enthaltene genomische DNA zu erkennen, wurden, wenn möglich, die Primerpaare übergreifend auf zwei verschiedene Exone gelegt.

Die Berechnung der Schmelzpunkte (TM) und der GC-Gehalte (% GC) erfolgte mit der Software des „*Whitehead Institute for Biomedical Research*“ [114].

Die gelieferte Ausgangskonzentration der Primer betrug 100 µM, in den PCR-Reaktionen wurde eine 10 µM Arbeitsverdünnung eingesetzt. Informationen zu den Primersequenzen sind in Tab. 4 dargestellt.

Die unterschiedlichen siRNA-Sequenzen wurden unter Verwendung des Design-Tools der Firma Dharmacon [115] erstellt. Bis auf die „*nonsense*“-siRNA (Qiagen, Hilden) wurden alle RNAs bei der Firma MWG (Ebersberg) bestellt. Für die Auswahl der doppelsträngigen RNA wurden nachfolgende Kriterien berücksichtigt:

Die Länge betrug 19nt, der GC-Gehalt lag zwischen 30 % und 52 %, nicht mehr als drei aufeinander folgende Basen waren gleich, am 3' -Ende befanden sich zwei überhängende Thymidinbasen und die Genspezifität musste höchstmöglich sein.

Diese Kriterien beruhen auf den von Reynold [116] experimentell ermittelten Parametern.

Tab. 4 Primer- und siRNA-Sequenzen

QRT-PCR	QRT-Primer for 5' - 3'	QRT-Primer rev 5' - 3'
18S Ribosomal RNA	AAACGGCTACCACATCCA AG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
Mouse Double Minute 4 (<i>mdm4</i>) – gesamt	GCTGCTCAGACTCTCGCTCT	GCAGTGTGGGGATATCGTC
Mouse Double Minute 4 (<i>mdm4</i>) – kurz	CAGCAGGTGCGCAAGGTGAA	GCACTTTGCTGTAGTAGCAGTG
Mouse Double Minute 2 (<i>mdm2</i>)	TCTGTGAGTGAGAACAGGTGTCAC	ACACACAGAGCCAGGCTTTC
cDNA-Synthese-Primer-Mix		
Random-Hexamer-Primer	NNNNNN	NNNNNN
beta 2 microglobulin		
beta 2 microglobulin	CACGTCATCCAGCAGAGAAT	TGCTGCTTACATGTCTCGAT
HCV -PCR	Primer for 5' - 3'	Primer rev 5' - 3'
HCV	ATAGTG GTCTGCGGAACCGGTGA	GCCTTTCGCGACCCAACACTACT
HBV-nested PCR	Primer for 5' - 3'	Primer rev 5' - 3'
<i>HBs-1</i> (HBV surface gene)	CCTCACAATACCRCAGAGTCTAGAC	AAGATGAGGCATAGCAGCAGGATG
<i>HBc-1</i> (HBV core gene)	TGGTGTCTTTYGGAGTGTGGATTTCGC	ATCTTCTGCGACGCGGYGATTGAG
<i>HBx-1</i> (HBV X-gene)	ATCCTKCGCGGGACGTCCTTTGT	GACGTGCAGAGGTGAAGCGAAGTGC
<i>HBs-2</i> (HBV surface gene)	GTCTAGACTCTGGGTGGACTTCTCTC	GGCATAGCAGCAGGATGMAGAGGAA
<i>HBc-2</i> (HBV core gene)	TTCGGAGTGTG GATTTCGACTCCT	GAGGCGAGGGAGTTCTTCTTAGG
<i>HBx-2</i> (HBV X-gene)	TACGTCCCGTCGGCGCTGAATCC	GTCCGGCAGATGAGAAGGCACAGAC
TP53 PCR		
<i>tp53-1</i> (Tumor suppressor p53)	AAGTCTAGAGCCACCGTCCA	GGACAGCATCAAATCATCCA
<i>tp53-2</i> (Tumor suppressor p53)	CCCCTCTGAGTCAGGAAACA	AGAATGCAAGAAGCCCAGAC
<i>tp53-3</i> (Tumor suppressor p53)	CCTGGCCCTGTCATCTT	CTCACAACTCCGTCATGTG
<i>tp53-4</i> (Tumor suppressor p53)	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	CCCATGCAGGAAGTGTACAC
<i>tp53-5</i> (Tumor suppressor p53)	TAGTGTGGTGGTGCCTATG	GCAGTGTCTCGTTAGTGCT
<i>tp53-6</i> (Tumor suppressor p53)	GCTTCGAGATGTTCCGAGAG	CAAAGACCCAAAACCCAAAA
siRNAs	Sequenz 5' - 3'	
<i>mdm4</i>	agcaacuauacaccuagaaTT	
<i>mdm2</i>	gauuauaugaugagaagcaTT	
<i>tp53</i>	uguuccgagagcugaaugaTT	
Kontroll-siRNA ("nonsense")	cgauaugagucaacagauTT	

3.6 Zellkulturmedien, Lösungen und Zellkulturzusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden die hier aufgeführten Produkte von der Firma PAA (Cölbe) bezogen.

Produkt	Inhaltsstoffe, Verwendung
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium	mit L-Glutamin Glukose (4,5 g/l), mit L-Glutamin, Kultivierung der HuH-7- und PLC-Zellen
DMSO (AppliChem)	Zusatz zur Kryokonservierung der Zelllinien und Lösungsmittel für Chemikalien
FCS, Fötale Kälberserum	Zusatzstoff für Zellkulturmedien
MEM, Modified Eagle's Medium mit Na ₂ (CO ₃) ₂	mit Eagle's Salt und L-Glutamin, Kultivierung der Hep3B-Zellen
Oligofectamin (Invitrogen)	Kationischer Carrier zum Transfizieren der siRNA
OptiMEM (Gibco)	Medium für die siRNA Transfektion
Penicillin-Streptomycin-Antibiotika-Lösung	10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin, als antibakterieller Zusatz zum Kulturmedium
RPMI, Roswell Park Memorial Institute	mit L-Glutamin, Kultivierung der HepG2-Zellen
Trypsin-EDTA-Lösung	0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA, zum Ablösen und Passagieren der Zellen

3.7 Zelllinien

Vier verschiedene Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet.

Die Zelllinie HepG2 wurde aus dem Hepatoblastom eines 15-jährigen argentinischen Jungen generiert. Die Zelllinie Hep3B entstammt dem HCC-Gewebe eines HBV-positiven Jungen afrikanischer Abstammung. Das Genom der Zellen enthält Teilintegrate des HBV-Genoms, welche jedoch nicht in der Lage sind, infektiöse Viruspartikel zu bilden.

Beide Zelllinien wurden über die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) bezogen (Artikelnummer HepG2: ACC180; Hep3B: ACC93).

Die Zelllinie PLC/PRF/5 wurde aus dem HCC eines 24-jährigen männlichen Mosambikaners entwickelt. Die Zellen sind in der Lage, das Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg) zu produzieren.

Aus dem HCC eines 57 Jahre alten japanischen Mannes wurde die Zelllinie HuH-7 entwickelt. Diese Zelllinie, wie auch die PLC/PRF/5 Zellen wurden von der *Japanese Collection of Research Bioresources* erworben.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die vier Zelllinien HepG2, HuH7, Hep3B und PLC/PRF/5 auf Grund ihres unterschiedlichen *tp53*-Status gewählt, welche in der nachfolgenden Tabelle aufgezeigt sind.

Zelllinie	<i>TP53</i> Mutation
HepG2	Wildtyp
HuH7	Y220C
PLC/PRF/5	R249S
Hep3B	Deletion

3.8 Tumormaterial und Patientendaten

Für die *array-basierte Comparative Genomische Hybridisierung* (aCGH)-Analysen wurden 63 humane HCCs und 4 HCC-Zelllinien (Hep3B, HuH7, PLC/PRF/5 und HepG2) untersucht. Das HCC-Kollektiv beinhaltete 39 Leberresektate und 21 Leberexplantat-Proben. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 57 Jahren (Spanne von 16 bis 78) und das Verhältnis von männlich zu weiblich lag bei 4:1. Eine Bestätigung der Diagnosen erfolgte durch histologische Re-Evaluation. Die Verwendung der Proben für die durchgeführten Untersuchungen wurde von den Ethikkommissionen der Universitäten Heidelberg und Bern genehmigt.

Die klinischen Parameter bezüglich der Größe und Morphologie der Tumore wurden in Tab. 5 aufgelistet.

Die Bestimmung der Ätiologie erfolgte auf der Basis serologischer, histologischer sowie molekularer Gewebsanalysen durch HBV-„*nested*“-PCR (siehe 3.12.8) und HCV-RT-PCR (3.12.6, 3.12.8; Primersequenzen siehe Tab. 4). 14 der untersuchten Tumore wiesen HCV als ätiologischen Faktor auf, je 13 Tumore wurden auf chronischen Alkoholabusus sowie kryptogenen Ursprungs zurückgeführt. 11 HCCs waren HBV-induziert, während drei Tumore mit Hämochromatose assoziiert waren. Weitere vier Tumore konnten mit einer HCV-/HBV-

Co-Infektion und ein Tumor mit einem α 1-Antitrypsin Mangel in Verbindung gebracht werden.

Bei den HCCs mit kryptogenem Ursprung waren bei vier Proben ein Diabetes Mellitus Typ II bekannt, sowie bei weiteren drei ein erhöhter Nüchternblutglucosewert.

Vier Tumore, die in der „nested“-PCR auf HBx-positiv getestet wurden, wurden mangels Informationen zu einer HBV-Infektion aus den ätiologie-abhängigen Analysen herausgenommen.

Tab. 5 Klinische Daten der durch aCGH analysierten HCC-Proben

Gesamtzahl		63
Geschlecht	männlich	50 (79,4 %)
	weiblich	13 (20,6 %)
Medians Alter (Spanne)		57,4 (16-78)
Ätiologie	HBV	11 (17,5 %)
	HCV	14 (22,2 %)
	HBV/HCV	3 (4,8 %)
	Alkohol	14 (22,2 %)
	„Kryptogen“	13 (20,6 %)
	Genetische Hämochromatose (HFE)	3 (4,8 %)
	α 1-Antitrypsin Defizienz	1 (1,6 %)
	Positiv HBx-nested PCR	4 (6,3 %)
Klassifizierung (Grading)	G1 (gut differenzierte HCC)	5 (7,9 %)
	G2 (mittelmäßig differenzierte HCC)	47 (74,9 %)
	G3 (gering differenzierte HCC)	10 (15,9 %)
	G4 (anaplastische HCC)	1 (1,6 %)
Wachstum	Solid-trabekulär	47 (74,6 %)
	Pseudoglandulär	5 (7,9 %)
	Gemischt	11 (17,5 %)
Tumorgroße	< 2,0 cm	2 (3,1 %)
	2,0 – 5,0 cm	33 (52,4 %)
	> 5,0 cm	28 (44,4 %)
UICC Stadium	I	41 (65,1 %)
	II	20 (31,7 %)

	III	0 (0 %)
	IV	2 (3,2 %)
Vaskuläre Invasion	vorhanden	23 (36,5 %)
	keine	40 (63,5%)
Leber Fibrose	Stadium 1	8 (12,7 %)
	Stadium 2	7 (11,1 %)
	Stadium 3	9 (14,3 %)
	Stadium 4	39 (61,9 %)

Für die TP53-Mutationsanalysen wurde auf dieses Fallkollektiv zurückgegriffen. Aufgrund degradierte RNA und den damit verbundenen Schwierigkeiten der cDNA-Synthese sowie der Amplifikation der *tp53*-Genfragmente pro Fall, musste das Kollektiv auf 44 Tumore und vier HCC-Zelllinien (Hep3B, HuH7, PLC/PRF/5 und HepG2) reduziert werden. Die HCCs beinhalteten 25 Leberresektate und 16 Leberexplantat-Proben. Das mediane Alter lag bei 55 Jahren (Bereich zwischen 16 - 78) und das männlich/weiblich Verhältnis war bei 3,4:1. Die Bestimmung der Ätiologie erfolgte wie bereits oben beschrieben. Es wurden 12 HCV-induzierte, neun HBV-induzierte Tumore, sowie sieben auf chronischen Alkoholabusus und 15 auf kryptogenen Ursprung zurückzuführende Tumore untersucht. Ein Tumor entstand auf dem Boden einer genetischen Hämochromatose.

Tab. 6 Klinische Daten der in der *tp53* Mutationsanalyse verwendeten HCC-Proben

Gesamtzahl		44
Medianes Alter		55 Jahre (16-78)
Ätiologie	HBV	9 (20,5 %)
	HCV	12 (27,2 %)
	Alkohol	7 (15,9 %)
	„Kryptogen“	15 (34,1 %)
	Genetische Hämochromatose (HFE)	1 (2,3 %)
Klassifizierung (Grading)	G1	8 (18,2 %)
	G2	27 (61,4 %)
	G3	9 (20,5 %)
UICC Stadium	I	20 (45,5 %)

	II	13 (29,5 %)
	III	8 (18,2 %)
	IV	3 (6,8 %)
Vaskuläre Invasion	vorhanden	16 (36,4%)
	keine	28 (63,6%)

Tab. 7 Klinische Daten des Materials für die Tissue-Micro-Arrays

Gesamtzahl		201
medianes Alter		58 Jahre (17-78)
Geschlecht	männlich	65
	weiblich	21
	unbekannt	1
Ätiologie	HBV	18
	HCV	25
	HBV/HCV	3
	HBV/HDV	1
	HCV/HDV	1
	Alkohol	19
	“Kryptogen”	17
	Genetische Hämochromatose (HFE)	3
Gewebe	Normallebergewebe	27
	peri-tumoröses Gewebe (PT)	87
	HCCs	87
Klassifizierung (Grading)	G1	14
	G2	63
	G3	10
	G4	0
Tumorgröße	< 2,0 cm	8
	2,0 – 5,0 cm	43
	> 5,0 cm	34
Vaskuläre Invasion	vorhanden	31
	keine	56
UICC Stadium	I	37
	II	30

	III	14
	IV	6
T-Stadium	T1	37
	T2	30
	T3	17
	T4	3
N-Stadium	N0	31
	N1	0
	Nx	56
M-Stadium	M0	8
	M1	3
	Mx	76

3.9 Geräte

ABI Prism[®] 7300 Real Time PCR System

ABI-377 DNA Sequencer

Agarosegelelektrophorese System

Agilent 2100 Bioanalyser

CO₂-Inkubatoren (Hera cell 150)

Cryostat 2800 Frigocut E

ELISA-Reader (Multiscan Ascent)

Entwicklermaschine (Optimax Typ TR)

FACS Calibur[™]

FluorChem-Imaging System WB

Geldokumentationssystem (Alpha Imager[™])

Inverses Mikroskop (Axiovert 25)

Lamina Flow (Microflow)

Mahlbecher mit Stahlkugel

Microfuge Micro 200

Mikroskop (Axiphot)

Mikrotom (SM 200R)

Mikrowelle

Nanodrop[®] ND-1000 UV-VIS Spektrophotometer

Applied Biosystems, Darmstadt

Applied Biosystems, Darmstadt

Keutz, Reiskirchen

Agilent Technologies, Böblingen

Heraeus, Hanau

Reichert-Jung, Nussloch

Thermo Electron Corporation, Dreieich

MS Laborgeräte, Heidelberg

BD Bioscience, Heidelberg

Alpha Innotech/Biozym, Oldendorf

Biozym, Oldendorf

Zeiss, Jena

Nunc[™], Wiesbaden

VWR, Darmstadt

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Zeiss, Jena

Leica, Solms

Panasonic, Hamburg

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

PAA-Gelelektrophorese System (SSCP-Gel)	Sigma-Aldrich, München
PAA-Gelelektrophorese System (WesternBlot)	Biozym, Oldendorf
PCR Block (Multi Cycler PTC)	Biozym, Oldendorf
pH Meter (pH 219 Microprocessor pH Meter)	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
pH-Meter (pH 210 Microprocessor pH Meter)	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Retsch Schwingmühle MM200	VWR, Darmstadt
Schüttel-Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Taumelschüttler (Biometra WT17)	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Western Blot Apparatur (LKB Multiphor II)	Pharmacia/Pfizer Pharma, Karlsruhe
Western Blot Apparatur (WetBlot)	Biozym, Oldendorf
Zellkulturzentrifuge Universal R32	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Varifuge 3.0/3.0R	Heraeus / Kendro, Hanau
<i>Swing-Off</i> -Rotors SW41.1	Beckmann, München

3.10 Software

CellQuest Pro™	BD Bioscience, Heidelberg
EndNote X0.2	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA
GenePix Pro 6.0 Microarray Image Analysis Software	Molecular Devices / Axon Instruments, Union City, USA
<i>Modfit</i> Lt™	BD Bioscience, Heidelberg
SPSS 16.0 Software	SPPS, Chicago, IL, USA
TMA Lab	Aperio Technologies, Vista/CA, USA
<i>tp53</i> -Mutationsinformation	http://www-p53.iarc.fr/

3.11 Zellkultur

3.11.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien PLC, Hep3B, HuH7 und HepG2 wurden in Zellkultur-Petrischalen oder Mehrlochplatten kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte stets bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %, sowie gesättigter

Luftfeuchtigkeit. Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die Kultivierung der Zellen in ihrem entsprechenden Medium (siehe 3.6) unter zusätzlicher Verwendung von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung.

Sobald die Zellen einen ca. 80-90 %igen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, erfolgte eine Passagierung. Um die Zellen abzulösen, wurde der Kulturüberstand vollständig entfernt und die Zellen mit einer der Platte angepassten Menge Trypsin/EDTA Lösung überschichtet. Der Chelat-Bildner EDTA ist in der Lage Mg^{2+} -Ionen als Bestandteil der Zellverbindungen zum Untergrund herauszulösen und zu komplexieren, zusätzlich führt die enzymatische Aktivität des Trypsins zum Ablösen der Zellen. Die mit Trypsin/EDTA bedeckten Zellen wurden für etwa 10 min im Brutschrank inkubiert, nachfolgend in ein Gefäß mit dem gleichen Volumen des entsprechenden Mediums überführt und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension konnte nun ein Aliquot (etwa $\frac{1}{8}$ bis $\frac{1}{4}$ beim einfachen Passagieren) entnommen, in ein frisches Kulturgefäß mit neuem Medium überführt und anschließend weiter im Brutschrank inkubiert werden.

Verschiedene Experimente erforderten eine definierte Zellzahl pro Fläche. Hierfür pipettierte man 10 μ l der Zellsuspension in eine Zählkammer nach Neubauer. Aus dem Mittelwert der Zellzahl von vier Großquadraten der Zählkammer multipliziert mit dem Faktor 10^4 konnte die Zellzahl pro Milliliter Suspension ermittelt werden.

$$Zellzahl = \frac{\sum \text{Zellzahl der Eckquadrate}}{4 \cdot 10^4}$$

3.11.2 Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen

Das nach dem Zentrifugieren erhaltene Zellpellet (siehe 3.11.1) einer zu 90 % konfluenten 10 cm Zellkulturschale wurde in 1,8 ml des entsprechenden mit 10 % DMSO versetzten Kulturmediums für die Kryo-Konservierung resuspendiert. Die Suspension wurde zeitnah in ein Kryoröhrchen (Greiner) überführt und eisgekühlt. Im Anschluss wurde der Behälter langsam bis zu -70°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Reaktionsgefäß aus dem Stickstofftank entnommen und zügig auf 37°C erwärmt. Man überführte die

Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtes Medium, um so das zytotoxische DMSO schnellstmöglich zu verdünnen. Nachdem die Suspension zentrifugiert (1000 rpm, 5 min) wurde, konnte der Überstand verworfen und das Pellet wie beschrieben aufgenommen und kultiviert werden (siehe 3.11.1).

3.11.3 Kontaminationsbestimmung

Es erfolgte regelmäßig eine lichtmikroskopische Kontrolle auf Kontamination durch Bakterien und Pilze. Um auch eine Überprüfung auf Mycoplasmen sicher zu stellen, wurden die Zellen in Abständen von drei Monaten unter Verwendung des Mycoplasma-Detektionskits VenorGeM (Minerva Biolabs) auf eine Kontamination hin untersucht. Zum Nachweis wurde der Kulturüberstand auf Mycoplasmen-DNA mittels PCR (siehe 3.10.7.) überprüft. Zur Durchführung des Tests wurden die Vorgaben des Herstellers exakt befolgt, als Polymerase wurde die Taq-Polymerase der Firma SIGMA genutzt.

Bei einer möglichen Kontamination erhielt man ein 265 - 287 bp großes PCR-Produkt. Eine vom Hersteller mitgelieferte interne Kontrolle von 191 bp diente zur Überprüfung der PCR. Als Positivkontrolle wurde die im Kit enthaltene Mycoplasmen-DNA, mit einer Größe von 278 bp, eingesetzt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren Mycoplasmen-negativ.

3.11.4 *small-interfering* RNA-Transfektion

Für die Transfektion mit „*small-interfering*“-RNAs (siRNA) wurde die kationische Trägersubstanz Oligofectamin (Invitrogen) eingesetzt. Die Anlagerung der Kationen an die RNA bewirkt einen Verlust ihres hydrophoben Charakters, wodurch die RNA in die Lage versetzt wird, durch die Zellmembran zu diffundieren.

Abhängig von der notwendigen Zellzahl für nachfolgend anstehende Analysen erfolgte die Transfektion auf 6-Well oder 6 cm Platten (Vitalitätstest 3.14.1, Proliferationstest 3.14.2, FACS-Analyse 3.14.3, Proteinisolierung 3.13.1.1) Für die Transfektion auf 6 cm Maßstab wurde die 1,5 fache Menge der Komponenten verwendet.

Die für Versuche auf 6-Well Kulturschalen benötigte Zellzahl war abhängig von der jeweiligen Zelllinie. So wurden für HepG2 $1,2 \times 10^5$, Hep3B und HuH7 $0,8 \times 10^5$ Zellen pro Well in Antibiotika-freiem Medium ausgesät und bis zum Ende des Versuches kultiviert. Die

Transfektion mit siRNA wurde am folgenden Tag unter Verwendung des nachstehenden Protokolls durchgeführt.

Tab. 8 Pipettierschema der siRNA-Transfektion

Probe		siRNA-Behandlung [μ l]	Oligofectamin- Kontrolle [μ l]	Unbehandelte Kontrolle [μ l]
Lösung A	OptiMEM	55	55	-
	Oligofectamin	5	5	-
Lösung B	OptiMEM	200	-	-
	siRNA [1μ M]	12	-	-
Lösung A und B bei RT für 10 min inkubieren				
Lösung A und B mischen und weitere 15 min bei RT inkubieren				
Lösung A und B	OptiMEM	128	340	400
Transfektionsgemisch in das Kulturmedium pipettieren				

Zu den am Vortag ausgesäten Zellen wurden 2 ml frisches Kulturmedium mit 10 % FCS ohne Antibiotika vorgelegt. Für die Inhibierung wurden zwei separate Reaktionsgefäße angesetzt. In einem wurden 5 μ l Oligofectamin in 55 μ l OptiMEM (Lösung A), in dem anderen 12 μ l einer 1 μ M siRNA in 200 μ l OptiMEM (Lösung B) verdünnt und bei Raumtemperatur (RT) 10 min inkubiert. Bei siRNA-Doppelinhibierungs-Versuchen wurden je 12 μ l der 1 μ M siRNA-1 und siRNA-2 dem OptiMEM zugesetzt. Weitere 15 min Inkubation bei RT erfolgte nach dem Mischen der Lösungen A und B. Nach der Inkubation wurde die Transfektionslösung auf ein Volumen von 400 μ l aufgefüllt, in den Kulturüberstand gegeben und gleichmäßig durch leichtes Schwenken verteilt, im Anschluss kultivierte man die Platten über Nacht im CO₂-Inkubator. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig bei allen Platten gewechselt oder die Zellen für weitere Versuche erneut abgelöst, gezählt und frisch ausgesät (siehe 3.11.1., Vitalitätstest 3.14.1, Proliferationstest 3.14.2, FACS-Analyse 3.14.3, Proteinisolierung 3.13.1.1).

3.11.5 Behandlung mit Inhibitor Nutlin-3

Der „*small molecule inhibitor*“ Nutlin-3 stellt einen kompetitiven Inhibitor der MDM2-TP53-Interaktion dar [117]. Wenngleich die Bindungsdomänen für MDM2 und MDM4 an TP53 partiell überlappen, wird eine effektive MDM4-Inhibition mit Nutlin-3 konformationsbedingt nicht erreicht [118].

Nutlin-3 wurde nach Herstellerangaben in DMSO gelöst und als eine Stocklösung von $c_{\text{Stock}} = 3,44 \text{ mM}$ bei -20 °C gelagert. In Abhängigkeit der nachfolgenden Versuche wurden 6×10^4 HepG2- / HuH7-Zellen pro Well einer 96-Well Kulturschale (Vitalitätstest 3.14.1) bzw. $1,7 \times 10^5$ HepG2- / HuH7-Zellen pro 6 cm Schale (FACS-Analyse 3.14.3, Proteinisolierung 3.13.1.1) ausgesät. Für die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor wurde eine Konzentrationsreihe von $4 \text{ }\mu\text{M}$, $8 \text{ }\mu\text{M}$ und $12 \text{ }\mu\text{M}$ Endkonzentration gewählt. Die Inkubation erfolgte in frischem Kulturmedium mit 10 % FCS ohne Antibiotika für 24 h.

3.12 Nukleinsäure-Techniken

3.12.1 DNA/RNA/Protein – Isolierung aus Gewebe

Erbse große tiefgefrorene Gewebestücke wurden in einer Schüttelmühle (Retsch/VWR) mit Hilfe eines gekühlten Metallzylinders (VWR) und einer Stahlkugel pulverisiert und in 6 ml 4 M Guanidinisothiocyanat (GITC) Lösung gelöst. Die Lysate wurden anschließend bei 2500 rpm für 15 min auf Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände im Anschluss vorsichtig auf 4 ml Cäsiumchlorid-Lösung in ein Beckmann SW41.1.-Polyallomergefäß pipettiert. Danach zentrifugierten die Proben für 16 h bei 32000 rpm (Beschleunigung = 1, Bremsung = 1) und 15 °C in einer Beckmann Ultrazentrifuge unter der Verwendung eines „*Swing-Off*“-Rotors SW41.1 (Beckmann). Am nächsten Tag entfernte man vorsichtig die obere, Lipide enthaltende Phase mit einem sterilen Wattestäbchen. Die nächsten 1,5 ml des Überstandes wurden in Kryo-Röhrchen überführt und zur späteren Aufbereitung der enthaltenen Proteine auf -80 °C tiefgefroren, weitere 2,5 ml Flüssigkeit, Zelltrümmer enthaltend, wurden verworfen. Die DNA-enthaltende Interphase der oberen 5 ml CsCl-Phase wurde in ein separates Gefäß überführt, um durch Proteinase-Verdau und Phenol/Chloroform-Extraktion die DNA zu isolieren, bis dahin erfolgte die Aufbewahrung bei -20 °C . Der verbleibende Rest

CsCl-Lösung wurde entfernt und zur Lufttrocknung des RNA-Pellets mit dem kopfüber stehenden Röhrchen für 15 min auf 4 °C inkubiert. Die pelletierte RNA wurde in 200 µl RNasin-Mix resuspendiert und in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt.

Um die RNA aus der Suspension zu präzipitieren, wurde das Gemisch mit 20 µl 7,5 M Natriumacetat und 500 µl eiskaltem Ethanol (EtOH) 100 % versetzt, gemischt, für mindestens 60 min bei -80 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 14000 rpm 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % RNase-freiem EtOH gewaschen, erneut für 10 min bei 14000 rpm 4 °C zentrifugiert und der Überstand entsorgt. Abschließend trocknete das Pellet an der Luft auf Eis, wurde erneut mit 150 µl RNasin-Mix resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

4M Guanidinisothiocyanat	
GITC	47 % [w/v]
1 M Natriumcitrat pH 7,0	2,5 % [v/v]
2-Mercaptoethanol	20,8 % [v/v]
H ₂ O DNase/RNase-frei	add 100 % [v/v]
pH-Wert mit NaOH oder Zitronensäure auf pH 7,0 einstellen, Lagerung bei -20 °C aliquotiert	

Cäsiumchlorid	
Cäsiumchlorid	5,7 M
3 M Natriumacetat	0,83 % [v/v]
H ₂ O Rnase/Dnase-frei	add 100 % [v/v]
Die Lösung sterilfiltrieren und bei Raumtemperatur lagern	

RNasin-Mix	
RNasin N2511 (40 U / µl)	333 Units/ml
0,1 M DTT (verdünnt in 0,01 M Natriumacetat pH 5,2)	2,7 % [v/v]
DEPC-behandeltes-H ₂ O	add 100 % [v/v]
Lagerung bei -20°C aliquotiert	

3.12.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen

Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80-90 % wurde die Gesamt-RNA der Zellen mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Kits isoliert, dessen Funktion auf einer Säulenaffinitätschromatographie basiert. Für die Durchführung wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Das für die Eluierung verwendete RNase-freie Wasser wurde auch als Referenzwert bei der Konzentrationsbestimmung eingesetzt (siehe 3.12.5)

3.12.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus Paraffingewebe

Zur Isolierung von RNA aus paraffinisierem Gewebe wurden von einem Paraffinblock drei je 7,5 µm dicke Schnitte am Mikrotom abgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zur Entparaffinisierung der Gewebeschnitte wurde zu jeder Probe 500 µl Xylol in das Gefäß hinzugefügt, gevortext, geschüttelt bei 65 °C für 5 min und für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Diesen Vorgang wiederholte man zweimal, nachdem jeweils der Überstand verworfen wurde. Danach wurden die Gewebe dreimal mit EtOH 100 % gewaschen, jeweils bei 13000 rpm für 2 min RT zentrifugiert und nach dem letzten Durchgang 1 h bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Es folgte eine Inkubation über Nacht [119] bei 65 °C mit 200 µl Proteinase-K-Mischung (Proteinase K in Proteinase-K-Puffer 1:40) und anschließendem Enzymstopp bei 95 °C für 10 min.

Nach der Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform-Iso-Amylalkohollösung und 20 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 wurde das Reaktionsgefäß invertiert, 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dieser wurde nun mit 200 µl eiskaltem Iso-Propanol und 2 µl t-RNA (10 mg/ml) bei -20 °C über Nacht inkubiert, wodurch die RNA gefällt wurde. Am folgenden Tag wurden die Proben bei 13000 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun dreimal mit je 500 µl eiskaltem 70 %igem EtOH gewaschen, für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet trocknete kurz bei 37 °C und wurde in 25 µl RT-Puffer mit 1 µl RNase-Inhibitor-Lösung aufgenommen. Abschließend wurde die RNA-Lösung mit 3 µl DNase (10 U/µl) und 1 µl MgCl₂ bei 37 °C für 30 min geschüttelt und durch 3 minütiges Kochen bei 95 °C die Enzymreaktion gestoppt. Weitere 1 µl RNase-Inhibitor wurden nach dem Abkühlen hinzugefügt.

