

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Sektion Molekularpathologie

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

GENKOPIEZAHIVERÄNDERUNGEN IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Marta Anna Swiatkowska

aus Danzig

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.09.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. G. Tiegs

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DAS HEPATOZELLULÄRE KARZINOM	1
1.1.1 <i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2 <i>Risikofaktoren</i>	1
1.1.3 <i>Pathologie</i>	3
1.1.4 <i>Diagnosestellung</i>	3
1.1.5 <i>Therapie</i>	6
1.2 GENETIK DES HEPATOZELLULÄREN KARZINOMS.....	8
1.3 METHODEN ZUR ANALYSE DER ZYTOGENETIK SOLIDER TUMOREN.....	10
1.3.1 <i>Methoden zur Identifikation von Amplifikationen</i>	10
1.3.2 <i>Tissue Microarrays</i>	12
1.4 ZIEL DER ARBEIT	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 REAGENZIEN UND MATERIALIEN	14
2.1.1 <i>Geräte</i>	14
2.1.2 <i>Array und Kits</i>	15
2.1.3 <i>Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien</i>	16
2.1.4 <i>Lösungen, Puffer und Medien</i>	18
2.1.5 <i>DNA-Sonden</i>	22
2.1.6 <i>Software</i>	23
2.2 UNTERSUCHUNGSMATERIAL.....	24
2.2.1 <i>Kryokonserviertes Tumorgewebe</i>	24
2.2.2 <i>Zelllinien</i>	25
2.2.3 <i>Datensätze der Gene Expression Omnibus Plattform</i>	25
2.2.4 <i>Datensätze aus dem Cancer Genome Project</i>	26
2.2.5 <i>Leber Tissue Microarray</i>	27
2.2.6 <i>Zelllinien Tissue Microarray</i>	28
2.3 METHODEN	34
2.3.1 <i>DNA-Extraktion aus Gewebe</i>	34
2.3.2 <i>DNA-Extraktion aus Zelllinien</i>	35
2.3.3 <i>Genome-Wide Human SNP Array 6.0</i>	36
2.3.4 <i>Kultivierung von Bacterial Artificial Chromosomes in E.coli</i>	46
2.3.5 <i>pBAC-DNA-Extraktion aus E. coli-Klonen</i>	47
2.3.6 <i>DIG-Nick-Translation</i>	48
2.3.7 <i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Paraffingewebe</i>	48
2.4 STATISTIK	51

3	ERGEBNISSE	52
3.1	GENOME-WIDE HUMAN SNP ARRAY 6.0	52
3.2	SELEKTION HOCHGRADIGER AMPLIFIKATIONSBEREICHE.....	58
3.2.1	<i>Deletionen</i>	61
3.2.2	<i>Amplifikationen</i>	62
3.3	FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	65
3.3.1	<i>Leber-TMA</i>	65
3.3.2	<i>Zelllinien-TMA</i>	75
4	DISKUSSION	77
5	ZUSAMMENFASSUNG	86
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	ANHANG	A
7.1	DANKSAGUNG	A
7.2	LEBENS LAUF	B
	ERKLÄRUNG	C

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AASLD: American Association for the Study of Liver Diseases

aCGH: array Comparative Genomic Hybridization

AFB₁: Aflatoxin B1

AFP: α -1-Fetoprotein

AK1-Lösung: Antikörper 1-Lösung

AK2-Lösung: Antikörper 2-Lösung

AK3-Lösung: Antikörper 3-Lösung

AML: akute myeloische Leukämie

ATCC: American Type Culture Collection

AXIN1: Axin 1

AXIN2: Axin 2

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

BCLC: Barcelona-Clinic-Liver-Cancer

B-NHL: B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom

BRCA3: breast cancer 3

BS: Blocking Solution

CCNA2: Cyclin A2

CCND1: Cyclin D1

CCNE1: Cyclin E1

CDH1: E-Cadherin

CDKN1B: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)

CEP: Chromosome Enumeration Probe

CGH: Comparative Genomic Hybridization

CK18: Cytokeratin 18

CK20: Cytokeratin 20

CK7: Cytokeratin 7

CK8: Cytokeratin 8

CLIP: Cancer of the Liver Italian Program

CLT: cadaveric liver transplantation

CNA: Copy Number Analysis

DAPI: 4',6-Diamin-2-phenylindol

DIG: Digoxigenin

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

dUTP: Desoxyuridintriphosphat

EBV: Epstein-Barr-Virus

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EDTA: Ethylendiamintetraacetat
EGF: epidermal growth factor
EGFR: epidermal growth factor receptor
ERBB2: v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
EtBr: Ethidiumbromid
EYS: eyes shut homolog (Drosophila)

FASLG: Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1
FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FNH: fokal noduläre Hyperplasie
FZD3: frizzled homolog 3 (Drosophila)

GEO: Gene Expression Omnibus

H.E.: Hämatoxilin-Eosin
HBV: Hepatitis B Virus
HCC: hepatozelluläres Karzinom
HCl: Chlorwasserstoff
HCV: Hepatitis C Virus
HDV: Hepatitis D Virus
HepPar-1: Hepatocyte
HGF: hepatocyte growth factor (hepapoietin A, scatter factor)
HIC1: hypermethylated in cancer 1
HIV: humanes Immundefizienz-Virus
HRAS: v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HSDNA: Herring Sperm DNA

IGF2: insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)

kb: Kilobasen
KCl: Kaliumchlorid
KDR: kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
KH₂PO₄: Kaliumhydrogenphosphat
KRAS: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LB: Luria Broth
LDLT: living donor liver transplantation
LEF1: lymphoid enhancer-binding factor 1
LOH: loss of heterozygosity

M6PR: mannose-6-phosphate receptor (cation dependent)
MEF2B: myocyte enhancer factor 2B
MET: met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)

MLLT11: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
MMP14: matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
MMP9: matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)

Na₂HPO₄: Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl: Natriumchlorid
NaOH: Natriumhydroxid
NHL: Non-Hodgkin-Lymphom
NRAS: neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog

OR4M2: olfactory receptor, family 4, subfamily M, member 2

p14: protein 14
p16: protein 16
p53: protein 53
PBS: Phosphate Buffered Saline Working Solution
pCEA: polyklonales Antiserum gegen Carcinoembryonales Antigen
PCM1: pericentriolar material 1
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
PDGF: platelet-derived growth factor
PEI: perkutane Ethanolinjektion
PIK3A: phosphoinositide-3-kinase adaptor
PLK3: polo-like kinase 3
PST: performance status
PTEN: phosphatase and tensin homolog
PTK7: protein tyrosine kinase 7

RB1: retinoblastoma 1
RF: Radiofrequency Ablation
RFTA: Radiofrequenzthermoablation
RHOC: ras homolog gene family, member C

SIAH1: seven in absentia homolog 1 (Drosophila)
SMAD2: SMAD family member 2
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SPLAT: SNP 6.0 Probe Level Access Tool
src: sarcoma

TACE: transarterielle Chemoembolisation
TAE-Puffer: Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TERT: telomerase reverse transkriptase
TGFA: transforming growth factor, alpha
TGFB1: transforming growth factor, beta 1

THOC1: THO complex 1
TIMP2: TIMP metalloproteinase inhibitor 2
TMA: Tissue Microarray
TMACL: Tetramethyl Ammonium Chloride
TNM: Tumor – Nodus – Metastase
ttc: treatment

UKE: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UNC5D: unc-5 homolog D (*C. elegans*)
USA: United States of America
USP22: ubiquitin specific peptidase 22
UV-Schlitten: Ultraviolett-Schlitten

VEGF: vascular endothelial growth factor
VEGFA: vascular endothelial growth factor A

WHO: World Health Organisation
WISP1: WNT1 inducible signaling pathway protein 1
WNT9A: wntless-type MMTV integration site family, member 9A

YES1: v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1

1 EINLEITUNG

1.1 *Das hepatozelluläre Karzinom*

1.1.1 Epidemiologie

Primäre Neoplasien der Leber, welche zu 85-90% der Fälle hepatozelluläre Karzinome (HCCs) sind (El-Serag and Rudolph, 2007), stellen mit 564000 Erkrankungen jährlich die fünfthäufigste Malignität dar. Eine Todesrate von 549000 Menschen jährlich lässt diese Tumoren an Platz drei der weltweiten krebsbedingten Todesursachen erscheinen (Parkin, 2001). Die höchsten Fallzahlen weisen Afrika und Asien auf. In Europa und Amerika sind die Inzidenzraten vergleichsweise geringer (El-Serag and Rudolph, 2007), wobei die Vereinten Nationen in den letzten Jahren eine steigende Mortalität sowie Inzidenz zu verzeichnen haben (El-Serag and Mason, 1999, Jemal et al., 2009). Männer sind mit einer Rate von 2:1 bis 4:1 deutlich häufiger betroffen als Frauen, welche meist eine geringere Exposition gegenüber Risikofaktoren aufweisen (El-Serag and Rudolph, 2007).

1.1.2 Risikofaktoren

Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms ist die Leberzirrhose. Etwa 70% bis 90% aller Leberzellkarzinome entstehen auf dem Boden einer chronischen Lebererkrankung. Jeder Einfluss, der zu einer Zirrhose führen kann, erhöht automatisch auch das Risiko für die Erkrankung an einem hepatozellulären Karzinom. Eine kontinuierliche Entzündungsreaktion mit andauernder Zellregeneration wird als Ursache chromosomaler Instabilität und im Folgenden hepatischer Karzinogenese angesehen. Desweiteren führen virale, toxische, metabolische sowie immunbedingte Faktoren zu einem erhöhten Risiko für ein HCC (El-Serag and Rudolph, 2007, Badvie, 2000, Gomaa et al., 2008, Coussens and Werb, 2002, Mantovani et al., 2008).

Zu den viralen und zugleich auch häufigsten begünstigenden Faktoren zählen das Hepatitis Virus B und C. HBV- und HCV-Infizierte haben ein 5-17fach erhöhtes Risiko an einem HCC zu erkranken als die restliche Bevölkerung. Das Virus begünstigt die Entstehung einer Fibrose und Zirrhose der Leber, worin sich die meisten Hepatitis-abhängigen HCCs entwickeln. Begünstigend für die

EINLEITUNG

Tumorentstehung sind zudem Koinfektionen beider Viruspezies sowie mit dem Hepatitis D (HDV) und dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), als auch ein Zusammentreffen einer Hepatitis-Infektion mit anderen Risikofaktoren.

Ein starker Alkoholkonsum von mehr als 50-70 g täglich korreliert stark mit der Entwicklung einer Leberzirrhose. Zusätzliche einwirkende begünstigende Faktoren erhöhen dieses Risiko und somit die Wahrscheinlichkeit, ein Leberzellkarzinom zu entwickeln.

Zur Gruppe der toxischen Risikofaktoren gehört neben dem Alkohol vor allem das Karzinogen Aflatoxin B1 (AFB₁), welches vom *Aspergillus flavus* produziert wird, einem Pilz, der vorwiegend auf Nahrungsvorräten wie Getreiden oder Nüssen der warmen Regionen der Erde zu finden ist. Dieses Aflatoxin kann nach Aufnahme in den Körper DNA-Schäden verursachen, unter anderem eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53, welche in ca. 30-60% aller HCCs der Aflatoxin-endemischen Regionen zu finden ist. Eine erhebliche Erhöhung des Risikos an einem HCC zu erkranken haben Individuen mit gleichzeitiger Hepatitis-B-Infektion und einer durch Aflatoxine belasteten Ernährung.

Pestiziden stehen ebenfalls in der Diskussion, das Tumorrisiko bei gleichzeitiger Hepatitis-Infektion durch Verursachen von genetischen Alterationen, oxidativen Stress und Inhibition der Apoptose zu erhöhen.

Ein Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit, Diabetes mellitus, der daraus folgenden Fettleber, sowie der Steatohepatitis und der Entwicklung eines HCCs wurde bereits bewiesen und beruht auf den Mechanismen der Zellschädigung in der fibrotischen und entzündlichen Leber.

Zu den weiteren weitaus selteneren Risikofaktoren gehören Hämochromatose, α -1-Antytrypsin-Mangel, Autoimmunhepatitis, Porphyrinen, primär biliäre Zirrhose und Schistosomiasis.

Einen protektiven Effekt bei der Karzinogenese hat Kaffee. Aufgrund des geringeren Risikos für die Entwicklung einer Zirrhose reduzieren etwa 2-4 Tassen täglich das HCC-Risiko um etwa 25-75% im Vergleich zu keinem Kaffeekonsum (El-Serag and Rudolph, 2007, Gomaa et al., 2008).

1.1.3 Pathologie

Makroskopisch lassen sich massive, multinoduläre sowie diffuse Typen mit oder ohne Kapsel unterscheiden. Die Farbe variiert von gelb, grau-weiß über braun-rot oder grünlich. Einblutungen, Nekrosen und Gefäßeinbrüche sind häufig.

Mikroskopisch ist eine trabekuläre, tubuläre oder papilläre Anordnung anzutreffen. Die Zellen weisen prominente und irreguläre Nuklei sowie Nukleoli und eine Verschiebung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses zugunsten der Kerne auf. Die Zellen erscheinen hyperchromatisch mit ausgeprägten Zellmembranen, im eosinophilen Zytoplasma findet man verschiedene Einschlüsse wie zum Beispiel Gallepigment, zytoplasmatisches Fett und Glykogen, Mallory-Körper und α_1 -Antitrypsin.

Immunhistologisch können in manchen hepatozellulären Karzinomen polyklonales Antiserum gegen Carcinoembryonales Antigen (pCEA), Hepatocyte (HepPar-1), α -1-Fetoprotein (AFP) und verschiedene Zytokeratine (CK7, CK8, CK18 und CK20) nachgewiesen werden (Goodman ZD, 2007).

1.1.3.1 Fibrolamelläres Karzinom

Eine Sonderform des HCC ist das fibrolamelläre Karzinom, welches gehäuft bei jungen Patienten beiderlei Geschlechts ohne Leberzirrhose oder andere Risikofaktoren auftritt. Es ist langsam wachsend, kann meist chirurgisch reseziert oder durch eine Lebertransplantation entfernt werden und bietet bessere Überlebensraten gegenüber dem gewöhnlichen HCC. Mikroskopisch äußert es sich durch Zellen mit deutlich eosinophilem Zytoplasma, welche trabekuläre Zellansammlungen zwischen lamellär angeordnetem zellarmen kollagenen Bindegewebe bilden (Goodman ZD, 2007).

1.1.4 Diagnosestellung

Klinische Erscheinungsmerkmale eines hepatozellulären Karzinoms sind: Schmerzen im rechten oberen Bauchquadranten, Gewichtsabnahme, erhöhte Leberenzyme im Blut und eine Anämie bei Patienten mit bekannter Leberzirrhose. Seltener anzutreffen ist ein akutes Abdomen aufgrund eines rupturierten und blutenden HCCs oder extrahepatische paraneoplastische

EINLEITUNG

Manifestationen wie Hypoglykämie, Hyperkalzämie, Erythrozytose und Thyreotoxikose. Zusätzlich zu den meist vorhandenen Zeichen der Zirrhose wie Ikterus, Palmarerythem, Gynäkomastie und portale Hypertension können auch systolische Lebergeräusche auftreten. Meist verläuft die Erkrankung lange asymptomatisch, sodass Diagnosen oft erst im Spätstadium gestellt werden (El-Serag et al., 2008).

Das HCC wird diagnostiziert mithilfe bildgebender Verfahren (Sonografie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie), Leberbiopsien und der AFP-Bestimmung im Blut. Die geeigneten Verfahren sowie die Abfolge derer sind von der Größe der Läsion abhängig. Einen Algorithmus zum diagnostischen Ablauf hat die American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) herausgegeben (Bruix and Sherman, 2005).

1.1.4.1 Screening und Surveillance

Aufgrund des signifikant höheren HCC-Risikos bei Patienten mit bestimmten Risikofaktoren sollten diese bei Surveillance-Programmen teilnehmen, bei welchen wiederholt Screening-Tests durchgeführt werden. Aktuelle Richtlinien zum Management des Leberzellkarzinoms nach AASLD empfehlen eine Surveillance für Patienten mit Leberzirrhose aufgrund folgender Grunderkrankungen: Hepatitis C, alkoholischer Zirrhose, genetischer Hämochromatose und primär biliärer Zirrhose. Desweiteren wird es empfohlen für alle Hepatitis-B-Virus-Träger, welche eine Leberzirrhose oder ein HCC in der Familienanamnese aufweisen, Patienten mit hoher HBV-DNA-Konzentration und starker inflammatorischer Aktivität, asiatische Männer ab dem Alter von 40 Jahren, asiatische Frauen ab dem Alter von 50 Jahren und afrikanische Patienten, welche älter als 20 Jahre sind. Für Hepatitis-B-Träger ohne Leberzirrhose und oben genannte Modalitäten ist das Risiko unklar, sodass der Nutzen eines Surveillance-Programmes jeweils individuell unter Berücksichtigung der Schwere der Lebererkrankung und vergangener sowie aktueller Entzündungsaktivität abgewogen werden sollte.

Im Rahmen dieser Überwachung wird bei den genannten Gruppen halbjährlich ein Screening mithilfe einer Leberultraschalluntersuchung durchgeführt. Eine zusätzliche Bestimmung des AFP ist in den meisten Zentren die Regel, sollte jedoch nicht als alleiniger Screeningtest genutzt werden. Bei Nachweis einer Raumforderung in der Leber ist eine weitere Diagnostik erforderlich, siehe Kapitel Diagnosestellung (Bruix and Sherman, 2005).

1.1.4.2 Staging

Für das hepatozelluläre Karzinom gibt es verschiedene Staging-Systeme, u.a. die TNM-Klassifikation (Tumor – Nodus - Metastase), Okuda-Kriterien, Cancer of the Liver Italian Program-Kriterien (CLIP) und das Barcelona-Clinic-Liver-Cancer-Staging (BCLC) System. Alle berücksichtigen bestimmte Parameter wie Tumorgröße, Tumorausbreitung, Leberfunktion und Allgemeinzustand des Patienten in unterschiedlicher Gewichtung. Weltweit gibt es keine Einigung über ein einheitliches System, wobei die Barcelona-Clinic-Liver-Cancer Einteilung bevorzugt eingesetzt wird, da sie als Einzige eine Klassifikation mit Therapievorschlügen assoziiert, siehe Abbildung 1. Zur Einteilung werden dort herangezogen: Tumorstadium, Leberfunktion über die Child-Pugh-Klassifikation und Körperstatus über den ECOG/WHO-Score (Eastern Cooperative Oncology Group/World Health Organisation) (Oken et al., 1982, Verslype et al., 2009, Llovet et al., 2008a).

	BCLC stage				
	Very early stage (0)	Early stage (A)	Intermediate stage (B)	Advanced stage (C)	Terminal stage (D)
Child-Pugh classification	A	A-B	A-B	A-B	C
Performance status	0	0	0	1-2	3-4
Tumor status	1 HCC <2cm <i>Carcinoma in situ</i>	1 HCC or 3 nodules <3cm	Multinodular	Portal invasion or N1/ M1	Terminal stage

Abbildung 1: Barcelona-Clinic-Liver-Cancer Einteilung des HCC, Quelle: Llovet et al., 2008a

1.1.5 Therapie

Den Algorithmus zur Einstufung sowie Therapie des hepatozellulären Karzinoms liefert das Barcelona-Clinic Liver Cancer Staging aus Abbildung 2 (Llovet et al., 2008a).

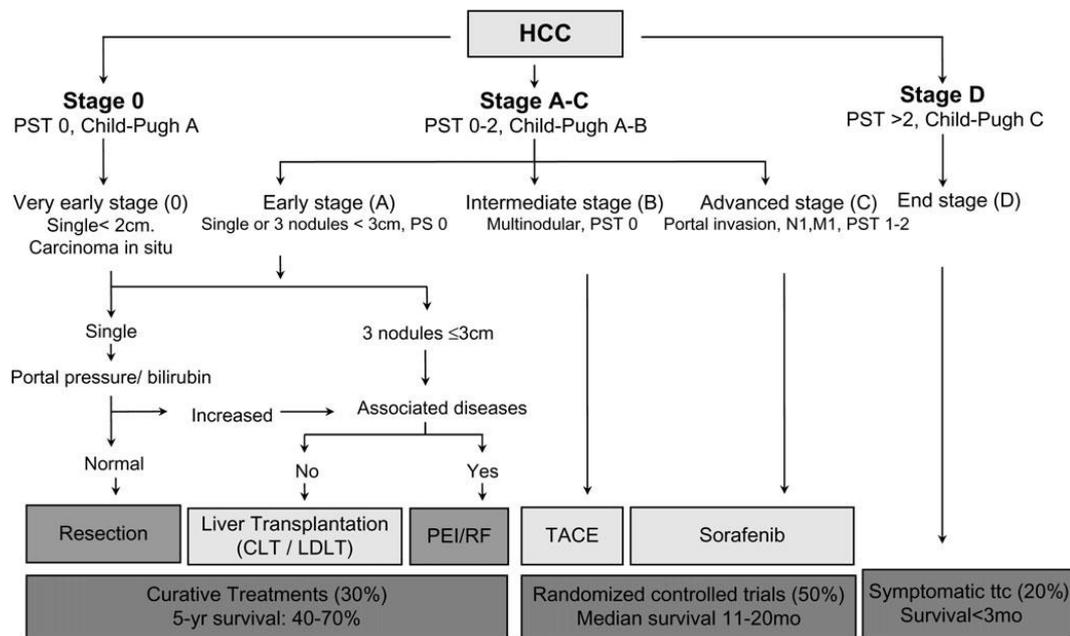


Abbildung 2: Barcelona-Clinic Liver Cancer Staging mit Therapieempfehlung und Überlebensdaten; PST: performance status, CLT: cadaveric liver transplantation, LDLT: living donor liver transplantation, ttc: treatment, PEI: percutaneous ethanol injection, RF: radiofrequency ablation, TACE: transarterial chemoembolization; Quelle Llovet et al., 2008a

Als Möglichkeiten zur Behandlung einer Leberzellkarzinoms stehen zur Wahl die chirurgische Resektion, Lebertransplantation, Tumorablation, transarterielle Chemoembolisation, molekulare Therapieansätze sowie weniger verbreitete Therapieoptionen auf die im Folgenden nicht näher eingegangen wird.

Die Therapie der Wahl bei Patienten ohne Leberzirrhose, dies entspricht etwa 5-15% aller Fälle, ist die chirurgische Leberresektion. Bei bereits vorhandener Zirrhose kann man lediglich mit einer Lebertransplantation den Nährboden sowie den Tumor mit zusätzlicher Minimierung der Rezidivwahrscheinlichkeit entfernen. Erkrankte im Frühstadium profitieren von einer Tumorablation, wenn Kontraindikationen vorliegen, die gegen eine Resektion oder Transplantation sprechen. Die beiden am häufigsten verwendeten Methoden sind die perkutane Ethanolinjektion (PEI) und die Radiofrequenzthermoablation (RFTA). Bei der PEI

EINLEITUNG

wird Ethanol minimalinvasiv direkt in die Läsionen injiziert und ruft dort eine Tumornekrose hervor, bei der RFTA wird mit einer Elektrode eine Nekrose des Gewebes durch Wärmeentwicklung eines Hochfrequenzstroms erzeugt (Lau and Lai, 2009). Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) wird bei HCCs im intermediären Stadium angewandt. Der arterielle Verschluss und gleichzeitige intraarterielle Gabe eines Chemotherapeutikums und Kontrastmittels induzieren eine ausgiebige Tumornekrose. Für das HCC im fortgeschrittenen Stadium wird eine systemische Therapie mit dem Multikinaseinhibitor Nexavar (Sorafenib, Bayer Healthcare AG, Leverkusen) empfohlen (Llovet et al., 2008b, El-Serag et al., 2008).

1.2 Genetik des hepatozellulären Karzinoms

In Lebertumoren zeigen sich gehäuft bestimmte Störungen des Erbgutes. Die Zellzyklusregulation ist häufig durch Punktmutationen oder einen loss of heterozygosity (LOH) im bekannten Tumorsuppressorgen p53, eine Stilllegung des p16 oder des Retinoblastom-Gens oder eine vermehrte Expression von Cyclin D1 (CCND1) gestört. Die Angiogenese kann durch Sekretion vom vascular endothelial growth factor (VEGF), dem platelet-derived growth factor (PDGF) sowie angiopoietin-2 oder eine hochgradige Amplifikation vom vascular endothelial growth factor A (VEGFA) kritisch dysreguliert werden (Chiang et al., 2008). Eine Reaktivierung der telomerase reverse transkriptase (TERT) führt zu einem grenzenlosen replikativen Potenzial, welches ebenfalls gehäuft bei entarteten Leberzellen nachgewiesen wurde. Die Umgehung der Apoptose wird hier häufig durch Dysregulation dafür relevanter Signalwege erreicht (Llovet and Bruix, 2008).

Bisherige Comparative Genomic Hybridization Analysen (CGH, siehe Kapitel 1.3.1.1) zeigen in den meisten Fällen folgende Bereiche mit vermehrter Genkopiezahl (Gains) in hepatozellulären Karzinomen: 1q (38-78%), 6p (22-35%), 8q (30-67%), 17q (22-37%), und 20q (30-41%). Einige Studien führen zusätzlich Gains im Bereich von 5p (30-40%), 5q (30%), 7p (32-35%), 7q (32-35%), 9p, 10q, 11q (31%, davon in 5% hochgradig vermehrt) sowie 19q (30%) auf. Eine verminderte Kopiezahl wurde in den meisten Untersuchungen für folgende chromosomale Abschnitte beobachtet: 1p (30-36%), 4q (30-75%), 6q (25-37%), 8p (30-80%), 13q (26-37%), 16q (30-70%), 17p (30-52%), einige Arbeitsgruppen beweisen zudem Verluste bei 9 (30%), 18q (30%) 19p (42%) und 22q (Villanueva et al., 2007, Moizadeh et al., 2005, Lau and Guan, 2005). Als Kandidaten in den genannten Bereichen mit Funktionen, die eine Kanzerogenese begünstigen können, werden unter anderem die im Folgenden vorgestellten Gene gesehen. Bereiche mit möglichen Onkogenen sind: 1q mit WNT9A (wingless-type MMTV integration site family, member 9A) und FASLG (Fas ligand (TNF superfamily, member 6)), 8q mit MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)) und WISP1 (WNT1 inducible signaling pathway protein 1), sowie 17q mit AXIN2 (axin 2) und TIMP2 (TIMP metalloproteinase inhibitor 2). Diskutierte Tumorsuppressorgene sind folgende: 4q mit LEF1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) und CCNA2 (Cyclin A2), 8p mit FZD3 (frizzled homolog 3 (Drosophila)) und PLK3 (polo-like kinase 3), 13q mit RB1 (retinoblastoma 1) und BRCA3 (breast cancer 3), 16q mit SIAH1 (seven in absentia homolog 1 (Drosophila)) und CDH1 (E-Cadherin) sowie 17p mit p53 (protein 53) und HIC1 (hypermethylated in cancer 1) (Moizadeh et al., 2005).

EINLEITUNG

Zu den bereits validierten Mutationen mit bestimmten Zielgenen zählen hier vor allem Deletionen in den Bereichen 4q (Cyclin A2), 13q (Rb1), 16q (das E-Cadherin) und 17p (p53). Hochgradige Amplifikationen können zudem in etwa 5% der Fälle auf dem Chromosom 11q13 im Bereich der CCND1 Genes sowie in 4-6% auf dem Chromosom 6p21 im Bereich der VEGFA Genes nachgewiesen werden (Llovet and Bruix, 2008).

Somatische Mutationen konnten im p53 in 0-67%, in β -Catenin in 0-44% und in seltenen Fällen auch im AXIN1 (Axin 1) in 4-14%, PIK3A (phosphoinositide-3-kinase adaptor) in 0-35%, PTEN (phosphatase and tensin homolog) in 0-11%, HRAS (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) in 9%, NRAS (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog) in 3% und KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) in 3-42% gezeigt werden (Llovet and Bruix, 2008, Villanueva et al., 2007).

Trotz häufiger Störungen im Bereich der Gene EGFR (epidermal growth factor receptor) und ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)) in anderen Tumoren konnte ihnen im HCC keine Bedeutung zugeschrieben werden (Llovet and Bruix, 2008).

Expressionsanalysen zeigen erhöhte Werte folgender Genprodukte in hepatozellulären Karzinomen: β -Catenin, MYC, TGFA (transforming growth factor, alpha), IGF2 (insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)), MET (met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)), HGF (hepatocyte growth factor (hepapoietin A, scatter factor)), EGFR, EGF (epidermal growth factor), RB1, Survivin, VEGF, KDR (kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)), Angiopoietin-2, RHOC (ras homolog gene family, member C), MMP14 (matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)), MMP9 (matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)), Topoisomerase 2A und Osteopontin sowie erniedrigte Werte folgender Genprodukte: E-Cadherin, PTEN, M6PR (mannose-6-phosphate receptor (cation dependent)), TGFB1 (transforming growth factor, beta 1), SMAD2 (SMAD family member 2), p53, p16 (protein 16), p14 (protein 14), CDKN1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)), CCND1 und Kangai 1 (Villanueva et al., 2007).

Eine genomische Instabilität sowie epigenetische Alterationen assoziiert mit erhöhter Telomeraseaktivität, Telomerverkürzung (Farazi et al., 2003) und Methylierung mit Folge der Inaktivierung sowie Veränderungen der für die DNA-Reparatur zuständigen Gene werden ebenfalls als zusätzliche Faktoren der Entstehung des HCCs angesehen (Llovet and Bruix, 2008).

1.3 Methoden zur Analyse der Zytogenetik solider Tumoren

Solide maligne Tumoren entwickeln sich nach einer gängigen Theorie aus mindestens drei kritischen Ereignissen in wichtigen intrazellulären Signaltransduktionswegen (Vogelstein and Kinzler, 2004). Für eine Entartung von Gewebe müssen einige der sechs Zellfunktionsbereiche dysreguliert werden: die Selbstständigkeit der Wachstumssignale, eine Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, das Umgehen der Apoptose, ein grenzloses replikatives Potenzial, eine Fortsetzung der Angiogenese sowie Tumorinvasion und Metastasen (Hanahan and Weinberg, 2000). Prozesse, die bei Entzündungsreaktionen einer Zelle ablaufen, werden als zusätzlicher siebter die Tumorentstehung begünstigender Bereich gesehen (Colotta et al., 2009).

Eine Störung der genannten Signalwege kann auf verschiedene Weisen erfolgen, zum einen durch Aktivierung eines Onkogens oder durch Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens. Onkogene können durch Punktmutationen, epigenetische Veränderungen oder Genkopiezahlveränderungen aktiviert werden. Tumorsuppressorgene werden durch einen loss of heterozygosity, Punktmutationen, epigenetische Stilllegung der Gene oder eine aberrierende Transkription dominant-negativer Proteine stillgelegt (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Amplifikationen (Zugewinne von Genkopien) von Onkogenen sowie Deletionen (Verluste von Genkopien) von Tumorsuppressorgenen können im bedeutenden Umfang eine Kanzerogenese initiieren und diese beschleunigen, weshalb der Fokus der vorliegenden Arbeit auf diese Erbgutveränderungen gerichtet wird.

1.3.1 Methoden zur Identifikation von Amplifikationen

In den letzten Jahren wurden verschiedene Strategien entwickelt, um genetische Aberrationen im Genom aufzudecken. Eine Auswahl dessen soll im Folgenden vorgestellt werden.

1.3.1.1 Comparative Genomic Hybridization

Eine klassische Methode zur Untersuchung von chromosomalen Aberrationen im Genom bietet die CGH. Mit dieser ist es möglich, Amplifikationen oder Deletionen über konkurrierende Hybridisierung mit einer Auflösung von bis zu fünf Megabasen zu detektieren. Sie beruht auf dem Vergleich von zu untersuchender Tumor-DNA und einer Referenz-DNA eines gesunden Patienten. Beide DNAs werden unterschiedlich farbmarkiert, auf Metaphase-Chromosomen hybridisiert und digital analysiert (Kallioniemi et al., 1992).

1.3.1.2 Array Comparative Genomic Hybridization

Eine weiterentwickelte Methode, die auf dem Prinzip der klassischen CGH beruht, ist die array Comparative Genomic Hybridization (aCGH). Dort sind auf einem Objektträger DNA-Fragmente rasterförmig aufgebracht, die z.B. einen Genomabschnitt höher auflösend abdecken. Die Auflösung kann auf diese Weise erheblich, bis auf 100 Kilobasen (kb) genau, verbessert werden (Shinawi and Cheung, 2008).

1.3.1.3 Single Nucleotide Polymorphism Array

Eine andere Möglichkeit einer arraybasierenden Anwendung wurde von der Firma Affymetrix als Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP Array) entwickelt. Es werden dabei Variationen der DNA an einer einzelnen Base analysiert. Diese Polymorphismen treten häufig (ca. 10 Millionen bekannt) und hochgradig konserviert im humanen Genom auf. Im Gegensatz zur klassischen CGH werden bei den SNP-Arrays nicht mehr Tumor- und Referenz-DNA konkurrierend hybridisiert. Vielmehr sind auf dem Array Nukleinsäure-Sequenzen immobilisiert, welche die SNPs enthalten. Die Tumor-DNA wird nach der Prozessierung auf den Array aufgetragen und die Hybridisierungsintensitäten digital ausgewertet. Hierbei wird also nur noch eine Farbmarkierung benötigt. An Stelle einer Referenz-DNA wird ein Set von Referenzproben verwendet, welche relative Intensitätsratios für jeden SNP liefern. Neben der Anwendung in der Krankheitsforschung (z.B. Risiko einer Erbkrankheit bei Kinderwunsch), lässt sich ein SNP-Array auch für die Untersuchung von Genkopiezahl-Veränderungen verwenden. Die neueste auf dem Markt erhältliche Version ist der Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, United States of America (USA)), bei welchem die Marker einen durchschnittlichen Abstand von ca. 0,7 Kilobasen aufweisen und somit eine viel höhere Auflösung als die klassische CGH erreichen können (McCarroll et al., 2008, Hoyer et al., 2007).

Die Anwendung der hier vorgestellten genomischen Untersuchungsmethoden ist heutzutage sehr verbreitet. Es bestehen offene sowie zugriffsbeschränkte Datenbanken, um die Rohdaten der Array-Experimente zu verwalten und öffentlich zugänglich zu machen.