RT-Puffer
50 mM Tris-HCl, pH 7,9
50 mM KCl
5 mM MgCl ₂
1 mM DTT

1 x Proteinase K-Puffer	
1 M Tris / HCl pH 7,8	1 % [v/v]
0,5 M EDTA pH 8,0	1 % [v/v]
5 M NaCl	3 % [v/v]
H ₂ O DNase / RNase frei	add 100 % [v/v]
20 % SDS	2,5 % [v/v]
vor SDS Zugabe Lösung autoklavieren	
Lagerung bei 4 °C, vor Gebrauch auf RT aufwärmen	

3.12.4 Isolierung der Gesamt-DNA

3.12.4.1 Isolierung aus Gewebe nach CsCl-Extraktion

Dem unter 3.12.1 erhaltenen 5 ml DNA-CsCl-Gemisch wurde die 2,5-fache Menge eiskaltes EtOH 100 % zugesetzt, alles sorgfältig vermischt und die Lösung für 30 min bei -80 °C inkubiert. Der bei der anschließenden Zentrifugation von 20 min bei 2500 rpm 4 °C erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml DNase-freiem EtOH 70 % gewaschen und wie vorher zentrifugiert. Dem Pellet wurden nun 5 ml Proteinase K-Puffer und 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugesetzt und die Reaktionsgefäße über Nacht bei 100 rpm und 50 °C geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurde der Proteinase-K-DNA-Mischung je ½ Volumen Phenol bzw. CIA (Chloroform : Iso-Amylalkohol; 25:1) zugesetzt, weitere 20 min bei RT gemischt und für 15 min bei 2500 rpm RT zentrifugiert. In dem Reaktionsgefäß konnte nun die in der oberen wässrigen Phase enthaltene DNA vorsichtig abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt werden. Weitere 5 ml CIA wurden dem 5 ml DNA-Gemisch hinzugegeben, für 10 min bei RT vermischt, um wie vorher beschrieben erneut zentrifugiert zu werden. Die obere

Phase der Lösung wurde in einen frischen Reaktionsbehälter pipettiert, diese mit 1/25 (v/v) 5 M Natriumchlorid-Lösung versetzt, gevortext, die 2,5 -fache Menge eiskaltes EtOH 100 % hinzugefügte und vorsichtig geschüttelt. Die Röhrchen wurden für 2 h bei -20 °C eingefroren und bei 2500 rpm 4 °C 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit kaltem DNase-freiem EtOH 70% gewaschen und wie beschrieben zentrifugiert. Entsprechend der DNA-Menge wurde das trockene DNA-Pellet in 300–500 µl TE-Puffer (10mM Tris/HCl pH 8) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.12.4.2 Isolierung aus Zellen

Für die Isolierung der Gesamt-DNA aus Zellen kam das DNA-Extraktions-Kit (Qiagen) zum Einsatz. Die Herstellerangaben wurden genau befolgt. Für eine 10 cm zu 90 % konfluente Zellkulturschale wurden 300 µl Zelllysepuffer-Proteinase-K-Mix eingesetzt. Zum Resuspendieren des Zellpellets wurden 25 µl der vom Hersteller mitgelieferten „*Hydratations Solution*“ verwendet, welche bei der Konzentrationsbestimmung als Referenz genutzt wurde.

3.12.5 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Für die quantitative Konzentrationsbestimmung der isolierten genomischen DNA sowie der gesamt-RNA erfolgte eine Messung des Absorptionsspektrums unter der Verwendung des NanoDrop® ND-1000 Spektrometer. Als Referenzwert wurden die bei der jeweiligen Isolierung verwendeten Elutions- bzw. Hydratisierungslösungen eingesetzt.

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm, wobei die Scans von 230 bis 400 nm durchgeführt wurde. Zur Reinheitsbestimmung der Nukleinsäure dient der Quotient $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$, welcher für eine gute Qualität ≥ 1.8 betragen soll.

Um die Integrität und Degradation der RNA zu ermitteln, wurden der 2100 BioAnalyzer (Agilent) in der Kombination des RNA 6000 Nano LabChip Kits (Agilent) nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Bei dieser auf dem Prinzip der kapillaren Gelelektrophorese beruhenden Analyse, werden nur kleinste Mengen RNA (25 - 500 ng) benötigt und mit Hilfe eines speziellen Algorithmus die RNA-Qualität durch die „*RNA Integrity Number*“ (RIN) [116] angegeben. Diese spiegelt das relative Maß an Degradation von RIN=1 (stark degradiert,

schlechte Qualität) bis RIN=10 (wenig bis gar nicht degradiert, gute Qualität) wieder. Für die Analysen wurde RNA mit einer RIN ≥ 5 eingesetzt.

3.12.6 c-DNA-Synthese – Reverse Transkription

Um aus RNA c-DNA zu synthetisieren, wurden 1,5 μg der Gesamt-RNA, mit 2 μl dNTPs [0,8 mM] und 1 μl eines Random-Hexamer-Primers [200 ng/ μl] (Sequenz siehe Tab. 4) gemischt. Dieser Mix wurde für 5 min auf 70 °C erhitzt damit die Sekundärstruktur der RNA denaturiert werden konnte. Anschließend wurden 4 μl des 5x Reaktionspuffers dem Reaktionsgemisch zugefügt, für 5 min bei 25 °C inkubiert, um so eine Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Nach Zugabe von 1 μl der reversen Transkriptase RevertAid™ H Minus MuLV [1 U/ μl] erfolgte eine weitere Inkubation von 10 min bei 25 °C und anschließend die c-DNA-Synthese für 1 h bei 42 °C. Die Polymerase wurde abschließend durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min inaktiviert.

Die so erhaltene cDNA wurde als Template sowohl für die Ätiologiebestimmung der Gewebe (HCV-Bestimmung siehe 3.12.8) als auch für die PCR und die semiquantitative „*realtime*“-PCR (3.12.7) verwendet.

Tab. 9 Pipettierschema Reverse Transkription

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
1,5 μg RNA + 2 μl dNTPs + 1 μl Random Primer → 5 min / 70 °C	+ 4 μl M-Mul V Reaktionspuffer → 5 min / 25 °C	+ 1 μl RevertAid™ H Minus MuLV reverse Transkriptase → 10 min / 25 °C → 60 min / 42 °C → 10 min / 70 °C

3.12.7 Semiquantitative „*realtime*“-PCR

Eine gezielte Expressionsanalyse einzelner Gene kann durch die Verwendung der TaqMan®-PCR Technologie im ABI Prism® 7300 durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde überprüft, in welchem Maße die Expression spezieller Gene innerhalb eines Tumor pools reguliert sind. Als endogene Kontrolle (endogK) wurde ein sogenanntes „*housekeeping*“-Gen gewählt,

welches in der Regel keiner maßgeblichen Regulationen unterliegt, in dieser Arbeit entsprach die 18S-RNA diesem Richtwert. Die Amplifikationsrate kann durch die Fluoreszenzintensität der unterschiedlichen PCR Proben bestimmt werden. Für die durchgeführten Analysen wurde der in die doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green eingesetzt. SYBR®Green I ist ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff der in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA mit einer etwa 100 mal höheren Affinität als Ethidiumbromid bindet. Somit ist dieser Farbstoff sehr gut geeignet die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte in der „*realtime*“-PCR (RT-PCR) sichtbar zu machen [120]. SYBR®Green I zeigt in der Gegenwart von doppelsträngiger DNA eine Absorption bei $\lambda = 480$ nm (blau) und eine Emission im grünen Wellenlängenbereich von $\lambda = 520$ nm. Die emittierte Fluoreszenz wird bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt. Die Intensität des erhaltenen Signals lässt sich direkt proportional mit der Zahl der vorhandenen Doppelstränge korrelieren.

Anders als bei sondenbasierenden Systemen steigt bei der Verwendung von SYBR®Green I sowohl das Signal spezifischer als auch unspezifischer Produkte. Aufgrund dessen ist die Auswahl von hochspezifischen Primern eine Grundvoraussetzung dieser Analysen. Zur Überprüfung der Spezifität wird anschließend an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei der Denaturierung und langsamen Abkühlung der PCR-Produkte interkaliert SYBR®Green I und somit kann die unterschiedliche Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit der Schmelztemperatur gemessen werden. Ein spezifisches Produkt ist zu erwarten, wenn ein schmaler, einzelner Fluoreszenzpeak detektiert werden kann.

Für alle Primerpaare wurde die Steigung des logarithmischen Anstiegs mit Korrelationskoeffizienten ermittelt, um Informationen zur PCR-Effizienz zu erhalten. Für die Berechnung der Expressionswerte wurden sowohl die Angaben der Standardkurve als auch der Expressionsdaten eines Gens in Form von Dreifachwerten (Tripletts) herangezogen. Der verwendete Messwert (C_T -Wert) bestimmte die Anzahl von Amplifikationszyklen die bis zum Erreichen einer bestimmten Fluoreszenzintensität (Schwellenwert) notwendig waren.

Die Auswertung erfolgte durch die Berechnung der durchschnittlichen relativen Mengeneinheiten (^{MW}Gen bzw. $^{MW}endogK$ und $^{STABW}Gen$ bzw. $^{STABW}endogK$) aus den Mittelwerten (MW) der zugehörigen Standardkurven und der Standardabweichung (STABW) der C_T -Werte-Triplets. Es erfolgte eine Normalisierung eines jeden Tumors (T) der durchschnittlichen relativen Mengeneinheit der Genexpression gegen die entsprechende relative Mengeneinheit der endogenen Kontrolle. Die Berechnung und Fortpflanzung der Standardabweichung erfolgte gemäß publizierten statistischen Verfahren [121].

$$normalisierter^{MW}Gen_T = \frac{Gen_T^{MW}}{endogK_T^{MW}}$$

$$STABW = \frac{Gen_T^{MW}}{Gen_T^{MW}} \cdot \sqrt{\left(\frac{Gen_T^{STABW}}{Gen_T^{MW}}\right)^2 + \left(\frac{endogK_T^{STABW}}{endogK_T^{MW}}\right)^2}$$

Die normalisierte Genexpression der HCC-Proben wurde dann in Relation zu der normalisierten Expression des gleichen Gens in einem Pool von normalen Lebern (Kalibrator) gesetzt. Durch diese Berechnung erhält man die relative mRNA-Expression eines Gens im Tumorgewebe (T) im Verhältnis zu dem Referenzwert der mRNA-Expression des Kontrollgewebes (R).

$$rel.mRNA\ Expression_x = \frac{Gen_T^{MW}}{endogK_T^{MW}} \cdot \frac{endogK_R^{MW}}{Gen_R^{MW}}$$

$$STABW = \frac{Gen_T^{MW}}{Gen_T^{MW}} \cdot \frac{endogK_R^{MW}}{Gen_R^{MW}} \cdot \sqrt{\left(\frac{Gen_T^{STABW}}{Gen_T^{MW}}\right)^2 + \left(\frac{endogK_T^{STABW}}{endogK_T^{MW}}\right)^2}$$

Um systematische Pipettierfehler und Ungenauigkeiten durch größere Volumina zu minimieren, wurden die cDNAs der Tumorproben („*template*“) zur Amplifikation von Zielgenen 1:20 und zur Amplifikation der endogenen Kontrollen 1:5000 verdünnt.

Pipettierschema [25µl]	
Mastermix (2x)	50 % [v/v]
Primer 1 und Primer 2	300nM
cDNA - „ <i>template</i> “	1/5 des Ansatzes
Verdünnung	
1. Zielgen	1:20
2. Endogene Kontrolle	1:5000

qPCR Programm			Schmelzkurvenanalyse	
Temperatur [°C]	Zeit		Temperatur [°C]	Zeit
50	2 min	} 40x	95	15 sec
95	15 min		60	30 sec
95	15 sec		95	15 sec
60	1 min			

3.12.8 PCR – Polymerasekettenreaktion

Die für die unterschiedlichen Polymerasekettenreaktionen eingesetzten Primerpaar-Sequenzen sind unter 3.5 in Tab. 4 aufgelistet.

Um eine eindeutige Klärung der Tumorätiologie zu erhalten, wurde die genomische TumordNA (siehe 3.12.1) für die HBV- und cDNA (siehe 3.12.6) für die HCV-Bestimmung in einer Polymerasekettenreaktion als Template eingesetzt. Die Überprüfung der Zielgene des HB-Virus (*HBx*, *HBc*, *HBs*) und des HC-Virus erfolgte in einer HBV-„*nested*“-PCR bzw. in einer HCV-PCR wie beschrieben (0) [122].

Außerdem wurde mittels sechs überlappender Primerpaare der *tp53*-Status der Tumorproben unter Verwendung von cDNA (siehe 3.12.6) als Template überprüft.

Als Kontrolle der HBV-PCR dienen Patientenproben, bei denen eine HBV-Vorgeschichte bekannt war. Die Qualität der cDNA für die HCV- und *tp53*-PCR wurde durch die Verwendung einer endogenen Kontrolle (*beta-2-microglobulin*) sichergestellt.

Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer versetzt und in einem 2 %igen Agarosegel (z.B. 2 g Agarose, 100 ml 1x TAE-Laufpuffer und 4 µl Ethidiumbromid) elektrophoretisch aufgetrennt (120V, 30–45 min). Die Dokumentation erfolgte anschließend digital.

Zur Überprüfung der peri-tumorösen Proben auf ihren *tp53*-Status verwendete man das hochsensitive RNeasy-Kit (Invitrogen) für die Nukleinsäureextraktion aus paraffin-eingebettetem, formalin-fixiertem Gewebe. Bei dem Gebrauch des Kits wurden die Protokollvorschriften des Herstellers exakt befolgt (Tab. 10).

Tab. 10 PCR- und RNeasy-Kit-Ansatz

Allgemeiner PCR-Ansatz	
Template (cDNA unverdünnt-1:10) (genomische DNA 1:10)	1 µl
Je Primer [10 µM]	0.4 µl
dNTPs [10 µM]	0.4 µl
DMSO	0,2 – 0,4 µl
Reaktionspuffer 10x	2 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,2 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl
H ₂ O (DNase/RNase frei)	14 – 14,2 µl
Σ	20 µl

Ansatz RNeasy-Kit	
RNA (unverdünnt)	2 µl
H ₂ O (DNase/RNase frei)	8,5 µl
Je Primer [10 µM]	0,5 µl
2x RXN (Reaktionspuffer)	12,5 µl
Taq-Mix SS III Platinum	1 µl
Σ	25 µl

Tab. 11 PCR-Programme

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit	
HBV-PCR I und -PCR II	1.	94 °C	5 min	
	2.	94 °C	1 min	
	3.	58 °C	1 min	
	4.	72 °C	1 min	
	30 Zyklen Schritt 2.- 4.			
	5.	72 °C	5 min	
HCV-PCR	1.	94 °C	5 min	
	2.	94 °C	1 min	
	3.	56 °C	1 min	
	4.	72 °C	1 min	
	30 Zyklen Schritt 2.- 4.			
	5.	72 °C	5 min	
TP53-PCR	1.	94 °C	5 min	
	2.	94 °C	30 sec	
	3.	58 °C, 59 °C bzw. 60 °C	45 sec	
	4.	72 °C	1 min	
	35 Zyklen Schritt 2.- 4.			
	5.	72 °C	10 min	
RNeasy-PCR	1.	55 °C	30 min	
	2.	94 °C	2 min	
	3.	94 °C	15 sec	
	4.	58 °C	45 sec	
	5.	68 °C	1 min	
	44 Zyklen Schritt 3.- 5.			
	6.	68 °C	5 min	

50x TAE- Puffer		5x Ladepuffer Orange G	
Tris-HCl	2 M	Glycerin 100 %	50 % (v/v)
Eisessig	0,0571 % (v/v)	1M EDTA pH 8,0	2 % (v/v)
EDTA (pH 8,0)	50mM	Orange G	1 % (w/v)
1x TAE = 50x TAE 1:50 verdünnt mit H ₂ O		Wasser	add 100 %

3.12.9 SSCP – „*Single-Strand Conformation Polymorphism*” – Gelanalyse

Die „SSCP-Gelanalyse ist eine Methode zum schnellen Mutationscreening von großen Genen. Dabei wird der doppelsträngige DNA-Strang durch kurze hohe Hitze einwirkung in seine beiden Einzelstränge denaturiert. Die so behandelten Proben wurden auf einem Polyacrylamidgel langsam aufgetrennt und die erhaltenen DNA-Banden mittels Silberfärbung hochempfindlich angefärbt [123]. Diese Art des Kandidatenscreenings wurde für die Bestimmung des *tp53*-Mutationsstatus der Tumorproben verwendet, um eine Vorauswahl möglicher Mutationsträger zu erhalten.

Nach der Überprüfung des *tp53*-PCR-Produktes auf einem Agarosegel, wurden 3 µl des PCR-Amplifikats, mit 2 µl Wasser und 5 µl Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 45 °C denaturiert und direkt auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben auf ein 8 %iges Polyacrylamidgel geladen und liefen für mindestens 6 Stunden bei 320 V in 0,5 % TBE-Puffer. Dabei war zu beachten, dass man das Gel vorher bereits für 30 min / 320 V leer laufen ließ, um die richtige Temperatur zu erhalten.

Zum Färben der Gele wurden diese vorsichtig von den Glasplatten abgehoben und mit entmineralisiertem Wasser gespült. Eine vor dem Gießen eingebrachte stabile adhäsive Trägerfolie (Qiagen) verhinderte ein Reißen des Gels. Anschließend inkubierte man das Gel in 10 %iger Essigsäure für 5 min und spülte es danach wieder mit Wasser, um nun für 20 min das Gel in Silbernitratlösung (AgNO_3) 0,1 % zu schwenken. Nachdem man überschüssiges AgNO_3 mit Wasser abgewaschen hatte, versetzte man 500 ml 0,75 M Natriumhydroxidlösung (NaOH) mit 1350 µl Formaldehyd und inkubierte das Gel ca. 30 min bis die DNA-Banden gut zu erkennen waren. Bevor man das Gel für weitere Auswertungen einscannte, wurde es ein weiteres Mal mit Wasser gespült.

Polyacrylamidgel 8%		Ladepuffer		5x TBE-Puffer	
5x TBE	4 ml	0,5 M NaOH	40 µl	Tris	450 mM
Polyacrylamid (AccuGel 29:1 30 %)	10,7 ml	100 mM EDTA	40 µl	Borsäure	440 mM
Glycerin 100 %	4 ml	40 % Glycerin mit Xylencyanol	80 µl	EDTA	10 mM
H ₂ O	add 40 ml			0,5x TBE = 5x TBE 1:10 verdünnt mit H ₂ O	
APS	200µl				
TEMED	25µl				

3.12.10 Array CGH-Microarrays

Ein Set mit ca. 3200 genomischen sequenzgeprüften BAC Fragmente [119, 124] und einer Auflösung der Genomabdeckung von etwa 0,4 Mb, wurde von der „*Mapping Core and Map Finishing2*“-Gruppe des „*Wellcome Trust Sanger Instituts*“ zur Verfügung gestellt. Zusätzlich bezog man 3000 gen- und regionspezifische Genomfragmente vom RZPD (Berlin) und CalTech BAC Libraries (Invitrogen). Die vollständige Liste der auf dem Array aufgebrachten genomischen Fragmente, kann auf GEO („*Gene Expression Omnibus*“ [125]) unter der Plattformnummer GPL5452 aufgerufen werden. Die Chromosomeninformationen basieren auf der „*Ensembl*“- Datenbank.

3.12.10.1 Herstellung von aCGH-Microarrays

Für die Herstellung der genomischen Fragmente wurden Bakterienkulturen in 96-Well Platten bei 37 °C für 14-16 h mit LB Medium und dem adäquatem Antibiotikum gezogen. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation und das erhaltene Bakterienpellet wurde mit einem alkalischen Lysepuffer (Qiagen) aufgeschlossen. Das Lysat wurde auf eine MANU 30 PCR-Product-Purification-Plate (Millipore) transferiert und mittels Zentrifugation aufgereinigt. Die so erhaltene DNA wurde nun mit 1x TE (pH 8,0) gewaschen, in 35 µl 1x TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei 4 °C in 96-Well Platten aufbewahrt. Die DNA-Qualität analysierte man durch Auftragen auf ein 1 %iges Agarosegel. Die sogenannte „*Degenerative Oligonucleotide-Priming*“-PCR (DOP-PCR) wurde mit leichten Modifikationen wie beschrieben [119] durchgeführt. So wurden 10 µl des DOP-PCR Produkts in 10 µl ‚Spotting‘- Puffer (3x SSC, 1,5

M Betain) lyophilisiert und resuspendiert. Mit Hilfe eines Spotting-Roboters (OmniGrid) wurde bei 20 °C und 40 % Luftfeuchtigkeit das DOP-PCR Produkt auf Epoxysilan beschichtete Träger (Nexterion Slide E, Schott AG) aufgebracht (siehe Abb. 4). Nach dem Auftragen wurden die Slides durch UV-Licht vernetzt, für 1 h bei 80 °C gebacken und erneut vernetzt, um ein physikalisches Binden der DNA an das Glas sicherzustellen.

20x SSC - Puffer
3 M NaCl
0,3 M Tri-Natrium-Dihydrat
gelöst in H ₂ O
3x SSC Puffer = 20x SSC 1:6,7 verdünnt mit H ₂ O
2x SSC Puffer = 20x SSC 1:10 verdünnt mit H ₂ O

3.12.10.2 Markierung und Hybridisierung von aCGH-Microarrays

Für aCGH, oder Matrix-CGH [108], wurde genomische DNA aus Tumorgewebe (siehe 3.12.1 und 3.12.4.1) sowie dem Blut gesunder Spender („*Blood and Cell Culture Kit*“) nach Herstellerangaben isoliert. Tumor DNA und geschlechtskompatible Referenz DNA (Gemisch von vier gesunden Individuen) wurden mittels „*Bioprime Labeling Kit*“ unterschiedlich markiert. Die markierte DNA wurde dreimal in Microcon YM-30 (Millipore)-Säulen gewaschen, um die markierter DNA von ungebundenem Farbstoff zu separieren. Jeweils 10-15 µg der markierten Test- und Referenz-DNA sowie 150 µg humaner Cot1-DNA wurden präzipitiert und in 130 µl ULTRAhyb™ Hybridisierungspuffer (Ambion, Austin, USA) resuspendiert.

Die Proben wurden bei 75 °C für 10 min denaturiert und bei 42 °C für 1 h inkubiert, um eine bessere Bindung zu erhalten. Die Hybridisierung erfolgte in einer GeneTAC Hybridization Station (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA) für 36 h bei 37 °C. Die Slides wurden mit 2x SSC / 0.05 % Tween-20 für einen Zyklus bei 37 °C, weitere zwei Zyklen bei 44 °C und zusätzliche drei Zyklen mit 50 % Formamid / 2x SSC / 0,1 % Tween-20 bei 44 °C gewaschen. Nachfolgend trockneten die Slides durch Zentrifugieren bei 54 g für 1 min, mit anschließender Zentrifugation für 1 min bei 216 g.

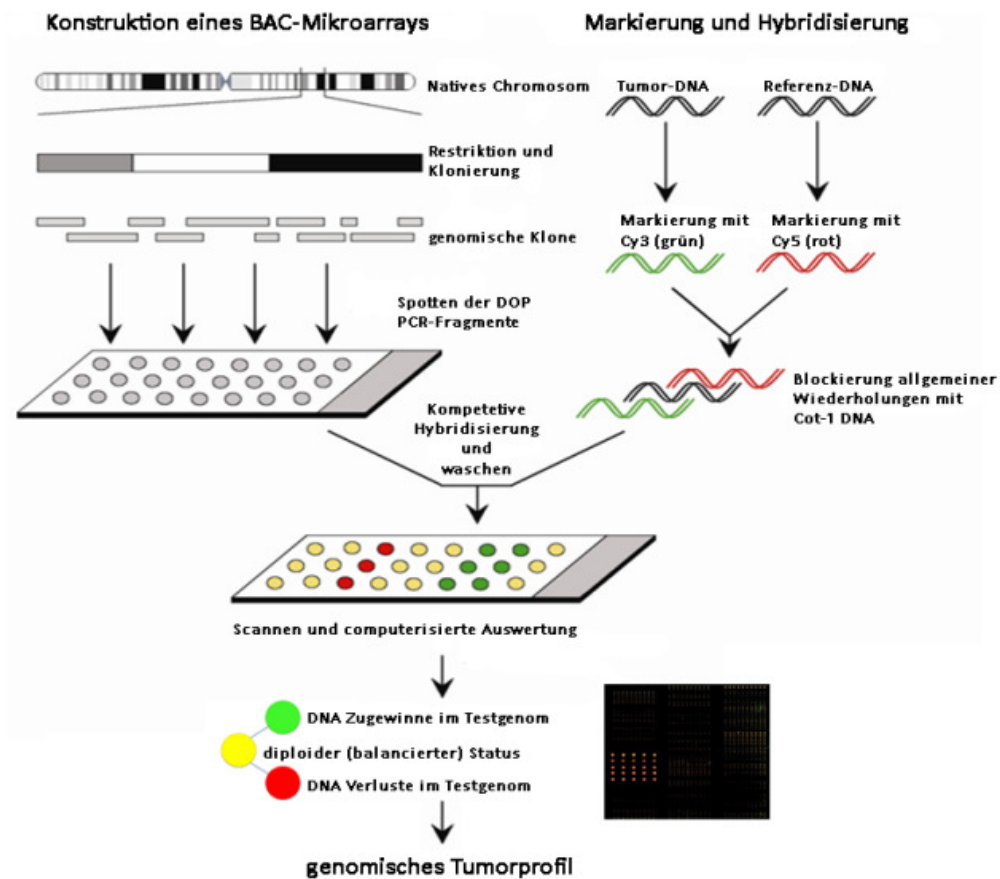


Abb. 4 Schematische Darstellung zum Herstellungs- und Hybridisierungsprozess eines aCGH-Mikroarrays (verändert nach der Dissertation von Christof Schläger, DKFZ, 2007). Oben links: Für die Produktion des Arrays wurde genomische Lymphozyten DNA enzymatisch geschnitten und in „large-insert“-Vektoren (BACs) kloniert. Diese wurden mittels DOP-PCR amplifiziert und auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht. Oben rechts und unten: Gleiche Mengen unterschiedlich markierter Tumor- und Referenz-DNA wurden, nachdem repetitive Sequenzen durch Cot-1-DNA gesättigt waren, auf dem Objektträger hybridisiert, später gewaschen und gescannt. Durch statistische Analysen werden die Fluoreszenzverhältnisse ausgewertet. Dabei wird ein grüner Punkt als Tumor-DNA Zugewinn ($\log_2 \text{ratio}(\text{Cy3}/\text{Cy5}) > 0$) gewertet und ein Verlust durch einen roten Punkt ($\log_2 \text{ratio}(\text{Cy3}/\text{Cy5}) < 0$) auf dem Mikroarray dargestellt. Gelbe Punkte ($\log_2 \text{ratio}(\text{Cy3}/\text{Cy5}) = 0$) repräsentieren einen balancierten Status innerhalb der Tumor DNA.

3.12.10.3 Darstellung und Datenprozessierung von aCGH-Mikroarrays

Die Arrays wurden mit dem Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) gescannt, die erhaltenen Bilder analysierte man mit der GenePix Pro 6.0 Software (Axon Instruments). Die Ergebnisse, welche \log_2 -Ratios der Fluoreszenzintensität enthielten, wurden mit der hierfür entwickelten ChipYard Microarray Analyse Software [126], der statistischen

Programmsprache „R“ und Teilen des „*Bioconductor Projects*“ [127, 128] bearbeitet. Die Daten wurden ständig bezogen auf die Korrelation zwischen Spot-Signal und lokalem Hintergrund ($>3,0$ für aCGH), dem Mittelwert der Spot-Intensität ($<0,3$) und der Spot-Standardabweichung ($< 0,25$). Die Normalisierung erfolgte durch „*Print-Tip-Loess*“ [129]. Für Genexpressionsdaten wurde eine zusätzliche Normalisierung wie unter Yang und Thorne [130] beschrieben durchgeführt.

Die prozessierten Daten und die Erkennung von Zugewinnen und Verlusten wurden für aCGH mittels des GLAD Algorithmus [131] geglättet. Alle aufbereiteten „*Copy Number*“-Ratios wurden diskretisiert und mit -1 für Verluste, 0 für balanciertes Genfragmente und +1 für Zugewinne kodiert. Es wurde für jede Hybridisierung individuell ein Grenzwert für die Zugewinne und Verluste definiert, basierend auf der zweifachen Standardabweichung des log₂ Ratio der balancierten Klone. Unterschiede mit einem log₂-Ratio kleiner -1 wurden als mögliche homozygote Deletion bezeichnet, da der Grenzwert der durchschnittlichen „*Copy Number*“ kleiner eins entsprach. Somit war anzunehmen, dass zumindest eine Zellsubpopulation eine homozygote Deletion aufwies. Waren die log₂-Ratios größer als eins wurde es als Amplifikation gewertet. Für die Signifikanzanalyse der Microarrays (SAM) verwendete man eine Ausführung von SAM für bestimmte Variablen. Hierbei wurden eine auf die Pearson's Chi-Square Statistik basierende Berechnung der Permutation für jeden der BAC-Klone verwendet. Als Signifikanzlevel der aCGH wurde eine „*False Discovery Rate*“ (FDR) von $< 10\%$ in Betracht gezogen [132].

3.12.11 Sequenzierung

Für die Sequenzierungsanalysen wurden die *tp53*-PCR-Produkte mit Hilfe des „*High Pure PCR Product Purification*“, exakt dem Herstellerprotokoll folgend, aufgereinigt. Das Isolat wurde auf einem Agarosegel (siehe 3.12.8) überprüft und die Menge abgeschätzt.

Je nach DNA-Menge wurden 1-5,5 µl mit 0-4,5 µl H₂O (DNase / RNase frei), sowie 0,5 µl des Sequenzier-Primers (10 µM) und 4 µl „*DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kits*“ angesetzt. Anschließend wurde das Gemisch in einer Sequenzierungs-PCR analysiert (Tab. 12).

Tab. 12 PCR-Protokoll DYEnamic-Sequenzierung

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit
DYEnamic-Sequenzierung	1.	95°C	20 sec
	2.	50°C	15 sec
	3.	60°C	1 min
	25 Zyklen Schritt 1.- 3.		
	5.	4°C	∞

Das PCR-Produkt wurde gefällt (Tab. 13). Hierfür versetzte man das PCR-Produkt mit Dextran Blau, 1,5 M Natrium-Acetat mit 250 mM EDTA, Ethanol 95 %, vermischte alles und inkubierte es für 10 min bei RT. Danach zentrifugierte das Gemisch 10 min bei 13000 rpm 4 °C und entfernte den Überstand vollständig. Das Nukleinsäurepellet wurde zweimal mit Ethanol 70 % gewaschen, der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand verworfen. Das Pellet trocknete bei 37 °C und wurde in 4 µl des im DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit enthaltenen Formamid-Ladepuffer aufgenommen.

Die Sequenzieranalyse wurde im ABI-377 DNA Sequencer den Herstellerangaben folgend durchgeführt.

Tab. 13 Zusammenfassung zur Fällung der Sequenzierungs-PCR-Produkte

Fällung der Sequenzierungs-PCR-Produkte	
Sequenzierungs-PCR-Produkt	10 µl
Dextran Blau gelöst in H ₂ O	10 µl
1,5 M Natrium-Acetat mit 250 mM EDTA (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit)	2 µl
95 % Ethanol	80 µl
Mischen Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min Zentrifugation für 15 min, 13000 rpm 4 °C	
70 % Ethanol	150 µl
Zentrifugation für 15 min, 13000 rpm 4 °C	
70 % Ethanol	150 µl
Zentrifugation für 15 min, 13000 rpm 4 °C	

Pellets trocknen	
Formamid-Ladepuffer (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit)	4 µl
15 sec vortexen	
Ladevolumen für ABI-377 DNA Sequencer	1,5 µl

3.13 Proteinanalytik

3.13.1 Isolierung von Gesamtprotein

3.13.1.1 Isolierung aus Zellen

Für die Proteinisolierung wurde von einer ca. 80 % konfluenten Zellkulturschale bzw. von Zellen nach Behandlung mit siRNA (3.11.4) oder Inhibitoren (3.11.5) der Kulturüberstand vollständig entfernt und einmal mit 1x PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Proteinisolierungspuffer bedeckt (100 µl pro 10 cm, 80 µl pro 6 cm bzw. 50 µl pro 6-Well Platte) und für 10 min auf Eis oder -20 °C inkubiert. Das Zelllysat kratzte man mit Hilfe eines ‚Zellschabers‘ von der Platte ab, überführte das Zell-Puffer-Gemisch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und stellte es sofort auf Eis. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurde das Gemisch zweimal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und wieder aufgetaut. Anschließend sonifizierte man das Lysat 3x 30 sec, kühlte zwischen den Intervallen für 1 min, um abschließend die Zelltrümmer durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm zu pelletieren. Der erhaltene Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Proteinisolierungspuffer	
10x Cell Lysis Buffer (Cell Signalling)	$\frac{1}{10}$ des Ansatzes
Protease Inhibitorcocktail (Sigma)	5 % [v/v]
H ₂ O reinst	add 100 % [v/v]

3.13.1.2 Isolierung aus Gewebe nach CsCl-Extraktion

Bei der Isolierung von Proteinen aus Gewebe, erhielt man nach der 16 -stündigen Ultrazentrifugation 1,5 ml eines CsCl-Proteingemisches (3.12.1).

Um die Proteine von der salzhaltigen Lösung zu trennen, wurden sie mit der 10 -fachen Menge eiskalten Acetons (Sigma-Aldrich) versetzt und bei -20 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend zentrifugierte man die Reaktionsgefäße bei 4 °C und 2500 rpm für 10 min, verwarf den Überstand und wiederholte den Vorgang, wenn das Proteinpellet noch nicht eindeutig vom Überstand zu separieren war. Das Pellet wurde mit 2 ml eines Proteinaseinhibitor-1x Lämmli-Puffer Gemisches resuspendiert.

3x Lämmli-Puffer	
SDS 20%	30 % [v/v]
2-Mercaptoethanol	15 % [v/v]
Glycerin 95,5 %	30 % [v/v]
1M Tris	18,75 % [v/v]
H ₂ O reinst	add 100 % [v/v]
1x Lämmli-Puffer = 3x Lämmli-Puffer 1:3 verdünnt	
Proteinpuffer: 1x Lämmli-Puffer versetzt mit 50 ml	
Proteinaseinhibitorcocktail	

3.13.2 Bestimmung der Proteing Gesamtkonzentration

Die Proteinkonzentration der Gewebsproteine wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm im NanoDrop®ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer bestimmt. Bei der Wellenlänge 280 nm liegt, auf Grund der Absorption der aromatischen Reste, das Absorptionsmaximum von Proteinen und daher kann durch die Bestimmung dieses Wertes auf die Proteinkonzentration zurückgeschlossen werden.

Für die Bestimmung der Konzentration von Zellkultur-Proteinen wurden die Proteinextrakte 1:10 und für eine Eichkurve bovines Serumalbumin (BSA A3156, Sigma) in einer Konzentrationsreihe (5, 10, 15, 20 und 25 µg/ml) in Wasser verdünnt. Anschließend versetzte man die wässrigen Proteinlösungen jeweils mit 20 % eines Coomassie-Blau-Reagents (Bradford Reagent B6916, Sigma), inkubierte das Gemisch für etwa 10 min bei Raumtemperatur und vermaß es im Photometer (595 nm). Anhand der BSA-Eichgeradengleichung wurde die Proteinkonzentration der Extrakte berechnet.

3.13.3 Western Blot

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-Proteinextrakte mittels SDS-PAGE erfolgte je nach Größe des zu detektierenden Proteins in einem 10 %igen oder 12 %igen Polyacrylamidgel, das aus Trenn- und Sammelgel bestand (Tab. 14; 52 cm², 15 min bei 50 mA und 1-2 h bei 100 mA). Anschließend wurden die Proteine auf eine für 1 min mit Methanol vorbehandelte PVDF Membran mittels der „WetBlot“-Technik transferiert (Tab. 15; 90 V/52 cm² für 60 min). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsmöglichkeiten erfolgte eine Inkubation der Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 1x TBST mit 2,5 % Milchpulver und 2.5 % BSA auf einem Rollenschüttler, anschließend wurde der Blockierungspuffer entfernt, der entsprechende Erstantikörper in 5 % Milchpulver in 1x TBST respektive 5 % BSA in 1x TBST für p21- und MDM2-Antikörper (Verdünnungen siehe Tab. 2) hinzugefügt und die Membran unter ständiger Bewegung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 5 min mit 1x TBST gewaschen und im Anschluss für eine Stunde mit dem entsprechenden in 1x TBST mit 5 % Milchpulver verdünnten Zweitantikörper inkubiert (Verdünnungen siehe Tab. 3). Nach drei weiteren fünf -minütigen Waschschritten mit 1x TBST im Anschluss erfolgte die Signaldetektion mit dem „ECL plus Western Blotting Detektionssystem“ oder dem „Western Lightning-Plus-ECL Detektionssystem“ jeweils nach Herstellerangaben. Für die Detektion der Fluoreszenzsignale wurde teilweise eine Belichtung von Kodak® Filmen abhängig von der Signalstärke (1 min–45 min) angewendet, wobei die Filme in einem Automaten entwickelt wurden (Optimax). Alternativ verwendete man für einige Detektionen zur Signalaufzeichnung das digitale „FluorChem-Imaging-System“ (Biozym) nach Herstellerangaben.

Für den Nachweis der β -Aktin-Expression als Ladekontrolle erfolgte die Inkubation des Erstantikörpers für 1 h bei RT. Zudem wurde die Signaldetektion mit der selbst angesetzten Signaldetektionslösung AB (Tab. 16; zwei minütige Inkubation bei RT) durchgeführt, welche weniger sensitiv war. Aufgrund der hohen Intensität des β -Aktin-Signals benötigten die Filme nur eine kurze Belichtungszeit (5–30 sec) mit anschließender automatischer Entwicklung.

Tab. 14 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentration

	Trenngel [10 %] Proteine > 80 kD	Trenngel [12 %] Proteine < 80 kD	Sammelgel
Acrylamid-Mix	10 % [v/v]	12 % [v/v]	5 % [v/v]
Tis-HCL	375 mM (pH 8,8)	375 mM (pH 8,8)	127 mM (pH 6,8)
SDS („sodium dodecyl sulfate“)	0.1 % [w/v]	0.1 % [w/v]	0.1 % [w/v]
APS (Ammonium Persulfat)	0.1 % [v/v]	0.1 % [v/v]	0.1 % [v/v]
TEMED	0.05 % [v/v]	0.06 % [v/v]	0.1 % [v/v]
H₂O reinst	add 100 % [v/v]	add 100 % [v/v]	add 100 % [v/v]

Tab. 15 Pufferzusammensetzung für Western Blot Analysen

Laufpuffer (Gelelektrophorese)		Boratpuffer (Blotten)		TBS (10x, pH 7,6)		TBST (1x)	
Glycin	387 mM	Borsäure	450 nM	Tris-HCl	200 mM	TBS (10x)	10 % [v/v]
Tris-HCl	50 mM	EDTA	20 nM	NaCl	1,5 mM	Tween-20	0,1 % [v/v]
SDS	0,2 % [w/v]	mit NaOH einstellen auf pH 8,8					

Tab. 16 Signaldetektionslösung AB

Lösung A		Lösung B	
Tris-HCl (pH 8.0)	98,5 mM	Tris-HCl (pH 8.0)	99,4 mM
Coumarsiure	0.39 mM	H ₂ O ₂	0,018 % [v/v]
Luminol	2,46 mM		

3.13.4 Immunhistochemie an Tissue-Micro-Arrays

Ein 201 Proben beinhaltend (27 Normalleber, 86 nicht-tumoröses Gewebe von HCC-Patienten, sowie 88 HCC-Gewebe) „Tissue-Micro-Array“ (TMA), wurde wie beschrieben [104] hergestellt und an 5 µm Schnitten dieses TMA immunhistochemische Analysen durchgeführt. Hierfür entparaffinierte man die Schnitte mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe, um anschließend die Färbung nach der „ABC-Technik“ oder unter Verwendung des EnVision-Kits durchzuführen. Der Epitopaufschluss erfolgte durch Aufkochen der Paraffinschnitte (600 Watt in der Mikrowelle, 3 x 5 min) in Zitratpuffer (10 mM, pH 6) bzw.

alkalischen Aufschlusspuffer (pH 9, DAKO; MDM2)). Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit 0,3 % H₂O₂ in PBS (ABC-Methode) oder 0,3 % H₂O₂ in Methanol (EnVision) bei 20 min Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurde danach mit Leitungswasser und 1x PBS gewaschen. Für den Nachweis mit dem EnVision Detektionssystem folgte man nun den Angaben des Herstellers. Für die Detektion mit der ABC-Methode wurde das endogene Biotin und das Epitop des Zweitantikörpers durch eine 30 minütige Inkubation in verdünntem Normalserum der Spezies, in welcher der Zweitantikörper generiert wurde (1:10 in 1x PBS mit 5 % Milchpulver) sowie 4 Tropfen Avidin-Lösung blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS erfolgte eine Sättigung der Streptavidinbindung durch eine Inkubation in 1x PBS mit 5 % Milchpulver und 4 Tropfen Biotin-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur.

Die Inkubation des Erstantiköpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper wurden in einem Antikörperverdünnungspuffer (ChemMate Antibody Diluent, DAKO) verdünnt (Verdünnungen siehe 3.4). Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst mit 0,05 % Triton-1x PBS danach mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit einem biotinylierten Zweitantikörper (Verdünnung in 1x PBS mit 2,5 % Milchpulver; siehe 3.4) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1x PBS erfolgte die HRP-Konjugation des Zweitantikörpers durch Behandlung mit einem AB-Komplex (Vectastain® ABC Standard Kit) für 30 min bei RT. Die Signaldetektion wurde nach einem weiteren Waschschrift durch eine Inkubation mit einer Peroxidase-Substrat Lösung (1–20 min, DAB-Substrat-Kit) durchgeführt. Die Farbreaktion für beide Detektionssysteme wurde mit Leitungswasser abgestoppt und es erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun für 15–45 sec. Die Schnitte wurden mit EUKITT (ABC-Methode) oder ‚Kaisers Glyceringelatine‘ (EnVision) eingedeckt.

Die immunhistochemische Färbung wurde gemäß des „*Immunoreactive Score*“ (IRS) ausgewertet [133] (0, fehlende; 1-4, schwache; 5-8, moderate; 9-12, starke Expression). Zur Analyse der Proliferation (MIB-1-Färbung) und der Apoptose (M30-Färbung) wurde der Prozentsatz der positiven Tumorzellen berechnet. Statistische Analysen wurden mittels der

Spearman Korrelation oder des Mann-Whitney U Tests unter Verwendung der SPSS 16.0 Software durchgeführt. Ein p-Value < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

10mM Zitratpuffer pH 6		10x Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,2	
Zitronensäure	1,8 mM	NaCl	1,5 M
Tri-Natrium-Zitrat	8,2 mM	Natriumphosphat	1 M

3.14 Funktionelle Analysen

3.14.1 Bestimmung der Zellvitalität – „MTT-Assay“

Biologisch aktive Zellen haben die Fähigkeit ein Chromophor (modifiziertes Tetrazoliumsalz) mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenase zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff zu reduzieren. Die Farbintensität korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen, wodurch man in der Lage ist, Rückschlüsse auf ihre Vitalität zu erhalten. Die chemische Reduktion des Chromophors kann kolorimetrisch bestimmt werden und dient somit als Maß für die relative Zahl vitaler Zellen.

Um die Zellvitalität zu ermitteln, wurde einen Tag nach der Inhibierung der Probe die Zellzahl bestimmt und jeweils 3000 (Hep3B) bzw. 4000 (HuH7, HepG2) Zellen in 96-Well Platten ausgesät. 72 h nach Inhibierung der Zellen wurde der MTT-Test nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung des Farbumschlages erfolgte bei 570 nm im ELISA Reader Multiscan Ascent. Für die Auswertung bestimmte man prozentual die relative Zellvitalität im Vergleich zu den Kontrollzellen.

3.14.2 Bestimmung der Proliferation – „BrdU-ELISA“

Zur Bestimmung der Proliferationsrate zählte man am Tag 2 nach Inhibierung die Zellen und säte 4000 (Hep3B) bzw. 6000 (HepG2) Zellen auf einer 96-Well Platte aus. Am nächsten Tag inkubierte man die Zellen je nach Konfluenz 2-4 Stunden in 10 µM BrdU enthaltendem Medium. In den proliferierenden Zellen wird in diesem Assay statt des Thymidins das Brom markierte Basenanalogen dUracil eingebaut, welches durch eine Enzym-gekoppelte Färbung und dessen Farbumschlag messbar gemacht werden kann. Die Angaben des Herstellers bezüglich des Protokolls wurden befolgt. Die Messung wurde bei 450 nm

(Referenzwellenlänge 630 nm) im ELISA Reader Multiscan Ascent durchgeführt. Für die Auswertung der Messung wurde, wie beim MTT-Test, die relative Proliferationsrate prozentual im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt.

3.14.3 Bestimmung der Apoptoserate – „FACS-Analyse“

Zur Bestimmung der Apoptoserate und einer Übersicht des Zellzyklusses wurden die Zellen in der FACS-Analyse untersucht. Die Untersuchung der einzelnen Proben erfolgte dreimal jeweils mit Probentriplets.

Nach Beendigung der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen trypsiniert, mit dem Zellkulturüberstand vereinigt und bei 800 rpm für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, 200 µl der Zellsuspension mit 500 µl Nicoletti-Puffer gemischt und so mit dem enthaltenen Propidiumiodid (PI) gefärbt. Im FACS-Calibur wurden jeweils 10000 Zellen pro Probe hinsichtlich der Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität gemessen. Propidiumiodid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der sich jedoch sterisch bedingt nur mit einem gewissen Basenpaarabstand in die DNA einlagern kann, was zu einer gesteigerten Interkalationrate bei zunehmender DNA Degradation führt. Somit nutzt man die Fluoreszenzintensität nicht nur als Marker für die DNA-Menge sondern auch für den Degradationszustand der DNA. Die Menge der DNA gibt Aufschluss über die Zellzyklusphase der jeweiligen Zelle, über das Ausmaß der Degradation erfolgen Rückschlüsse auf frühe, mittlere und späte Apoptose. Je geringer die Fluoreszenz, desto degradiert die DNA und umso weiter fortgeschritten ist die Apoptose.

Die Apoptoseanalyse wurde durch logarithmisches Auftragen der Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität im Acquisitionsprogramm CellQuest Pro™ (BD-Bioscience) durchgeführt. Das Programm „Modfit Lt™“ (BD-Bioscience) wurde für die Analyse des Zellzyklus, in dem die Auftragung der graphischen Darstellung linear erfolgte, verwendet.

In von der Software erstellten Histogrammen wurde die Größe der DNA-Fragmente (X-Achse) gegen die Anzahl der Zellen (Y-Achse) aufgetragen. Während lebende Zellen einen charakteristischen G₀/G₁- und G₂/M-Peak zeigen, ist die fragmentierte und damit kürzere DNA der apoptotischen Zellen links neben dem Peak der G₀/G₁-Phase zu sehen. In der logarithmischen Darstellung befinden sich in den ersten drei Dekaden apoptotische Zellen,

wobei in der dritten Dekade Zellen der frühen Apoptose, in der zweiten Dekade Zellen mittlerer Apoptose und in der ersten Dekade die Zellen der späten Apoptose bzw. in nekrotischem Zustand dargestellt werden.

Nicolettipuffer	
Propidium-Iodid	50 mg/ml
Natrium-Citrat	0,1 % [w/v]
Triton-X-100	0,1 % [v/v]

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Virusätiologie im HCC-Kollektiv

Da nicht zu allen HCCs unseres Kollektivs ausreichende klinische Informationen bezüglich der Ätiologie vorhanden waren, wurde zusätzlich zur immunhistologischen Bestimmung mit Hilfe der zu Beginn isolierten Tumor-DNA und -RNA die Virusätiologie (HBV und HCV) mittels PCR und RT-PCR bestimmt.

Für die HBV-Analyse wurden die HBV-Gene HBx, HBc und HBs mittels einer „nested“-PCR analysiert. Für die HCV Ätiologiebestimmung wurde mittels RT-PCR, wenn vorhanden, die HCV-RNA nachgewiesen. So konnten 11 Fälle mit einer HBV-Infektion, 14 Fälle mit einer HCV-Infektion und drei Fälle mit einer Doppelinfection HBV/HCV in Verbindung gebracht werden. Vier HCCs ohne vorher bekannte HBV-Infektion waren nur in der HBx-„nested“-PCR positiv und wurden deshalb als virales Integrat bei Zustand nach „ausgeheilte“ Hepatitis B gewertet.

14 Fälle mit klinisch bekanntem Alkoholmissbrauch wurden bei negativer Serologie als ‚alkohol-assoziiert‘ eingeordnet. Für drei HCCs war eine genetische Hämochromatose (HFE) und für einen Tumor eine α 1-Antitrypsin Mangel bekannt. War weder nach anamnestischen, serologischen, histologischen noch nach molekularen Untersuchungen erklärbar, welcher Ätiologie (HBV, HCV, alkoholisch induziert, spezifische Stoffwechselerkrankung) die Tumore zugeordnet werden konnten, wurden sie als ‚kryptogen‘ bewertet. Im untersuchten Kollektiv waren dies 13 HCCs. Die Tab. 17 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Verteilung der Ätiologien im Kollektiv.

Alle Informationen bezüglich Tumorgröße, morphologischen Charakteristika der Tumore und Ätiologie sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 17 Zusammenfassung Ätiologie des HCCs Kollektivs

Gesamtzahl		63
Ätiologie	HBV	11 (17,5 %)
	HCV	14 (22,2 %)
	HBV/HCV	3 (4,8 %)
	Alkohol	14 (22,2 %)
	“Kryptogen”	13 (20,6 %)
	Genetische Hämochromatose (HFE)	3 (4,8 %)
	α 1-Antitrypsin Mangel	1 (1,6 %)
	Integrat bei Z.n. HBV	4 (6,3 %)

4.2 Analyse chromosomaler Alterationen im HCC

Die Tumor-DNA unseres HCC-Kollektivs wurde auf ihre chromosomalen Alterationen hin untersucht. Die Analysen der 63 HCCs und vier HCC-Zelllinien erfolgten mittels einer BAC array-basierten Comparativen Genomischen Hybridisierung und wurden, ebenso wie die angeschlossene bio-informatische Auswertung, von Dr. rer. nat. Christof Schläger im DKFZ, Heidelberg, durchgeführt.

In diesen Untersuchungen konnten verschiedene rekurrente chromosomale Alterationen im humanen HCC detektiert werden (Abb. 5). So zeigten sich gehäuft auf den Chromosomen 1q (70,6 %), 6p (41,2 %), 8q (48,5 %), 17q (30,9 %), 19p (30,9 %) und 20q (42,6 %) DNA Zugewinne, während auf den Chromosomen 1p (30,9 %), 4q (45,6 %), 8p (51,5 %), 13q (35,3 %), 16q (30,9 %) und 17p (36,8 %) Verluste ermittelt wurden. Im Gegensatz zu bisherigen konventionellen CGH-Analysen konnten 36 Loci mit kleinen chromosomalen Zugewinnen, z.B. auf 1q23.2-23.3, 8q24.23-24.3, 11q13.2, 11q13.3 oder 14q12, oder möglichen homozygoten Deletionen, wie auf 8p.23.1 bzw. 12p13.33, identifiziert werden. Unter anderem wurde auch ein einzelnes bislang nicht im humanen HCC beschriebenes Amplikon auf 1q32.1 ermittelt, das eine Region von 350 kb umspannte und von drei BAC Klonen detektiert wurde. Dieser Locus kodiert auch für das in dieser Arbeit näher charakterisierte Onkogen *mdm4* (Abb. 6A).

Durch die Eingrenzung sogenannter minimal überlappender Regionen aus dem Gesamtdatensatz aller Fälle war es möglich, den Bereich des chromosomalen Zugewinns von 20q13 auf eine 2,5 Mb große Region und damit auf den Teilbereich 20q13.33 einzugrenzen. Diese Region beinhaltet n.a. das potentielle Onkogen *eef1a2* (Abb. 6B).

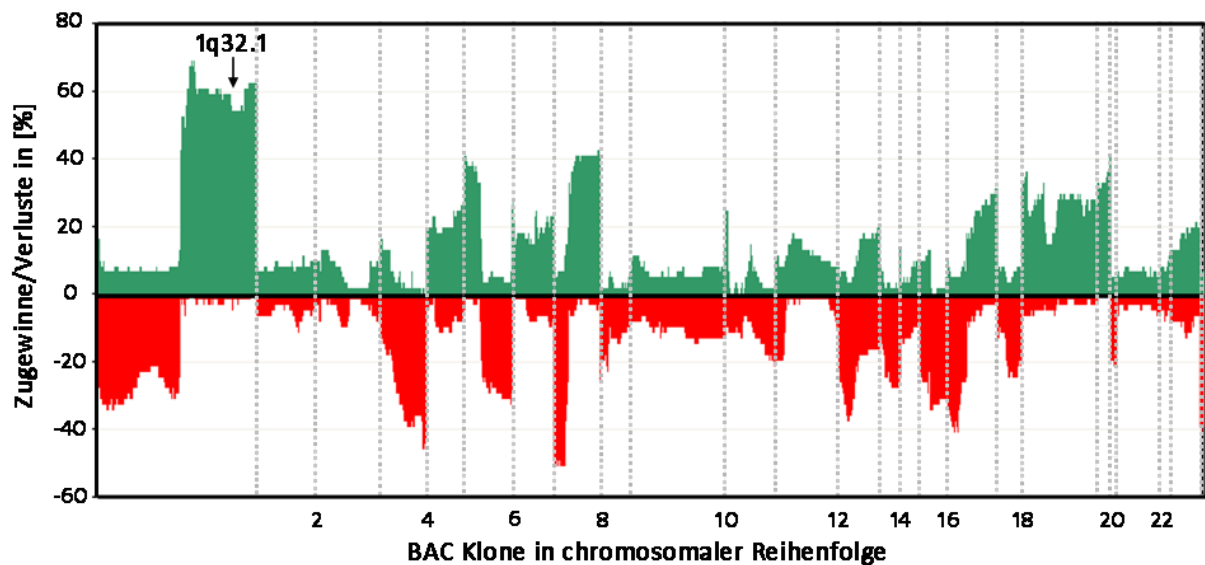


Abb. 5 Häufigkeitsverteilung der chromosomalen Alterationen im untersuchten Kollektiv von 63 HCCs und vier HCC-Zelllinien. Die BAC-Klone sind auf der x-Achse in chromosomaler Reihenfolge angeordnet. Chromosomengrenzen wurden durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Häufigkeit der Alterationen ist auf der Ordinate wiedergegeben. Die durch einen Pfeil hervorgehobene Region, wurde in dieser Arbeit näher untersucht. (In Kooperation mit der AG Prof. Dr. Lichter, DKFZ Heidelberg)

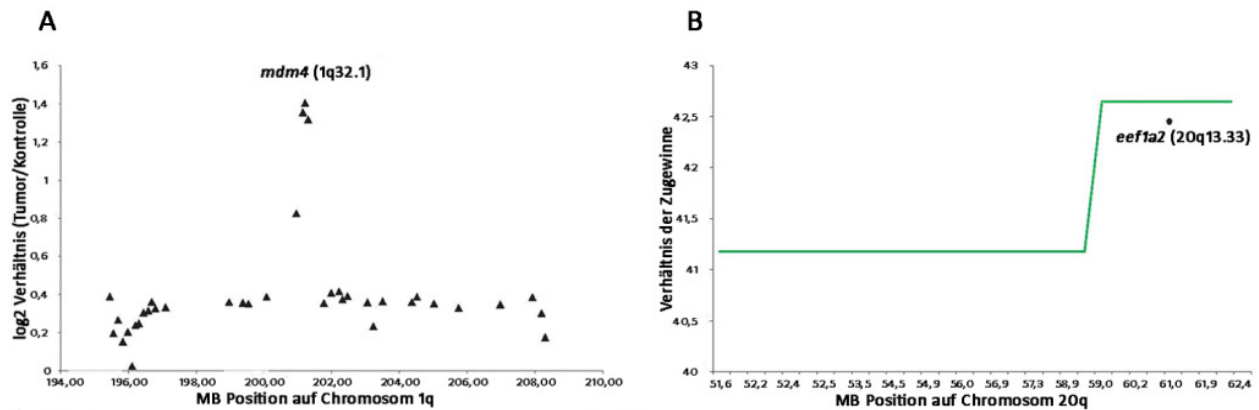


Abb. 6 Detaillierte Darstellung der veränderten Regionen auf 1q und 20q, sowie die Identifizierung der im HCC relevanten Kandidatengen. (A) In diesem HCC ist die Amplifikation des 1q32.1 Locus durch drei BAC Klone abgedeckt und enthält das Gen *mdm4*. (B) Darstellung der Häufigkeit von DNA-Kopie Zugewinnen auf Chromosom 20q im Gesamtkollektiv. Der Genlocus von *eef1a2* wird durch den schwarzen Punkt markiert. (In Kooperation mit der AG Prof. Dr. Lichter, DKFZ)

Ein Abgleich der aCGH-Daten mit den vier ätiologischer Gruppen: HCV-, HBV-, alkohol-assoziierten sowie sog. kryptogenen HCCs, konnte ätiologie-abhängige aber auch -unabhängige Alteration aufzeigen. Die Hauptunterschiede in der Häufigkeit der Zugewinne detektierte man zwischen HBV- und HCV-assoziierten HCCs auf 1q32.1, 7q22.1 und 10q26.3-qter, während die Verluste auf 4q34.3-qter, 9p24.3 und 14q21.2-32.33 zu beobachten waren. HCCs eines kryptogenen Hintergrunds oder einer alkoholischen Zirrhose zeichneten sich durch Unterschiede in den Zugewinnen auf 1q31.1, 8q11.21, 8q24.12-21 und 10q26.2 sowie den Verlusten auf 13q14.13-q14.3, 17p11.2, 18q21.1-21.32, 22q12.3 und 22q13.2-13.31 aus. In Tab. 18 sind alle Regionen aufgeführt, die einen Häufigkeitsunterschied von mindestens 30 % zwischen zwei Ätiologiegruppen aufwiesen.

Tab. 18 Gegenüberstellung der ätiologie-abhängigen chromosomalen Alterationen in den untersuchten HCCs. Die Gruppe mit der jeweils höchsten Alterationsfrequenz ist durch Fettschrift hervorgehoben.

Region	Alteration	HBV	HCV
1q32.1	Zugewinn	15,4 %	57,1 %
7q22.1	Zugewinn	0,0 %	42,9 %
10q26.3-qter	Zugewinn	7,7 %	50,0 %
4q34.3-qter	Verlust	76,9 %	28,6 %

9p24.3	Verlust	69,2 %	21,4 %
14q21.2-32.33	Verlust	38,5 %	0,0 %
Region	Alteration	Alkohol	Kryptogen
1q31.1	Zugewinn	69,2 %	30,8 %
8q11.21	Zugewinn	53,8 %	7,7 %
8q24.12-21	Zugewinn	76,9 %	0,0 %
10q26.2	Zugewinn	46,2 %	7,7 %
13q14.13-q14.3	Verlust	21,3 %	61,5 %
17p11.2	Verlust	15,4 %	53,8 %
18q21.1-21.32	Verlust	7,7 %	53,8 %
22q12.3	Verlust	0,0 %	38,5 %
22q13.2-13.31	Verlust	0,0 %	38,5 %

Während für den Bereich um 8q24.12-21, durch den das proto-Onkogen *c-myc* kodiert wird, in alkoholischen HCCs ein Zugewinn in ca. 77 % der Fälle detektiert wurde, war in allen untersuchten kryptogenen HCCs diese Region balanciert. Expressionsanalysen bestätigten die ätiologie-abhängige Überexpression von *c-MYC* in alkohol-induzierten HCCs, während kryptogene HCCs eine geringere *c-myc*-Expression aufwiesen als normale Leber.

Im Bereich um 1q32.1, Kodierungsregion des Onkogens *mdm4*, wurde in 57,1 % der HCV-assoziierten HCCs ein Zugewinn nachgewiesen, dagegen wiesen nur ca. 15 % der HBV-assoziierten HCCs einen chromosomalen Zugewinn auf. Die oben beschriebenen chromosomalen Zugewinne auf 20q13.33 waren dagegen ätiologie-unabhängig.

4.3 Expression des Proteins MDM4 im hepatozellulären Karzinom

Aufgrund der aCGH-Daten wurde MDM4 auf 1q.32.1 als HCC relevantes Kandidatengen in Betracht gezogen. In einer Western Blot Analyse wurde die Expression von MDM4 in 33 humanen HCCs analysiert. Es zeigte sich, dass in 75 % der HCC-Gewebe (18/24) ein erhöhter Proteinlevel gegenüber normaler Leber detektiert werden konnte (Abb. 7). Jedoch wurde anders als in der aCGH kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Ätiologien

nachgewiesen. Eine MDM4-Überexpression konnte in 83 % (5/6) der kryptogenen HCCs nachgewiesen werden, während 100 % (6/6) der alkohol-assoziierten Tumore einen Anstieg der MDM4-Expression aufwiesen. In 67 % (4/6) der Karzinome mit HCV und in 50 % (3/6) der HCCs mit HBV Assoziation zeigte sich eine Hochregulation des MDM4-Proteins.

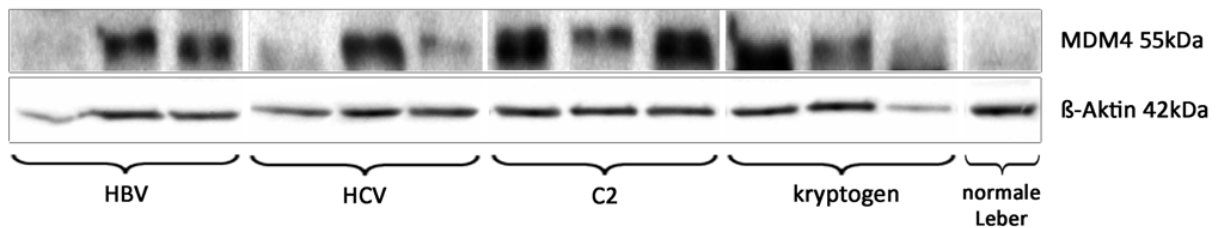


Abb. 7 Darstellung der Überexpression von MDM4-Proteinen im HCC. Gezeigt ist eine exemplarische Western Blot Analyse von HCCs unterschiedlicher Ätiologie und einer Normalleber.