1.3.1.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine zytogenetische Methode zum zielgerichteten Nachweis bestimmter chromosomaler Abschnitte bzw. Veränderungen. Die Auflösung wird durch die Größe der gewünschten eingesetzten Sonde bestimmt, die an einen definierten Locus im Genom bindet und über spezifische Antikörperreaktionen sichtbar gemacht werden kann. Sie ermöglicht somit eine exakte Bestimmung der Kopiezahl am vorliegenden Inter- oder Metaphasekern einer Zelle und damit die Untersuchung einer Amplifikation oder Deletion. Ein weiterer Vorteil der FISH ist die Möglichkeit der Aufdeckung von Heterogenität im Gewebe, z.B. einer Beimischung von gesunden Zellen im zu analysierenden pathogenen Gewebe während der Untersuchung, was bei Screeningmethoden wie der aCGH nicht möglich ist (Levsky and Singer, 2003).

1.3.2 Tissue Microarrays

Der Einsatz der Gewebearray Technik (Tissue Microarray, TMA) ermöglicht eine standardisierte Untersuchung von bis zu 1000 gestanzten Gewebeproben auf nur einem Objektträger. Durch die Möglichkeit einer gleichzeitigen Behandlung aller Gewebe mit nur einem Satz von Reagenzien ermöglicht diese Technik eine schnelle und kostengünstige Hochdurchsatzanalyse der Gewebe (Kononen et al., 1998).

Die Möglichkeit, mit der SNP-Chipanalyse relevante Kandidatengene für die HCC-Entstehung aufzuzeigen und die Verfügbarkeit von einem Archiv an Tissue Microarrays verschiedenster Tumorentitäten am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE), an denen die relevanten Gene weitergehend untersucht werden können, bieten optimale Voraussetzungen für die vorliegende Studie.

1.4 Ziel der Arbeit

Das hepatozelluläre Karzinom ist eine der häufigsten Malignitäten weltweit mit stark begrenzten Therapiemöglichkeiten und einer sehr schlechten Prognose. Genetische Aberrationen sind häufige Ursachen der Tumorentstehung sowie Tumorprogression, für das HCC konnten bisher nur wenige nachgewiesen werden (Chiang et al., 2008, Llovet and Bruix, 2008, Villanueva et al., 2007).

Die Entdeckung eines neuen Onkogens oder Tumorsuppressorgens mit Relevanz für das HCC würde gleichzeitig ein neues mögliches Ziel für Therapieansätze aufzeigen und könnte zu einem Durchbruch im Kampf gegen diesen Tumor verhelfen.

Die Analyse von nur wenigen Proben mithilfe des SNP-Arrays könnte bereits auf einen auffälligen Locus hinweisen, der sich als häufige Amplifikation bzw. Deletion in der Gesamtheit der HCCs widerspiegelt.

An unserem Institut haben wir nicht nur die Möglichkeit kryokonservierte hepatozelluläre Karzinome selbst mit der zum heutigen Zeitpunkt neuesten Version des Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 zu analysieren, sondern auch den Zugang zu weltweit öffentlichen, aber auch zugriffsbeschränkten Datenbanken mit bereits erhobenen Rohdaten der SNP-Arrays.

Mit der uns vorliegenden Auswahl an Tissue Microarrays können wir zudem schnell und effektiv auffällige Veränderungen an einer Vielzahl von HCCs und anderen malignen Entitäten sowie Zelllinien in einer Hochdurchsatzanalyse überprüfen.

Im Rahmen dieser Studie sollen hepatozelluläre Karzinome der institutseigenen Tumorbank mithilfe des Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 analysiert werden. Für eine anschließende Übersicht aller auffälligen genetischen Aberrationen im HCC sollen zudem bereits erstellte und zur Verfügung gestellte Affymetrix SNP-Array Rohdaten verschiedener externer Datenbanken ausgewertet werden.

Besonders auffällige und rekurrente Amplifikationen sollen im Anschluss in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf verschiedenen Tissue Microarrays überprüft, genau charakterisiert und weiterführend untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien und Materialien

2.1.1 Geräte

Eine Übersicht verwendeter Geräte liefert Tabelle 1.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
AxioCam MRc 5	Zeiss (Jena)
Biofuge 13	Heraeus (Hanau)
Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg)
Dampfsterilisator Varioklav 400	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Digital pH Meter PH525	WTW (Weilheim)
DNA/RNA UV-Cleaner UVT-S-AR	Biosan (Riga, Lettland)
Fireboy	Tecnomara (Wallisellen)
Geldokumentationsanlage De Vision DBOX	Decon Science Tec (Hohengandern)
Gelelektrophoresekammer Model 40-1410	Bio-Rad (Hercules, USA)
Gelelektrophoresekammer Wide Mini Sub Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
GeneChip Fluidics Station	Affymetrix (Santa Clara, USA)
GeneChip Hybridization Oven 640	Affymetrix (Santa Clara, USA)
GeneChip Scanner 3000 7G	Affymetrix (Santa Clara, USA)
GFL-Schüttelinkubator 3031	GFL (Burgwedel)
HBO 100	Leistungselektronik Jena (Jena)
Heizplatte Typ 12801	Medax (Neumünster)
Heizrührer Ikamag Ret	Ika (Staufen)
Magnetrührer Ikamag RH	Ika (Staufen)
Magnetrührer RET-GS Ikamag	Ika (Staufen)
MC 6 Centrifuge	Sarstedt (Nümbrecht)
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand (Wertheim)
Metallhalogenidlampe HXP 120	Zeiss (Jena)
Mikroskop Axio Imager A1	Zeiss (Jena)
MS1 Minishaker	Ika (Staufen)
Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau)
Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab (Erlangen)

MATERIAL UND METHODEN

Gerät	Firma
Pipettierhilfe Accu-jet	Brand (Wertheim)
PTC-100 Peltier Thermal Cycler	MJ Research (Waltham, USA)
PTC-100 Programmable Thermal Controller	MJ Research (Waltham, USA)
Reinstwassersystem	Membrapure (Bodenheim)
Schüttelinkubator IH 50 K15/300	Incutec (Kernersville, USA)
Schüttelmaschine LS 10	Gerhardt (Königswinter)
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad (Hercules, USA)
Spannungsquelle Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Thermobrite Statspin	Abbott (Wiesbaden)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank/Inkubationsofen	Memmert (Schwabach)
Vero Power, Power Supply 231	Eplax (Bremen)
Vortex Vibrofix VF1	Ika (Staufen)
Waage AE100	Mettler-Toledo (Giessen)
Waage PJ3000	Mettler-Toledo (Giessen)
Wärmeschrank Typ 1705309900312	WTB Binder (Tuttlingen)
Wasserbad Typ 1002	GFL (Burgwedel)
Wasserbad Typ 1003	GFL (Burgwedel)
Wasserbad Typ 1083	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Sigma 2K15	B. Braun Melsungen (Melsungen)

2.1.2 Array und Kits

Der benutzte Array und vorgefertigte Kits sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Verwendeter Array und Kits

Array/Kit	Firma
Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Genome-Wide Human SNP Array 6.0	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 5.0/6.0	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Nick Translation System	Invitrogen (Paisley, UK)
Nspl	New England Biolabs (Ipswich, UK)

MATERIAL UND METHODEN

Array/Kit	Firma
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Styl	New England Biolabs (Ipswich, UK)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich, UK)
TITANIUM DNA Amplification Kit	Clontech (Mountain View, USA)

2.1.3 Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Die Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die zur Anwendung kamen, sind in einer Übersicht in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Verwendete Enzyme, Reagenzien und Materialien

Enzyme, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien	Firma
10% Surfact-Amps	Thermo Scientific (Waltham, USA)
20X SSC	Abbott (Wiesbaden)
20X SSPE	Lonza (Basel, Schweiz)
5M NaCl, Rnase-free, Dnase-free	Applied Biosystems (Foster City, USA)
80% Ethanol	Th. Geyer (Renningen)
96% Ethanol	Th. Geyer (Renningen)
Acetat	Merck (Darmstadt)
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen (Paisley, UK)
Agencourt Ampure	Beckman Coulter (Fullerton, USA)
Anti-streptavidin antibody (goat), biotinylated	Vector (Burlingame, USA)
Bleach	VWR (West Chester, USA)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Cot Human DNA	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Deionisiertes Fornamid	Merck (Darmstadt)
Denhardt´s Solution, 50x concentrate	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dextransulfat	Fluka (St. Louis, USA)
Digoxigenin-11-dUTP (Desoxyuridintriphosphat)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNA Polymerase I	Invitrogen (Paisley, UK)
EDTA (Ethylendiamintertaacetat)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Th. Geyer (Renningen)

MATERIAL UND METHODEN

Enzyme, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien	Firma
Ethidium Bromide	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution for molecular biology, 0.5 M	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fixogum	Marabu (Tamm)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas (Ontario, Kanada)
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Fermentas (Ontario, Kanada)
Glycerol anhydrous	Fluka (St. Louis, USA)
HCl (Chlorwasserstoff)	Merck (Darmstadt)
Herring Sperm DNA (HSDNA)	Promega (Madison, USA)
Human Cot-1 DNA	Invitrogen (Paisley, UK)
Immersol 518 N	Zeiss (Jena)
KCl (Kaliumchlorid)	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Merck (Darmstadt)
Luria Broth Base (Miller´s LB Broth Base)	Invitrogen (Paisley, UK)
MES hydrate	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MES Sodium salt	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck (Darmstadt)
NaCl (Natriumchlorid)	Merck (Darmstadt)
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck (Darmstadt)
NP-40	Abbott (Wiesbaden)
Pretreatment Reagent VP 2000	Abbott (Wiesbaden)
Protease Buffer Vysis VP 2000	Abbott (Wiesbaden)
Protease I	Abbott (Wiesbaden)
R-Phycoerythrin Streptavidin	Invitrogen (Paisley, UK)
Tetramethyl Ammonium Chloride (TMACL; 5M)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Titriplex	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tough-Spots, Label Dots	USA Scientific (Ocala, USA)
Tween	Merck (Darmstadt)
Vectashield Mounting Medium with DAPI (4',6-Diamin-2-phenylindol)	Vector (Burlingame, USA)
Water Molecular Biology Reagent	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Wells und Plates	Seahorse (North Billerica, USA)
Xylol	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Die folgenden, in Tabelle 4 dargestellten Lösungen, Puffer und Medien wurden im Rahmen dieses Projekts verwendet.

Tabelle 4: Lösungen, Puffer und Medien

Lösung, Puffer, Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	• 12,5 g LB-Base
	• 500 ml dH ₂ O
	• Autoklavieren
Chloramphenicol-Lösung	• 34 mg/ml in 100% Ethanol
pBAC-E.coli-Glycerol-Stock (Bacterial Artificial Chromosome)	• 320 µl 60% Glycerol
	• 1 ml E. coli-Kultur (Endkonzentration 15 % Glycerol)
	• bei -80°C lagern
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	• 145,37 g/l Tris
	• 11,16 g/l EDTA
	• 34,4 ml Acetat
	• Auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen

MATERIAL UND METHODEN

10x PBS (Phosphate Buffered Saline Working Solution)	• 4 g KCl
	• 4 g KH ₂ PO ₄
	• 160 g NaCl
	• 23 g Na ₂ HPO ₄
	• 1600 ml H ₂ O
	• Auf pH 7,4 einstellen
	• Auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen
	• Autoklavieren
FISH-Hyb-Waschpuffer	• 264 g 20x SSC
	• 80 ml H ₂ O
	• 3 ml NP-40
	• Bis 1000 ml auffüllen
	• Den pH auf 7,25 einstellen
70% Ethanol	• 700 ml 99% Ethanol
	• 300 ml H ₂ O
Basis-Hybridisierungsmix	• 5 ml deionisiertes Fornamid
	• 1,5 ml 20x SSC
	• 1 g Dextransulfat
	• Bei 60°C auf Heizrührer stellen
	• Mit 2M HCl auf pH 7 einstellen
	• Auf 7 ml mit H ₂ O auffüllen
	• Bei 4°C aufbewahren

MATERIAL UND METHODEN

Sonden-Hybridisierungsmix	• 14 µl Basismix
	• 2 µl COT Human DNA
	• 3,5 µl Sonde
	• 0,5 µl CEP (Chromosome Enumeration Probe)
1x PBS	• 100 ml 10x PBS
	• 900 ml H ₂ O
FISH-Detektionspuffer	• 100 ml 10x PBS
	• 900 ml H ₂ O
	• 2 ml Tween
Protease-Lösung	• 500 ml Vysis VP 2000 Protease Buffer
	• 250 mg Vysis Protease I
1,33 fache Blocking Solution (BS)	• 7650 µl 1x PBS
	• 150 µl Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection Blocking Solution 10x
Antikörper 1 Lösung (AK1-Lösung)	• 500 µl Anti-DIG monoclonal antibody against digoxigenin, mouse IgG1
	• 1 ml dd H ₂ O
Antikörper 1	• 100 µl Blocking Solution
	• 650 µl PBS
	• 250 µl AK1-Lösung
Antikörper 2 Lösung (AK2-Lösung)	• 500 µl Anti-mouse-Ig-DIG, F(ab') ₂ , fragment from sheep
	• 1 ml dd H ₂ O
Antikörper 2	• 125 µl AK2-Lösung
	• 875 µl 1x Blocking-Solution
1x Blocking-Solution	• 788 µl PBS
	• 88 µl BS

MATERIAL UND METHODEN

Antikörper 3 Lösung (AK3-Lösung)	<ul style="list-style-type: none"> • 500 µl Anti-DIG-Fluorescein, Fab fragments from sheep
	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml dd H₂O
Antikörper 3	<ul style="list-style-type: none"> • 125 µl AK3-Lösung
	<ul style="list-style-type: none"> • 875 µl 1x Blocking-Solution
1X Array Holding Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 8,3 ml 12X MES Stock Buffer
	<ul style="list-style-type: none"> • 18,5 ml 5 M NaCl
	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 ml 10% Tween-20
	<ul style="list-style-type: none"> • 73,1 ml H₂O
	<ul style="list-style-type: none"> • Lichtgeschützt aufbewahren bei 2-8°C
12X MES Stock Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 70,4 g MES hydrate
	<ul style="list-style-type: none"> • 193,3g MES Sodium Salt
	<ul style="list-style-type: none"> • 800 ml Molecular Biology Grade Water
	<ul style="list-style-type: none"> • Mischen und bis auf 1.000 ml auffüllen
	<ul style="list-style-type: none"> • Den pH auf 6,5-6,7 einstellen
	<ul style="list-style-type: none"> • Filtern durch einen 0,2 µm Filter
	<ul style="list-style-type: none"> • Lichtgeschützt aufbewahren bei 2-8°C
0.5 mg/ml Anti-Streptavidin Antibody	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 mg Anti-Streptavidin Antibody
	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml H₂O
	<ul style="list-style-type: none"> • Bei 4°C aufbewahren
Non-Stringent Wash Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 300 ml 20X SSPE
	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml 10% Tween-20
	<ul style="list-style-type: none"> • 699 ml H₂O
	<ul style="list-style-type: none"> • Filtern durch einen 0,2 µm Filter
	<ul style="list-style-type: none"> • Bei Raumtemperatur aufbewahren

MATERIAL UND METHODEN

Stringent Wash Buffer	<ul style="list-style-type: none">• 30 ml 20X SSPE
	<ul style="list-style-type: none">• 1 ml 10% Tween-20
	<ul style="list-style-type: none">• 969 ml Wasser
	<ul style="list-style-type: none">• Filtern durch einen 0,2 µm Filter
	<ul style="list-style-type: none">• Bei Raumtemperatur aufbewahren
	<ul style="list-style-type: none">• Der pH sollte 8 betragen

2.1.5 DNA-Sonden

2.1.5.1 Klone

Die kommerziell erhältlichen Klone, welche zur Herstellung der Sonden dienen, sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Verwendete Klone

Gen	RPCIB-Nr.	RP11-Nr.	Firma
CCNE1	RPCIB753J24104Q	RP11-104J24	Imagenes, Berlin
EYS	RPCIB753M01316Q	RP11-166P24	Imagenes, Berlin
FGFR1	RBCIB753N15350Q	RP11-350N15	Imagenes, Berlin
MEF2B	RBCIB753G03520Q	RP11-520G03	Imagenes, Berlin
MLLT11	RPCIB753P24166Q	RP11-316M1	Imagenes, Berlin
OR4M2	RPCIB753F092Q	RP11-2F9	Imagenes, Berlin
PCM1	RPCIB753O22525Q	RP11-525O22	Imagenes, Berlin
PTK7	RPCIB753M24387Q	RP11-387M24	Imagenes, Berlin
UNC5D	RPCIB753N15345Q	RP11-345N15	Imagenes, Berlin
USP22	RPCIB753M01746Q	RP11-746M1	Imagenes, Berlin
YES1	RPCIB753O08769Q	RP11-769O8	Imagenes, Berlin

2.1.5.2 Chromosome Enumeration Probes und Telomere Probes

Folgende Chromosome Enumeration Probes (CEP) sowie Telomere Probes wurden als Referenzmarker verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Verwendete Chromosome Enumeration Probes und Telomere Probes

Probes	Firma
CEP 1 (D1Z5) SpectrumOrange Probe	Abbott (Wiesbaden)
CEP 6 (D6Z1) SpectrumOrange Probe	Abbott (Wiesbaden)
CEP 8 (D8Z2) SpectrumOrange Probe	Abbott (Wiesbaden)
CEP 15 (D15Z4) SpectrumOrange Probe	Abbott (Wiesbaden)
CEP 17 (D17Z1) SpectrumOrange Probe	Abbott (Wiesbaden)
CEP 18 (D18Z1) SpectrumOrange Probe	Abbott (Wiesbaden)
TelVysion 19q SpectrumOrange	Abbott (Wiesbaden)

2.1.6 Software

Die Software, die zur Anwendung kam, ist in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Software

Software	Firma
GeneChip Operating Software	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Affymetrix GeneChip Command Console	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Axiovision	Zeiss (Jena)
Copy Number Analysis (CNA)	Zentrum für Bioinformatik, Universität Hamburg
FISH Oracle 1.0	Zentrum für Bioinformatik, Universität Hamburg
Nano Drop ND-1000 V3.1.0	Peqlab (Erlangen)
SNP 6.0 Probe Level Access Tool (SPLAT)	Affymetrix (Santa Clara, USA)

2.2 Untersuchungsmaterial

Insgesamt stehen uns zur Analyse 118 SNP-Array Datensätze von HCCs zur Verfügung. Sie setzen sich zusammen aus fünf institutseigenen Tumorproben, zwei kommerziell erworbenen Zelllinien, acht Zelllinien aus dem Cancer Genome Project sowie 103 Proben der Gene Expression Omnibus (GEO) Datenbank.

2.2.1 Kryokonserviertes Tumorgewebe

Die Tumorgewebebank des Universitätsklinikums Hamburg enthält zurzeit fünf kryokonservierte Leberzellkarzinomproben aus den Jahren 2006-2008, welche für diese Studie verwendet wurden.

Das Tumorgewebe wurde nach Entnahme schockgefroren und bei -80°C gelagert. Ein Teil dessen wurde mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) eingefärbt. Ein Pathologe hat die H.E.-Schnitte bezüglich der Diagnose bestätigt sowie die Ausdehnung des Tumors für das weitere Vorgehen kenntlich gemacht. Eine Übersicht mit Merkmalen der Tumorproben inklusive Differenzierungsgrad und Tumorausdehnung laut TNM-Klassifikation gibt Tabelle 8.

Tabelle 8: Übersicht kryokonservierter HCC-Proben

Tumorbanknummer	Geschlecht	Alter	Grading: G	Staging: T
16	weiblich	72	3	1
578	männlich	43	2	2
590	männlich	72	2	2
977	männlich	68	2	1
1076	männlich	50	1	2

2.2.2 Zelllinien

Wir verwendeten die kommerziell erhältliche Zelllinie Huh7 (American Type Culture Collection (ATCC): CCL-185). Diese wurde aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 57-jährigen Japaners gewonnen (Nakabayashi et al., 1982).

In einer vorangegangenen Studie wurde am UKE - Institut für Pathologie, Sektion Molekularpathologie, bereits die Leberzellkarzinom-Zelllinie Hep-G2 (ATCC: HB-8065) kultiviert, die DNA extrahiert sowie eine Genome-Wide Human SNP Array 6.0-Analyse durchgeführt. Die Hep-G2 Zelllinie wurde aus den Leberzellkarzinomzellen eines männlichen 15-jährigen gewonnen (Aden et al., 1979). Die Ergebnisse dieser SNP-Analyse liegen vor.

2.2.3 Datensätze der Gene Expression Omnibus Plattform

Die Gene Expression Omnibus Datenbank des National Center for Biotechnology Information in Bethesda, USA enthält zurzeit 103 Affymetrix Mapping 250K Sty2 SNP Array Datensätze von Proben des hepatozellulären Karzinoms, die wir mit der freundlichen Genehmigung von Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J et al. (Chiang et al., 2008) verwenden dürfen.

Bei den Datensätzen handelt es sich um 103 kryokonservierte Leberzellkarzinomproben von 100 Patienten, welche sich einer Resektion oder Transplantation in einem der folgenden Zentren unterzogen haben: Barcelona Hospital Clinic (Spanien), Milan National Cancer Institute (Italien) oder Mount Sinai School of Medicine (New York, USA).

Klinische Daten sind für 81 der 100 Patienten erhältlich. Davon sind 54 männlich und 27 weiblich, das Durchschnittsalter am Tag der Operation liegt bei 68 Jahren. Alle Patienten sind mit dem Hepatitis C-Virus infiziert. Das Staging nach den Barcelona Clinic Liver Cancer Kriterien ist in der Tabelle 9 dargestellt, dabei fehlen Stagingdaten eines Patienten.

Tabelle 9: Staging der GEO-Patientendaten

Barcelona Clinic Liver Cancer Staging	Anzahl (n=80)
0	9
A	56
B	7
C	8

2.2.4 Datensätze aus dem Cancer Genome Project

Durch Zugriff auf die Cancer Genome Project Datenbank des des Wellcome Trust Sanger Instituts aus Cambridge konnten wir die freundlicherweise zur Verfügung gestellten neun Datensätze von Leberzellkarzinom-Zelllinien analysieren. Eine Übersicht der verwendeten Zellliniendaten ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Cancer Genome Project Zelllinien

HCC-Zelllinie	Alter bei Diagnose	Geschlecht
HLE	68	männlich
Huh-6-clone5	57	männlich
PLC-PRF-5	unbekannt	unbekannt
SNU-387	41	weiblich
SNU-423	40	männlich
SNU-449	52	männlich
SNU-475	43	männlich
C3A	15	männlich

2.2.5 Leber Tissue Microarray

Zur Validierung von Veränderungen von Kandidatengenomen wurde ein am Institut für Pathologie bereits bestehender HCC-Gewebemicroarray verwendet. Der Leber Tissue Microarray besteht aus 223 Gewebeprobe, welche nach Fixierung mit Formalin mit jeweils einem Durchmesser von 0,6 mm in einen Paraffinblock gestanzt wurden.

Er enthält alle malignen sowie benignen primär in der Leber vorkommenden Tumoren oder tumorartige Läsionen sowie eine Auswahl von Kontrollgeweben.

Eine detaillierte Auflistung der Gewebe ist der folgenden Tabelle 11 zu entnehmen, eine Übersicht des Arrays in der H.E.-Färbung gibt Abbildung 3.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Leber Tissue Microarray

Tumortyp	Anzahl (n=222)
Hepatozelluläres Karzinom	93
Cholangiozelluläres Karzinom	21
Hepatoblastom	5
Gallengangsadenom	3
Leberzelladenom	7
Gallengangshamartom	2
Fokal noduläre Hyperplasie (FNH)	26
Infantiles Hämangioendotheliom	2
Hämangioendotheliom eines Erwachsenen	1
Angiomyolipom	2
Mammakarzinom Kontrolle	5
Hepatitis-C-Kontrolle	10
Unspezifische Zirrhose	5
Gallengangsatresie	5
Standard Control Tissue Herz	2
Standard Control Tissue Niere	2
Standard Control Tissue Lunge	2
Standard Control Tissue Endometrium	2
Standard Control Tissue Prostata	2
Standard Control Tissue Lymphknoten	2
Standard Control Tissue Quergestreifte Muskulatur	2
Standard Control Tissue Haut	2
Standard Control Tissue Colon	3
Leber Normalgewebe	16

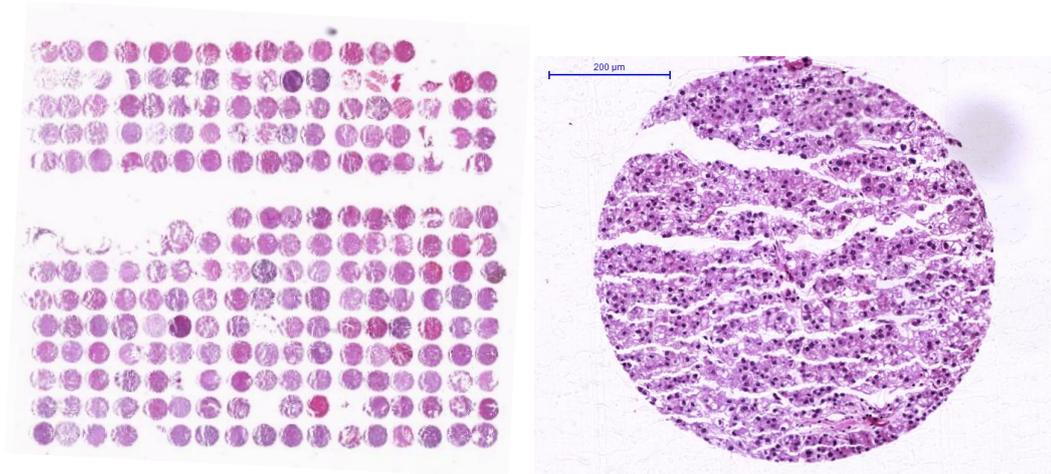


Abbildung 3: Leberarray in der H.E. Färbung – Übersicht, Detail

2.2.6 Zelllinien Tissue Microarray

Der Zelllinien Tissue Microarray wurde ebenfalls am Institut für Pathologie hergestellt und setzt sich aus 140 kommerziell erhältlichen Zelllinien zusammen, welche nach Fixierung mit Formalin mit jeweils einem Durchmesser von 0,6 mm in einen Paraffinblock gestanzt wurden.

Er enthält unter anderem die Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms Hep-G2 sowie vieler anderer unterschiedlicher Tumorarten, nicht tumorösem Gewebe sowie präneoplastischen Läsionen überwiegend humanen Ursprungs. Eine detaillierte Auflistung ist der Tabelle 12 zu entnehmen, eine schematische Übersicht gibt Abbildung 4.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Zelllinien Tissue Microarray

Spot	Zelllinie	ATCC-Nr.	DSMZ-Nr.	Herkunfts-Gewebe
1a	HCT 116	CCL-247	ACC 581	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
1b	HCT-15	CCL-225	ACC 357	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ C
1c	Hep G2	HB-8065	ACC 180	Leber; hepatozelluläres Karzinom
1e	HT-29	HTB 38	ACC 299	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
1h	IGROV1			Eierstock; Zystadenokarzinom
1i	K-562	CCL-243	ACC 10	Knochenmark; chronische myeloische Leukämie
1k	LOX IMVI			Haut; malignes amelanotisches Melanom
1l	MCF7	HTB-22	ACC 115	Brustdrüse, epithelial; Adenokarzinom

MATERIAL UND METHODEN

Spot	Zelllinie	ATCC-Nr.	DSMZ-Nr.	Herkunfts-Gewebe
1m	MDA-MB-231	HTB-26		Brustdrüse, epithelial; Adenokarzinom
1n	NCI-H226 (H226)	CRL-5826		Lunge; squamöses Karzinom, Mesotheliom
1o	NCI-H460 (H460)	HTB-177		Lunge; großzelliges Karzinom
1p	PC-3	CRL-1435	ACC 465	Vorsteherdüse; Adenokarzinom, Grad IV
1r	RPMI 8226	CCL-155	ACC 402	Peripheres Blut, B-Lymphozyt; Plasmozytom, multiples Myelom
2a	RXF-393	HTB-46		Niere; Hypernephrom
2b	SF-268			Gehirn; anaplastisches Astrozytom
2e	SK-MEL-2	HTB-68		Haut; malignes Melanom
2f	SK-MEL-28	HTB-72		Haut; malignes Melanom
2g	SK-MEL-5	HTB-70		Haut; malignes Melanom
2h	SK-OV-3 (SKOV-3)	HTB-77		Eierstock; Adenokarzinom
2i	SN-12C			Niere; Karzinom
2k	SNB-19		ACC 325	Gehirn, links parietookzipital; Glioblastom
2l	SW620 (SW-620)	CCL-227		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C
2m	T-47D	HTB-133		Brustdrüse; duktales Karzinom
2n	TK-10			Niere; Karzinom
2o	U-251			Gehirn; Glioblastom
2p	UACC-257			Haut; malignes Melanom
2q	UACC-62			Haut; malignes Melanom
2r	A549	CCL-185	ACC 107	Lunge; Adenokarzinom
3a	MDA-MB-435S	HTB-129		Brustdrüse; duktales Adenokarzinom
3b	MOLT-4	CRL-1582	ACC 362	Peripheres Blut, T-Lymphoblast; akute lymphoblastische Leukämie
3c	NCI-H23 (H23)	CRL-5800		Lunge; Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom
3d	NCI-H322M	CRL-5806		Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
3e	NCI-H522 (H522)	CRL-5810		Lunge; Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom
3f	OVCAR-3	HTB-161		Eierstock; Adenokarzinom
3g	OVCAR-4			Eierstock; Adenokarzinom
3h	OVCAR-5			Eierstock; Adenokarzinom
3i	OVCAR-8			Eierstock; Adenokarzinom
3k	SF-295			Gehirn; multiformes Glioblastom
3l	SF-539			Gehirn; Gliosarkom
3m	SNB-75			Gehirn; Astrozytom

MATERIAL UND METHODEN

Spot	Zelllinie	ATCC-Nr.	DSMZ-Nr.	Herkunfts-Gewebe
3n	SR	CRL-2262		Lymphoblast; großzelliges immunoblastisches Lymphom
3o	UO-31			Niere; Karzinom
3p	786-O (786-0)	CRL-1932		Niere; Adenokarzinom
3q	A-498	HTB-44	ACC 55	Niere; Karzinom
3r	ACHN	CRL-1611		Niere; Adenokarzinom
4a	BT-549	HTB-122		Brustdrüse; duktales Karzinom
4b	Caki-1	HTB-46	ACC 142	Niere; Klarzellkarzinom
4c	CCRF-CEM (CCRF CEM)	CCL-119	ACC 240	Peripheres Blut, T-Lymphoblast; akute lymphoblastische Leukämie
4d	COLO 205	CCL-222		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ D
4e	EKVX			Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
4f	HCC-2998			Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
4g	HOP-62			Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
4h	HOP-92			Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
4i	Hs 578T	HTB-126		Brustdrüse; duktales Karzinom
4k	KM-12			Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
4l	M-14			Haut; amelanotisches Melanom
4m	Malme-3M	HTB-64		Haut; malignes Melanom
4n	KRIB			Knochen; Osteosarkom
4o	T98G (T98-G)	CRL-1690		Gehirn; multiformes Glioblastom
4p	U-343-MG			Glioblastom
4q	LN-401			Glioblastom
4r	LN-229	CRL-2611		Gehirn, rechts frontaler parietookzipitaler Kortex; Glioblastom
5a	BS 149			Knochenmark; aplastische Anämie
5b	MEL-HO		ACC 62	Haut; Melanom
5c	COLO-849		ACC 216	Malignes Melanom
5d	ECV-304		ACC 310	Harnblase; Karzinom
5e	Caki-2	HTB-47	ACC 54	Niere; Klarzellkarzinom
5f	RT-112	RT-112 D21	ACC 418	Harnblase; Transitionalzellkarzinom, Grad II
5g	293 (HEK-293)	CRL-1573	ACC 305	Niere; embryonal, transformiert durch Adenovirus 5 DNS
5h	A-375 (A375)	CRL-1619		Haut; malignes Melanom
5i	MBC-5/MRC-5	CCL-171		Lunge, Fibroblast; normal
5k	SM			Melanom

MATERIAL UND METHODEN

Spot	Zelllinie	ATCC-Nr.	DSMZ-Nr.	Herkunfts-Gewebe
5l	BT-474	HTB-20	ACC 64	Brustdrüse; duktales Karzinom
5n	SJCRH30 (RC13; RMS 13; SJRH30)	CRL-2061		Muskel; Rhabdomyosarkom
5o	IM-9	CCL-159	ACC 117	Peripheres Blut, B-Lymphoblast; transformiert durch Epstein-Barr-Virus (EBV)
5p	VM-CUB 1		ACC 400	Harnblase; Transitionalzellkarzinom
5q	HeLa	CCL-2	ACC 57	Gebärmutterhals, epithelial; Adenokarzinom
5r	HACAT			Haut; Keratinozyt
6a	KU-19-19		ACC 395	Harnblase; Transitionalzellkarzinom
6b	GAMG		ACC 242	Gehirn; Glioblastom
6c	IGR-1		ACC 236	malignes Melanom
6d	CRL-7930	CRL-7930		Harnblase; Karzinom
6e	A-172			Gehirn; Glioblastom
6f	COS-1	CRL-1650	ACC 63	Niere; Fibroblast, transformiert durch eine originfehlerhafte Mutante von SV-40
6g	Hs 766T	HTB-134		Bauchspeicheldrüse; Karzinom
6h	HUT 12			Fibrosarkom
6i	HUVEC			endothelial (Nabelschnurvene)
6k	IMR-90	CCL-186		Lunge, Fibroblast; normal
6l	U-138 MG	HTB-16	ACC 291	Gehirn; Glioblastom
6m	U-87 MG	HTB-14		Gehirn; Glioblastom, Astrozytom, Grad III
6n	WSS-1 (WS-1)	CRL-2029		Niere; transformiert durch Adenovirus 5 DNS
6o	Hs68	CRL-1635		Haut, Vorhaut, Fibroblast; Aspartoacylase-Mangel, mögliche Canavan Erkrankung
6p	MCF 10A	CRL-10317		Brustdrüse, epithelial; fibrozystische Krankheit
6q	RT-112	RT-112 D21	ACC 418	Harnblase; Transitionalzellkarzinom, Grad II
6r	MDA-HER-2			Brustdrüse; Adenokarzinom
7a	MDA-NEO			Brustdrüse; Adenokarzinom
7b	CAL-62		ACC 448	Schilddrüse; anaplastisches Karzinom
7c	DBTRG-05MG	CRL-2020	ACC 359	Gehirn, Gliazelle; multiformes Glioblastom
7d	HBL-100	HTB-124		Brustdrüse; epithelial
7e	HT-1080	CCL-121	ACC 315	Bindegewebe; Fibrosarkom
7f	LN-405		ACC 189	Gehirn; Astrozytom, Grad IV
7g	MDA-MB-433		ACC 65	Brustdrüse; Karzinom
7h	NCI-H82 (H82)	HTB-175	ACC 556	Lunge; kleinzelliges Karzinom
7i	CRO-AP3		ACC 275	B-Zell-Lymphom