4.4 Funktionelle Analysen

Für MDM4 sind verschiedene Splicevarianten in humanen Tumoren beschrieben [95, 134]. In unseren Untersuchungen *in vivo* war es möglich für MDM4 bis zu vier unterschiedliche Isoformen zwischen 45 und 55 kDa zu detektieren.

Alle siRNA-vermittelten Experimente wurden in den HCC-Zelllinien HepG2 (*tp53*-Wildtyp (HepG2_{*tp53*WT})), HuH7 (*tp53*-mutiert (HuH7_{*tp53*mut})) und Hep3B (homozygote *tp53*-Deletion (Hep3B_{*tp53*del})) durchgeführt.

4.4.1 siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4

Für die Transfektion mit siRNA wurden unterschiedliche Methoden beschrieben. Das hier verwendete Protokoll (3.11.4) stellt eine Weiterentwicklung des Protokolls der Firma Invitrogen sowie der Arbeitsgruppe Tuschl dar [135], das in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde. Zur Inhibierung des *mdm4*-Gens wurden drei siRNAs konstruiert und in einer Verdünnungsreihe in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die siRNA mit der jeweils besten Inhibierungseffizienz in einer Endkonzentration von 5 nM wurde für weitere Experimente gewählt.

Zum Ausschluss unspezifischer Effekte wurden in allen Behandlungen Kontrollen in Form von sogenannten „nonsense“-siRNAs (ctrl-siRNA), dem Transfektionsreagenz Oligofectamin

sowie reinem Medium mitgeführt. In den Darstellungen der funktionellen Analysen wurde gegen die Kontroll-siRNA normalisiert. 72h nach der genspezifischen siRNA Transfektion wurden die Gesamtproteinfraktionen isoliert und die Inhibierungseffizienz mittels Western Blot Analyse validiert.

Um zu überprüfen, ob auftretende Effekte TP53-abhängig oder -unabhängig waren, wurde für die MDM4-spezifische siRNA-vermittelte Inhibierung drei HCC-Zelllinien mit unterschiedlichem *tp53*-Status (HepG2_{*tp53*WT}, HuH7_{*tp53*mut}, Hep3B_{*tp53*del}) ausgewählt. Wie in der Abb. 8 dargestellt ist, konnte mit der gewählten siRNA siMDM4 in allen drei Zelllinien eine effiziente Reduktion der Proteinexpression des MDM4 gegenüber der Kontrolle mit „nonsense“-siRNA (ctrl-5 nM) und den nur mit Medium behandelten Zellen (unbehandelt) erreicht werden.



Abb. 8 Spezifische siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4 in den Zelllinien HepG2, HuH7 und Hep3B. Dargestellt ist die Proteinexpression des MDM4 nach Inhibierung (siMDM4) und in den mitgeführten Kontrollen (ctrl-5nM und unbehandelt).

4.4.2 Effekte der MDM4-siRNA Inhibierung auf Zellvitalität, Proliferation und Apoptose

Nachdem die MDM4-Inhibierung durch siRNA auf Proteinebene bestätigt werden konnte, wurde die Veränderung der Zellvitalität der HepG2-, HuH7- und Hep3B-Zellen mittels MTT-Test untersucht. Nach der Inhibierung von MDM4 wurde in HepG2-Zellen eine signifikante Reduktion der Zellvitalität um 45 % ($0,55 \pm 0,01$; $p < 0,001$) im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen detektiert. Während HuH7-Zellen keine Vitalitätsänderung nach Inhibierung zeigten ($0,98 \pm 0,03$; $p > 0,05$), wiesen Hep3B-Zellen eine Vitalitätsreduktion um 59 % ($0,41 \pm 0,05$; $p < 0,001$; Abb. 9A) auf.

Da es der MTT-Assay nicht ermöglicht die Ursache der veränderten Vitalität (z.B. Proliferationsreduktion oder Apoptoseinduktion) zu unterscheiden, wurde die siRNA-induzierte Apoptoserate mittels FACS-Analyse in den HCC-Zelllinien bestimmt (Abb. 9B). Die Ergebnisse der Analyse wiesen darauf hin, dass die Vitalitätsreduktion der HepG2- und Hep3B-Zellen mit einer signifikanten Apoptoseinduktion assoziiert war (2,9-fach \pm 0,15 respektive 2,3 \pm 0,14; $p < 0,001$). In HuH7-Zellen dagegen ließ sich eine geringe Reduktion der Apoptoserate ($0,9 \pm 0,1$; $p > 0,05$) feststellen.

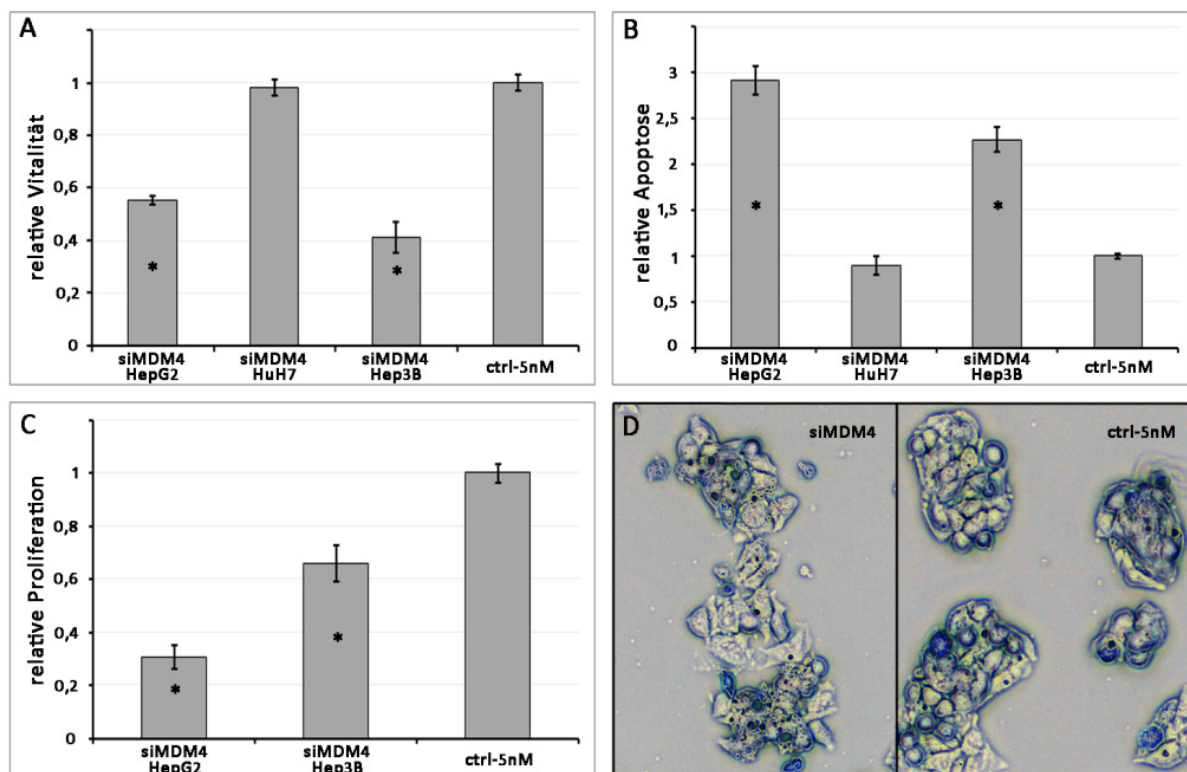


Abb. 9 Funktionelle Untersuchung nach siRNA-vermittelter Inhibierung von MDM4 in HepG2-, HuH7- und Hep3B-Zellen. (A) MTT-Zellvitalitätsassay unter Verwendung der genspezifischen siRNA gegen MDM4 (siMDM4), sowie Kontroll-siRNAs 5nM (ctrl 5nM). Signifikanzen wurden durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,001$) (B) Apoptose Analysen mittels FACS nach MDM4-siRNA Inhibierung (C) Proliferationsanalyse nach genspezifischer siRNA-Inhibierung (D) Darstellung von HepG2-Zellen nach MDM4-spezifischer siRNA-Behandlung (links) und nach Behandlung mit der Kontroll-siRNA (rechts); Vergrößerung 1:10

Zusätzlich wurden HepG2- und Hep3B-Zellen nach siRNA-Inhibierung mittels eines BrdU-ELISAs hinsichtlich Effekten auf die Proliferation untersucht. Die Inhibierung in HepG2 Zellen resultierte in einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate um 69 % ($0,3 \pm 0,04$, $p < 0,001$). Auch in Hep3B-Zellen in denen eine Vitalitätsreduktion und ein Anstieg der

Apoptoserate nachgewiesen wurde, reduzierte sich die Proliferation um 34 % ($0,66 \pm 0,07$, $p < 0,001$; Abb. 9C).

4.5 Untersuchung des komplexen MDM4-TP53-MDM2-Regulationsnetzwerks *in vitro*

MDM4-Überexpression wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben und spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in der Inhibierung der transkriptionellen Aktivierungsfunktion von TP53 durch Bindung der N-terminalen Transaktivierungsdomäne *in vitro* [136]. Da MDM4 vielleicht sogar einen bedeutenderen TP53 Inhibitor darstellt als MDM2, sollte mit den nachfolgenden Experimenten der regulatorische Zusammenhang des MDM4-TP53-MDM2 Netzwerkes im HCC untersucht werden.

Für ein genaueres Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen nach Doppelinhibierungen wurde die *tp53*-Wildtypzelllinie HepG2 und die *tp53*-mutierte Zelllinie HuH7 (Y220C) näher analysiert. Die *tp53*-deletierte HCC-Zelllinie Hep3B wurde für diese Experimente nicht verwendet. Durch die Doppelinhibierung mit *tp53*-siRNA wurde überprüft, ob die beobachteten Effekte *tp53*-abhängig oder -unabhängig waren. Da die genspezifische Einzelinhibierung von MDM4 in den *tp53*_{WT} Zellen HepG2 einen Effekt auf die Zellvitalität, die Proliferation und Apoptose der Tumorzellen zeigte, wurde überprüft, ob eine simultane siRNA vermittelte Inhibierung der TP53-Regulatoren MDM4 und MDM2 den vorher beobachteten Effekt potenzieren würde.

4.5.1 siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4, MDM2 und TP53

Sowohl für MDM4 als auch für MDM2 sind verschiedene Splicevarianten in humanen Tumoren beschrieben [95, 134]. Das MDM2-Volllängenprotein (90 kDa) ließ sich nur in humanen HCCs und in Nutlin-3-behandelten Zelllinien (3.11.5) nachweisen. Eine Isoform mit einem Molekulargewicht von 35 kDa war in allen *in vitro*-Experimenten und einigen humanen HCCs nachweisbar.

Wie für die Etablierung der MDM4-spezifischen siRNA, wurden auch für MDM2 zwei siRNAs konstruiert und in einer Verdünnungsreihe in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

Die siRNA mit der besten Inhibierungseffizienz in einer Endkonzentration von 5 nM wurde für weitere Experimente verwendet. Für die TP53-Inhibierung waren bereits siRNAs im Labor etabliert [74] und so wurde eine dieser siRNAs für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Für jeden experimentellen Durchgang wurden sowohl die jeweiligen Einzel- als auch die Doppelinhibierungen durchgeführt, um identische Umgebungsvoraussetzungen sicherzustellen.

Um unspezifische Effekte aufgrund der siRNA-Konzentration nach Doppelinhibierung auszuschließen, wurden in allen Behandlungen die Kontroll-siRNAs in den jeweiligen Molaritäten (ctrl-5nM bzw. ctrl-10nM (Einzel- bzw. Doppelinhibierung)) mitgeführt. In den Darstellungen der Proteinexpression und den funktionellen Analysen wurde sich auf die Kontroll-siRNA der höchsten Molarität bezogen.

4.5.1.1 siRNA-vermittelte Reduktion von MDM4, MDM2 und TP53 auf Proteinebene

Zunächst wurden die Ergebnisse der siRNA-Transfektion auf Proteinebene überprüft. In Abb. 11 ist die siRNA-vermittelte Inhibierung sowohl von MDM4, MDM2, TP53 als auch den jeweiligen Doppelinhibierungen MDM2-TP53, MDM4-TP53 und MDM2-MDM4 auf Proteinebene in HepG2-Zellen dargestellt. Es ist eindeutig zu sehen, dass eine Reduktion von MDM4 bzw. MDM2 zu einer Inhibierung des jeweils anderen Proteins in den *tp53_{WT}* HepG2-Zellen führte, während es keine Änderung der TP53-Level gab.

Wie erwartet sank nach TP53-Einzelinhibierung das TP53-Proteinlevel gegenüber den Kontrollen. Die MDM4-Expression wurde hierdurch nicht wesentlich beeinflusst, jedoch war eine Reduktion von MDM2 detektierbar. Eine Hochregulation des TP53-Zielgens *p21* konnte nur nach der Einzelinhibierung mit MDM2-siRNA auf Proteinebene im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt werden.

Eine simultane Inhibierung von MDM2 und TP53 in HepG2-Zellen bewirkte für MDM4 eine Reversierung der durch MDM2-Einzelinhibierung entstandenen Reduktion. Der MDM4-Proteinlevel wurde auf Kontrollzellniveau angehoben, während es zu einer Verstärkung der MDM2-Reduktion gegenüber der Inhibierung mit siMDM2 kam.

Wurden sowohl MDM4 als auch TP53 gleichzeitig mittels siRNA inhibiert, detektierte man eine Reduktion von MDM4 und TP53. Verglichen mit den jeweiligen Einzelinhibierungen blieb die TP53-Reduktion auf diesem Niveau, während MDM4 eine Verminderung des Inhibierungseffektes zeigte. Die detektierte Intensität der MDM2-Proteinexpression korrelierte mit der der TP53-Einzelinhibierung.

Der simultane Einsatz MDM4- und MDM2-spezifischer siRNA führte erwartungsgemäß zu einer Reduktion der beiden Proteine, die jedoch nicht die gleiche Stärke der jeweiligen Einzelinhibierung erreichte. Die Expression des TP53-Proteins sank nach der Doppelinhibierung gegenüber der MDM4-Einzelinhibierung leicht ab.

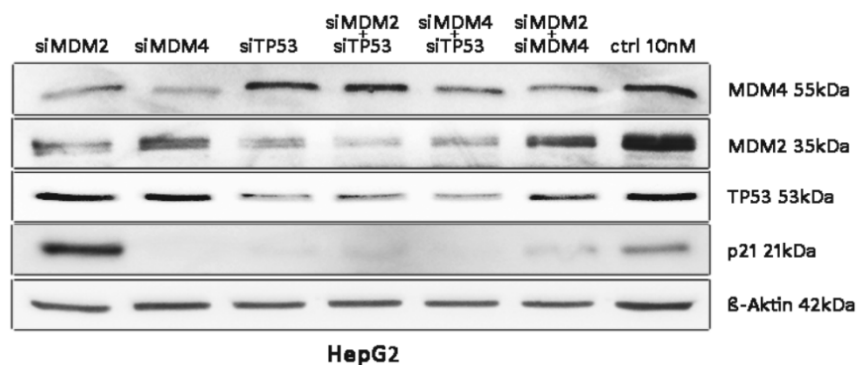


Abb. 10 WB der siRNA-vermittelten Inhibierung von MDM4, MDM2 und TP53 in HepG2-Zellen. Dargestellt ist die Einzelinhibierung von MDM4 (siMDM4), MDM2 (siMDM2) und TP53 (siTP53) sowie die Doppelinhibierungen (siMDM2 + siTP53, siMDM4 + siTP53 bzw. siMDM2 + siMDM4) im Vergleich zur Kontroll-siRNA 10nM (ctrl 10nM).

Wie in der Abb. 11 zu sehen ist, ergab die siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4 bzw. MDM2 in HuH7-Zellen auch eine Reduktion des jeweils anderen Proteins. Anders als HepG2-zeigten HuH7-Zellen eine erhöhte TP53-Expression nach *mdm4*-Inhibierung. Nach einer TP53-Einzelinhibierung sank der TP53-Proteinlevel gegenüber der Kontrolle ab. Die MDM4-Expression wurde hierdurch nicht wesentlich beeinflusst, jedoch konnte eine Abnahme der MDM2-Expression nachgewiesen werden.

Nachdem die Zellen mit MDM2- und TP53-siRNA simultan inhibiert wurden, zeigte sich für MDM2 und TP53 keine Änderung der Expression im Vergleich zu den Einzelinhibierungen. Dagegen sah man eine Induktion der MDM4-Proteinexpression bis auf den Level der Kontrollen.

Erfolgte eine Doppelinhibierung mit siMDM4 und siTP53 wurde eine Expressionsabnahme von TP53 detektiert, die dem Niveau der Einzelinhibierung entsprach. Der Reduktionseffekt für MDM4 war im Vergleich zur Einzelinhibierung geringer. Im Unterschied zu HepG2-Zellen zeigte sich nach dieser Simultaninhibierung in HuH7-Zellen eine Verstärkung der MDM2-Reduktion sowohl gegenüber der TP53- als auch der MDM4-Inhibierung.

Der gleichzeitige Einsatz MDM4- und MDM2-spezifischer siRNA führte in den HCC-Zellen erwartungsgemäß zu einer Reduktion beider Proteine, die eine verstärkte MDM2-Reduktion im Vergleich zur einfachen MDM2-Inhibierung und eine MDM4-Reduktion auf MDM4-Einzelinhibierungsniveau zeigte. Die TP53-Proteinexpression wurde gegenüber der MDM4-Einzelinhibierung reduziert, aber im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte eine Proteininduktion nachgewiesen werden.

Keine der Behandlungen bewirkten einen Anstieg der p21-Proteinexpression.

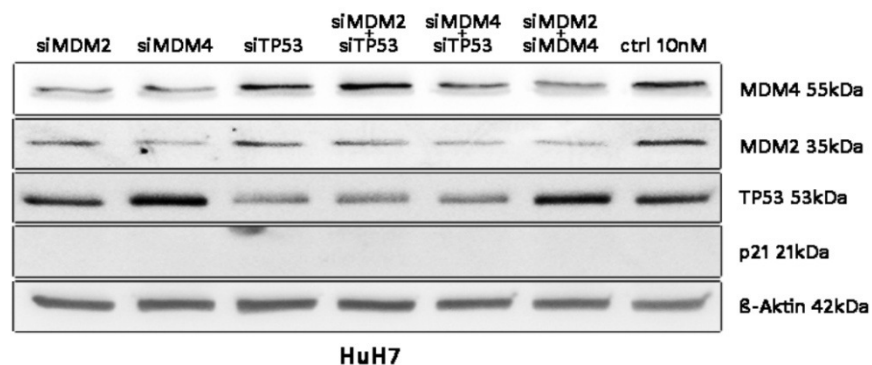


Abb. 11 Darstellung von MDM4, MDM2, TP53, p21 und Aktin nach siRNA-Inhibierung in HuH7-Zellen mittels Westernblot. Gezeigt ist die siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4 (siMDM4), MDM2 (siMDM2) und TP53 (siTP53) sowie deren Doppelinhibierung (siMDM2 + siTP53, siMDM4 + siTP53 bzw. siMDM2 + siMDM4). Als Vergleich sind Behandlungen mit der Kontroll-siRNA 10nM (ctrl 10nM) angegeben.

4.5.1.2 Auswirkungen der Reduktion von MDM4, MDM2 und TP53 auf die Zellvitalität

Nachdem die genspezifische Reduktion der drei Gene erfolgreich auf Proteinebene nachgewiesen wurde, konnte die Untersuchung der funktionellen Effekte nach siRNA-Inhibierung erfolgen.

Zunächst wurde die Auswirkung der genspezifischen siRNA Transfektion auf die Zellvitalität sowohl in HepG2- (Abb. 12A) als auch in HuH7-Zellen (Abb. 12B) mittels MTT-Test (3.14.1) untersucht.

Im Vergleich zur „nonsense“-siRNA Kontrolle (ctrl 10nM) führte die siRNA-vermittelte Inhibierung von MDM4 in HepG2-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität von 43 % ($0,57 \pm 0,01$, $p < 0,001$), während in HuH7-Zellen nur eine Verminderung um 6 % ($0,94 \pm 0,06$, $p > 0,05$) beobachtet werden konnte. Die Transfektion von HCC-Zellen mit MDM2-spezifischer siRNA bewirkte eine signifikante Verringerung der Zellvitalität in HepG2-Zellen von 25 % ($0,75 \pm 0,03$, $p < 0,001$), aber eine 1,27-fach ($\pm 0,09$, $p = 0,001$) erhöhte Vitalität in der *tp53_{mut}* Zelllinie HuH7. Die siRNA-Inhibierung von TP53 zeigte weder in HepG2- noch in HuH7-Zellen signifikante Effekte auf die Zellvitalität ($1,06 \pm 0,02$ und $1,08 \pm 0,02$, $p > 0,05$).

Die gleichzeitige Reduktion von TP53 und MDM4 zeigte keinen wesentlichen Vitalitätsunterschied gegenüber der Einzelinhibierung in HuH7-Zellen ($0,96 \pm 0,01$) während in den *tp53_{WT}* Zellen HepG2 sich die Vitalität um weitere 7 % reduzierte ($0,5 \pm 0,02$, $p < 0,05$). Die Doppelinhibierung von TP53 und MDM2 führte, verglichen mit der MDM2-Einzelinhibierung, zu einem 15 %igen Anstieg der Vitalität in HepG2- ($0,9 \pm 0,04$, $p < 0,001$) und in den HuH7 Zellen ($1,36 \pm 0,05$, $p = 0,001$).

Sowohl in HepG2- als auch in HuH7-Zellen liessen sich in der Doppelinhibierung mit spezifischer siRNA gegen MDM4 und MDM2 eine weitere Abnahme der Vitalität im Vergleich zu den Einzelinhibierungen verzeichnen. In HepG2-Zellen sank die relative Vitalität um 63 % ($0,37 \pm 0,04$, $p < 0,001$) und in HuH7-Zellen um 18 % ($0,82 \pm 0,02$, $p < 0,001$).

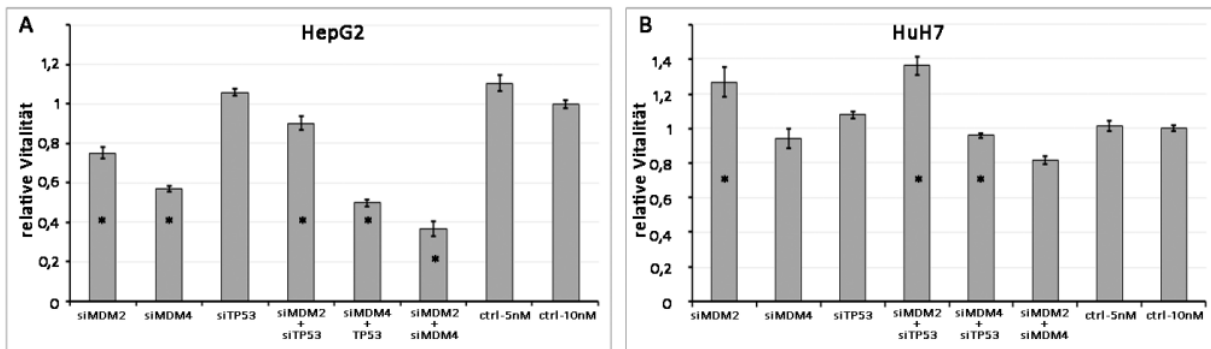


Abb. 12 Funktionelle Analysen nach siRNA-vermittelter Inhibierung von MDM4, MDM2 und TP53 in HepG2- und HuH7-Zellen. **(A,B)** MTT-Zellvitalitätsassay unter Verwendung der genspezifischen siRNA gegen MDM4 (siMDM4), MDM2 (siMDM2) und TP53 (siTP53) und ihre Kombinationen, sowie Kontroll-siRNAs 5nM und 10nM (ctrl 5nM, ctrl 10nM); Signifikanzen wurden durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,001$).

4.5.1.3 Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose nach Reduktion der MDM4, MDM2 und TP53-Expression

Zusätzlich zu der Vitalitätsbestimmung wurde mittels FACS-Analyse die siRNA-induzierte Apoptoserate in den Zelllinien HepG2 (Abb. 12C) und HuH7 (Abb. 12D) bestimmt.

Die durch die alleinige Reduktion von MDM4 in HepG2-Zellen hervorgerufene Verminderung der Zellvitalität, war assoziiert mit einer deutlichen Induktion der Apoptose um das 2,8 -fache ($\pm 0,03$, $p < 0,001$), während in HuH7-Zellen in der FACS-Analyse keine Änderung zu messen war ($1,0 \pm 0,1$). In HepG2-Zellen war die Anzahl apoptotischer Zellen durch die MDM2-Reduktion um den Faktor 1,8 erhöht ($\pm 0,05$, $p < 0,001$). Die MDM2-siRNA Inhibierung in HuH7 dagegen zeigte einen Rückgang der Apoptoserate ($0,74 \pm 0,05$, $p < 0,05$). Die alleinige siRNA-vermittelte TP53-Inhibierung hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollen in HepG2- oder HuH7-Zellen (1,1-fach $\pm 0,04$ und 1,0-fach $\pm 0,05$, $p > 0,05$).

Die Doppelinhibierung von MDM2 und TP53 in HepG2-Zellen zeigte eine Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zu der alleinigen MDM2-Inhibierung auf das 1,3 -fache ($\pm 0,08$, $p < 0,05$), so dass der Effekt der Einzelinhibierung partiell zu reversieren war. Kombinierte man MDM2- und TP53-Inhibierung hingegen in HuH7-Zellen, war keine wesentliche Veränderung in der Apoptoserate zu erkennen ($0,75 \pm 0,02$, $p > 0,05$). Für die siRNA-Kombination MDM4 und TP53 konnte für HuH7-Zellen keine Veränderung in der Zahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zur MDM4-Einzelinhibierung gesehen werden (1,0-fach $\pm 0,04$). Dagegen verringerte sich Apoptoserate der HepG2-Zellen nach MDM4-TP53-

Doppelinhibierung gering auf das 2,5-fache ($\pm 0,03$), verglichen mit der MDM4-Einzelinhibierung, und zeigte somit eine partielle Umkehrung des Effektes der MDM4-Einzelinhibierung.

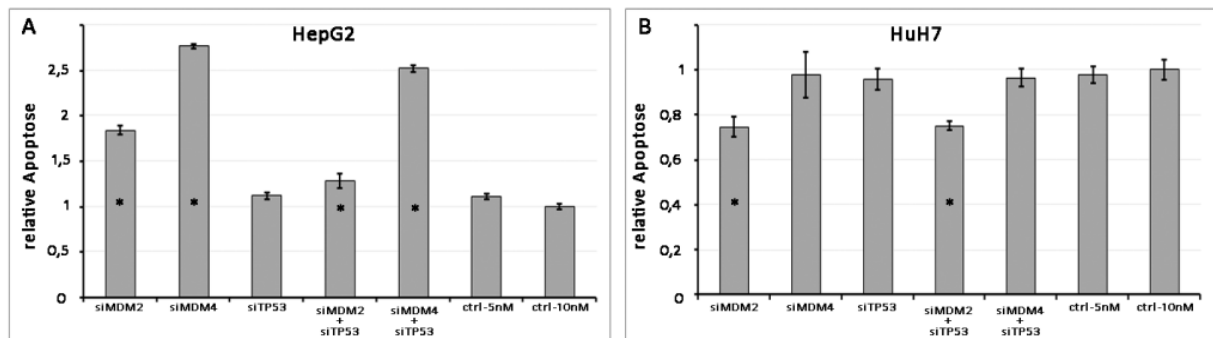


Abb. 13 (A,B) Apoptose-Analysen mittels FACS nach siRNA-Inhibierung; (A) In HepG2-Zellen reduziert MDM4- und MDM2-Inhibierung signifikant die Vitalität, während die Apoptoserate steigt (MDM4>MDM2). Der Effekt ist teilweise reversibel durch simultane Inhibierung mit siTP53. (B) Keine Effekte sind dagegen nach MDM4-Inhibierung in HuH7-Zellen (*tp53*-Mutation, Y220C). Nach der Inhibierung mit siMDM2 zeigt sich dagegen einen Anstieg in der Zellvitalität und Reduktion der Apoptose unabhängig von einer Doppelinhibierung mit siTP53; Signifikanzen wurden durch einen Stern markiert ($p < 0,001$).

4.5.2 Proteinexpression nach Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3

Da in prä-klinischen Untersuchungen am Retinoblastom der „small molecule inhibitor“ Nutlin-3 bereits eine anti-tumorigene Effizienz bewiesen hat [93], sollte ermittelt werden, inwieweit eine Nutlin-3-Behandlung ein therapeutisches Potential in HCC-Zelllinien haben kann.

Nach Behandlung der Zelllinien HepG2 und HuH7 mit dem Inhibitor (4 μ M / 24 h) wurden zunächst Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot durchgeführt. Als Kontrollen wurden neben Proteinen unbehandelter Zellen, Lysate mit dem Lösungsmittel DMSO-behandelter Zellen aufgetragen (Abb. 14).

Die Untersuchung zeigte eine Induktion der TP53-Level in HepG2-Zellen in Verbindung mit einer Verminderung der MDM4-Expression. Während man keinen Unterschied in der 35 kDa Isoform des MDM2 sah, war, anders als in den Kontrollen, nun das Volllängenprotein bei 90 kDa zu detektieren. Zusätzlich kam es zu einer Hochregulation des TP53-Zielgens *p21*.

Im Gegensatz dazu ließen sich in HuH7-Zellen keine Änderungen in der Proteinexpression von TP53, MDM4 oder MDM2 erkennen. Das p21-Protein war nicht detektierbar.

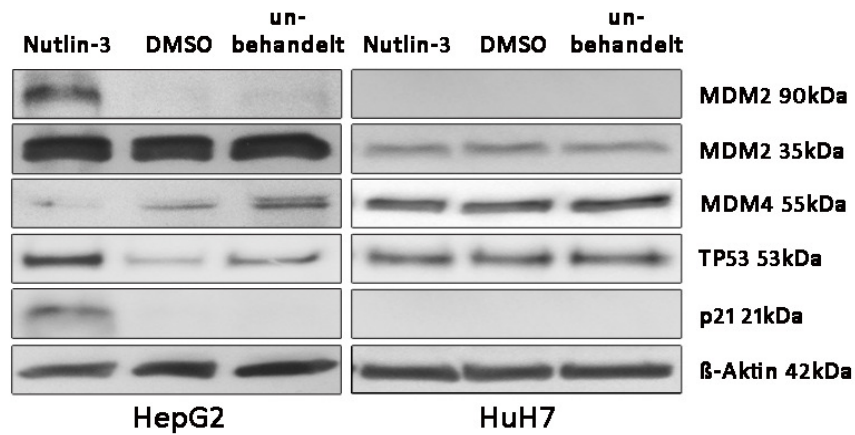


Abb. 14 Western Blot nach Behandlung von HepG2- und HuH7-Zellen mit dem MDM2 (MDM4)-Inhibitor Nutlin-3. Für jede der Zelllinien wurden Proteinlysate Nutlin-3 (4 μ M) behandelter und als Kontrollen DMSO-behandelter sowie unbehandelter Zellen aufgetragen. HepG2-Zellen zeigten nach Behandlung einen Anstieg für TP53, p21 und ebenfalls der MDM2-90 kD-Isoform, das MDM4-Level dagegen sank. In HuH7-Zellen war keine Änderung der Proteinexpression zu sehen.

4.5.3 Auswirkungen der Nutlin-3 Behandlung auf die Zellvitalität, den Zellzyklus und die Apoptose

Um die im Western Blot beobachteten Auswirkungen funktionell näher zu bestimmen, wurde mittels MTT die Zellvitalität untersucht. FACS-Analysen ermöglichen die Beeinflussung der Tumorzell-Apoptose und des Zellzyklus näher zu charakterisieren.

Sowohl in HepG2- als auch HuH7-Zellen ließen sich eine Reduktion der Zellvitalität nach dem Zusatz von 4 μ M Nutlin-3 (24h) nachweisen ($0,72 \pm 0,03$ sowie $0,78 \pm 0,03$, $p < 0,001$, Abb. 15A). Anders als HepG2-Zellen ($0,91 \pm 0,1$, $p > 0,5$), wiesen HuH7 eine Apoptoseinduktion aber keine Änderung im Zellzyklus im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen auf ($1,9$ -fach $\pm 0,41$, $p = 0,09$, Abb. 15B und C). Die FACS-Analysen der HepG2-Zellen zeigten dagegen einen fast vollständigen S-Phase Arrest (Abb. 15C).

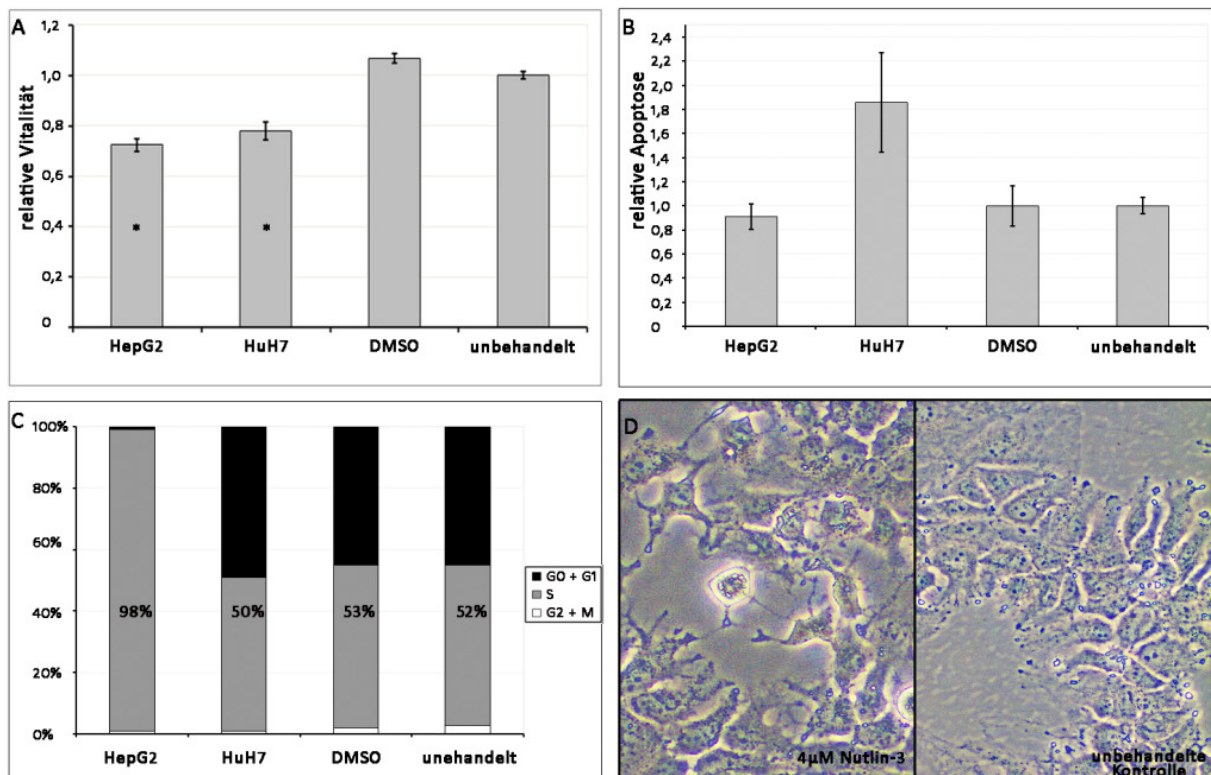


Abb. 15 Darstellung funktioneller Analysen nach Behandlung mit Nutlin-3. Reduzierte Zellvitalität in HepG2- und HuH- Zellen (**A**) ist verbunden mit einem S-Phase Arrest in HepG2- (**C**) sowie einer Apoptoseinduktion (**B**) in HuH7-Zellen (**D**) HuH7-Zellen vor (rechts) und nach einer Behandlung mit 4 μM Nutlin-3 (links); Vergrößerung 1:10

4.6 *tp53*-Mutationsanalysen

Die Untersuchungen der siRNA-vermittelten Inhibierung in Zelllinien mit voneinander abweichendem *tp53*-Status ergaben verschiedene Resultate. Deshalb wurde in den anschließenden Experimenten der *tp53*-Mutationsstand der HCC-Proben analysiert.

4.6.1 Amplifikation und Überprüfung des *tp53*-Gens mittels PCR und SSCP-Gelanalyse

Zum Nachweis möglicher tumorassoziierter Mutationen wurde das gesamte *tp53*-Transkript von 44 hepatozellulären Karzinomen mittels RT-PCR amplifiziert. Die Amplifikation wurde mit sechs überlappenden Primerpaaren durchgeführt. Die konstruierten *tp53*-Primerpaare lieferten Amplifikate von 275bp (TP-1), 314bp (TP-2), 253bp (TP-3 und TP-4), 284bp (TP-5) und 254bp (TP-6). Die PCR Produkte wurden zunächst auf Agarosegele aufgetragen. Die

Lauflänge der nachgewiesenen Banden entsprach der nach den Genbankdaten erwarteten Produktgröße. In einem zweiten Schritt wurden die amplifizierten PCR Produkte bezüglich alterierender Banden auf SSCP-Gelen getestet. Produkte deren Banden vom allgemeinen Bandenmuster des SSCP-Gels abwichen, wurden sequenziert (Abb. 16).

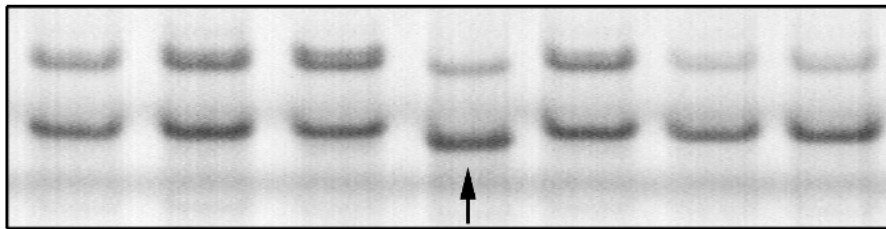


Abb. 16 Amplifikation der *tp53*-Fragmente und anschließende Überprüfung im SSCP-Gel. Exemplarischer SSCP-Gel Scan. Pfeil markiert einen Fall mit aberrantem Migrationsverhalten und damit einer potentiellen Mutation.

4.6.2 Sequenzierungsanalysen potentieller Mutationskandidaten

Das SSCP-Screening in Verbindung mit den nachgeschalteten Sequenzierungen ergab in 84 % der HCCs (37/44) ein wildtypisches *tp53*-Gen. In 6,8 % (3/44) der Tumoren wurde an Position 890 ein Austausch von Adenin zu Guanin gefunden. Dieser Austausch ist ein sogenannter stiller „*Single Nucleotid Polymorphismus*“ (SNP) bei dem es zu keiner Aminosäureveränderung kommt (R213R). 9,1 % der HCCs (4/44) wiesen *tp53*-Mutationen auf. Zwei dieser Mutationen befanden sich im Exon 4, dabei führte eine Mutation zu einem Basenaustausch von Guanin zu Cytosin (Position 466) in der „*SH3-like*“-Domäne, wodurch die Aminosäure Arginin gegen Prolin getauscht wurde (R72P; [72]). Die zweite Veränderung in der die Base Guanin gegen Thymin (Position 581) ersetzt wurde und es auf Grund dessen zu einem Tausch der Aminosäure Arginin gegen Leucin (R110L) kam, betraf ebenfalls die „*SH3-like*“-Domäne. Eine weitere Genmutation von Adenin zu Guanin im Exon 6 an Position 865, die zu einem Aminosäuretausch (Thyrosin zu Cystein (Y205C)) führt, wurde in einem Fall nachgewiesen. Ein anderes HCC zeigte eine Substitution von Arginin zu Tyrosin (Position 1021). Hieraus resultierte ein Aminosäureaustausch von Lysin zu Glutamin (L257Q) in Exon 7. Beide Mutationen betreffen die TP53 DNA-Bindedomäne.

Um sicher zu stellen, dass die nachgewiesenen Mutationen tumorspezifisch waren, erfolgten vergleichende Sequenzierungsanalysen des peri-tumorösen Lebergewebes. Der Vergleich zwischen Tumorgewebe und dem entsprechenden peri-tumorösen Gewebe bestätigte, in allen Fällen eine Tumor-spezifische Mutation (Abb. 17).

In Tab. 19 ist eine Zusammenfassung der *tp53*-Alterationen in den untersuchten hepatozellulären Karzinomen und den HCC-Zelllinien wiedergegeben.

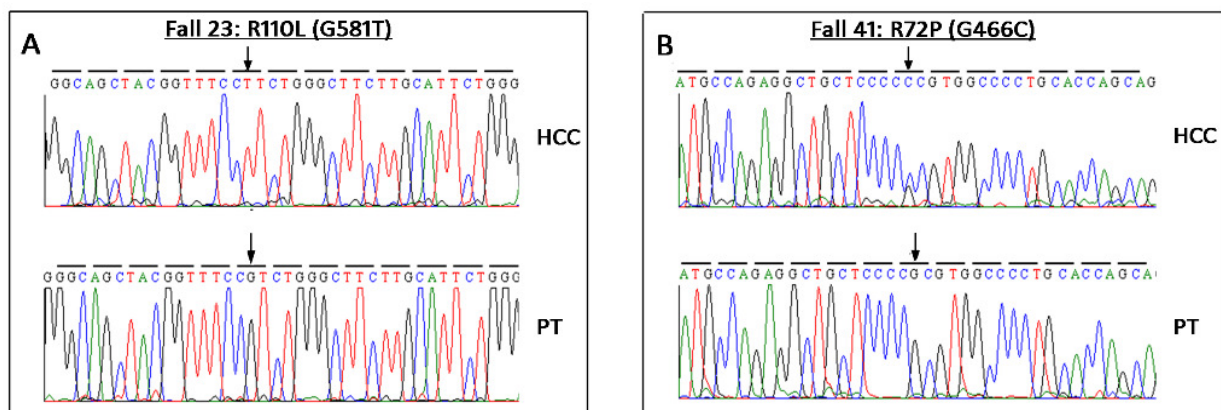


Abb. 17 Exemplarische Darstellung von Chromatogrammen. Die Abbildungen zeigen zwei *tp53* mutierte HCCs sowie den komplementären *tp53*-Wildtyp nicht-tumorösen Materials (PT) der gleichen Patienten. **(A)** Fall 23 weist einen Basenaustausch von ‚G‘ im nicht-tumorösen Material zu ‚T‘ im HCC auf (Pfeil). **(B)** In Fall 41 fand im tumorösen Material ein Basenaustausch von ‚G‘ zu ‚C‘ statt (Pfeil).

Tab. 19 Zusammenfassung des Mutationsstatus der 44 HCCs

Tumore / Zelllinien	TP53 Veränderungen
37 Tumore	Wildtyp
3 Tumore	silent SNP: R213R
4 Tumore	Mutation: Y205C
	Mutation: L257Q
	Mutation: R110L (Abb. 17A)
	Mutation: R72P (Abb. 17B)
Zelllinie: PLC	Mutation: R249S
Zelllinie: HuH7	Mutation: Y220C
Zelllinie: Hep3B	Deletion
Zelllinie: HepG2	Wildtyp

4.7 Chromosomale Alterationen genomischer Loci von *mdm4*, *tp53* und *mdm2* im humanen HCC

Chromosomale Alterationen können allein oder synergistisch die genetische Basis für gestörte Kontrollmechanismen in Tumorzellen bilden. Um dies in Bezug auf das Regulationsnetzwerk MDM4-TP53-MDM2 zu klären, wurden hepatozelluläre Karzinome auf genomische Alterationen dieser Gene und ihre Kombinationen hin überprüft. Hierfür konnte für 41 der 44 HCCs auf die Daten der array-basierten Comparativen Genomischen Hybridisierung zurückgegriffen werden.

Keine Alterationen im genomischen Bereich von *mdm4*, *tp53* oder *mdm2* wurden für vier von 41 HCCs (9,8 %) festgestellt. Genomische Verluste auf Chromosom 17p (*tp53*-Genlocus) waren bei 10/41 untersuchten Proben (24,4 %) nachweisbar, während 15/41 Tumoren (36,6 %) einen Zugewinn am *mdm4*-Genlocus aufwiesen. Isolierte *mdm2*-Zugewinne konnten innerhalb dieses Kollektivs nicht detektiert werden. Eine Kombination von *mdm4*-Zugewinnen und *tp53*-Verlusten wiesen 5/41 Tumoren (12,2 %) auf. In jeweils 2/41 Fällen (4,9 %) wurde die Kombination eines *mdm4*-*mdm2*-Zugewinns bzw. eines *mdm4*-*mdm2*-Zugewinns in Assoziation mit Verlusten am *tp53*-Genlocus gefunden. Die Kombination von *mdm2*-Zugewinn und *tp53*-Verlust, *mdm4*- und *tp53*-Zugewinnen und *mdm4*-Zugewinn in Verbindung mit dem Verlust von *mdm2* und *tp53* wurden in je einem Patienten (1/41, 2,4 %) festgestellt. Tab. 20 listet zusammenfassend die chromosomalen *mdm4*-*tp53*-*mdm2* Alterationsmuster auf.

Statistisch zeigte sich eine Assoziation des *mdm4*-Zugewinns der mit Verlusten am *tp53*-Genlocus (Spearman's rho = 0,56, $p < 0,0001$) und in einer geringeren Ausprägung mit *mdm2*-Zugewinnen (Spearman's rho = 0,36, $p \leq 0,02$). Zusätzlich zeigte sich eine Tendenz der Assoziation von Zugewinnen am *mdm2*-Genlocus mit *tp53*-Verlusten (Spearman's rho=0,28, $p=0,07$).

Es zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Assoziation von *tp53*-Verlusten und *tp53*-Mutationen ($p > 0,05$).

Tab. 20 Zusammenstellung der genomischen Alterationen und ihrer Kombinationen im HCC-Kollektiv

genomische Alteration	Häufigkeit (n/n _{gesamt})
<i>mdm4</i> -Zugewinn	36,6 % (15/41)
<i>tp53</i> -Verlust	24,4 % (10/41)
<i>mdm4</i> -Zugewinn und <i>tp53</i> -Verlust	12,2 % (5/41)
<i>mdm4</i> - und <i>mdm2</i> -Zugewinn	4,9 % (2/41)
<i>mdm4</i> - mit <i>mdm2</i> -Zugewinn kombiniert mit <i>tp53</i> -Verlust	4,9 % (2/41)
<i>mdm2</i> -Zugewinn und <i>tp53</i> -Verlust	2,4 % (1/41)
<i>mdm4</i> - und <i>tp53</i> -Zugewinn	2,4 % (1/41)
<i>mdm4</i> -Zugewinn kombiniert mit <i>mdm2</i> - und <i>tp53</i> -Verlust	2,4 % (1/41)
keine Alterationen	9,8 % (4/41)

4.8 Expressionsanalysen im humanen HCC

4.8.1 mRNA Expression von MDM4-FL, MDM4-S und MDM2

Zur weiteren Analyse der gefundenen genomischen Alterationen, wurden Expressionsanalysen der *mdm4-F-L*, *mdm4-S*- und *mdm2*-mRNA mittels semiquantitativer „*realtime*“-PCR durchgeführt. Es wurden 44 HCCs und drei Normallebern in drei unabhängigen Experimenten gemessen und gegen die Expression von 18s-RNA und den Normalleberpool (n=3) normalisiert. Eine >2-fache relative Überexpression der TumormRNA wurde für *mdm4-FL* in 86,4 % (38/44) der getesteten Fälle ermittelt, die übrigen HCCs zeigten keine biologisch signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zu gepoolten Normallebern (Abb. 18A). HCCs ohne *tp53*-Mutationen zeigten tendenziell höhere mRNA-Expressionen, als Fälle mit Mutation ($28,2 \pm 14,5$ bzw. $3,0 \pm 1,4$, $p=0,056$). Im Gegensatz dazu wurde eine Überexpression von *mdm4-S*-mRNA nur in 11,4 % (5/44) der untersuchten Tumore festgestellt, dagegen wiesen 65,9 % der HCCs eine reduzierte Expression verglichen mit normaler Leber auf (relative Expression <1, 29/44; Abb. 18B). Bezüglich der *mdm2*-mRNA Expression zeigten sich in 50 % (22/44) der analysierten Fälle eine >2-fache Hochregulation und 4,5 % (2/44) der HCCs zeigte eine verminderte Expression (Abb. 18C).

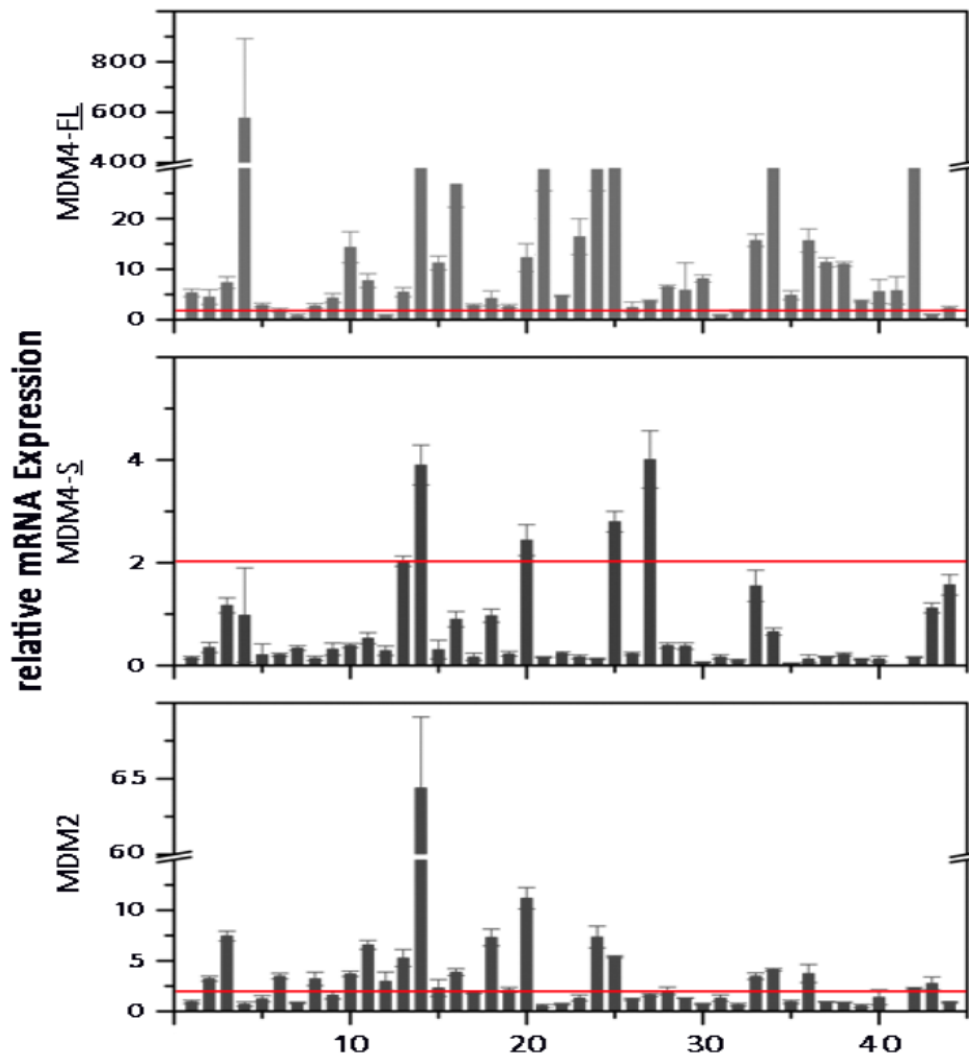


Abb. 18 Semiquantitative „*realtime*“ PCR der *mdm4-FL*- (oben), *mdm4-S*- (mitte) und *mdm2* (unten)-mRNA-Expression in 44 HCCs in Relation zu einem Normalleberpool (n=3; Normalleber =1). Die rote Linie kennzeichnet eine 2-fache relative Überexpression gegenüber den Normallebern.

Untersuchungen an Mauszelllinien lassen vermuten, dass das relative Verhältnis von MDM4 und MDM2 zueinander eine wichtige Rolle sowohl in der Regulation der TP53 Funktion als auch dessen Abbau spielt [98]. Ein MDM4/MDM2-Ratio von 1:1, so wurde postuliert, führt zu einer MDM2-abhängigen proteasomalen Degradation des TP53. Verändert sich die Relation zugunsten von MDM4 (MDM4/MDM2-Ratio >2:1) inhibiert dieses den MDM2-vermittelten TP53-Abbau und MDM4 verhindert TP53-abhängige Transkription. Bei einem Verhältnis von <1:2 jedoch kommt es zur MDM2-vermittelten TP53-Degradation. Die entsprechenden Verhältnisse wurden im untersuchten Kollektiv ermittelt, um eine

Vorstellung von der biologischen Bedeutung der Alteration auf das MDM4-TP53-MDM2-Netzwerk zu erhalten.

Eine MDM4-FL-Überexpression in Kombination mit einem erhöhten MDM4-FL/MDM2-Verhältnis konnte in 28 von 44 HCCs (63,6 %) nachgewiesen werden. Diese Teilmenge beinhaltete auch zwei Fälle mit einer *tp53*-Mutation (R72P und R110L) sowie zwei HCCs mit dem stillen SNP (R213R, Fall# 21 und 41). Desweiteren wurden eine Hochregulation um >2 von *mdm4-FL* und *mdm2* in Verbindung mit einem balancierten MDM4-FL/MDM2-Verhältnis in 9 der 44 HCCs gesehen (20,5 %), aber nur in vier Tumoren (9,1 %) ließ sich eine *mdm2*-Überexpression zusammen mit einem verminderten MDM4-FL/MDM2-Ratio detektieren.

Eine Überexpression von *mdm4-S* kombiniert mit einem erhöhten MDM4-S/MDM2-Ratio wurde nur in einem Fall detektiert (2,3 %, Fall# 27), in vier Tumoren (9,1 %) zeigte sich bei erhöhtem *mdm4-S*-Level ein vermindertes MDM4-S/MDM2-Verhältnis.

Nur in einem Tumor (2,3 %) wurde weder eine *tp53*-Mutation, noch eine *mdm4-FL*- oder *mdm2*-Hochregulation nachgewiesen. In Tab. 21 sind die Ergebnisse der Expressions-, Mutations- und Verhältnisanalysen zusammenfassend dargestellt.

Tab. 21 Tabellarische Auflistung des *tp53*-Mutationsstatus kombiniert mit dem mRNA-Niveau von *mdm4-FL*, *mdm4-S* und *mdm2*. *tp53*-Mutationen wurden in Fettschrift dargestellt. Die grau hinterlegte Zeile (Fall# 32) repräsentiert den Tumor, in dem weder eine *tp53*-Mutation noch eine protumorigen alterierte *mdm4*-, *mdm2*-mRNA-Expression oder erhöhte MDM4/MDM2-Verhältnisse nachgewiesen werden konnten.

Fall #	<i>tp53</i> Mutation	<i>mdm4-FL</i> mRNA	<i>mdm4-S</i> mRNA	<i>mdm2</i> mRNA	<i>mdm4-FL/mdm2</i> mRNA	<i>mdm4-S/mdm2</i> mRNA
1	WT	5,3	0,1	0,9	5,7	0,2
2	WT	4,5	0,3	3,2	1,4	0,1
3	R213R silent SNP	7,3	1,2	7,5	1	0,2
4	WT	576,7	1	0,7	809,4	1,4
5	WT	2,9	0,2	1,3	2,3	0,2
6	WT	1,9	0,2	3,5	0,5	0,1
7	Y205C	0,9	0,3	0,8	1	0,4
8	WT	2,7	0,1	3,2	0,9	0
9	WT	4,3	0,3	1,6	2,7	0,2
10	WT	14,4	0,4	3,7	3,9	0,1
11	WT	7,7	0,5	6,6	1,2	0,1
12	WT	0,8	0,3	3	0,3	0,1
13	WT	5,5	2	5,3	1	0,4
14	WT	120,9	3,9	64,4	1,9	0,1
15	WT	11,2	0,3	2,3	4,9	0,1
16	WT	26,8	0,9	3,9	6,9	0,2
17	WT	2,8	0,2	1,9	1,5	0,1
18	WT	4,2	1	7,3	0,6	0,1
19	WT	2,7	0,2	2,1	1,3	0,1
20	WT	12,3	2,4	11,2	1,1	0,2
21	R213R silent SNP	52,5	0,9	0,4	132,2	2,3
22	WT	4,7	0,2	0,7	6,6	0,3
23	WT	16,4	0,2	1,3	12,5	0,1
24	WT	29,7	0,1	7,3	4	0

Tab 21 - Fortsetzung

Fall #	<i>tp53</i> Mutation	<i>mdm4-FL</i> mRNA	<i>mdm4-S</i> mRNA	<i>mdm2</i> mRNA	<i>mdm4-FL/mdm2</i> mRNA	<i>mdm4-S/mdm2</i> mRNA
26	WT	2,4	0,2	1,2	2,1	0,2
27	WT	3,7	4	1,6	2,3	2,5
28	R72P	6,5	0,4	2	3,2	0,2
29	WT	5,9	0,4	1,3	4,5	0,3
30	WT	8,1	0,1	0,7	11,4	0,1
31	L257Q	0,9	0,2	1,3	0,7	0,1
32	WT	1,6	0,1	0,6	2,6	0,2
33	WT	15,7	1,5	3,5	4,5	0,4
34	WT	31,2	0,7	4,1	7,6	0,2
35	WT	4,9	0	0,9	5,2	0
36	WT	15,7	0,1	3,7	4,2	0
37	WT	11,3	0,2	0,9	12	0,2
38	WT	11	0,2	0,9	12,3	0,2
39	R110L	3,7	0,1	0,5	6,8	0,2
40	WT	5,6	0,1	1,4	4	0,1
41	R213R silent SNP	5,8	0	0,1	99,9	0,1
42	WT	35	0,2	2,3	15,5	0,1
43	WT	1,1	1,1	2,8	0,4	0,4
44	WT	2,3	1,6	0,9	2,7	1,8

4.8.2 Zusammenhang zwischen mRNA-Expression, –Ratio und klinischen Parametern

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der *mdm4-FL*-, *mdm4-S*- und *mdm2*-mRNA Expression unter den wichtigsten ätiologischen Gruppen (HBV, HCV, chronischer Alkoholmissbrauch und kryptogene Ätiologie) waren nicht nachweisbar ($p > 0,05$). Jedoch zeigten virusinduzierte HCCs (HBV und HCV) höhere MDM4-FL/MDM2- (Abb. 19B) und MDM4-S/MDM2-Verhältnisse (Abb. 19A) ($53,9 \pm 38,5$ und $0,5 \pm 0,16$, $p = 0,04$), als

vergleichsweise HCCs ohne viralen Hintergrund ($3,7 \pm 0,8$ und $0,2 \pm 0,03$, $p=0,04$).

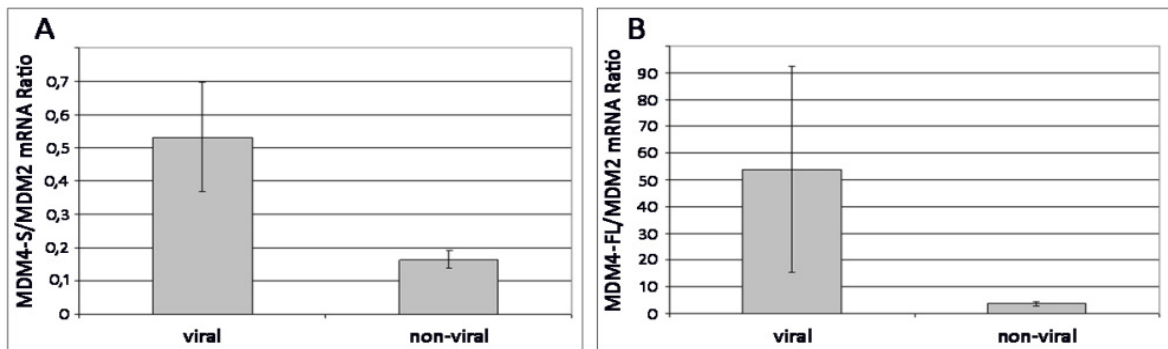


Abb. 19 Darstellung der relativen **(A)** *mdm4-S/mdm2*- und **(B)** *mdm4-FL/mdm2*-mRNA Ratio in humanen HCCs mit und ohne viralen Hintergrund.

Das Verhältnis von *mdm4-FL/mdm2*-mRNA war signifikant kleiner in gut differenzierten HCCs als in moderat differenzierten Tumoren ($p=0,004$). Es konnte jedoch kein statistischer Unterschied zwischen gut und gering bzw. moderat und gering differenzierten Tumoren detektiert werden ($p>0,05$).

Die Analyse von HCCs mit und ohne vaskulärer Invasion zeigte eine *mdm4-FL*-Überexpression und ein höheres MDM4-FL/MDM2-Ratio für Tumore mit vaskulärer Invasion ($p=0,001$ und $p=0,029$; Abb. 20B), während eine niedrigere MDM4-S/MDM2-Ratio in HCCs mit vaskulärer Invasion gesehen wurde ($p=0,048$; Abb. 20A). Für MDM2 konnten hier keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden ($p>0,05$).