MATERIAL UND METHODEN

Spot	Zelllinie	ATCC-Nr.	DSMZ-Nr.	Herkunfts-Gewebe
7k	SW-548			Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ B
7l	A431NS	CRL-2592	ACC 91	Haut, Epidermis; epidermoides Karzinom
7m	CRO-AP2		ACC 48	B-Zell-Lymphom
7n	BHT-101		ACC 279	Schilddrüse; anaplastisches papilläres Schilddrüsenkarzinom
7o	BT 717			Brustdrüse; Karzinom
7p	A-172 (A172)	CRL-1620		Gehirn; Glioblastom
7q	S-117		ACC 266	Schilddrüse; Sarkom
7r	CRO-AP5		ACC 215	B-Zell-Lymphom
8a	B-CPAP		ACC 273	Schilddrüse; Karzinom
8c	HCT-8 (HRT-18)	CCL-244		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
8d	SU-DHL-6		ACC 572	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL)
8e	MD 435 (MDA-MB-435)			Malignes Melanom
8f	OCI-LY-19		ACC 528	Knochenmark; B-Zell-Lymphom (Non-Hodgkin-Lymphom)
8g	ZR-75-1	CRL-1500		Brustdrüse, epithelial; duktales Karzinom
8h	ML-1		ACC 464	Schilddrüse; follikuläres Karzinom
8i	BT-747 (BT-474)	HTB-20	ACC 64	Brustdrüse; duktales Karzinom
8k	8305C		ACC 133	Schilddrüse; Karzinom
8l	NCI-H510A (H510A; NCI-H510)	HTB-184	ACC 568	Lunge; kleinzelliges Karzinom, extrapulmonalen Ursprungs
8m	SU-DHL-4		ACC 495	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL)
8n	ONCO-DG-1		ACC 507	Schilddrüse; oxyphiles papilläres Karzinom
8o	MDA-MB-435S	HTB-129		Brustdrüse; duktales Adenokarzinom
8p	A-498	HTB-44	ACC 55	Niere; Karzinom
8q	CRL-1472	CRL-1472		Harnblase; Karzinom, Grad 3
8r	Caco-2	HTB-37	ACC 169	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
9a	SK-CO-1	HTB-39		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
9b	HT-29	HTB 38	ACC 299	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
9c	Saos-2	HTB-85	ACC 243	Knochen; Osteosarkom
9d	SW480 (SW-480)	CCL-228	ACC 313	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ B
9e	786-O (786-0)	CRL-1932		Niere; Adenokarzinom
9f	KARPAS-1106P		ACC 545	B-Zell-Lymphom (Non-Hodgkin-Lymphom)
9g	MDA-MB-415	HTB-128		Brustdrüse; Adenokarzinom

MATERIAL UND METHODEN

Spot	Zelllinie	ATCC-Nr.	DSMZ-Nr.	Herkunfts-Gewebe
9h	8505C		ACC 219	Schilddrüse; papilläres Adenokarzinom
9i	DLD-1	CCL-221	ACC 278	Dickdarm, epithelial; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ C
9k	HCT-8 (HRT-18)	CCL-244		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
9l	SW403 (SW-403)	CCL-230	ACC 294	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ C, Grad III
9m	T-47D	HTB-133		Brustdrüse; duktales Karzinom

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

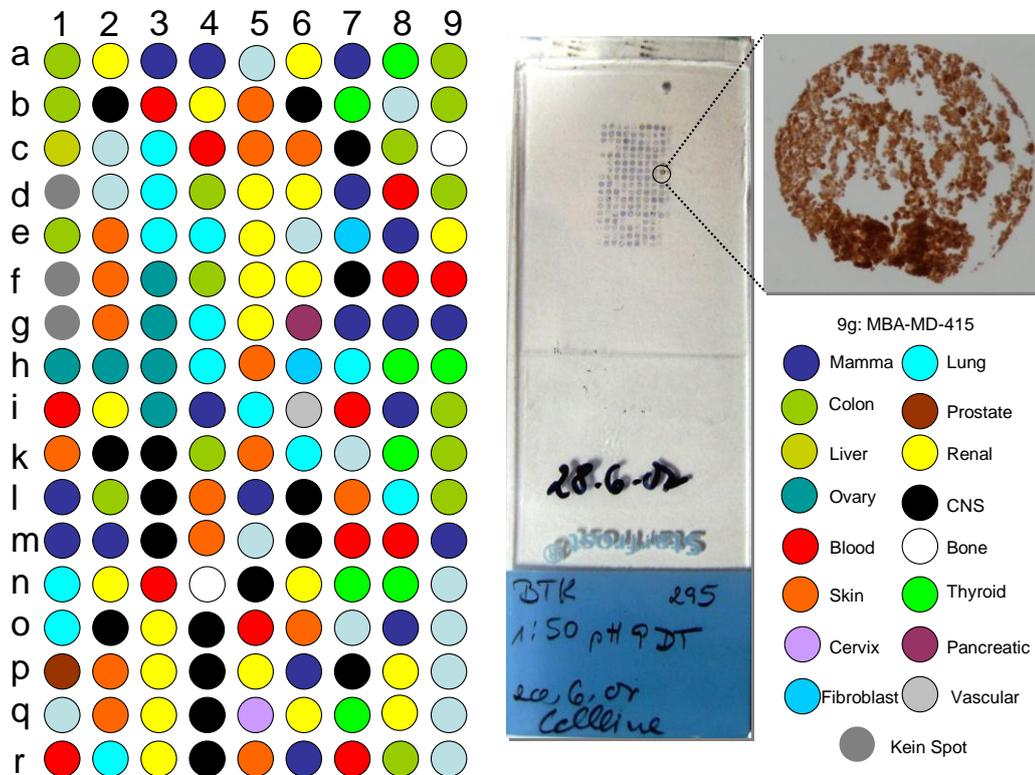


Abbildung 4: Zelllinienarray

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus Gewebe

mit QIAGEN „QIAamp DNA Mini Kit“

Ein Pathologe vom Institut für Pathologie des UKE hat im H.E.-Schnitt des zugehörigen kryokonservierten Leberzellkarzinomgewebes die Diagnose bestätigt und die Ausdehnung des Tumors angezeichnet. Aus diesem Bereich wird nun im folgenden Schritt mit einem Skalpell bis zu 25 mg herausgeschält und die DNA aus diesen Zellen isoliert.

2.3.1.1 Laborprotokoll

- Bis zu 25 mg Frischgewebe in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen geben
- 180 µl Puffer ATL hinzugeben
- 20 µl Proteinase K hinzufügen, vortexen und kurz zentrifugieren
- 2-3 Stunden bei 56°C im Thermoschüttler bei 1000-1200 U/min inkubieren
- Kurz zentrifugieren
- 200 µl Puffer AL hinzugeben, vortexen und kurz zentrifugieren
- Für 10 min bei 70°C im Thermoschüttler inkubieren
- Kurz zentrifugieren
- 200 µl Ethanol (absolut) hinzugeben, vortexen und kurz zentrifugieren
- Den gesamten Ansatz inkl. des entstandenen Niederschlags in ein „QIAamp Spin Column“ überführen
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp Spin Column“ in ein neues „collection tube“ setzen, das alte „collection tube“ mit dem Durchfluss verwerfen
- 500 µl Puffer AW1 hinzugeben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp Spin Column“ in ein neues „collection tube“ setzen, das alte „collection tube“ mit dem Durchfluss verwerfen
- 500 µl Puffer AW2 hinzugeben
- 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp Spin Column“ in ein neues „collection tube“ setzen und erneut 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp Spin Column“ in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen setzen, das alte „collection tube“ mit dem Durchfluss verwerfen
- 100 µl Puffer AE oder ddH₂O hinzugeben

- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren

Anschließend wird die DNA-Konzentration in einem Spektrophotometer bestimmt. Für das weitere Vorgehen werden Proben ausgewählt, die folgenden Kriterien entsprechen: Konzentration von mindestens 50 ng/µl, eine 260/280 Ratio von 1,8-2 und eine 260/230 Ratio von 1,8-2,2.

2.3.2 DNA-Extraktion aus Zelllinien

mit QIAGEN „QIAamp DNA Mini Kit“

Eine Zellkultur mit einer maximalen Konzentration von 5×10^6 Zellen wird für den folgenden Schritt verwendet. Daraus wird anhand eines für Zellkulturen speziellen Protokolls die DNA isoliert.

2.3.2.1 Laborprotokoll

- 20 µl Proteinase K vorlegen
- 200 µl der Zellkultur (max. Konzentration: 5×10^6 Zellen) zufügen
- 200 µl Puffer AL hinzugeben, vortexen und kurz zentrifugieren
- Für 10 min bei 56°C im Thermoschüttler bei 1000-1200 U/min inkubieren
- Kurz zentrifugieren
- 200 µl Ethanol (absolut) hinzugeben, vortexen und kurz zentrifugieren
- Den gesamten Ansatz inkl. des entstandenen Niederschlags in ein „QIAamp Spin Column“ (in einem 2 ml „collection tube“) überführen
- 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp Spin Column“ in ein neues 2 ml „collection tube“ setzen, das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluss verwerfen
- 500 µl Puffer AW1 hinzugeben
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp Spin Column“ in ein neues 2 ml „collection tube“ setzen, das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluss verwerfen
- 500 µl Puffer AW2 hinzugeben
- 3 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp Spin Column“ in ein neues 2 ml „collection tube“ setzen und erneut 1 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
- Das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluss verwerfen
- „QIAamp Spin Column“ in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen setzen

- Das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluss verwerfen
- 100-200 µl Puffer AE oder ddH₂O hinzugeben
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren

Anschließend wird die DNA-Konzentration in einem Spektrophotometer bestimmt. Für das weitere Vorgehen werden Proben ausgewählt, die folgenden Kriterien entsprechen: Konzentration von mindestens 50 ng/µl, eine 260/280 Ratio von 1,8-2 und eine 260/230 Ratio von 1,8-2,2.

2.3.3 Genome-Wide Human SNP Array 6.0

Die Array Comparative Genomic Hybridization mit dem Genome-Wide Human SNP Array 6.0 umfasst folgende Teilschritte:

- Digestion
- Ligation
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- Gelelektrophorese
- Pooling und Aufreinigung
- Fragmentierung
- Gelelektrophorese
- Labeling
- Hybridisierung
- Waschen und Färben
- Scan und Datenprozessierung
- Auswertung

Ein ausführliches Laborprotokoll des Genome-Wide Human SNP Arrays 6.0 ist beim Hersteller Affymetrix (Santa Clara, USA) erhältlich.

2.3.3.1 Digestion

Bei der Digestion wird die isolierte DNA durch zwei Restriktionsenzyme, NspI und StylI, verdaut. Es entstehen somit gleiche definierte Enden aller DNA-Fragmente.

MATERIAL UND METHODEN

2.3.3.1.1 Laborprotokoll

- 5 µl genomische DNA (50 ng/µl) pro Probe und Enzym (Nsp I und Sty I) vorlegen
- Digestion-Mastermix für jedes Enzym (Nsp I und Sty I) nach Tabelle 13 auf Eis herstellen und vor Gebrauch vorsichtig vortexen

Tabelle 13: Mastermix Digestion

<u>Reagent</u>	<u>1 Sample [µl]</u>
ddH ₂ O	11,55
NE Buffer 3 oder 2 (10X)	2
BSA (100X; 10 mg/mL)	0,2
Sty I (10 U/µL) <u>oder</u> Nspl (10 U/µL)	1

- In jede Probe 14,75 µl Mastermix pipettieren
- Stripes vortexen und kurz herunterzentrifugieren
- Stripes in den Cycler stellen und Programm nach Tabelle 14 einstellen

Tabelle 14: Cyclerprogramm Digestion (beheizter Deckel)

<u>Temperature [°C]</u>	<u>Time [min]</u>
37	120
65	20
4	∞

2.3.3.2 Ligation

Während der Ligation werden an die definierten DNA-Enden bestimmte Adapter gekoppelt. Sie bilden eine wichtige Bindungssequenz für die nächsten Schritte, die Polymerase-Kettenreaktion und die Aufreinigung.

2.3.3.2.1 Laborprotokoll

- Ligation-Mastermix für jeden Enzym-Adapter (Nsp I und Sty I) nach Tabelle 15 auf Eis herstellen und vor Gebrauch vorsichtig vortexen

Tabelle 15: Mastermix Ligation

<u>Reagent</u>	<u>1 Sample [µl]</u>
T4 DNA Ligase Puffer	2,5
Adapter Nsp I <u>oder</u> Sty I	0,75
T4 DNA Ligase	2

- In jede Probe 5,25 µl Mastermix pipettieren

MATERIAL UND METHODEN

- Stripes vortexen und kurz herunterzentrifugieren
- Stripes in den Cycler stellen und Programm nach Tabelle 16 einstellen

Tabelle 16: Cyclerprogramm Ligation (beheizter Deckel)

<u>Temperature [°C]</u>	<u>Time [min]</u>
16	180
70	20
4	∞

- Nach Beendigung des Cyclerprogramms wird jede Probe mit 75 µl ddH₂O verdünnt
- Stripes vortexen und kurz herunterzentrifugieren

2.3.3.3 PCR

Bei der PCR werden die DNA-Fragmente mithilfe spezifischer Primer vervielfältigt.

2.3.3.3.1 Laborprotokoll

- PCR-Mastermix nach Tabelle 17 auf Eis unter der Hood herstellen und vorsichtig vortexen
- In jedes Tube (auch in die Leerkontrolle) 90 µl Mastermix vorlegen

Tabelle 17: Mastermix PCR

<u>Reagent</u>	<u>1 Sample [µl]</u>
ddH ₂ O	39,5
<i>Taq</i> PCR Puffer	10
GC-Melt	20
dNTPs	14
PCR Primer 002	4,5
<i>Taq</i> DNA Polymerase	2

- Verdünnte Ligation vortexen und kurz herunterzentrifugieren
- Template zum Mastermix pipettieren: 10 µl aus dem Ligationsansatz in die entsprechenden Tubes pipettieren, bei der Leerkontrolle 10 µl Wasser verwenden
- Stripes vortexen und kurz herunterzentrifugieren
- Stripes in den Cycler stellen und Programm nach Tabelle 18 einstellen

Tabelle 18: Cyclerprogramm PCR (beheizter Deckel)

Temperature [°C]	Time	Cycles
94	3 min	1x
94	20 sec	
60	45 sec	30x
68	15 sec	
68	7 min	1x
4	∞	

- Stripes vortexen und kurz herunterzentrifugieren

2.3.3.4 Gelelektrophorese nach PCR

Der Erfolg der letzten Schritte wird mit einer Gelelektrophorese überprüft. Nach der PCR sollten alle Proben eine Fragmentgröße von etwa 200-1100 bp aufweisen.

2.3.3.4.1 Laborprotokoll

- Die Agarose in der Mikrowelle verflüssigen
- 100 ml Agarose in einen Erlenmeyerkolben aliquotieren und mit einem Magnetrührer vermischen
- Der Agarose 5 µl Ethidiumbromid (EtBr) beimengen und homogen verteilen lassen
- Die Agarose mit EtBr zügig in einen Gelschlitten schütten und einen Taschenkamm einsetzen
- Gel aushärten lassen
- Proben vortexen und kurz zentrifugieren
- 3 µl PCR-Probe und 4 µl Ladepuffer vermengen, 3 µl des Leerwerts und 4 µl Ladepuffer vermengen (pro PCR ein Mal), 1 µl DNA-Ruler (100 bp) und 5 µl Ladepuffer vermengen (pro Kamm ein Mal)
- Den Kamm anschließend herausziehen, den Gelschlitten in Gelkammer setzen und mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) überschichten
- Je 5 µl der Proben, pro Kamm 5 µl DNA-Ruler und pro PCR 5 µl Leerwert in die Geltaschen pipettieren
- Eine Spannung von 100 V für ca. 30 min anlegen
- Gel auf den Ultraviolett-Schlitten (UV-Schlitten) legen und fotografieren

2.3.3.5 Pooling und Aufreinigung der PCR-Produkte

In diesem Schritt finden das Pooling und die Aufreinigung der PCR-Produkte statt. Über die ligierten magnetischen Adapter bindet die DNA an „Magnetic Beads“, welche dem Ansatz zugegeben werden. Anschließend werden die Proben über ein Filtersystem gewaschen und eluiert.

2.3.3.5.1 Laborprotokoll

- Jede PCR einer Probe in ein Well der Poolingplate pipettieren
- Zu jedem PCR-Pool 1 ml Magnetic Beads pipettieren und den Ansatz gut mischen
- 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Ansatz auf die Filterplatte überführen, unbenutzte Wells abkleben, Platte auf die Apparatur installieren, abdecken (Poolingplate als Abfallbehälter nicht vergessen) und ein Vakuum von max. 24 in HG anlegen
- Vakuum solange angelegt lassen, bis die Beads trocken sind (ca. 60 bis 70 min, nicht 90 min überschreiten)
- Vakuum entfernen und die Beads mit 1,8 ml Ethanol (75%) überschichten. Erneut im Vakuum trocken lassen
- Nach 20 min das Vakuum lösen und anhaftende Tropfen an der Filterplatte entfernen
- Zur endgültigen Trocknung die Platte weitere 15 min im Vakuum belassen
- Filterplatte aus der Apparatur nehmen und auf einer Catchplate mittels Klebeband fixieren
- 55 µl EB Puffer in die Wells pipettieren
- Filterplatte auf einem Vortex mit Plattenaufsatz fixieren und die DNA 30 min von den Beads eluieren
- Filterplatte vom Vortex nehmen, in die Apparatur einbauen und ca. 20 min ein Vakuum von max. 24 in Hg anlegen, bis die Beads trocken erscheinen
- Filterplatte 5 min bei 1500 rcf in einer Plattenzentrifuge zentrifugieren
- 45 µl Eluat aus der Catchplate in einen neuen 8er-Stripe überführen
- DNA-Gehaltsbestimmung am NanoDrop (Sample 1:10 verdünnen, z.B. 4,5 µl EB-Puffer + 0,5 µl Probe), erwarteter Wert liegt ungefähr zwischen 500 bis 600 ng/µl

2.3.3.6 Fragmentierung

Die Proben werden erneut fragmentiert, da für die Hybridisierung kleinere DNA-Fragmente als bisher vorhanden benötigt werden.

2.3.3.6.1 Laborprotokoll

- Aufgereinigte PCR-Proben auftauen lassen
- In jede Probe 5 µl Fragmentierungspuffer zur Verdünnung pipettieren
- Fragmentierungs-Mastermix nach Tabelle 19 auf Eis herstellen und vor Gebrauch vorsichtig vortexen

Tabelle 19: Mastermix Fragmentierung

Reagent	1 Sample [µl]
ddH ₂ O	6,45
Fragmentierungspuffer	0,75
Fragmentierungsreagenz	0,3

- In jede Probe 5 µl Mastermix pipettieren
- Stripes vortexen und kurz herunterzentrifugieren
- Stripes in den Cycler stellen und Programm nach Tabelle 20 einstellen

Tabelle 20: Cyclerprogramm Fragmentierung (beheizter Deckel)

Temperature [°C]	Time [min]
37	35
95	15
4	∞

2.3.3.7 Gelelektrophorese nach Fragmentierung

Bei dieser Gelelektrophorese wird die zweite Fragmentierung überprüft. Für das weitere Vorgehen dürfen die Fragmente nicht größer als 180 bp sein.

2.3.3.7.1 Laborprotokoll

- Die Agarose in der Mikrowelle verflüssigen
- 100 ml Agarose in einen Erlenmeyerkolben aliquotieren und mit einem Magnetrührer vermischen
- Der Agarose 5 µl EtBr beimengen und homogen verteilen lassen
- Die Agarose mit EtBr zügig in einen Gelschlitten schütten und einen Taschenkamm einsetzen
- Gel aushärten lassen
- Proben vortexen und kurz zentrifugieren
- 1 µl Fragmentierungsprobe und 5 µl Ladepuffer vermengen, 1 µl DNA-Ruler (50 bp) und 5 µl Ladepuffer vermengen (pro Kamm ein Mal)

MATERIAL UND METHODEN

- Den Kamm anschließend herausziehen, den Gelschlitten in Gelkammer setzen und mit TAE-Puffer überschichten
- Je 5 µl der Proben, pro Kamm 5 µl DNA-Ruler in die Geltaschen pipettieren
- Eine Spannung von 100 V für ca. 30 min. anlegen
- Gel auf den UV-Schlitten legen und fotografieren

2.3.3.8 Labeling

Im Folgenden Labeling werden die Fragmente mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert.

2.3.3.8.1 Laborprotokoll

- Labeling-Mastermix nach Tabelle 21 auf Eis herstellen und vor Gebrauch vortexen

Tabelle 21: Mastermix Labeling

Reagent	1 Sample [µl]
TdT Puffer	14
DNA Labeling Reagenz	2
TdT Enzym	3,5

- In jede Probe 19,5 µl Mastermix pipettieren
- Stripes vortexen und kurz herunterzentrifugieren
- Stripes in den Cyclor stellen und Programm nach Tabelle 22 einstellen

Tabelle 22: Cyclorprogramm Labeling (beheizter Deckel)

Temperature [°C]	Time [min]
37	320
95	15
4	∞

2.3.3.9 Hybridisierung

Ein Hybridisierungsmix wird bei diesem Schritt angefertigt. Die DNA der Proben wird denaturiert und inkubiert zusammen mit dem Hybridisierungsmix in einem Hybridisierungsofen auf dem Genome-Wide Human SNP Array 6.0.

MATERIAL UND METHODEN

2.3.3.9.1 Laborprotokoll

- Hybridisierungs-Mastermix nach Tabelle 23 herstellen und vor Gebrauch vortexen
- Hybridisierungs-Ofen bei 50 °C vorwärmen

Tabelle 23: Mastermix Hybridisierung

Reagent	1 Sample [µl]
MES (12x, 1,25 M)	12
Denhardt's Solution (50x)	13
EDTA (0,5 M)	3
HSDNA (10 mg/ml)	3
OCR	2
Human Cot-1 DNA (1mg/ml)	3
Tween-20 (3%)	1
DMSO (100%)	13
TMACL (5M)	140

- In jede Probe 190 µl Mastermix pipettieren
- Tubes vortexen und kurz herunterzentrifugieren
- Tubes in den Cycler stellen und Programm nach Tabelle 24 einstellen
- Die Affy-Chips im Hyb-Ofen bei 50°C rotierend (20 rpm) vorwärmen

Tabelle 24: Cyclerprogramm Hybridisierung (beheizter Deckel)

Temperature [°C]	Time [min]
95	10
50	∞

- Eine Pipettenspitze in das obere rechte Septum stecken (Chip-Rückseite) und den Affy-Chip mit 200 µl denaturierten Proben befüllen
- Beide Septen mit einem Tough-Spot (oder Klebestreifen) gut abdichten
- Die befüllten Affy-Chips für 16 h bei 50°C im Hyb-Ofen (60 rpm) inkubieren

2.3.3.10 Waschen & Färben

Bei diesem Schritt wird der Hybridisierungsmix sowie die Proben-DNA aus den Chips herausgenommen, eine Wasch- und Färbelösung angefertigt und die Waschung und Färbung vollautomatisch an der Affymetrix-Waschstation ausgeführt.

MATERIAL UND METHODEN

2.3.3.10.1 Laborprotokoll

- Färbe-Mastermix nach Tabelle 25 herstellen und vor Gebrauch kurz vortexen

Tabelle 25: Mastermix Färbelösung

Reagent	1 Sample [μ l]
ddH ₂ O	800.04
SSPE (20x)	360
Tween-20 (3%)	3.96
Denhardt´s Solution (50x)	24

- Hybridisierungs-Mix aus den Chips entfernen und in das entsprechende Tube zurückpipettieren (Pipettenspitze im oberen rechten Septum)
- Die Chips mit 270 μ l Array Holding Puffer befüllen
- Pro Probe je 594 μ l der Färbelösung für SAPE (siehe Tabelle 26) und AB (siehe Tabelle 27) in ein lichtdichtes Eppendorf-Röhrchen vorlegen, in das eine Eppendorf-Röhrchen (SAPE) 6 μ l Strepavidin Lsg., in das andere (AB) 6 μ l biotin. Antikörper pipettieren
- 1 ml Array Holding Puffer in ein lichtdichtes Eppendorf-Röhrchen aliquotieren

Tabelle 26: Färbelösung "SAPE"

Temperature [$^{\circ}$ C]	1 Sample [μ l]
Färbelösung	594
Strepavidin Phycoerythrin	6

Tabelle 27: Färbelösung "AB"

Temperature [$^{\circ}$ C]	1 Sample [μ l]
Färbelösung	594
Biotinylierter Antikörper	6

- Den Barcode der Chips am Computer einscannen, die Proben-ID eingeben und das Wasch-Protokoll definieren
- Die Chips, die Färbelösungen und den Arrayholding-Puffer in die Waschanlage stellen und die Waschung starten

2.3.3.11 Scan und Datenprozessierung

Im Anschluss an das Färben und Waschen werden die Array-Chips gescannt und die Rohdaten als CEL-Dateien abgespeichert. Eine Qualitätskontrolle bietet die in der Genotyping Command Console angezeigte Callrate, welche bei Datensätzen mit hoher Qualität bei mindestens 86% und optimal um die 95%-Marke liegt. Die Daten werden mithilfe der Software SNP 6.0 Probe Level Access Tool (SPLAT) von Affymetrix normalisiert, wobei keine externen Referenz-DNA-Datensätze verwendet werden, sondern ein eigenes Set von 10-20 Tumorproben verschiedener Entitäten. Im letzten Schritt werden die Kopiezahlveränderungen mit der Copy Number Analysis (CNA) Software berechnet und als Abbildung des Kopiezahlprofil sowie zugehörige Excel-Liste mit allen Intensitätswerten der Genorte ausgegeben.

2.3.3.12 Auswertung Genome-Wide Human SNP Array 6.0

Bei der Auswertung dieser Daten werden auffällige chromosomale Zugewinne sowie Verluste auffindig gemacht und dokumentiert.

Die Genkopiezahlveränderung der untersuchten Proben wird als segment mean bezeichnet und stellt einen photometrisch erfassten durchschnittlichen Intensitätswert aller Single Nucleotide Polymorphisms dar, welche von einem SNP-Segment abgedeckt werden. Sie werden im Vergleich zu einem bereits bestehendem Kollektiv bereits untersuchter anderer Tumorproben sowie nicht neoplastischem Normalgewebe am Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf erfasst und als numerische Werte gespeichert. Für eine einfachere Skalierung sowie Interpretation der Daten werden diese logarithmiert, sodass anschließend segment mean Werte größer als eins Genkopiezahlzugewinne und Werte kleiner als eins Genkopiezahlverluste anzeigen. Als Schwellenwert für die Darstellung der Werte wählten wir 0,5, sodass positive als auch negative segment mean-Werte ab einem Mindestunterschied zu Referenzdaten von 0,5 als Genkopiezahlzugewinn oder –verlust betrachtet wurden.

Eine institutseigene Software, das FISH Oracle 1.0 wird für die Dokumentation verwendet. Das FISH-Oracle stellt automatisch amplifizierte sowie deletierte Bereiche aller bisher analysierten Tumorproben mit beliebigen Subsets grafisch und numerisch dar.

Da in dieser ersten Analyse sehr viele Signale in der Auswertung dargestellt werden, welche teilweise sehr groß sind und den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden, nicht immer rekurrent sind und aufgrund von allgemein auftretenden

leichten Schwankungen in der Genkopiezahl ein Signalrauschen aufweisen, haben wir zur genaueren Eingrenzung und Auswahl der am häufigsten vorkommenden kleinsten gemeinsamen amplifizierten/deletierten Bereiche eine zweite Analyse durchgeführt. Dabei haben wir visuell das Genkopiezahlprofil eines jeden Chromosoms der von uns untersuchten Tumorproben analysiert und chromosomale Bereiche zur weiteren Analyse selektiert, die besonders auffällige Veränderungen zeigten. Dies waren Genomabschnitte mit besonders hoher Genkopiezahl und einer Ausdehnung von maximal 10 Megabasen. Solche Bereiche enthalten mit hoher Wahrscheinlichkeit hochgradige Amplifikationen, die jedoch nur vergleichsweise wenige Gene betreffen und bieten daher eine gute Chance, relevante Gene zu identifizieren. Der Nachteil dabei ist, nicht alle auffälligen Bereiche untersuchen zu können und mögliche Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene in der hier beschriebenen Auswahl außer Acht gelassen zu haben.

In dieser Arbeit wurde für die weitere Analyse aufgrund des großen Umfangs der Daten das Augenmerk auf Amplifikationen gelegt. Durch Internetrecherche und Diskussionen konnten wir aus einer Vielzahl einige wenige interessante Kandidatengene für die weitere Analyse aussuchen.

2.3.4 Kultivierung von Bacterial Artificial Chromosomes in E.coli

Anhand der gewählten genomischen Bereiche wurden die in Kapitel 2.1.5.1 beschriebenen Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) über die Firma Imagenes (Berlin) bezogen. Im Folgenden werden die Klone kultiviert.

2.3.4.1 Laborprotokoll

- 10 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben abfüllen
- Mit 30 µl Chloramphenicol-Lösung bzw. 5 µl Kanamycin vermischen
- Mit 10 µl BAC-E. coli-Kultur aus Glycerol-Stock oder mit Abstrich aus kommerziellem Klon animpfen
- 2 Tage bei Raumtemperatur und 200 rpm im Schüttler inkubieren
- 12 µl der gewachsenen Kultur im Erlenmeyerkolben animpfen mit:
 - 12 ml LB-Medium
 - 36 µl Chloramphenicol-Lösung, bzw. 6 µl Kanamycin
- Erneut 2 Tage bei Raumtemperatur und 200 rpm im Schüttler inkubieren

2.3.5 pBAC-DNA-Extraktion aus E. coli-Klonen

mit QIAGEN „QIAprep Spin Miniprep Kit“ und „LyseBlue“

Um die gewünschte DNA zu erhalten wird eine DNA-Extraktion nach dem folgenden modifizierten Protokoll von Qiagen (Venlo, Niederlande) durchgeführt.

2.3.5.1 Laborprotokoll

- 4 ml einer pBAC-E. coli-Kultur pelletieren (2 min, ca. 14000 rpm (~ 18000 × g))
- Pellet in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendieren
- 250 µl Puffer P2 zur Suspension hinzufügen und vorsichtig 8 – 12 × invertieren
- 350 µl Puffer N3 hinzufügen und sofort vorsichtig 8 – 12 × invertieren
- 30 min bei ca. 14000 rpm (~ 18000 × g) zentrifugieren
- Überstand in eine „QIAprep spin“-Säule überführen
- 1 min bei ca. 14000 rpm (~ 18000 × g) zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- „QIAprep spin“-Säule mit 500 µl Puffer PE beladen
- 1 min bei ca. 14000 rpm (~ 18000 × g) zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- „QIAprep spin“-Säule erneut mit 500 µl Puffer PE beladen
- 1 min bei ca. 14000 rpm (~ 18000 × g) zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 1 min bei ca. 14000 rpm (~ 18000 × g) zentrifugieren
- Durchfluss und „2 ml collection tube“ verwerfen
- „QIAprep spin“-Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen setzen
- „QIAprep spin“-Säule mit 50 µl 70°C warmen EB-Puffer beladen
- 1 min inkubieren (Raumtemperatur)
- 1 min bei ca. 14000 rpm (~ 18000 × g) zentrifugieren

2.3.6 DIG-Nick-Translation

mit dem Invitrogen „Nick Translation System“

In diesem Schritt wird die Nick Translation angewandt, eine DNA-Markierungstechnik, bei der gewünschte Abschnitte in Genom indirekt mit Digoxigenin (DIG) markiert werden. Das verwendete Protokoll von Invitrogen (Paisley, UK) wurde wie folgt modifiziert.

2.3.6.1 Laborprotokoll

- Im 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen ansetzen (auf Eis):
 - 5 µl dNTP Mix (minus dTTP)
 - 1 µl Digoxigenin-11-dUTP
 - x µl pBAC-DNA-Lösung (entsprechend ca. 2 µg, höchstens 38 µl)
 - x µl dH₂O (zu 38µl pBAC-DNA-Lösung fehlendes Volumen)
 - 5 µl Pol I/DNase I Mix
 - 1 µl DNA Polymerase I
- Durchmischen
- 90 min bei 15°C im Thermocycler inkubieren
- Zugabe von 5 µl Pol I-DNase-Mix
- 15 min bei 15°C im Thermocycler inkubieren
- Zugabe von 5 µl Stop-Puffer
- Vortexen, herunterzentrifugieren
- Bei 4°C lagern

2.3.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Paraffingewebe

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Paraffinschnitt umfasst folgende Teilschritte:

- Entparaffinierung, proteolytische Vorbehandlung
- Hybridisierung
- Waschen
- Fluoreszenz-Detektion
- Auswertung

2.3.7.1 Entparaffinierung, proteolytische Vorbehandlung: Laborprotokoll

Am ersten Tag der FISH werden die Paraffin-Gewebeschnitte nach folgendem Schema vorbereitet.

TAG 1

- Objektträger-fixierte Paraffin-Gewebeschnitte entparaffinieren
 - 3 × 10 min in Xylol
 - 2 × 5 min in 96% Ethanol
- 3 min Lufttrocknung 48°C auf Heizplatte
- 15 min in Pretreatment-Lösung bei 80°C im Wasserbad
- 2 min in dH₂O waschen
- 150 min in Protease-Lösung bei 37°C im Wasserbad
- 2 min in dH₂O waschen
- 3 min in 70 % Ethanol waschen
- 3 min in 80 % Ethanol waschen
- 3 min in 96 % Ethanol waschen
- 3 min Lufttrocknung 48°C auf Heizplatte

2.3.7.2 Hybridisierung: Laborprotokoll

Anschließend werden die selbst hergestellten Sonden mit einer zusätzlichen kommerziellen Referenzsonde auf die Schnitte gebracht und hybridisiert.