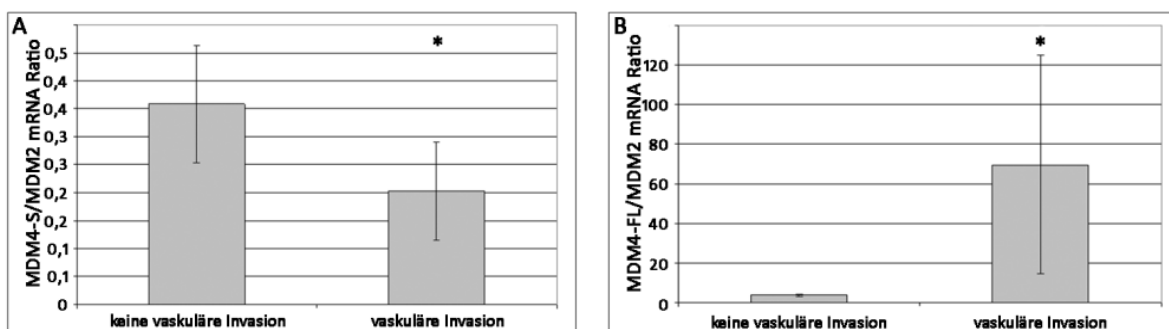


Abb. 20 Vergleich klinischer Parameter mit mRNA-Ratio. **(A)** Deutlich verringertes *mdm4-S/mdm2*-mRNA Ratio in HCCs mit vaskulärer Invasion. **(B)** Signifikant höheres MDM4-FL/MDM2-Verhältnis bei Tumoren mit vaskulärer Invasion.

4.8.3 Vergleich der MDM4–MDM2–TP53-Proteinexpression im HCC

4.8.3.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Um die Proteinexpression von MDM4, MDM2 sowie TP53 im Vergleich immunhistologisch untersuchen zu können, wurde ein TMA angefertigt, wovon je 5 µm dünne Schnitte mit den jeweiligen proteinspezifischen Antikörpern immunhistochemisch angefärbt wurden.

Eine zytoplasmatische MDM4-Färbung war in nicht-neoplastischem Gewebe aber auch in HCCs zu detektieren. Nukleäre MDM4-Expression wurde vornehmlich in HCCs gefunden. Die Ausnahme bildeten eine Normalleber und zwei peri-tumoröse Lebergewebe, welche eine schwache nukleäre Färbung aufwiesen. Keine nukleäre MDM4-Expression wurde in 61 % der HCCs (54/88) gesehen. Eine schwache MDM4-Kernfärbung zeigten 35 % (31/88) der HCCs, während in zwei Fällen (2 %) eine moderate und in einem HCC (1 %) eine starke Färbung in der Mehrheit der Kerne detektiert werden konnte (Abb. 21D). In 19 % (17/88) der untersuchten HCCs konnten keine, in 75 % (66/88) eine leichte, in 3 % (3/88) eine moderate und in 2 % (2/88) eine starke zytoplasmatische MDM4-Proteinexpression gezeigt werden.

Nur in zwei Tumoren (2 %) wurde keine MDM2-Färbung gesehen. Eine schwache MDM2-Färbung der Kerne wurde in 11 % (10/88) der HCCs gesehen. Dagegen konnte in 40 % (35/88) der Fälle eine moderate und in 47 % (41/88) eine starke Färbung nachgewiesen werden (Abb. 21).

TP53 wurde in 64 % (56/88) der HCCs nicht detektiert. Eine schwache Expression konnte für 28 % (25/88) ermittelt werden, eine mittlere Färbeintensität zeigten 6 % der Tumore (5/88) und in zwei Fällen (2 %) wurde eine starke nukleäre TP53-Expression gesehen (Abb. 21).

Statistische Analysen belegten keine Assoziation zwischen der TP53-Färbung, chromosomalen Alterationen (Spearman's rho = 0,12, p=0,51) oder *tp53*-Mutationen (Spearman's rho = 0,12, p=0,51). Die immunhistologische TP53-Färbung zeigte eine schwache Assoziation mit der nukleären Expression von MDM4 (Spearman's rho = 0,19, p<0,05) und eine moderate Korrelation mit der MDM2-Färbung (Spearman's rho = 0,31, p<0,0001).

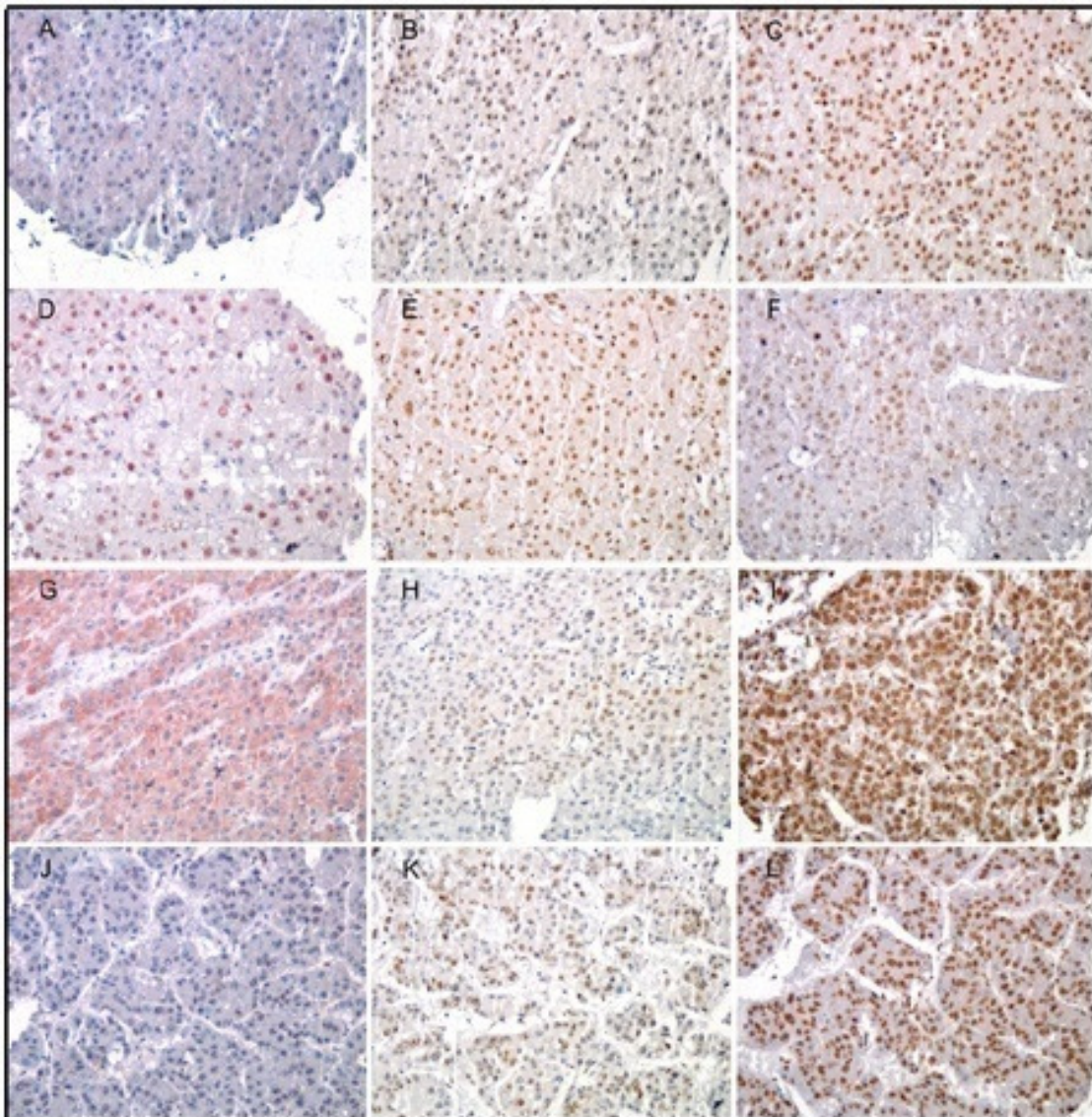


Abb. 21 Immunohistochemische Färbung von MDM4, TP53 und MDM2 in $tp53_{mut-}$ und $tp53_{WT}$ -HCCs. **(A-C)** $tp53$ -mutiertes HCC (Fall# 10, Y205C) mit schwacher nukleärer MDM4- (A), moderater TP53- (B) und starker MDM2-Färbung(C), **(D-L)** $tp53$ -Wildtyp HCCs; **(D-F)** starke nukleärer MDM4-Expression, starke TP53- und schwache MDM2-Färbung; **(G-I)** $tp53$ -Wildtyp HCC: starke zytoplasmatische MDM4- mit kräftiger MDM2-Färbung und schwacher-moderater TP53-Expression des Nukleus; **(J-L)** $tp53$ -Wildtyp HCC: schwache MDM4-Expression in einigen Kernen, moderate bis starke nukleäre TP53-Immunfärbung und intensive MDM2-Proteinexpression; Vergrößerung 1:200

4.8.3.2 Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot

Um zusätzliche Informationen zu den komplexen Alterationen des MDM4-TP53-MDM2-Regulationsnetzwerkes zu erhalten, wurden Western Blot Analysen der HCC-Proteine durchgeführt (Abb. 22 und Abb. 23). Da MDM2 nicht nur Regulator, sondern auch

transkriptionelles Zielgen des TP53 ist, wurde ergänzend ein weiteres Zielgen - *p21* - untersucht.

Von 24 im Western Blot untersuchten HCCs waren in 18 (75 %) eine MDM4-Überexpression verglichen mit normaler Leber detektierbar. Zudem konnte in 42 % (10/24) der HCCs sowohl das Volllängenprotein MDM2 (90 kDa) als auch eine alternative Splicevariante bei 35 kDa detektiert werden. Das 90 kDa MDM2-Protein in Abwesenheit der Splicevariante wurde von 37,5 % (9/24) exprimiert, dagegen wies keines der analysierten HCCs eine alleinige Expression der 35 kDa Variante des MDM2-Proteins auf. In 21 % (5/24) der Proben konnte weder das Volllängenprotein noch die alternative Splicevariante detektiert werden. In den Normallebern ließ sich eine deutliche Expression des 90 kDa MDM2-Proteins aber nur ein schwaches bzw. kein MDM2 35 kDa-Signal nachweisen.

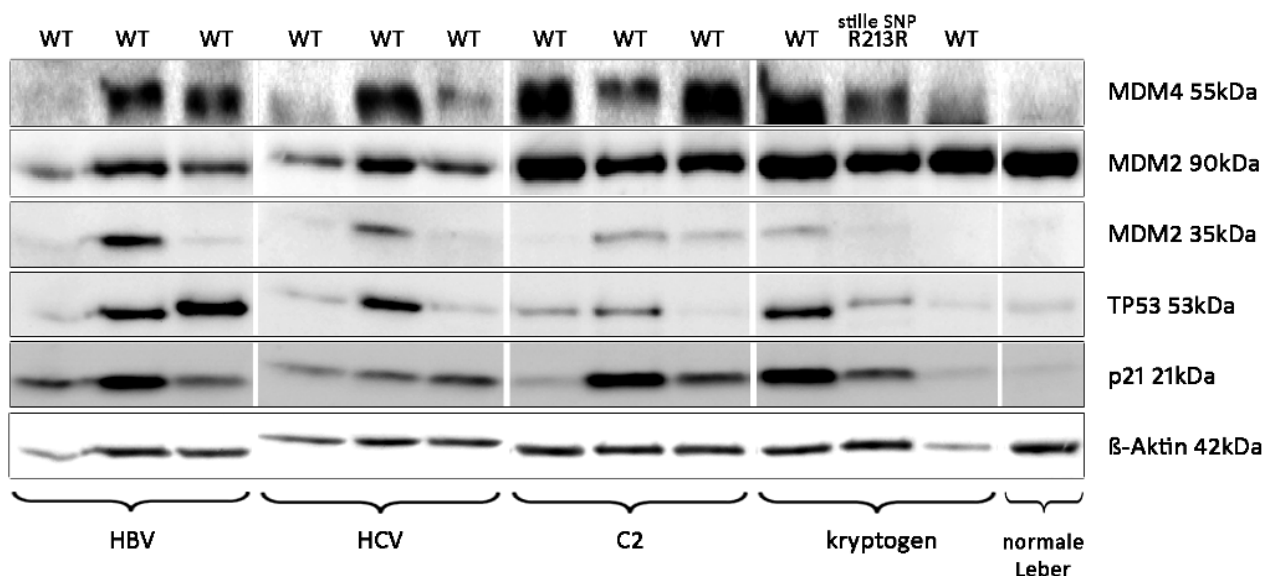


Abb. 22 Proteinexpressionsanalysen von HCCs mit und ohne *tp53*-Mutation mittels Western Blot. Dargestellt sind je drei Beispiele pro Ätiologie und eine Normalleber, sowie der *tp53*-Mutationsstatus (WT = Wildtyp, R213R = TP53 stille Mutation). Gezeigt sind die unterschiedlichen Expressionsmuster der Proteine MDM4, MDM2 90 kDa und 35 kDa, TP53 und p21. Aktin ist die Ladekontrolle.

Die Proteinexpression von TP53 und p21 variierte von starken Signalen bis nicht detektierbar. Die p21-Proteinexpression war in 67 % der HCCs (16/24) im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Der überwiegende Teil der Tumore (79 %, 19/24) zeigte eine TP53-Proteinüberexpression gegenüber den Normallebern.

Dabei detektierte man bei 83 % (15/18) *tp53*-Wildtyp HCCs eine TP53-Überexpression, drei der vier Tumore (75 %) mit einer *tp53*-Mutation (L257Q, R72P, Y205C) zeigten ebenfalls erhöhte TP53-Proteinlevel, während der Tumor mit der Mutation R110L kein TP53 Protein exprimierte (Abb. 23). Ein HCC mit stillem SNP R213R zeigte eine verstärkte TP53-Expression (Abb. 22) dagegen ließ sich in dem zweiten Tumor mit R213R kein TP53 nachweisen (Abb. 23).

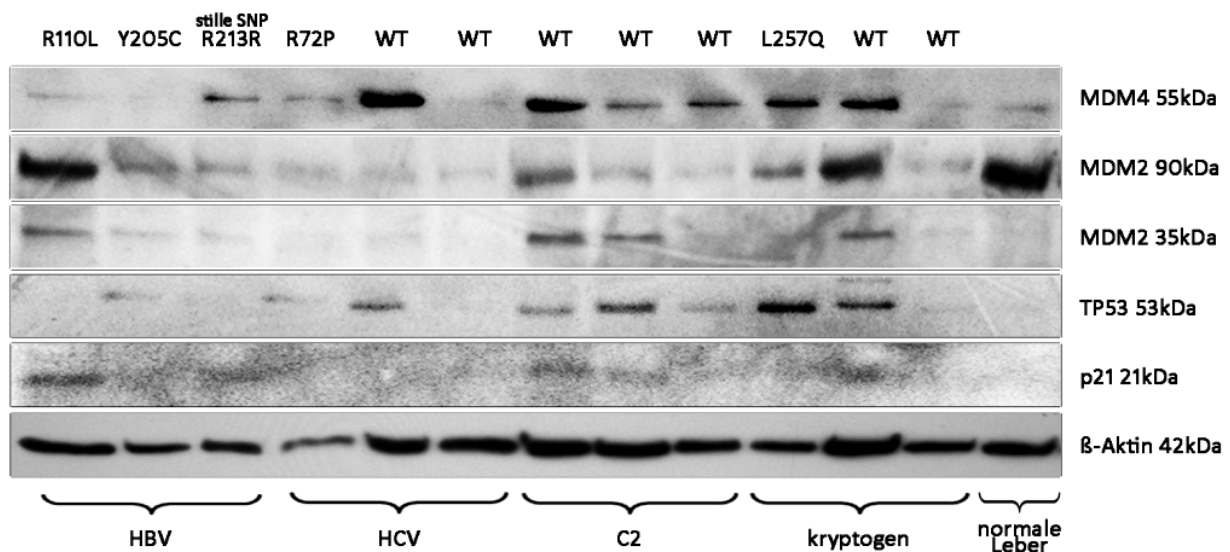


Abb. 23 Western Blot Darstellung weiterer HCCs in Bezug auf die Proteinexpression von MDM4, MDM2, TP53 und p21. Gezeigt sind alle im Kollektiv identifizierten *tp53*-mutierten HCCs (R110, Y205C, R72P und L257Q) sowie eine weitere stille Mutation R213R im Vergleich mit *tp53*-Wildtyp HCCs.

Da vermutet wird, dass das MDM4/MDM2-Verhältnis im Zusammenhang mit der TP53-Degradation und Signalgebung steht, wurde überprüft ob in *tp53*_{WT} HCCs eine hohe MDM4-Proteinexpression mit geringer Expression der TP53-Zielmoleküle MDM2 und p21 korreliert. Obwohl einige der untersuchten Fälle in dieses Muster passten, war es kein Ergebnis, das sich *in vivo* verallgemeinern ließ. Grundsätzlich wiesen die humanen HCCs innerhalb dieses Kollektivs ein heterogenes Bild der MDM4-, MDM2-, TP53- und p21-Proteinexpression, sowie ihrer Verhältnisse zueinander auf. Von 24 untersuchten HCCs zeigten zwei eine MDM4-Überexpression verbunden mit einer fehlenden Expression der TP53-Zielgene *mdm2* und *p21* (2/24; 8.3 %). In einem der analysierten Fälle (1/24; 4,2 %) wurden neben der MDM4-Überexpression auch das MDM2-Volllängenprotein (90 kDa) jedoch nicht dessen 35

kDa Isoform oder p21 detektiert. Weitere vier HCCs (4/24; 16,7 %) wiesen sowohl eine MDM4-, MDM2-90 kDa- als auch eine p21-Überexpression auf. Gleichfalls zeigten HCCs mit TP53-Überexpression nicht notwendigerweise hohe MDM2- und p21-Level, oder Tumore mit schwachen TP53-Signalen miteinander vergleichbare MDM2- und MDM4-Proteinexpression. Obwohl in acht HCCs (8/24; 33,3 %) eine hohe TP53-Expression mit einer MDM2- und p21-Überexpression nachgewiesen wurde, ließ sich in weiteren sechs HCCs (6/24; 25 %) eine TP53-Hochregulation mit einer verminderte Proteinexpression der TP53-Zielmoleküle MDM2 und p21 detektieren. Während in vier (4/24; 16,7 %) der untersuchten Tumore eine Korrelation zwischen geringem TP53-Level und etwa vergleichbarer MDM4- und MDM2-Proteinexpression aufgezeigt wurde, konnte in einem HCC (1/24; 4,2 %) weder eine TP53- oder MDM4-Expression detektiert, noch die TP53-Zielgene *mdm2* und *p21* auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zudem wies ein Tumor (1/24; 4,2 %) eine MDM2- und p21-Proteinüberexpression in Verbindung mit geringen MDM4- und TP53-Proteinlevel auf.

5 Diskussion

Für das zu den häufigsten humanen Malignomen gehörende hepatozelluläre Karzinom, stehen für fortgeschrittene Tumoren bislang keine suffizienten Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Operative Therapien, wie Leberteilresektion oder Lebertransplantation, bleiben hauptsächlich kurative Behandlungen der frühen HCCs, weshalb nur bei einem kleinen Teil der Patienten diese therapeutische Strategie angewandt werden kann. Zudem spricht das HCC nicht oder nur schlecht auf gängige chemotherapeutische Therapieansätze an.

Die genomischen Grundlagen des humanen HCCs sind bisher gut verstanden. Durch konventionelle CGH-Analysen wurden chromosomale Aberrationen identifiziert, denen z.T. auch Zielgene wie *rb-1* (13q14) oder *tp53* (17p13) zugeordnet werden konnten. Vielen dieser rekurrenten Imbalancen konnten jedoch bislang keine Zielgene zugewiesen werden, was z.T. in der limitierten Auflösung konventioneller CGHs begründet ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Verwendung eines hochauflösenden array-basierenden CGH-Ansatzes ein Kollektiv von 63 HCCs auf genomische Alterationen untersucht, nachfolgend minimale Überlappungsregionen definiert, denen putative Kandidatengene zugeordnet wurden. Das *mdm4*-Gen wurde als ein Zielgen rekurrenter 1q32-Zugewinne identifiziert. Da MDM4 als negativer Regulator des *tp53*-Tumorsuppressorgens diskutiert wird, war es Ziel dieser Arbeit seine protumorigene Funktion innerhalb des MDM4-TP53-MDM2 Netzwerks zu analysieren. Dies hat besondere Bedeutung, da TP53 zu den grundsätzlich in humanen Malignomen am häufigsten mutierten Genen zählt, jedoch in westlichen HCCs nur selten strukturell inaktiviert wird.

5.1 Ätiologie-abhängige und -unabhängige Aberrationen im humanen HCC

An 63 ätiologisch gut definierten HCCs wurden durch aCGH-Untersuchungen ätiologie-abhängige und -unabhängige chromosomale Aberrationen nachgewiesen.

Ätiologie-typische Alterationen, welche bereits in früheren Meta-Analysen konventioneller CGH-Daten identifiziert wurden [50], konnten durch diese Untersuchungen validiert und in Teilen substantiell weiter differenziert werden. In der oben genannten CGH-Meta-Analyse waren Zugewinne auf dem Chromosomenarm 8q eine der häufigsten genomischen Alterationen im humanen HCC. Sie wurden in 46,6 % der untersuchten Fälle detektiert. Diese Ergebnisse wurden durch die hier durchgeführte aCGH-Untersuchung (48,8 %) reproduziert. Die in der Arbeit erhobenen Daten zeigen weiterhin, dass die 8q-Alteration zwar in HBV- und HCV-induzierten sowie in mit chronischem Alkoholabusus assoziierten HCCs nachweisbar ist, aber nicht in sogenannten kryptogenen HCCs. Die meisten der sog. kryptogenen HCCs, wie auch in dieser Studie, können mittlerweile ätiologisch einer NAFLD zugeordnet werden, die im Rahmen des metabolischen Syndroms bei Typ II-Diabetikern entstehen kann. Da die Prävalenz der NAFLD in der westlichen Welt zunimmt, könnte dem obigen Ergebnis zukünftig eine klinische Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung zielgerichteter therapeutischer Optionen zukommen. Als mögliches Zielgen der kryptogenen HCCs ist hierbei der „*fibroblast growth factor 19 precursor*“ (FGF19) auf 11q13.1 denkbar. In den in dieser Arbeit analysierten kryptogenen HCCs wurde eine starke Hochregulation der *fgf19*-mRNA gemessen (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass FGF19 eine Bindung mit dem FGF-Rezeptor 4, einem von vier hochaffinen FGF-Rezeptoren, eingeht und die FGF-Signalwege (z.B. RAS/RAF-Kaskade, Phosphatidyl-Inositol-3-kinase-Signalweg) aktiviert [137]. Eine ektope FGF19-Überexpression im Skelettmuskel von transgenen Mäusen führte zur Ausbildung von HCCs, welche durch die Unterbindung der FGF19-FGFR4-Interaktion mittels eines Antikörpers begrenzt bzw. die Tumorentstehung verhindert werden konnte [138, 139]. Auf Grund dessen ist anzunehmen, dass FGF19 eine protumorigene Rolle in der humanen Hepatokarzinogenese spielen kann.

Der Region 8q24.12-21 lassen sich verschiedene, für die Hepatokarzinogenese potentiell relevante Onkogene, wie *ptk2*, *jab1* oder *c-myc* [140-142] zugeordnet. Die Expressionsuntersuchungen unseres HCC-Kollektivs bestätigten eine Überexpression der *c-myc*-mRNA in allen HCCs mit einem 8q-Zugewinn. Beim Vergleich der *c-myc*-Genexpression von Alkohol-, HBV- und HCV-assoziiierter HCCs mit der Genexpression kryptogener HCCs unseres Kollektivs, zeigte sich nicht nur eine Überexpression des *c-myc*-Gens und eine

Aktivierung seiner Zielgene in HCCs mit 8q-Zugewinnen, sondern sogar eine verminderte Expression in kryptogenen HCCs im Vergleich zu normaler adulter Leber. Eine Aktivierung des *c-myc*-Gens und abhängiger Signalwege wurden in 30-60 % der humanen HCCs durch verschiedene Arbeitsgruppen nachgewiesen [6]. Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Tumorätiologie und der *c-myc*-Expression wurden bei der Analyse der HBV-assoziierten HCCs gefunden [142]. c-MYC ist in der Lage regulatorisch auf Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose [143] einzuwirken, indem es u.a. RNA-Polymerasen (RNA Pol I, II und III) aktiviert [144], Ubiquitin-Ligasen wie HectH9 beeinflusst [145] oder, wie in neueren Studien gezeigt, als einer von insgesamt vier benötigten Transkriptionsfaktoren Fibroblasten in pluripotente Stammzell-ähnliche Zellen umprogrammieren kann [146]. Diese Eigenschaften von c-MYC lassen vermuten, dass es auch im humanen HCC eine Rolle, z.B. bei der klonalen Selektion möglicher Vorläuferzellen, spielt. Dieser Pathomechanismus scheint nach den in dieser Arbeit erhobenen Daten jedoch in kryptogenen HCCs keine Rolle zu spielen, wobei o.g. Überexpression von FGF19 einen komplementären Mechanismus darstellen kann.

Neben den zuvor genannten ätiologie-typischen genomischen Alterationen, wurden außerdem ätiologie-unabhängige Imbalancen nachgewiesen. So konnte durch die Identifizierung minimaler Überlappungsregionen dem 1q32-Zugewinn das potentiell HCC-relevante Gen *mdm4* und dem 20q13-Zugewinn das Kandidatengen *eef1a2* zugeordnet werden (siehe 4.2).

Das *eef1a2*-Gen liegt in der chromosomalen Region 20q13.3, welche in 43 % der analysierten HCCs genomische Zugewinne aufwies. Diese HCCs zeigten ätiologie-unabhängig eine signifikante Überexpression ($p < 0,01$) der *eef1a2*-mRNA und des eEF1A2-Proteins im Vergleich zu normaler adulter Leber. Eine Überexpression von eEF1A2 konnte auch bereits in anderen Tumortypen wie Ovarialkarzinomen [147], Mammakarzinomen [148] oder pulmonalen Adenokarzinomen [149] nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass diese Alteration Teil eines allgemein gültigen tumorbiologisch wichtigen, pathogenetischen Prinzips ist. Weiterführende Untersuchungen in o.g. Tumorentitäten zeigten, dass der Translationsfaktor eEF1A2 die Caspase-3-vermittelten Apoptose inhibiert [150], sowie einen

Einfluss auf phosphotyrosin-vermittelte Signalwege ausübt, wobei Interaktionen mit unterschiedlichen Signalmolekülen beschrieben wurden [151]. eEF1A2 ist an der Organisation des Zytoskeletts (Aktinvernetzung) beteiligt und kann auch mit dem Mikrotubulusapparat (β -Tubulin) interagieren [152]. Hierbei kommt es zur eEF1A2-abhängigen Aktivierung des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)- und Akt-Signalwegs. eEF1A2-Überexpression kann über diesen Mechanismus prinzipiell die Migrations- und Invasionsfähigkeit steigern, wie in Mammakarzinomzelllinien gezeigt wurde [153]. In neueren Untersuchungen führte die eEF1A2-Überexpression in Ovarialkarzinomzelllinien zu einer erhöhten Proliferationsrate und einem serum-unabhängigen Zellwachstum [154]. Eine protumorigene Wirkung von eEF1A2 konnte durch eigene Untersuchungen in den HCC-Zelllinien Hep3B und HepG2 bestätigt werden. Hier führte eine genspezifische Inhibierung mittels siRNA zu einer Reduktion der Proliferation (39 % respektive 90 %) und Vitalität (76 % respektive 83 %). Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen, zeigte sich zudem ein Anstieg der Apoptoserate in Hep3B- (5,1-fach) und in HepG2-Zellen (4,8-fach). Dies deutet darauf hin, dass eEF1A2 im HCC proliferationsfördernd und anti-apoptotisch wirkt. Es scheint jedoch im HCC nach eEF1A2-siRNA-Inhibierung nicht zu einer Aktivierung des Akt/PI3K – Signalwegs, wie oben beschrieben, zu kommen.

5.2 MDM4 – protumorigenes Potential im HCC?

Das auf 1q32 codierte *mdm4*-Gen, zeigte in einem Tumor dieses Kollektivs eine umschriebene Amplifikation. Diese Region war weiterhin in 70,6 % der HCCs Bestandteil größerer genomischer Zugewinne. Amplifikationen dieser Chromosomenregion wurden wiederholt in verschiedenen Tumorentitäten, z.B. in Mammakarzinomen [69], Glioblastomen [92], Retinoblastomen [155] und im Blasenkarzinom [156] durch CGH- und FISH-Analysen detektiert. Da Zugewinne auf dem Chromosomenarm 1q frühe, ätiologie-unabhängige genomische Imbalancen im HCC darstellen [50], kann es sich hierbei um ein Zielgen handeln, das möglicherweise bereits in prämaligen Läsionen therapeutisch angegangen werden kann.

MDM4 wirkt nach gegenwärtiger Vorstellung als funktioneller Inhibitor des Tumorsuppressor-Proteins TP53, indem es durch Bindung an die N-terminale Transaktivierungsdomäne die transkriptions-aktivierende Funktion des TP53 hemmt [94, 136]. In dieser Arbeit wurde in 86 % der HCCs eine *mdm4*-mRNA Überexpression detektiert. Diese ließ sich auf Proteinebene in 75 % der untersuchten HCCs bestätigen. Damit stellt die MDM4-Überexpression im HCC, verglichen mit Bronchial-, Kolon-, oder Mammakarzinomen (ca. 19 % mRNA-Überexpression) [69, 157], ein häufiges Ereignis dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Rolle von MDM4 in der Hepatokarzinogenese näher charakterisiert.

Das MDM4-Protein besitzt kein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) (siehe Abb. 3), weshalb es primär zytoplasmatisch lokalisiert ist, was auf ca. 61 % der hier untersuchten HCCs zutrif. Durch die Interaktion mit anderen Proteinen, wie beispielsweise TP53 oder MDM2, kann MDM4 in den Kern translozieren [158-160], wobei nur nukleäres MDM4 TP53 vollständig inhibieren kann [161]. Mit Ausnahme einer schwachen nukleären MDM4-Expression in einer normalen Leber und in zwei peri-tumorösen Lebergeweben, ließ sich eine nukleäre MDM4-Expression in 39 % der HCCs (34/87) feststellen. Weiterhin wurde in dem untersuchten HCC-Kollektiv immunhistologisch eine schwache Assoziation zwischen nukleärer MDM4- und TP53-Expression beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass TP53 ein Kooperationspartner für die nukleäre MDM4-Translokation im HCC sein kann. Es zeigte sich zwar eine statistische Assoziation zwischen nukleärer TP53- und MDM2-Expression ($p < 0,001$); eine signifikante Korrelation zwischen nukleärem MDM4 und MDM2 bestand jedoch nicht.