- 20 µl Sonden-Hybridisierungsmix auf das Gewebe pipettieren
- Mit Deckgläschen eindecken, mit Fixogum versiegeln und im Dunkeln trocknen lassen
- Gewebeschnitte-Objektträger in Thermobrite-Gerät legen und Programm starten:
 - 10 min bei 72°C denaturieren;
 - Direkt anschließend über Nacht (bzw. bis zu 3 Tage) bei 37°C inkubieren

2.3.7.3 Waschen: Laborprotokoll

Am zweiten Tag der FISH werden zunächst nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Sonden durch Waschen entfernt.

TAG 2

- Gewebeschnitte-Objektträger aus dem Thermobrite-Gerät nehmen
- Fixogum entfernen
- Gewebeschnitte-Objektträger in FISH-Hyb-Waschpuffer (Raumtemperatur) stellen
- Deckgläschen entfernen
- 2 min bei 72°C in FISH-Hyb-Waschpuffer stellen
- In 1 x PBS stellen
- Trocknen

2.3.7.4 Fluoreszenz-Detektion: Laborprotokoll

Mit dem Roche „Fluorescent Antibody Enhancer Set“

Im Folgenden werden die hybridisierten Sonden über eine Antikörperkaskade detektiert. Der dritte Antikörper ist hierbei an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, sodass anschließend die Auswertung am Mikroskop erfolgen kann. Die Detektion erfolgt mit dem Fluorescent Antibody Enhancer Set von Roche (Grenzach-Wyhlen).

- Objektträger mit 500 µl 1xBlocking-Solution eindecken
- 45 min bei Raumtemperatur in trockener Kammer inkubieren
- Blocking-Solution abkippen
- Antikörper 5 min bei 13000 U/min zentrifugieren
- 50 µl Antikörper 1 auf Objektträger pipettieren, mit Parafilm abdecken
- 75 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren
- 3x 2 min mit 100 ml FISH-Detektionspuffer bei 37°C waschen
- 50 µl Antikörper 2 auf Objektträger pipettieren, mit Parafilm abdecken
- 75 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren
- 3x 2 min mit 100 ml FISH-Detektionspuffer bei 37°C waschen
- 50 µl Antikörper 3 auf Objektträger pipettieren, mit Parafilm abdecken
- 75 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren (Antikörper und eingedeckte Objektträger dunkel halten)
- 3 x 5 min mit 100 ml FISH-Detektionspuffer bei 37°C waschen
- Lufttrocknen der Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur
- Eindecken mit 50 µl DAPI
- Mit Deckgläschen abdecken, möglichst dunkel halten

2.3.7.5 Auswertung FISH

Am Mikroskop wurde die Ratio Gensignal/Zentromersignal in den Tumorzellen für jede Gewebeprobe des Arrays geschätzt. Die selbst hergestellte genspezifische Sonde ist hierbei mit einem grünen, die kommerziell erhältliche Referenzsonde einem orangenen Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Eine Tumorzelle wird als normal angesehen, wenn die Anzahl der Gensignale sowie die Anzahl der Zentromersignale gemäß dem diploiden Chromosomensatz in den Zellen je zwei beträgt (Ratio = 1).

Ist die Anzahl der Gen- sowie Zentromersignale größer als zwei, sprechen wir von einer Polyploidie (Ratio = 1).

Gewebeproben, die eine Ratio von größer als 1 und kleiner als 2 aufwiesen ($1 < \text{Ratio Gensignal/Zentromer} < 2$), werden als ein Gain bezeichnet.

Eine erhöhte Gensignanzahl bei normaler Zentromersignanzahl ist ein Hinweis auf einen Zugewinn des DNA-Abschnittes. Bei einer Ratio größer gleich 2 sprechen wir im Allgemeinen von einer Amplifikation ($\text{Ratio Gensignal/Zentromer} \geq 2$). Wenn hierbei die Anzahl der Gensignale 10 überschreitet nennen wir dies Highlevel-Amplifikation.

Bei weniger Gensignalen als Referenzsignalen pro Zelle im Gewebe sprechen wir von einer Deletion (Ratio < 1).

Für eine übersichtliche statistische Darstellung wurde zudem die reine Genkopiezahl betrachtet, welche zwei Möglichkeiten bietet: Gene copy ≤ 2 (normal) sowie gene copy > 2 (erhöht).

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit JMP Statistical Software Package 5.0.1, John's Macintosh Project (SAS Inc., Chicago, USA). Assoziationen zwischen der Genkopiezahl und dem Grading bzw. Staging wurden mit Hilfe der Contingency Table Analysis und des Chi-Quadrat-Tests berechnet. Werte von $p \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 *Genome-Wide Human SNP Array 6.0*

Die Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der Genkopiezahlverluste und -zugewinne, welche mit dem Genome-Wide Human SNP Array 6.0 an einem Kollektiv von 118 hepatozellulären Karzinomen entdeckt wurden. Man erkennt eine Vielzahl von amplifizierten sowie deletierten Bereichen, welche zum Teil sehr große Genomabschnitte, z.B. ganze Chromosomenarme umfassen. Rekurrente Deletionen (in der Abbildung jeweils links vom Chromosom) sind vor allem auf Chromosom 1q, 3p, 4q, 8q, 9p, 10q, 11q, 14q, 15q, 16p und 16q zu sehen. Hinweise auf rekurrente Amplifikationen (in der Abbildung jeweils rechts vom Chromosom) finden sich auf Chromosom 1q, 6p, 6q, 11q, 15q und 19p. Verluste bzw. Veränderungen ganzer Chromosomenarme sehen wir gehäuft auf Chromosom 6q (Verlust), 7 (Zugewinn), 8q (Zugewinn), 17p (Verlust), Xq (Verlust) und X (Zugewinn). Bei den Genkopiezahlveränderungen sind viele Bereiche vorhanden, welche sehr kurz und demnach kaum in dieser Übersicht darstellbar sind. Häufig sind diese Veränderungen jedoch aufgrund der begrenzten Menge der enthaltenen Gene und somit in Frage kommenden treibenden Onkogene von großem Interesse, weshalb im Folgenden der hauptsächlichste Augenmerk auf hochgradige Genkopiezahlveränderungen gelegt wird, welche ein kleines Gebiet umfassen und nur wenige Gene enthalten.

ERGEBNISSE

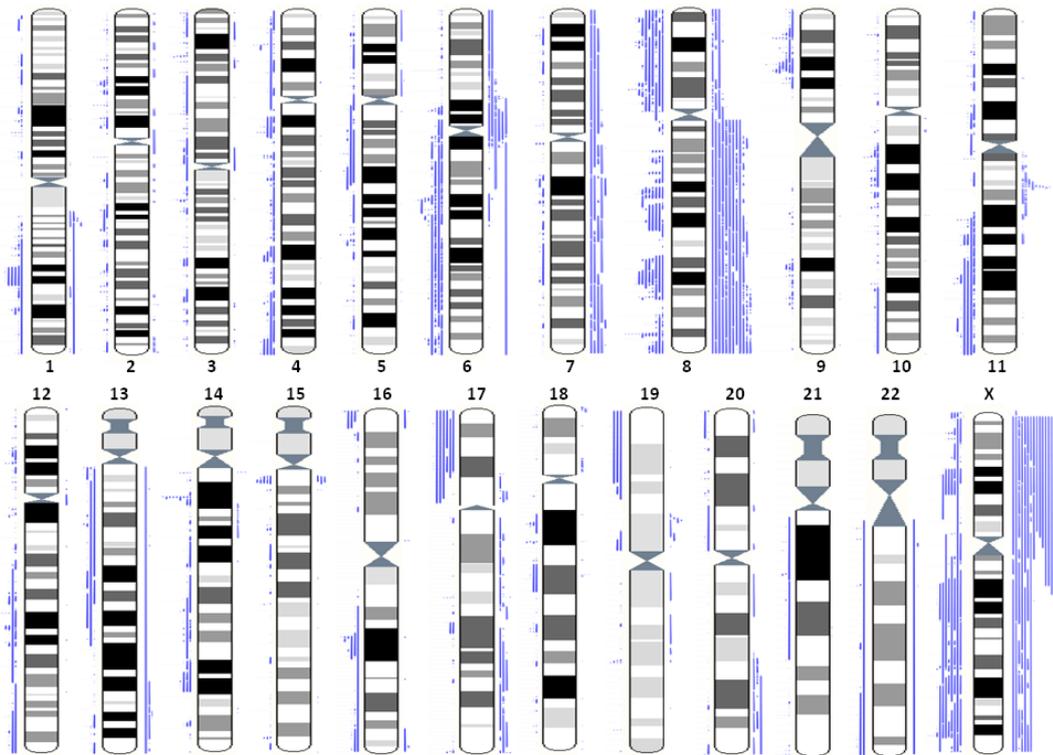


Abbildung 5: Übersicht aller Genkopiezahlveränderungen ab einer relativen Veränderung des segment mean von 0,5 im Vergleich zu Referenzgewebe. Links von den jeweiligen Chromosomen sind jeweils alle Deletionen, rechts alle Amplifikationen, zu sehen. Als Bildquelle dienen die Chromosomendarstellungen der Internetseite www.ensembl.org (Flicek and Searles, 2012a), welche mit den Ergebnisdarstellungen ergänzt wurden.

Die folgende Tabelle 28 zeigt die Anzahl der Deletionen sowie Amplifikationen im untersuchten Tumorgewebe, welche mindestens eine relative Genkopiezahlveränderung von 0,5 im SNP-Array aufweisen. Dieser Schwellenwert stellt einen Verhältnisunterschied von mindestens von 0,5 in der SNP-Array Analyse der hier verwendeten zu Referenz-DNA Proben dar.

Die Durchschnittsanzahl der Genkopiezahlgewinne beträgt hierbei 10,15 (Standardabweichung 11,43) sowie der Deletionen 34,04 (Standardabweichung 63,57) pro Tumor.

ERGEBNISSE

Tabelle 28: Identifizierte Anzahl der Genkopiezahzugewinne sowie -verluste pro Tumorprobe im SNP-Array

Tumorprobe	Anzahl Genkopiezahzugewinne	Anzahl Genkopiezahlverluste
Hep-G2	18	60
TB1076	24	68
TB977	5	44
C3A	3	2
TB16	30	32
TB578	24	30
TB590	22	41
HLE	6	26
HUH 6	0	27
HuH 7	14	27
PLC PRF	19	92
SNU.387	21	31
SNU.423	0	16
SNU.449	9	40
SNU.475	7	41
GSM248832	5	13
GSM248833	12	14
GSM248834	7	17
GSM248835	3	7
GSM248836	20	75
GSM248837	3	11
GSM248838	12	19
GSM248839	1	6
GSM248840	1	18
GSM248841	3	13
GSM248842	3	26
GSM248843	34	58
GSM248844	21	16
GSM248845	5	14
GSM248846	5	20
GSM248847	11	3

ERGEBNISSE

Tumorprobe	Anzahl Genkopiezahlgewinne	Anzahl Genkopiezahlverluste
GSM248848	15	35
GSM248849	22	32
GSM248850	8	16
GSM248851	1	14
GSM248852	3	15
GSM248853	15	20
GSM248854	15	29
GSM248855	5	13
GSM248856	6	11
GSM248857	10	13
GSM248858	5	27
GSM248859	26	74
GSM248860	17	33
GSM248861	15	27
GSM248862	8	14
GSM248863	7	9
GSM248864	3	15
GSM248865	9	16
GSM248866	10	36
GSM248867	1	12
GSM248868	12	53
GSM248869	6	15
GSM248870	19	26
GSM248871	16	20
GSM248872	0	18
GSM248873	5	105
GSM248874	5	12
GSM248875	2	15
GSM248876	10	13
GSM248877	9	84
GSM248878	5	35
GSM248879	61	76
GSM248880	40	555

ERGEBNISSE

Tumorprobe	Anzahl Genkopiezahlgewinne	Anzahl Genkopiezahlverluste
GSM248881	0	5
GSM248882	0	11
GSM248883	6	19
GSM248884	4	10
GSM248782	1	65
GSM248783	1	7
GSM248784	1	33
GSM248785	5	15
GSM248786	2	11
GSM248787	0	13
GSM248788	8	17
GSM248789	5	153
GSM248790	13	15
GSM248791	3	7
GSM248792	0	31
GSM248793	3	8
GSM248794	16	7
GSM248795	0	9
GSM248796	1	3
GSM248797	2	10
GSM248798	0	3
GSM248799	3	13
GSM248800	3	25
GSM248801	11	15
GSM248802	0	13
GSM248803	11	17
GSM248804	10	14
GSM248805	6	14
GSM248806	17	23
GSM248807	51	351
GSM248808	2	13
GSM248809	6	14
GSM248810	23	19

ERGEBNISSE

Tumorprobe	Anzahl Genkopiezahlgewinne	Anzahl Genkopiezahlverluste
GSM248811	61	21
GSM248812	20	12
GSM248813	5	13
GSM248814	9	19
GSM248815	5	0
GSM248816	2	8
GSM248817	14	15
GSM248818	21	187
GSM248819	6	12
GSM248820	1	73
GSM248821	1	15
GSM248822	3	11
GSM248823	18	13
GSM248824	0	23
GSM248825	10	112
GSM248826	15	7
GSM248827	13	15
GSM248828	36	22
GSM248829	1	19
GSM248830	2	24
GSM248831	2	18
Durchschnitt	10,15	34,04
Standardabweichung	11,43	63,57

3.2 Selektion hochgradiger Amplifikationsbereiche

Aus den oben aufgeführten amplifizierten Bereichen erklärten wir mithilfe des FISH Oracles diese Genomabschnitte für besonders interessant, welche möglichst häufig amplifiziert waren und gleichzeitig wenige Gene enthielten.

Ein Nachteil dieser Darstellung ist allerdings, dass nur die Ausdehnung, nicht das Amplifikationsniveau im Falle von Zugewinnen angezeigt wird. Um Bereiche mit besonders hoher Genkopiezahl zu detektieren, wurde eine zusätzliche Analyse durchgeführt, wobei die stärksten Peaks „von Hand“, d.h. direkt am Genkopiezahlprofil der individuellen Tumoren, bestimmt wurden. Zusammen ergab sich somit eine Liste der sowohl kleinsten (<10 Megabasen) als auch hochgradig amplifizierter Genomabschnitte, die in Abbildung 6 zusammenfassend dargestellt sind.

Amplifizierte Bereiche sind auf der rechten Seite des jeweiligen Chromosoms, deletierte Bereiche auf der linken Seite dargestellt. Eigene kryokonservierte Tumorproben wurden orange (Deletion) bzw. hellblau (Amplifikation), Zelllinien braun (Deletion) bzw. dunkelblau (Amplifikation) sowie solide Tumoren anderer Kollektive rot (Deletion) bzw. grün (Amplifikation) markiert.

ERGEBNISSE

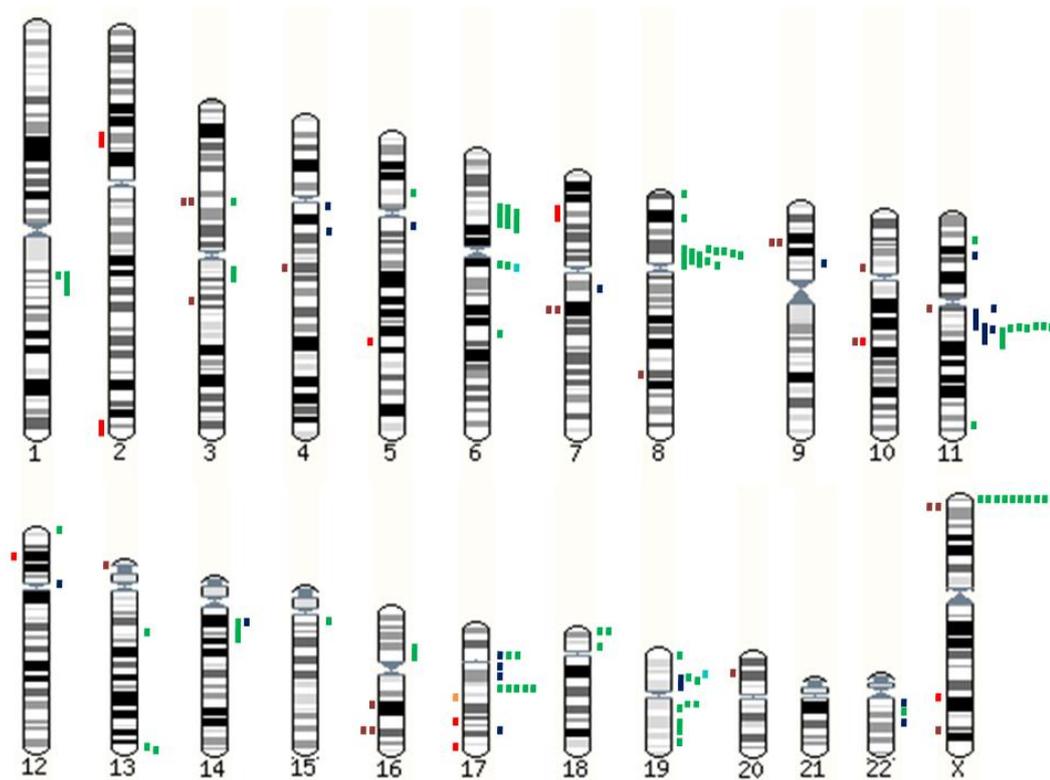


Abbildung 6: Idiogramm, Erläuterungen siehe oben. Als modifizierte Quelle dieser Chromosomendarstellung dienten die Chromosomengrafiken des im Internet verfügbaren Ensembl Genome Browsers (Flicek and Searles, 2012b)

Eine beispielhafte Ansicht einiger im Folgenden ausgewählten Gene ist in den folgenden Abbildungen 7-10 zu sehen. Dabei ist links im Bild eine graphische Darstellung der im aufgerufenen Bereich liegenden amplifizierten Bereiche, rechts sind die enthaltenen Gennamen mit Angaben zur Häufigkeit der Amplifikation sowie Lokalisation und Größe zu finden. Es wurden für diese grafische Darstellung die vorhandenen Amplifikationen mitberücksichtigt ohne besondere Zielsetzung des segment mean und ohne besonders hochgradige Amplifikons zu unterscheiden oder hervorzuheben. Es konnten nicht alle weiteren untersuchten Bereiche auf diese Weise angezeigt werden, da die im Rahmen dieser Arbeit aktuelle und verwendete Version des FISH Oracles Einschränkungen in der Darstellung u.a. großer und häufiger Amplifikationen aufweist. Für die verbleibenden Genortanalysen wählten wir den im Internet frei verfügbaren Ensembl Genome Browser (Flicek and Searles, 2009).