Wenngleich ein hoher Prozentsatz der untersuchten HCCs (86 % bzw. 75 %) eine MDM4-Überexpression aufwies, war diese in nur etwa 57 % der Fälle durch einen Gen-Dosis-Effekt aufgrund chromosomaler Zugewinne am MDM4-Locus zu erklären. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass andere Mechanismen, wie beispielsweise eine aberrante transkriptionelle Aktivierung oder eine verminderte proteasomale Degradation ebenfalls zu einer MDM4-Akkumulation *in vivo* beitragen können. Die Arbeiten von Gilkes et al. zeigen, dass der Wachstumsfaktor IGF-1 und das Onkogen *k-ras* die *mdm4*-mRNA Transkription z.B. in Bronchial- und Mammakarzinomzelllinien induzieren können [162], was offenbar über die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Elk-1 vermittelt wird [162]. Ob diese Möglichkeit der

transkriptionellen *mdm4*-Hochregulation auch im HCC eine Rolle spielt, müssen zukünftige Studien zeigen.

Für MDM4 sind verschiedene Splicevarianten, wie das unter 1.2.1 dargestellte MDM4-S, in humanen Tumoren beschrieben [95, 96, 134, 163]. Die hieraus translatierten Proteine weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. So wird die Splicevariante *mdm4-A*, der die „saure“ Domäne (Δ Exon 9) fehlt, verstärkt MDM2-vermittelt proteasomal degradiert, wobei MDM2 gleichzeitig stabilisiert wird. Die Variante *mdm4-G* mit fehlender TP53-Bindungsdomäne (Δ Exon 3–5) zeigt erwartungsgemäß nur eine minimale Inhibierung der transkriptionellen Aktivierung TP53-abhängiger Zielgene [163].

In dem hier untersuchten Kollektiv wurden auf Proteinebene vier unterschiedliche MDM4-Isoformen mit einer Größe von 45-55 kDa in HCC-Zelllinien detektiert. Während die 55 kDa-Form dem Volllängenprotein entspricht, konnten die übrigen Banden keiner der bekannten Splicevariante definitiv zugeordnet werden; wobei eine weitergehende Proteinanalytik (z.B. MALDI-TOF) hier nicht unternommen wurde.

Wie bereits o.g., konnte eine *mdm4-FL*-mRNA Überexpression in einem Großteil der HCCs nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die relative mRNA-Expression der Δ Exon 6 Splicevariante *mdm4-S*, die als potenterer TP53-Inhibitor als das WT-Protein gilt [164, 165], mittels semiquantitativer „*realtime*“-PCR bestimmt. Eine Bestimmung der Proteinexpression war nicht möglich, da der einzige MDM4-Antikörper, der im Rahmen dieser Arbeit positiv validiert werden konnte, gegen ein Epitop in Exon 6 gerichtet ist. Das protumorigene Potential der *mdm4-S*-Überexpression ist aufgrund seiner höheren TP53-Affinität und damit der effizienteren Blockierung der DNA-Bindungsdomäne stärker als das von MDM4-FL. MDM4-S wurde in 11,4 % der untersuchten HCCs überexprimiert, während der überwiegende Teil der Tumore eine verminderte Expression gegenüber normaler Leber aufwies. Daraus lässt sich folgern, dass anders als z.B. beim Glioblastom [92], der Überexpression von MDM4-S im Vergleich zur der des Volllängenproteins, keine quantitativ bedeutende Rolle in humanen HCCs zukommt.

Die immunhistologischen Daten suggerieren, dass eine funktionelle MDM4-vermittelte TP53-Inhibierung in bis zu 38 % (MDM4-nukleär) der HCCs möglich ist. Diese Hypothese konnte in

drei HCC-Zelllinien mit unterschiedlichem *tp53*-Status belegt werden, in denen es nach genspezifischer siRNA-vermittelter Inhibierung von MDM4 zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität und Zellproliferation sowie einem Anstieg der Apoptoserate kam. Gleichgerichtete Effekte wurden auch in MDM4-überexprimierenden Mammakarzinom- und Retinoblastom-Zelllinien beschrieben [93, 157, 165].

In der vorliegenden Arbeit war die Reduktion der Zellproliferation nach MDM4-spezifischer siRNA-vermittelter Inhibierung in HepG2-Zellen (*tp53*_{WT}) mit 69 % etwa doppelt so hoch wie in Hep3B-Zellen (*tp53*_{del}). Gleichzeitig zeigte sich eine 2,9-fache Apoptoseinduktion in HepG2-Zellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die MDM4-Überexpression funktionell eine *tp53*-Mutation im HCC ersetzen kann, ähnlich wie dies bereits für das Glioblastom [92, 166] beschrieben ist.

Jedoch legen die hier erhobenen Ergebnisse auch TP53-unabhängige, protumorigene Wirkungen des MDM4 nahe, da die Proliferation der Hep3B-Zellen mit Deletion des *tp53*-Gens ebenfalls, wenn auch deutlich geringer (33 %), gegenüber den Kontrollen reduziert war. Zudem konnte auch eine Apoptoseinduktion nach Inhibierung der MDM4-Expression in Hep3B-Zellen beobachtet werden. Dementgegen war nach MDM4-Inhibierung in der Zelllinie HuH7 (mit einer Y220C „*gain-of-function*“-Mutation des *tp53* [167]) keine wesentliche Veränderung der Vitalität oder Apoptoserate gegenüber den Kontrollen feststellbar. Möglich scheint, dass die „*gain-of-function*“-*tp53*-Mutation mit der Interaktion von MDM4 mit TP53 interferiert, was jedoch bislang nicht experimentell belegt ist.

MDM4 stellt somit nach den bisherigen Ergebnissen eine denkbare Zielstruktur für zukünftige zielgerichtete Therapien dar, wobei der Einfluss unterschiedlicher TP53-Mutationen auf den therapeutisch erzielbaren Effekt noch weiter analysiert werden muss. Aufgrund der bereits in prämaligen Dysplastischen Knoten nachweisbaren 1q-Zugewinne (4.2), sollte weiterhin überprüft werden, ob bereits hier eine MDM4-Überexpression vorliegt, was die Frage nach einer möglichen MDM4-gerichteten Therapie im Rahmen der Sekundärprävention des HCC aufwirft.

5.3 Das Regulationsnetzwerk MDM4-TP53-MDM2

TP53, einer der wichtigsten Koordinatoren der zellulären Antwort auf Stresssignale, unterliegt unter physiologischen Bedingungen verschiedenen Regulationsmechanismen. Der strukturellen oder funktionellen Dysfunktion dieses essentiellen Signalwegs kommt eine maßgebliche Bedeutung in der Tumorentstehung und -progression zu [168]. MDM4 und das ihm homologe MDM2 (siehe 1.2) sind Teil der komplexen und vielschichtigen TP53-Regulation [69, 98]. Das MDM4-TP53-MDM2-Regulationsnetzwerk wurde in dieser Arbeit im Kontext der Hepatokarzinogenese näher analysiert.

Das zur MDM-Proteinfamilie gehörende MDM2 ist eine E3 Ubiquitin-Ligase, die erstmals in spontan transformierten murinen 3T3-DM Zellen (BALB/3T3 Zelllinie) identifiziert wurde [83, 84]. In den folgenden Jahren konnte sein onkogenes Potential, initial durch den Nachweis von Genamplifikationen, in unterschiedlichen Malignomen, wie Hepatoblastomen, Osteosarkomen, Pankreastumoren oder Leukämien belegt werden [85, 86]. Studien zur MDM2-Expression im HCC zeigen ein heterogenes Bild, wobei immunhistologisch eine Überexpression in 26 % bis 59 % der HCCs beschrieben wurde [87-89]. Analysen des gesamten MDM4-TP53-MDM2-Netzwerks wurden bislang nicht durchgeführt.

In dem hier untersuchten Kollektiv zeigten 50 % der HCCs eine mRNA-Überexpression (>2fach) und eine verstärkte MDM2-Proteinexpression wurde in 42 % der Fälle detektiert. Eine MDM2-Überexpression verstärkt die TP53-Degradation und inhibiert so funktionell diesen Signalweg [169]. Einzelne Studien im HCC deuten darauf hin, dass eine MDM2-Überexpression in *tp53*-wildtypischen HCCs mit einer gesteigerten Invasivität und schlechteren Prognose assoziiert sein kann [77, 90, 169].

Wie auch für MDM4 wurden in humanen Tumoren zahlreiche alternative MDM2-Isoformen beschrieben [170, 171]. In den analysierten HCCs wurde *in vivo* neben dem Vollängenprotein (90 kDa), das *in vitro* nur in der HCC-Zelllinie HepG2 nach Nutlin-3 Behandlung festgestellt wurde, auch eine Splicevariante von 35 kDa detektiert. Nach Sigalas et al. könnte diese der alternativ geschnittenen Transkriptvariante MDM2-D entsprechen, die neben anderen als eine onkogene MDM2-Variante gilt [171]. Wie in anderen MDM2-Isoformen ist auch in MDM2-D die TP53-Bindedomäne deletiert, wodurch es zum Verlust der

TP53-vermittelten Feedback-Regulation kommt [170]. Die genauen Funktionen der verschiedenen MDM2-Splicevarianten, die in der Regel parallel zum Volllänge MDM2 *in vivo* auftreten, sind bisher noch nicht ausreichend verstanden. Jedoch wird angenommen, dass zusätzlich auch der Verlust der p14^{ARF}-Bindung [158, 170], Grundlage für den onkogenen Charakter der o.g. Splicevarianten sein kann.

Im Gegensatz zu MDM4 besitzt MDM2 eine ähnlich kurze Halbwertszeit wie TP53 [162, 172]. In der Abwesenheit von MDM4 ist daher die MDM2-vermittelte TP53-Inhibierung ineffizient, da es auf Grund einer schnellen Ubiquitinierung durch andere E3-Ubiquitin-Ligasen rasch proteasomal degradiert wird. Durch die Bildung eines Hetero-Komplexes können sich MDM4 und MDM2 über ihre RING-Domänen jedoch gegenseitig stabilisieren, was eine effiziente MDM2-vermittelte TP53-Degradation begünstigt [173]. Hieraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass eine protumorigene Selektion der Überexpression beider Komponenten des Regulationsnetzwerks eine effizientere funktionelle TP53-Inhibierung gewährleistet, als dies durch eine Überexpression der Einzelkomponenten möglich ist.

5.3.1 MDM – Alterationen und mutationsbedingte TP53 – Dysfunktion

Naturgemäß kann das TP53-Regulationsnetzwerk auch strukturell durch *tp53*-Mutationen gestört sein. Betrachtet man die drei Komponenten TP53, MDM2 und MDM4 zusammen, so wurden in insgesamt 90,2 % der untersuchten HCCs Veränderungen nachgewiesen, die entweder *tp53*-Mutationen oder MDM4- bzw. MDM2-Überexpressionen betreffen. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten [86, 93] zeigten sich in dem hier untersuchten HCC-Kollektiv relativ häufig kombinierte Alterationen, die potentiell synergistisch protumorigen wirken können. Dies waren im Einzelnen:

- a) *mdm4*-Zugewinne mit *tp53*-Verlusten (24 %),
- b) *mdm4*-Zugewinne mit *mdm2*-Zugewinnen (5 %),
- c) *mdm4*- und *mdm2*-Zugewinne mit *tp53*-Verlusten (5 %) sowie
- d) *mdm2*-Zugewinne mit *tp53*-Verlusten (2 %).

Weiterhin wurde im Unterschied zur vorbeschriebenen, isolierten *mdm4*-Genamplifikationen in Mammakarzinomen (5 %), Weichgewebssarkome (17 %) und etwa 10

% aller bisher analysierten übrigen Tumoren [157, 161, 165] nur in einem Fall des hier untersuchten Kollektivs eine *mdm4*-Genamplifikation nachgewiesen. Es konnte jedoch in 36,6 % der HCCs chromosomale Zugewinne am *mdm4*-Genlocus als singuläre Alteration des untersuchten Netzwerks mittels hochauflösender aCGH detektiert werden. Die Ergebnisse in diesem Kollektiv deuten auf eine Selektionierung von häufig kombinierten MDM-Alterationen im Rahmen der Tumorgenese hin, die durch Beeinträchtigung des Regulationsnetzwerkes protumorigene Effekte vermittelt können.

Obwohl, wie unter a) gezeigt, in 24 % der Tumore genomische Verluste des *tp53*-Genlocus nachweisbar waren, zeigten nur vier dieser 10 HCCs zusätzlich eine *tp53*-Missense Mutation, was einer *tp53*-Mutationsfrequenz von 9 % entspricht. Diese Frequenz ist nahezu identisch zu der einer früheren Analyse eines deutschen HCC-Kollektivs (10 %) [174]. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass *tp53*-Mutationen nicht die Hauptursache der gestörten TP53-Regulation in HCCs unseres geographischen Raums sind. In ersten *in vivo* Untersuchungen zur Haploinsuffizienz von TP53 in Li-Fraumeni-Syndrome (LFS)-Tumoren [175] und *in vitro* Untersuchungen in LFS-Fibroblasten [176] zeigte sich eine verminderte Stressantwort und eine verminderte Tumorsuppression nach Verlust eines *tp53*-Allels.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Kombinationen konnte in einem Tumor neben einer *tp53*-Mutation auch ein *mdm4*-Zugewinn festgestellt werden. Da beide Veränderungen im Rahmen der Tumorgenese selektiert wurden, deutet dies darauf hin, dass MDM4 im HCC auch TP53-unabhängige protumorigene Effekte vermitteln kann, wie es auch zum Teil aus den *in vitro* Ergebnissen (*tp53*-deletierter Hep3B-Zellen) abzuleiten ist. Die Hypothese TP53-unabhängiger MDM4-Effekte wird auch durch die statistische Auswertung der aCGH-Daten gestützt, in der eine signifikante Assoziation zwischen *tp53*-Verlusten und *mdm4*-Zugewinnen nachweisbar war.

Darüber hinaus wurde in einem HCC die Kombination von *mdm4*-Zugewinnen, verbunden mit einer relativen *mdm4*-mRNA-Überexpression und Zugewinnen am *tp53*-Genlocus detektiert. Diese Kombination ist tumorbiologisch schwer zu interpretieren, verdeutlicht jedoch, dass allein auf der Basis von deskriptiven genomischen Daten nicht in allen Fällen valide funktionelle Hypothesen abzuleiten sind, sondern lediglich selektionierte Muster

aufgezeigt werden können. Da die BAC-Klone, die den *tp53*-Genlocus abdecken, auch benachbart kodierte Gene, wie bspw. „*Fragile X Mental Retardation Syndrome related Protein 2*“ (FXR2), „*Diamine Acetyltransferase 2*“ (SAT2) oder „*Dynein Axonemal Heavy Chain Domain 2*“ (DNAH2), abdecken, erscheint es prinzipiell möglich, dass diese Gene protumorigene Wirkungen entfalten, was die o.g. Beobachtung erklären kann. Interessanterweise führt die FXR2-TP53-Bindung in megakaryoblastischen Leukämiezelllinien zu einer TP53-Inhibierung [177, 178]. Im Kolonkarzinom scheint SAT2 im Vergleich zu normaler Dickdarmschleimhaut differenziell reguliert zu werden [179]. Da die genannten Gene keine unmittelbaren Mitglieder des MDM4-TP53-MDM2-Netzwerks darstellen, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit nicht näher charakterisiert.

5.3.2 Bedeutung der MDM4-MDM2-Ratio im HCC

Im Gegensatz zu MDM4, das in Reinform als Monomer vorliegt, kann MDM2 sowohl homo- als auch heterodimerisieren [180, 181]. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität ihrer RING-Domänen kommen MDM4 und MDM2 in normalen Zellen offenbar vorwiegend als Heterodimere vor [182, 183]. Da die funktionelle Konsequenz einer TP53-Aktivierung, wie in der Einleitung beschrieben, auch vom zellulären MDM4/MDM2-Verhältnis abhängig ist [98], wurden die relativen Expressions-Verhältnisse von MDM4-FL/MDM2 und MDM4-S/MDM2 bestimmt. Da kein valider MDM4-S-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, musste auf eine Überprüfung dieser Verhältnisse auf Proteinebene verzichtet und nur die mRNA-Expressionsdaten einbezogen werden.

Unsere Daten wiesen in 63,6 % der Tumore eine mRNA-Überexpression von *mdm4-FL* kombiniert mit einem erhöhten MDM4-FL/MDM2-Verhältnis auf. Nach Marine et al. [98] spricht dies für eine vornehmlich MDM4-vermittelte TP53-Transkriptionshemmung.

Weiterhin ist nach diesem Modell bei 9,1 % der HCCs mit einer Kombination einer MDM2-Überexpression und einem verminderten MDM4-FL/MDM2-Verhältnis von einer vornehmlich MDM2-vermittelten proteasomalen TP53-Degradation auszugehen.

Eine vermehrte Expression von *mdm4-FL* und *mdm2* (>2-fach) kombiniert mit einem balancierten MDM4-FL/MDM2-Verhältnis wurde in 20,5 % der Tumore nachgewiesen. Dieses Ergebnis deutet auf eine kooperative funktionelle TP53-Inhibierung durch MDM4 und

MDM2 in diesen Fällen hin, wobei sowohl die TP53-Degradation gesteigert (MDM2) als auch die -abhängige Transkription inhibiert (MDM4) wird.

Bemerkenswerterweise ließ sich in zwei HCCs eine MDM4-Überexpression mit erhöhtem MDM4-FL/MDM2-Verhältnis und einer gleichzeitig bestehenden *tp53*-Mutation (R72P bzw. R110L) nachweisen, wobei beide Mutationen nicht die DNA-Bindungsdomäne betrafen, sondern die „*SH3-like*“-Domäne. Da das umgebende Lebergewebe in beiden Fällen einen *tp53*-Wildtyp aufwies, ist es möglich, dass sich diese Mutationen in ihrer funktionellen Auswirkungen von „klassischen“ *tp53*-Mutationen unterscheiden. Hierbei ist eine MDM4-Bindung an die intakte TP53-DNA-Bindungsdomäne denkbar, wodurch eine ggfs. erhaltene TP53-abhängige Transkriptionsregulation funktionell inhibiert werden konnte.

Die Tatsache, dass sich im untersuchten Kollektiv nur ein HCC ohne potentiell protumorigene Alterationen des TP53-Signalweges fand, spricht dafür dass die TP53-Inaktivierung einen häufigen, wenn nicht generellen Mechanismus der Hepatokarzinogenese darstellt. Dieser Mechanismus erfolgt in westlichen HCCs hauptsächlich, wenn auch nicht exklusiv, durch eine funktionelle TP53-Inhibierung und dies zu einem wesentlichen Teil durch das komplexe Zusammenspiel von MDM4 und MDM2. Dies erklärt auch pathomechanistisch die geringere Prävalenz an *tp53*-Mutationen in HCCs der westlichen Welt verglichen mit dem asiatischen und afrikanischen Raum und zu anderen Tumorentitäten [184].

Zwei Beobachtungen lassen vermuten, dass die funktionelle Inaktivierung von TP53 eher ein Ereignis der Tumorprogression als der -initiation ist. Zunächst zeigten gut differenzierte HCCs niedrigere MDM4-FL/MDM2-Verhältnisse als schlechter differenzierte Tumoren. Außerdem war die *mdm4-FL*-Überexpression mit tumorösen Blutgefäßeinbrüchen assoziiert, die in frühen gut differenzierten Tumoren seltener nachweisbar sind.

Theoretisch sollte ein erhöhtes MDM4/MDM2-Verhältnis TP53 stabilisieren und die abhängige Transkription (z.B. p21) inhibieren [98, 185]. Diese Konstellation war im Immunoblot allerdings nur in zwei HCCs nachweisbar (2/24). Mittels Westernblot konnte nur ein HCC identifiziert werden, das simultan erhöhte TP53-, MDM2- und p21-Level aufwies, was auf eine transkriptionelle Aktivierung der TP53-Zielgene *mdm2* und *p21*, entsprechend dem regulatorischen Feedbackloop nach zellulär-induziertem Stress, hindeutet [69, 186].

Vier von 24 Tumoren mit schwacher TP53-Expression zeigten vergleichbare MDM2- und MDM4-Proteinsignale passend zum Modell einer kooperativen TP53-Degradation. Ferner zeigte ein Tumor (1/24) eine erhöhte MDM2/MDM4-Ratio verbunden mit einer verminderten TP53-Expression passend zu einer MDM2-vermittelten Degradation. Somit ließ sich in 33 % (8/24) der untersuchten HCCs eine Konstellation nachweisen, die nach dem Konzept von Marine et al. [98] mit einer funktionellen TP53-Inhibierung konsistent ist.

Die übrigen Fälle ließen sich nach dem Modell von Marine et al. nicht eindeutig klassifizieren. Dies ist möglicherweise Ausdruck der Tatsache, dass die Situation *in vivo* komplexer ist, als es *in vitro* Experimente darstellen. So müssen ggf. auch Mutationen innerhalb der Promotorregion oder Mutationen der RING- oder TP53-Bindedomäne von MDM2 zusätzlich in Betracht gezogen werden [169, 187, 188]. Zudem wäre es möglich, dass weitere Faktoren, wie bspw. andere für den proteasomalen Abbau essenzielle Proteine in diesen Fällen alteriert sind.

Für p21, ein wesentliches TP53-Zielgen, können verschiedene Regulationsmechanismen direkt oder indirekt zu einer TP53-unabhängigen p21-Repression führen. Beispielsweise kann eine p63-Splicevariante an den p21-Promotor binden und die p21-Transkription inhibieren [189]; auch Aberrationen in p21-vorgeschalteten Tumorsuppressorgenen, wie z.B. BRCA1 [190], oder die negative Beeinflussung von p21-Aktivatoren, wie E-Box-Bindeproteine [191, 192], sind Beispiele für eine TP53-unabhängige p21-Repression. In verschiedenen Tumoren konnten zudem p21-Promotormethylierungen nachgewiesen werden, die zu einer verminderten p21-Expression führten [193]. Aufgrund dieser Mechanismen, spiegelt die funktionelle Betrachtung des MDM4-TP53-MDM2-Netzwerks im HCC seine Bedeutung in Bezug auf TP53-regulierte Zielgene wider.

5.3.3 Kooperation von MDM4 – TP53 – MDM2 *in vitro*

Mittels *in vitro*-Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, das Zusammenspiel der Mitglieder des MDM4-TP53-MDM2-Netzwerks besser zu verstehen. Auf die hierzu durchgeführten siRNA-vermittelte Inhibierungen einzelner oder mehrerer Komponenten des Regulationsnetzwerks, folgten die Untersuchungen funktioneller Effekte und ihre Abhängigkeiten.

In beiden der hier hinsichtlich des MDM4-TP53-MDM2-Netzwerks detailliert untersuchten HCC-Zelllinien (HuH7, HepG2), konnten durch MDM4- bzw. MDM2-spezifische siRNA-vermittelte Inhibierungen TP53-abhängige und –unabhängige protumorigene Funktion von MDM4 und MDM2 im HCC *in vitro* dargestellt werden. Die Inhibierung von MDM4 und MDM2 führte in beiden Zelllinien zur Reduktion des jeweils anderen Proteins. Da sich beide Proteine, wie unter 5.3 erläutert, durch Heterodimerisierung gegenseitig stabilisieren, ist dieser Effekt wohl auf eine verminderte Proteinstabilität nach Wegfall des Dimerisierungspartners zurückzuführen [82, 98]. Andererseits sind Interaktionen der MDM-Proteine mit HAUSP (MDM4 [172]) oder ARF (MDM2 [194]) bekannt, die ebenfalls die Proteinstabilität beeinflussen.

Nach MDM4-Inhibierung wurde von Gu et al. [161] in *tp53_{WT}* U2OS-Zellen (Osteosarkom) eine simultane TP53- und p21-Induktion beschrieben. In HuH7-Zellen (*tp53_{mut/Y220C}*) kam es nach MDM4-Inhibierung in den hier durchgeführten Analysen zwar zu einer TP53-Induktion, die p21-Expression blieb aber unverändert. Dies kann dafür sprechen, dass *tp53_{mut/Y220C}* zum Verlust der p21-Induzierbarkeit durch die Interaktion mit p63 und p73 führt [74]. Alternativ kann die natürlich vorkommende TP53-Splicevariante TP53as an den p21-Promotor binden und so die TP53-abhängige p21-Induktion verhindern [195]. Desweiteren konnte in Studien eine direkte Korrelation zwischen dem Verlust des Tumorsuppressors NRE1A, ein TP53-unabhängiger p21-Regulator, bzw. dessen verminderten Expression und p21 im HCC hergestellt werden [196]. Zusätzliche Untersuchungen in dieser Richtung können mögliche Erklärungen für die festgestellten aberranten Reaktionen liefern.

Anders als für *tp53_{WT}* U2OS-Zellen (Osteosarkom) beschrieben, veränderte sich die TP53-Konzentration in *tp53_{WT}* HepG2-Zellen weder nach MDM2- noch nach MDM4-Inhibierung und zeigt damit eine vergleichbare Reaktion, wie sie in *tp53_{WT}* MCF-7-Zellen (Mammakarzinom) nachgewiesen wurde [157]. Diese Ergebnisse und die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen suggerieren, dass neben dem *tp53*-Status auch der zelluläre Kontext wesentlich für den Effekt der MDM-Inhibierung ist [185, 197]. Die bei unverändertem TP53-Protein Level nach MDM2-Inhibierung in HepG2-Zellen nachweisbare p21-Induktion, lässt sich durch eine reduzierte MDM2-abhängige p21-Degradation erklären [198].

Erwartungsgemäß unterschieden sich die funktionellen Auswirkungen, der hier durchgeführten siRNA-vermittelte MDM-Inhibierung in HepG2- und HuH7-Zellen. Während in HepG2-Zellen sowohl die singuläre MDM4- als auch die singuläre MDM2-Inhibierung zu einer Reduktion der Zellvitalität verbunden mit einer Apoptoseinduktion führte, zeigte sich in HuH7-Zellen (*tp53_{mut/Y220C}*) nach MDM4-spezifischer siRNA Behandlung keine reduzierte Zellvitalität und kein Effekt auf das Apoptoseverhalten der Zellen.

Im Gegensatz zur MDM4-Inhibierung, die keinen signifikanten Effekt auf die Vitalität der HuH7-Zellen hatte, resultierte die MDM2-Inhibierung sogar in einem Vitalitätsanstieg verbunden mit einer verminderten Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollen. Da nach einer MDM4-Inhibierung eine Reduktion der Vitalität basierend auf einer Apoptoseinduktion sowohl in *tp53*-Wildtyp HepG2- als auch in *tp53*-deletierten Hep3B-Zellen nachgewiesen wurde, deuten diese Ergebnisse auf einen neuen Aspekt des „gain-of-function“ Charakters der Y220C-Mutation in HuH7-Zellen hin. Dieser wird in unbehandelten Zellen, in denen eine erhöhte TP53-Halbwertszeit festgestellt wurde [199], möglicherweise durch die MDM2-vermittelte Degradation limitiert.

Durch die Doppelinhibierung mit MDM2- und TP53-spezifischen siRNAs konnte zumindest teilweise eine Umkehrung der MDM2-Einzelinhibierungseffekte in HepG2-Zellen erreicht werden, während dies für MDM4 nicht der Fall war. Die unvollständige Aufhebung der Effekte der MDM2-Einzelinhibierung durch eine Doppelinhibierung mit TP53, lässt sich in erster Linie dadurch erklären, dass die Proteinexpression mit dem hier verwendeten transienten Transfektionsansatz nicht vollständig supprimiert wurde. Eine endgültige Klärung können hier zukünftige Experimente mit einem stabilen shRNA-Transduktionssystem bringen.

In der kombinierten Inhibierung von MDM2 und MDM4 wurde in beiden Zelllinien eine zusätzliche Reduktion der Zellvitalität gegenüber den Einzelinhibierungen beobachtet. Diese Tatsache weist darauf hin, dass durch ein Targeting beider TP53-Regulationskomponenten, die anti-tumorigene Effektivität gesteigert werden kann. Zudem deuten Daten von Supiot et al. darauf hin, dass zumindest in Prostatakarzinomzellen nach MDM-Inhibierung zusätzlich

eine Sensitivierung der Zellen gegen klassische Chemotherapeutika oder Bestrahlung erzielt werden kann [200].

5.3.4 Aktivierung des TP53-Signalweges durch MDM-Antagonisierung

Kristallographische Studien bezüglich der TP53-MDM2-Bindung zeigten Interaktionen der N-terminalen Enden beider Proteine [201]. Nutlin-3, ein potenter Inhibitor der MDM2-TP53-Interaktion besetzt die am N-Terminus liegende hydrophobe TP53-Bindetasche des MDM2. Hierdurch wird TP53 vor proteasomaler Degradation geschützt und stabilisiert, wodurch die TP53-vermittelte Apoptose in *tp53*-Wildtyp-Zellen induziert wird. Zudem kann Nutlin-3, wenn auch strukturbedingt mit geringerer Affinität, die MDM4-TP53-Interaktionen inhibieren [202]. Ob es mit Nutlin-3 tatsächlich möglich ist, die MDM4-TP53-Bindung suffizient *in vivo* zu inhibieren, wird allerdings kontrovers diskutiert [203]. Zumindest in therapeutisch relevanten Dosen scheint dies nicht der Fall zu sein.

In prä-klinischen Studien am Retinoblastom konnte eine anti-tumorigene Wirkung von Nutlin-3 gezeigt werden [93], weshalb das inhibierende Potential von Nutlin-3 hier in HCC-Zelllinien untersucht wurde. Wie erwartet, konnte kein funktioneller Effekt der Nutlin-3-Behandlung in *tp53*-homozygot-deletierten Hep3B-Zellen festgestellt werden, dagegen war die Zellvitalität in HepG2- und in geringerem Maß auch in HuH7-Zellen nach Nutlin-3-Behandlung vermindert.

Die in HepG2-Zellen (*tp53*_{WT}) beobachteten Effekte der Nutlin-3 Behandlungen, wie die MDM4-Reduktion, waren nach der Datenlage in der Literatur zu erwarten und denen der siRNA-Inhibierung vergleichbar. Zudem zeigte sich eine TP53-Akkumulation verbunden mit einer Induktion des TP53-Zielgens *p21*. Im Unterschied zu den siRNA-Inhibierungen ließ sich nach der Zugabe von Nutlin-3 zusätzlich das Volllängen MDM2-Protein (90 kDa) nachweisen. Unter physiologischen Bedingungen sinkt die zelluläre MDM2-Konzentration durch Autoubiquitinierung kurz nach einer Induktion wieder ab [83]. Durch die Nutlin-3 vermittelte intrazelluläre Blockade der MDM2-TP53-Interaktion, kommt es zur TP53-Akkumulation und Aktivierung des TP53-Signalweges. Der Nachweis der MDM2_{90 kDa}-Isoform nach Nutlin-3-Behandlung ist daher wahrscheinlich in der Störung des MDM2-TP53-Feedback-Loops

begründet. Die MDM4-Reduktion ist möglicherweise wiederum eine Folge des unphysiologisch erhöhten MDM2-Spiegels mit konsekutiver MDM4-Degradation [100, 204].

Anders als bei der genspezifischen siRNA-Inhibierung, änderten sich nach Nutlin-3 Behandlungen jedoch weder die MDM4- noch die TP53-Proteinkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen. Da im Unterschied zu einer siRNA-Inhibierung durch die Nutlin-3 Behandlung die MDM2-Expression nicht betroffen ist, sondern eine Störung der MDM2-TP53-Interaktion resultiert, bleiben mögliche TP53-unabhängige MDM2-Funktionen von einer Nutlin-3 Behandlung unbeeinträchtigt. Hierzu gehört beispielsweise die Interaktion von MDM2 mit dem „*Hypoxia Inducible Factor 1 α* “ (HIF-1 α), sowie Wechselwirkungen der E3-Ubiquitin-Ligasen untereinander [205]. Zudem wird die MDM4-TP53-Interaktion zumindest partiell beeinflusst, was ebenfalls zur anti-tumoralen Wirkung beitragen kann.

Im Gegensatz zu den siRNA-Experimenten führte Nutlin-3-Behandlung nicht zu einer signifikanten Apoptoseinduktion in HepG2-Zellen, es resultierte jedoch in einem fast vollständigen S-Phase Arrest; ein bekannter Nutlin-3-Effekt [117, 206]. Obwohl sowohl Apoptoseinduktion als auch Zellzyklusarrest TP53-Effekte sind, bleibt unklar, warum Nutlin-3 in HepG2-Zellen keine Apoptose induziert. Möglicherweise kommt hier die anti-apoptotische Wirkung des p21 zum Tragen, wie es für U87MG Gliomzellen nach Behandlung mit BCNU gezeigt wurde [207].

5.4 *tp53*-unabhängige protumorigene Effekte von MDM4

Obwohl die genauen onkogenen Mechanismen des MDM4 bisher noch nicht identifiziert werden konnten, implizieren die in dieser Arbeit erhobenen Daten auch TP53-unabhängige, protumorigene MDM4-Effekte in humanen HCCs. Dies beruht vor allem auf einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität verbunden mit einer Apoptoseinduktion in den homozygot *tp53*-deletierten Hep3B-Zellen nach siRNA-vermittelter MDM4-Inhibierung.

Auch die klonale Selektion von TP53-Veränderungen und MDM4-Alterationen, die auf den ersten Blick vergleichbare protumorigene Funktionen ausüben, kann zumindest teilweise auf TP53 unabhängige Wirkungen von MDM4 beruhen.

Mögliche Erklärungsansätze sind Interaktionen von MDM4 mit anderen Mitgliedern der TP53-Familie (z.B. TP73). Daneben kann MDM4 auch die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. E2F1 [208, 209] und Smad 3/4 [210], beeinflussen, so dass MDM4-Effekte möglicherweise auf einem protumorigenen „Cross-Talk“ mit anderen TP53-unabhängigen Signalwegen beruhen.

Insgesamt suggerieren die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse, dass eine isolierte Betrachtungsweise des MDM4-TP53-MDM2-Regulationsnetzwerks nicht ausreicht, um die funktionellen Konsequenzen allein aus den Expressionsdaten valide vorherzusagen. Möglicherweise sind auch systembiologische Ansätze geeignet, hier ein verbessertes Verständnis der wesentlichen Pathomechanismen zu erzielen.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit häufige komplexe Alterationen des MDM4-TP53-MDM2-Regulationsnetzwerks im humanen HCC aufgezeigt, die sich von der genomischen-, über die Expressionsebene bis zur Funktionalität erstrecken. Die Resultate der Untersuchung im humanen HCC unterscheiden sich von den Ergebnissen in anderen humanen Tumoren, in denen das Vorkommen von *tp53*-Mutationen und MDM-Überexpression bislang als exklusiv angesehen wurde.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Analysen implizieren, sowohl auf genomischer als auch auf Proteinebene, dass MDM4 und MDM2 inaktivierend auf TP53 wirken und somit Mutationen im *tp53*-Genom komplementieren können. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die geringere *tp53*-Mutationsrate innerhalb westlicher HCCs dar. Weiterhin zeigten die Untersuchungen eine besonders effiziente TP53-Inhibierung durch die Kooperation von MDM4 und MDM2.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weisen die Daten zudem auf bislang nicht charakterisierte TP53-unabhängige protumorigene Effekte von MDM4 im humanen HCC hin. Aufgrund der *in vitro* Ergebnisse in Zelllinien mit differenten *tp53*-Status ist bei Inhibierung des MDM4-TP53-MDM2-Netzwerks mit unterschiedlichen funktionellen Konsequenzen abhängig vom *tp53*-Status und dem zellulären Kontext zu rechnen. Die Resultate belegen differenzielle Funktionen der unterschiedlichen *tp53*-Mutationen.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist eine TP53-Reaktivierung bzw. -Sensitivierung durch gegen MDM4/MDM2-gerichtete Therapien denkbar, wodurch ggfs. eine Chemosensitivierung des HCCs ermöglicht werden kann. Hierbei scheint MDM4 im Vergleich zu MDM2 die attraktivere Zielstruktur für neue Therapieansätze zu sein.

In Bezug auf zukünftige Arbeiten kann eine detaillierte Analyse der einzelnen *tp53*-Mutationen *in vitro* und *in vivo* mittels geeigneter transgener Modelle helfen, den zellulären Kontext systematisch verstehen zu lernen. Offen bleiben bislang auch die zugrunde liegenden Mechanismen in den MDM-überexprimierenden HCC ohne Zugewinne von genomischem Material. Hier sind Analysen zur Promotomethylierung oder anderer aberranter Transkriptionsaktivierungsmechanismen sinnvoll. Sollte MDM4 bereits in Dysplastischen Knoten, die bekanntermaßen z.T. bereits 1q-Zugewinne aufweisen, überexprimiert werden, ist auch eine Rolle einer MDM4-zielgerichteten Therapie im Rahmen der Sekundärprävention des HCC denkbar.

6 Literatur

1. Bosch, F.X., et al., *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S5-S16.
2. Montesano, R., P. Hainaut, and C.P. Wild, *Hepatocellular carcinoma: from gene to public health*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(24): p. 1844-51.
3. Feitelson, M.A., et al., *Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis*. Oncogene, 2002. **21**(16): p. 2593-604.
4. Farazi, P.A. and R.A. DePinho, *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 674-87.
5. Beasley, R.P. and L.Y. Hwang, *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus*. Semin Liver Dis, 1984. **4**(2): p. 113-21.
6. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
7. Blum, H.E., *Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(47): p. 7391-400.
8. Chen, C.J., M.W. Yu, and Y.F. Liaw, *Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol Hepatol, 1997. **12**(9-10): p. S294-308.
9. Thorgeirsson, S.S. and J.W. Grisham, *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. Nat Genet, 2002. **31**(4): p. 339-46.
10. Arbutnot, P., A. Capovilla, and M. Kew, *Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(4): p. 357-68.
11. Kekule, A.S., et al., *The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 457-61.
12. Tokino, T., et al., *Chromosome deletions associated with hepatitis B virus integration*. Virology, 1991. **185**(2): p. 879-82.
13. Murakami, Y., et al., *Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas*. Gut, 2005. **54**(8): p. 1162-8.
14. Hino, O., et al., *Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol, 2002. **37**(11): p. 883-7.
15. Kane, M.A., *Global control of primary hepatocellular carcinoma with hepatitis B vaccine: the contributions of research in Taiwan*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(1): p. 2-3.
16. Kubicka, S., et al., *Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area*. Liver, 2000. **20**(4): p. 312-8.

17. El-Serag, H.B. and A.C. Mason, *Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States*. Arch Intern Med, 2000. **160**(21): p. 3227-30.
18. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S74-83.
19. Moriya, K., et al., *The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1065-7.
20. Kato, N., et al., *Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8856-9.
21. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
22. Park, K.J., et al., *Hepatitis C virus NS5A protein modulates c-Jun N-terminal kinase through interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30711-8.
23. Pachiadakis, I., et al., *Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence?* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(5): p. 296-304.
24. Cramp, M.E., *Hbv + Hcv = Hcc?* Gut, 1999. **45**(2): p. 168-9.
25. Morgan, T.R., S. Mandayam, and M.M. Jamal, *Alcohol and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S87-96.
26. Wheeler, M.D., *Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease*. Alcohol Res Health, 2003. **27**(4): p. 300-6.
27. McClain, C.J., et al., *Monocyte activation in alcoholic liver disease*. Alcohol, 2002. **27**(1): p. 53-61.
28. Wu, D. and A.I. Cederbaum, *Alcohol, oxidative stress, and free radical damage*. Alcohol Res Health, 2003. **27**(4): p. 277-84.
29. Osna, N.A., D.L. Clemens, and T.M. Donohue, Jr., *Ethanol metabolism alters interferon gamma signaling in recombinant HepG2 cells*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1109-17.
30. Donato, F., et al., *Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(4): p. 323-31.
31. Ikeda, K., et al., *A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis*. Hepatology, 1993. **18**(1): p. 47-53.
32. Henry, S.H., et al., *Policy forum: public health. Reducing liver cancer--global control of aflatoxin*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2453-4.
33. Van Rensburg, S.J., et al., *Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei*. Br J Cancer, 1985. **51**(5): p. 713-26.
34. Bressac, B., et al., *Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa*. Nature, 1991. **350**(6317): p. 429-31.

-
35. Jackson, P.E., et al., *Specific p53 mutations detected in plasma and tumors of hepatocellular carcinoma patients by electrospray ionization mass spectrometry*. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 33-5.
 36. Hussain, S.P., et al., *TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(15): p. 2166-76.
 37. Goldblum, J.R., et al., *Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 1993. **17**(12): p. 1244-51.
 38. El-Serag, H.B., T. Tran, and J.E. Everhart, *Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(2): p. 460-8.
 39. Duvnjak, M., et al., *Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(34): p. 4539-50.
 40. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. *Hepatology*, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S99-S112.
 41. Wilfred de Alwis, N.M. and C.P. Day, *Genes and nonalcoholic fatty liver disease*. *Curr Diab Rep*, 2008. **8**(2): p. 156-63.
 42. Kern, M.A., K. Breuhahn, and P. Schirmacher, *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. *Adv Cancer Res*, 2002. **86**: p. 67-112.
 43. Lehmann, U., et al., *Epigenetic defects of hepatocellular carcinoma are already found in non-neoplastic liver cells from patients with hereditary haemochromatosis*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(11): p. 1335-42.
 44. *Terminology of nodular hepatocellular lesions. International Working Party*. *Hepatology*, 1995. **22**(3): p. 983-93.
 45. McKillop, I.H., et al., *Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. *J Surg Res*, 2006. **136**(1): p. 125-35.
 46. Kondo, Y., *Pathology of early hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions in the liver*. In: "Liver Cancer" (K. Okuda and E. Tabor, Eds.), 1997: p. pp. 135-154 New York: Churchill Livingstone.
 47. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 209-18.
 48. Lechel, A., M.P. Manns, and K.L. Rudolph, *Telomeres and telomerase: new targets for the treatment of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2004. **41**(3): p. 491-7.
 49. Satyanarayana, A., M.P. Manns, and K.L. Rudolph, *Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis*. *Hepatology*, 2004. **40**(2): p. 276-83.
 50. Moynadeh, P., et al., *Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(5): p. 935-41.
 51. Breuhahn, K., T. Longerich, and P. Schirmacher, *Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma*. *Oncogene*, 2006. **25**(27): p. 3787-800.

-
52. Niketeghad, F., et al., *Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis*. Br J Cancer, 2001. **85**(5): p. 697-704.
 53. Matsumura, T., R. Makino, and K. Mitamura, *Frequent down-regulation of E-cadherin by genetic and epigenetic changes in the malignant progression of hepatocellular carcinomas*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 594-9.
 54. Buetow, K.H., et al., *Loss of heterozygosity suggests tumor suppressor gene responsible for primary hepatocellular carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8852-6.
 55. Pasquinelli, C., et al., *Rearrangement of a common cellular DNA domain on chromosome 4 in human primary liver tumors*. J Virol, 1988. **62**(2): p. 629-32.
 56. Qin, L.X., et al., *The association of chromosome 8p deletion and tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5662-5.
 57. Muller, H. and K. Helin, *The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1470**(1): p. M1-12.
 58. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
 59. Attri, J., et al., *Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma*. BMC Gastroenterol, 2005. **5**: p. 22.
 60. Latil, A., et al., *Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and RB1 status in human prostate cancer*. Hum Pathol, 1999. **30**(7): p. 809-15.
 61. Zhang, X., et al., *Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 1994. **54**(15): p. 4177-82.
 62. Edamoto, Y., et al., *Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis*. Int J Cancer, 2003. **106**(3): p. 334-41.
 63. Kikuchi, A., *Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway*. Cancer Sci, 2003. **94**(3): p. 225-9.
 64. Buendia, M.A., *Genetics of hepatocellular carcinoma*. Semin Cancer Biol, 2000. **10**(3): p. 185-200.
 65. Giles, R.H., J.H. van Es, and H. Clevers, *Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1653**(1): p. 1-24.
 66. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
 67. Prange, W., et al., *Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes*. J Pathol, 2003. **201**(2): p. 250-9.
 68. Taniguchi, K., et al., *Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas*. Oncogene, 2002. **21**(31): p. 4863-71.

-
69. Toledo, F. and G.M. Wahl, *Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(12): p. 909-23.
 70. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
 71. Scoumanne, A. and X. Chen, *Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation*. Histol Histopathol, 2008. **23**(9): p. 1143-9.
 72. International Agency for Research on Cancer, I., *IARC TP53 Mutation Database*, in <http://www-p53.iarc.fr>. 2008.
 73. Moradpour, D. and H.E. Blum, *Pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(5): p. 477-83.
 74. Singer, S., et al., *Protumorigenic overexpression of stathmin/Op18 by gain-of-function mutation in p53 in human hepatocarcinogenesis*. Hepatology, 2007. **46**(3): p. 759-68.
 75. Hayashi, H., et al., *The clinical significance of p53 gene mutation in hepatocellular carcinomas from Japan*. Hepatology, 1995. **22**(6): p. 1702-7.
 76. Itoh, T., et al., *Relationship between p53 overexpression and the proliferative activity in hepatocellular carcinoma*. Int J Mol Med, 2000. **6**(2): p. 137-42.
 77. Qiu, S.J., et al., *The expression of the mdm2 gene may be related to the aberration of the p53 gene in human hepatocellular carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 1998. **124**(5): p. 253-8.
 78. Haupt, Y., *p53 Regulation: a family affair*. Cell Cycle, 2004. **3**(7): p. 884-5.
 79. Levine, A.J., W. Hu, and Z. Feng, *The P53 pathway: what questions remain to be explored?* Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1027-36.
 80. Sharp, D.A., et al., *Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38189-96.
 81. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
 82. Marine, J.C. and A.G. Jochemsen, *Mdmx and Mdm2: brothers in arms?* Cell Cycle, 2004. **3**(7): p. 900-4.
 83. Toledo, F. and G.M. Wahl, *MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(7-8): p. 1476-82.
 84. Cahilly-Snyder, L., et al., *Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line*. Somat Cell Mol Genet, 1987. **13**(3): p. 235-44.
 85. Momand, J., et al., *The MDM2 gene amplification database*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(15): p. 3453-9.
 86. Bartel, F., et al., *Amplification of the MDM2 gene, but not expression of splice variants of MDM2 mRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma*. Int J Cancer, 2001. **95**(3): p. 168-75.

-
87. Bahnassi, A.A., et al., *Hepatitis C virus-NS3P in relation to p53, p21waf, mdm2, p21-ras and c-erbB2 in hepatocarcinogenesis*. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(11): p. 1731-40.
 88. Endo, K., et al., *Protein expression of MDM2 and its clinicopathological relationships in human hepatocellular carcinoma*. Liver, 2000. **20**(3): p. 209-15.
 89. Zhu, M.H., et al., *[Determination of expression of eight p53-related genes in hepatocellular carcinoma with tissue microarrays]*. Ai Zheng, 2003. **22**(7): p. 680-5.
 90. Schoniger-Hekele, M., et al., *Hepatocellular carcinoma--survival and clinical characteristics in relation to various histologic molecular markers in Western patients*. Liver Int, 2005. **25**(1): p. 62-9.
 91. Marine, J.C., M.A. Dyer, and A.G. Jochemsen, *MDMX: from bench to bedside*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 3): p. 371-8.
 92. Riemenschneider, M.J., et al., *Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification*. Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6091-6.
 93. Laurie, N.A., et al., *Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma*. Nature, 2006. **444**(7115): p. 61-6.
 94. Francoz, S., et al., *Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3232-7.
 95. Bartel, F., et al., *MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(1): p. 29-35.
 96. Giglio, S., et al., *Identification of an aberrantly spliced form of HDMX in human tumors: a new mechanism for HDM2 stabilization*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9687-94.
 97. Rallapalli, R., et al., *A novel MDMX transcript expressed in a variety of transformed cell lines encodes a truncated protein with potent p53 repressive activity*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8299-308.
 98. Marine, J.C. and A.G. Jochemsen, *Mdmx as an essential regulator of p53 activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(3): p. 750-60.
 99. Pereg, Y., et al., *Phosphorylation of Hdmx mediates its Hdm2- and ATM-dependent degradation in response to DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5056-61.
 100. Pan, Y. and J. Chen, *MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(15): p. 5113-21.
 101. Saucedo, L.J., C.D. Myers, and M.E. Perry, *Multiple murine double minute gene 2 (MDM2) proteins are induced by ultraviolet light*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8161-8.

-
102. Kallioniemi, O.P., et al., *Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **10**(4): p. 231-43.
 103. du Manoir, S., et al., *Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization*. Hum Genet, 1993. **90**(6): p. 590-610.
 104. Kuukasjarvi, T., et al., *Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization*. Genes Chromosomes Cancer, 1997. **18**(2): p. 94-101.
 105. Lichter, P., et al., *Comparative genomic hybridization: uses and limitations*. Semin Hematol, 2000. **37**(4): p. 348-57.
 106. Weiss, M.M., et al., *Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization*. J Pathol, 2003. **200**(3): p. 320-6.
 107. Pinkel, D., et al., *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 207-11.
 108. Solinas-Toldo, S., et al., *Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances*. Genes Chromosomes Cancer, 1997. **20**(4): p. 399-407.
 109. Wessendorf, S., et al., *Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization*. Lab Invest, 2002. **82**(1): p. 47-60.
 110. Wessendorf, S., et al., *Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization*. Oncogene, 2003. **22**(9): p. 1425-9.
 111. Kohlhammer, H., et al., *Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions*. Blood, 2004. **104**(3): p. 795-801.
 112. Holzmann, K., et al., *Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4428-33.
 113. Neben, K., et al., *Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3103-11.
 114. Research, W.I.f.B., *Software Schmelzpunkt und GC-Gehalt*.
 115. Dharmacon, *siRNA- Design-Tool*
 116. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 326-30.
 117. Vassilev, L.T., et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. Science, 2004. **303**(5659): p. 844-8.

-
118. Popowicz, G.M., et al., *Molecular Basis for the Inhibition of p53 by Mdmx*. Cell Cycle, 2007. **6**(19).
 119. Fiegler, H., et al., *DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **36**(4): p. 361-74.
 120. Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer, *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. Biotechniques, 1998. **24**(6): p. 954-8, 960, 962.
 121. Ewens, W.J. and R.S. Spielman, *Locating genes by linkage and association*. Theor Popul Biol, 2001. **60**(3): p. 135-9.
 122. Dries, V., et al., *Detection of hepatitis C virus in paraffin-embedded liver biopsies of patients negative for viral RNA in serum*. Hepatology, 1999. **29**(1): p. 223-9.
 123. Somerville, L.L. and K. Wang, *The ultrasensitive silver "protein" stain also detects nanograms of nucleic acids*. Biochem Biophys Res Commun, 1981. **102**(1): p. 53-8.
 124. Knight, S.J., et al., *An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(2): p. 320-32.
 125. Omnibus, G.E.
 126. Software, C.M.A.
 127. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
 128. Gentleman, R.D.C.T.R., *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. In; 2006, 2006.
 129. Smyth, G.K., Y.H. Yang, and T. Speed, *Statistical issues in cDNA microarray data analysis*. Methods Mol Biol, 2003. **224**: p. 111-36.
 130. Yang Yat, N., *Normalization for two-color cDNA microarray data*. 2003.
 131. Hupe, P., et al., *Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions*. Bioinformatics, 2004. **20**(18): p. 3413-22.
 132. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
 133. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
 134. Ramos, Y.F., et al., *Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1839-42.
 135. Elbashir, S.M., et al., *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs*. Methods, 2002. **26**(2): p. 199-213.

-
136. Toledo, F., et al., *A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(4): p. 273-85.
 137. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 211-25.
 138. Desnoyers, L.R., et al., *Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models*. *Oncogene*, 2008. **27**(1): p. 85-97.
 139. Nicholes, K., et al., *A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(6): p. 2295-307.
 140. Okamoto, H., et al., *PTK2 and EIF3S3 genes may be amplification targets at 8q23-q24 and are associated with large hepatocellular carcinomas*. *Hepatology*, 2003. **38**(5): p. 1242-9.
 141. Patil, M.A., et al., *Array-based comparative genomic hybridization reveals recurrent chromosomal aberrations and Jab1 as a potential target for 8q gain in hepatocellular carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(12): p. 2050-7.
 142. Iizuka, N., et al., *Involvement of c-myc-regulated genes in hepatocellular carcinoma related to genotype-C hepatitis B virus*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006. **132**(7): p. 473-81.
 143. Vervoorts, J., J. Luscher-Firzlaff, and B. Luscher, *The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(46): p. 34725-9.
 144. Oskarsson, T. and A. Trumpp, *The Myc trilogy: lord of RNA polymerases*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(3): p. 215-7.
 145. Adhikary, S., et al., *The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation*. *Cell*, 2005. **123**(3): p. 409-21.
 146. Meissner, A., M. Wernig, and R. Jaenisch, *Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells*. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(10): p. 1177-81.
 147. Anand, N., et al., *Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer*. *Nat Genet*, 2002. **31**(3): p. 301-5.
 148. Kulkarni, G., et al., *Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **102**(1): p. 31-41.
 149. Li, R., et al., *Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach*. *Oncogene*, 2006. **25**(18): p. 2628-35.
 150. Ruest, L.B., R. Marcotte, and E. Wang, *Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 5418-25.

-
151. Panasyuk, G., et al., *A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(1): p. 63-71.
 152. Gross, S.R. and T.G. Kinzy, *Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(9): p. 772-8.
 153. Amiri, A., et al., *eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration*. *Oncogene*, 2007. **26**(21): p. 3027-40.
 154. Sun, Y., et al., *The eukaryotic translation elongation factor eEF1A2 induces neoplastic properties and mediates tumorigenic effects of ZNF217 in precursor cells of human ovarian carcinomas*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(8): p. 1761-9.
 155. Corson, T.W. and B.L. Gallie, *One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007. **46**(7): p. 617-34.
 156. Veerakumarasivam, A., et al., *High-resolution array-based comparative genomic hybridization of bladder cancers identifies mouse double minute 4 (MDM4) as an amplification target exclusive of MDM2 and TP53*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(9): p. 2527-34.
 157. Danovi, D., et al., *Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(13): p. 5835-43.
 158. Weber, J.D., et al., *Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(7): p. 2517-28.
 159. Lohrum, M.A., et al., *Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(3): p. 179-81.
 160. Li, C., L. Chen, and J. Chen, *DNA damage induces MDMX nuclear translocation by p53-dependent and -independent mechanisms*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(21): p. 7562-71.
 161. Gu, J., et al., *Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(22): p. 19251-4.
 162. Gilkes, D.M., et al., *Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(6): p. 1999-2010.
 163. de Graaf, P., et al., *Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 38315-24.
 164. Rallapalli, R., et al., *Identification of a domain within MDMX-S that is responsible for its high affinity interaction with p53 and high-level expression in mammalian cells*. *J Cell Biochem*, 2003. **89**(3): p. 563-75.
 165. Bartel, F., et al., *Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis*. *Int J Cancer*, 2005. **117**(3): p. 469-75.
-

-
166. Riemenschneider, M.J., C.B. Knobbe, and G. Reifenberger, *Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target*. Int J Cancer, 2003. **104**(6): p. 752-7.
 167. Hsu, I.C., et al., *p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines*. Carcinogenesis, 1993. **14**(5): p. 987-92.
 168. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
 169. Bond, G.L., et al., *A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans*. Cell, 2004. **119**(5): p. 591-602.
 170. Bartel, F., H. Taubert, and L.C. Harris, *Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(1): p. 9-15.
 171. Sigalas, I., et al., *Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 912-7.
 172. Meulmeester, E., et al., *Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2*. Mol Cell, 2005. **18**(5): p. 565-76.
 173. Barboza, J.A., et al., *Mdm2 and Mdm4 loss regulates distinct p53 activities*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(6): p. 947-54.
 174. Kubicka, S., et al., *Low incidence of p53 mutations in European hepatocellular carcinomas with heterogeneous mutation as a rare event*. J Hepatol, 1995. **23**(4): p. 412-9.
 175. Lynch, C.J. and J. Milner, *Loss of one p53 allele results in four-fold reduction of p53 mRNA and protein: a basis for p53 haplo-insufficiency*. Oncogene, 2006. **25**(24): p. 3463-70.
 176. Liu, P.K., et al., *Analysis of genomic instability in Li-Fraumeni fibroblasts with germline p53 mutations*. Oncogene, 1996. **12**(11): p. 2267-78.
 177. Kanazaki, R., et al., *Cloning and characterization of the novel chimeric gene p53/FXR2 in the acute megakaryoblastic leukemia cell line CMK11-5*. Tohoku J Exp Med, 2006. **209**(3): p. 169-80.
 178. Lagerbauer, B., et al., *Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(4): p. 329-38.
 179. Gornati, R., et al., *Evaluation of SAT-1, SAT-2 and GalNAcT-1 mRNA in colon cancer by real-time PCR*. Mol Cell Biochem, 2007. **298**(1-2): p. 59-68.
 180. Poyurovsky, M.V., et al., *The Mdm2 RING domain C-terminus is required for supramolecular assembly and ubiquitin ligase activity*. Embo J, 2007. **26**(1): p. 90-101.
 181. Uldrijan, S., W.J. Pannekoek, and K.H. Vousden, *An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX*. Embo J, 2007. **26**(1): p. 102-12.

-
182. Wang, Y.V., et al., *Quantitative analyses reveal the importance of regulated Hdmx degradation for p53 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12365-70.
 183. Tanimura, S., et al., *MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains*. FEBS Lett, 1999. **447**(1): p. 5-9.
 184. Hernandez-Boussard, T., et al., *IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines*. International Agency for Research on Cancer. Hum Mutat, 1999. **14**(1): p. 1-8.
 185. Linares, L.K., et al., *HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12009-14.
 186. Stommel, J.M. and G.M. Wahl, *A new twist in the feedback loop: stress-activated MDM2 destabilization is required for p53 activation*. Cell Cycle, 2005. **4**(3): p. 411-7.
 187. Jablkowski, M., et al., *A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2005. **24**(1): p. 117-25.
 188. Schlott, T., et al., *Different gene expression of MDM2, GAGE-1, -2 and FHIT in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia*. Br J Cancer, 1999. **80**(1-2): p. 73-8.
 189. Westfall, M.D., et al., *The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(7): p. 2264-76.
 190. Somasundaram, K., et al., *Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 187-90.
 191. Kim, J.Y., et al., *Orphan nuclear receptor small heterodimer partner, a novel corepressor for a basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/neuroD*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(4): p. 776-90.
 192. Prabhu, S., et al., *Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(10): p. 5888-96.
 193. Claus, R. and M. Lubbert, *Epigenetic targets in hematopoietic malignancies*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6489-96.
 194. Kamijo, T., et al., *Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8292-7.
 195. Zheng, G. and Y.C. Yang, *ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42410-21.
 196. Calvisi, D.F., et al., *NORE1A tumor suppressor candidate modulates p21CIP1 via p53*. Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4629-37.
 197. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. Cell, 1998. **92**(6): p. 725-34.

-
198. Zhang, Z., et al., *MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16000-6.
 199. Bressac, B., et al., *Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1973-7.
 200. Supiot, S., R.P. Hill, and R.G. Bristow, *Nutlin-3 radiosensitizes hypoxic prostate cancer cells independent of p53*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(4): p. 993-9.
 201. Kussie, P.H., et al., *Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain*. Science, 1996. **274**(5289): p. 948-53.
 202. Macchiarulo, A., et al., *Targeting the conformational transitions of MDM2 and MDMX: insights into dissimilarities and similarities of p53 recognition*. J Chem Inf Model, 2008. **48**(10): p. 1999-2009.
 203. Patton, J.T., et al., *Levels of HdmX expression dictate the sensitivity of normal and transformed cells to Nutlin-3*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3169-76.
 204. Kawai, H., et al., *DNA damage-induced MDMX degradation is mediated by MDM2*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45946-53.
 205. LaRusch, G.A., et al., *Nutlin3 blocks vascular endothelial growth factor induction by preventing the interaction between hypoxia inducible factor 1alpha and Hdm2*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 450-4.
 206. Kranz, D. and M. Dobbstein, *Nongenotoxic p53 activation protects cells against S-phase-specific chemotherapy*. Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10274-80.
 207. Gartel, A.L. and A.L. Tyner, *The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(8): p. 639-49.
 208. Strachan, G.D., et al., *The E2F-1 transcription factor is negatively regulated by its interaction with the MDMX protein*. J Cell Biochem, 2003. **88**(3): p. 557-68.
 209. Wunderlich, M., et al., *MdmX represses E2F1 transactivation*. Cell Cycle, 2004. **3**(4): p. 472-8.
 210. Kadakia, M., et al., *MdmX inhibits Smad transactivation*. Oncogene, 2002. **21**(57): p. 8776-85.

7 Danksagung

Sehr geehrter Herr Professor Schirmacher, vielen Dank für die Möglichkeit, meine Arbeit in ihrer Gruppe durchführen zu können. Es war schön, dass Sie sich stets Zeit nahmen, und meine Arbeit durch hilfreiche und kritische Anregungen begleitet und unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Urban danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation vor der Biowissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg zu vertreten.

Thomas, Dir danke ich für die fachliche Betreuung, dafür, dass Du immer Zeit für mich hattest und vor allem dafür, dass Du beim Endspurt Überblick und Nerven behalten hast!

Ein besonderes Dankeschön geht an Antje. Du hast mir nicht nur oft in der Arbeit mit anregenden Diskussionen geholfen, ein Problem von einer anderen Seite zu betrachten, sondern standest mir auch in persönlich schweren Zeiten hilfreich zur Seite!

Ein großes Dankeschön geht auch an euch liebes Laborteam: Mona, Eva, Michaela, Marco, Olaf, Rossella, Elisabeth und Tanja! Eure stete Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima haben dazu beigetragen, den Laboralltag abwechslungsreich zu erleben.

Meinen Eltern möchte ich für ihre stete Unterstützung und Ihr Vertrauen in all den Jahren des Studiums danken. Ihre moralische und oft auch finanzielle Unterstützung haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Einen großen Dank auch an meine Geschwister Susan und Carsten, die mich immer wieder motiviert und angespornt haben. Es ist schön, dass ihr an mich glaubt und euch für das, was ich mache interessiert!

Dir, lieber Steven, danke ich von ganzem Herzen, dass es Dich in meinem Leben gibt! Du bist immer für mich da, wenn ich dich brauche, du gibst mir den Rückhalt und die Energie, das Vertrauen und die Ruhe, die ich brauche, um alle Aufgaben zu meistern!

Abschließend ein herzliches Dankeschön auch an alle anderen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen haben.