ERGEBNISSE

Amp 1	Amp 2	Amp 3	Amp 4	Amp 5	Amp 6	Amp 7	Amp 8	Amp 9	Amp 10	Amp 11	Amp 12	found compl	Associated Gene Name	Ch ro	Band	Gene Start	Gene End (bp)	Gene Size
			83.01	85.01	86.01	89.01						4	EGFL11	6	q12	66095895	66473339	377944
				85.01	86.01							1	BAI3	6	q12	69401950	7055154	754444
				85.01								2	LMBRD1	6	q13	70442419	70563609	121190
				85.01								1	COL19A1	6	q13	70632169	70978878	345709
				85.01								0	COL9A1	6	q13	70982529	71069494	86965

Abbildung 7: FISH Oracle Darstellung vom amplifizierten Bereich bei 6q12-13 mit EGFL11 (aktuell umbenannt in EYS) als Gen im kleinsten gemeinsam amplifizierten Bereich

Amp 1	Amp 2	Amp 3	Amp 4	Amp 5	Amp 6	Amp 7	Amp 8	Amp 9	Amp 10	Amp 11	Amp 12	found compl	Associated Gene Name	Ch ro	Band	Gene Start	Gene End (bp)	Gene Size
111.01												0	PDGFL	8	p22	17478443	17545655	67212
111.01	108.01											1	MTUS1	8	p22	17545584	17702666	157082
111.01	108.01											2	FGL1	8	p22	17766169	17812154	45985
111.01	108.01											2	PCM1	8	p22	17824646	17925562	110916
111.01												1	ASAH1	8	p22	17958214	17984787	28573
111.01												1	NAT1	8	p22	18111895	18125096	13201

Abbildung 8: FISH Oracle Darstellung von Amplifikationen bei 8p22 mit PCM1 als Ziel der weiteren Analyse

Amp 1	Amp 2	Amp 3	Amp 4	Amp 5	Amp 6	Amp 7	Amp 8	Amp 9	Amp 10	Amp 11	Amp 12	found compl	Associated Gene Name	Ch ro	Band	Gene Start	Gene End (bp)	Gene Size
295.01	302.01	309.01										0	USP14	18	p11.32	148479	202729	55260
295.01	302.01	309.01										3	THOC1	18	p11.32	204527	258059	53532
295.01	302.01	309.01										2	COLEC12	18	p11.32	309256	490689	181333
295.01	302.01											2	CETN1	18	p11.32	570367	571524	1157
295.01	302.01											2	CLUL1	18	p11.32	586998	640291	53293
295.01	302.01											2	C18orf56	18	p11.32	629621	648240	8719
295.01	302.01											2	TYMS	18	p11.32	647619	662492	15873
295.01	302.01											2	ENOSF1	18	p11.32	662918	702642	39724
295.01	302.01											2	YES1	18	p11.32	711588	802227	90739
295.01	302.01											2	ADCYAP1	18	p11.32	895061	902172	7112
295.01												1	C18orf2	18	p11.32	1259822	1349630	89808

Abbildung 9: FISH Oracle Darstellung von Genabschnitt 18p11.32 mit im Folgenden ausgewähltem YES1 als Ziel

Amp 1	Amp 2	Amp 3	Amp 4	Amp 5	Amp 6	Amp 7	Amp 8	Amp 9	Amp 10	Amp 11	Amp 12	found compl	Associated Gene Name	Ch ro	Band	Gene Start	Gene End (bp)	Gene Size
325.02	329.01		335.02	338.01								4	UQCFS1	19	q12	34290137	34295883	5746
325.02			335.02	338.01								3	VSTM2B	19	q12	34709331	34747045	37714
325.02			335.02	338.01								3	POP4	19	q12	34785992	34798546	12554
325.02			335.02	338.01								3	PLEKHF1	19	q12	34847803	34858204	10401
325.02			335.02	338.01								3	C19orf12	19	q12	34881634	3489292	16456
325.02			335.02	338.01								3	CCNE1	19	q12	34994741	35007056	12315
325.02			335.02	338.01								3	C19orf2	19	q12	35106291	35198451	92060
325.02			335.02	338.01								3	ZNF536	19	q12	35555168	35740805	185627
325.02		334.01		338.01								3	TSHZ3	19	q12	36485791	36532271	74580
325.02												1	ZNF507	19	q13.11	37522393	37570411	42018
325.02												1	DPY19L3	19	q13.11	37588526	37667076	78540
325.02												1	PDCD5	19	q13.11	37762944	37770162	6218
325.02												1	ANKRD27	19	q13.11	37779747	37857942	78195
325.02												1	RGS9BP	19	q13.11	37858153	37861046	2893
325.02												1	NUDT19	19	q13.11	37874707	37896541	21334
325.02												0	TDRD12	19	q13.11	37902499	37998267	95868

Abbildung 10: FISH Oracle Darstellung vom amplifizierten Bereich bei Chromosom 19q12-13.11 mit anschließend ausgewähltem CCNE1 als Gen für die weiteren Analysen

3.2.1 Deletionen

Eine Zusammenfassung der selektierten Deletionen ist in Tabelle 29 zusammengefasst, beispielhafte Darstellungen der SNP Ergebnisse folgen in Abbildung 11 und Abbildung 12.

Tabelle 29: Wichtigste Deletionen im HCC

Chromosomaler Bereich	Häufigkeit	Größe des minimal deletierten Abschnittes (kb)	Anzahl der Gene im minimal deletierten Abschnitt	Abbildung
2p14-15	1/118 (0,8%)	3377778	16	-
2q37.1-37.3	1/118 (0,8%)	8159617	94	-
3p14.2	2/118 (1,7%)	145599	94	-
3q13.31	1/118 (0,8%)	677075	1	-
4q22.1	1/118 (0,8%)	360405	1	-
5q23.1-23.2	1/118 (0,8%)	2832278	12	-
7p15.1-15.3	1/118 (0,8%)	6395528	41	-
7q21.11	2/118 (1,7%)	809315	1	-
8q22.3-23.1	1/118 (0,8%)	2172555	3	-
9p21.3	2/118 (1,7%)	3585028	15	Abbildung 11
10p11.21	1/118 (0,8%)	2104924	5	-
10q22.2-22.3	2/118 (1,7%)	471491	1	-
11q12	1/118 (0,8%)	310538	8	-
12p12.1-12.3	1/118 (0,8%)	9524734	21	-
13q11-12.11	1/118 (0,8%)	796904	4	-
16q21	1/118 (0,8%)	1668490	1	-
16q23.1	2/118 (1,7%)	131887	1	-
17q21.31	1/118 (0,8%)	10643	1	-
17q24.1-24.2	1/118 (0,8%)	1170117	4	-
17q25.3	1/118 (0,8%)	5319104	>100	-
20p12.1	1/118 (0,8%)	1458152	1	-
Xp22.2-22.31	2/118 (1,7%)	142623	2	Abbildung 12
Xq23-24	1/118 (0,8%)	3280297	10	-
Xq27.1	1/118 (0,8%)	99440	1	-

ERGEBNISSE

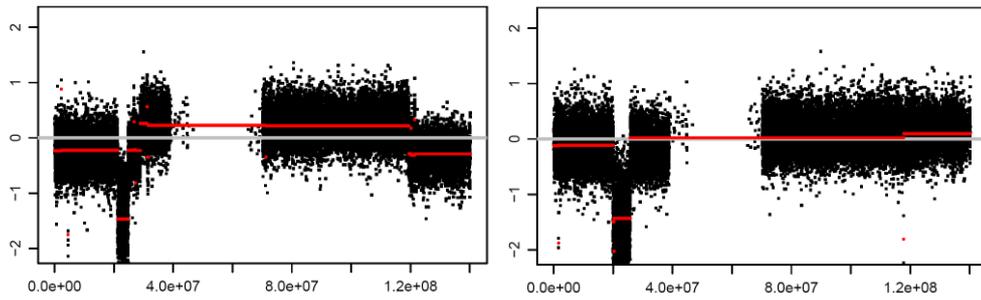


Abbildung 11: Verlust auf dem Chromosomenabschnitt 9p21.3, Probe SNU387 und SNU449

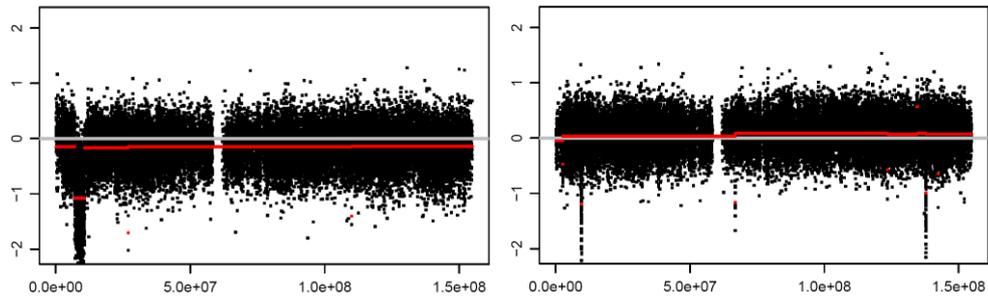


Abbildung 12: Verlust auf dem Chromosomenabschnitt Xp22.2-22.31, Probe Huh6 und SNU475

3.2.2 Amplifikationen

Eine Übersicht der ausgewählten amplifizierten Bereiche gibt Tabelle 30. Auch hier werden anschließend exemplarisch einige Bereiche als Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt.

Tabelle 30: Wichtigste Amplifikationen im HCC

Chromosomaler Bereich	Häufigkeit	Größe des minimal amplifizierten Abschnittes (kbp)	Anzahl der Gene im minimal amplifizierten Abschnitt	Mutmaßliches Zielgen	Abbildung
1q21.2-1q21.3	2/118 (1,7%)	3392914	27	MLLT11	-
3p14.2	1/118 (0,8%)	101253	1		-
3q12.1-13.11	1/118 (0,8%)	7382805	32		-
4p11-q12	1/118 (0,8%)	6293214	16		-
4q13.1-13.2	1/118 (0,8%)	3165445	7		-
5p13.2	1/118 (0,8%)	1404653	5		-
5q11.2	1/118 (0,8%)	671412	3		-

ERGEBNISSE

Chromosomaler Bereich	Häufigkeit	Größe des minimal amplifizierten Abschnittes (kbp)	Anzahl der Gene im minimal amplifizierten Abschnitt	Mutmaßliches Zielgen	Abbildung
6p21.1	3/118 (2,5%)	2092733	70	PTK7	-
6q12	3/118 (2,5%)	2690226	1	EYS	-
6q21	1/118 (0,8%)	1386390	8		-
7q11.22-11.23	1/118 (0,8%)	3953623	9		-
8p11.1-12	10/118 (8,5%)	7486975	42	FGFR1, UNC5D	Abbildung 13
8p22	1/118 (0,8%)	273995	3	PCM1	-
8p23.3	1/118 (0,8%)	228366	3		-
9p13.2-13.3	1/118 (0,8%)	1607372	9		-
11p14.1-14.2	1/118 (0,8%)	61342	1		-
11p15.1	1/118 (0,8%)	784441	5		-
11q13.2-13.3	10/118 (8,5%)	268287	1		-
11q24.2	1/118 (0,8%)	67679	1		-
12q11-p11.21	1/118 (0,8%)	911527	9		-
12p13.33	1/118 (0,8%)	5050829	14		-
13q14.11-14.12	1/118 (0,8%)	5095790	29		-
13q34	2/118 (1,7%)	3415301	25		-
14q12	2/118 (1,7%)	1142111	7		-
15q11.2	1/118 (0,8%)	1632718	5	OR4M2	-
16p11.2-12.1	1/118 (0,8%)	5232021	92		-
17p11.2	3/118 (2,5%)	2271175	5	USP22	Abbildung 14
17q11.2	1/118 (0,8%)	1935182	46		-
17q12	1/118 (0,8%)	4595079	55		-
17q21.31	5/118 (4,2%)	134586	2		-
17q24.1-24.2	1/118 (0,8%)	3009399	39		-
18p11.21	1/118 (0,8%)	3847220	25		-
18p11.32	2/118 (1,7%)	773010	10	YES1	-
19p12-13.12	4/118 (3,3%)	528785	15	MEF2B	-
19p13.3	1/118 (0,8%)	1807294	47		-
19q12	3/118 (2,5%)	2988088	8	CCNE1	-
19q13.11-13.2	1/118 (0,8%)	7040135	>100		-
19q13.31	1/118 (0,8%)	490780	12		-
22q11.21	1/118 (0,8%)	2281356	34		-
22q12.1-12.2	1/118 (0,8%)	2377246	48		-
22q11.22-11.23	1/118 (0,8%)	1793746	12		-
Xp22.33	9/118 (7,6%)	2417343	14		-

ERGEBNISSE

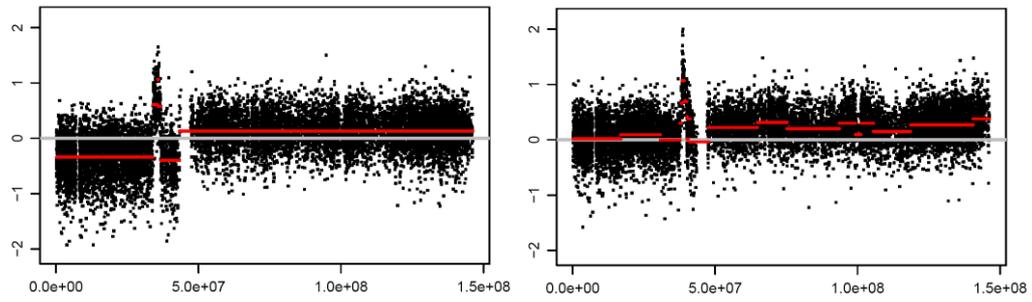


Abbildung 13: Zugewinn auf dem Chromosomenabschnitt 8p11.1-12, Probe GSM248791 und GSM248869

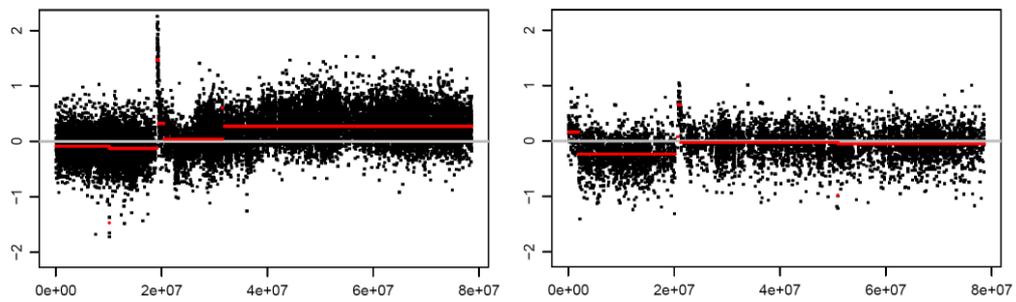


Abbildung 14: Zugewinn auf dem Chromosomenabschnitt 17p11.2, Probe Snu449 und GSM248850

3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.3.1 Leber-TMA

Mit den vorliegenden SNP-Ergebnissen, welche anschließend im FISH Oracle sowie in einer zusätzlichen visuellen Analyse selektiert wurden, erklärten wir 11 amplifizierte Bereiche für besonders interessant. Für alle gewählten DNA-Abschnitte konnten wir erfolgreich Sonden herstellen und sie auf dem Leber-TMA analysieren.

Von den 222 vorhandenen Gewebeproben auf dem Microarray waren bei den 11 Sonden durchschnittlich 142 (64%) der Spots auswertbar. Die geringste Auswertbarkeitsrate betrug 37,4% bei CCNE1, die höchste 80,6% bei PCM1. Eine Übersicht der untersuchten Bereiche sowie der erreichten Auswertbarkeit ist in Tabelle 31 zu finden.

Tabelle 31: Übersicht selbst hergestellter DNA-Sonden

Genname	Genort	Klon-Lokalisation	Auswertbarkeit (n=222) gesamter TMA	Auswertbarkeit HCC (n=93)
MLLT11	1q21.2	1: 149152908: 149345003	97 (43,7%)	57 (61,3%)
PTK7	6p21.1	6: 43123646: 43253529	178 (80,2%)	76 (81,7%)
EYS	6q12	6: 66139698: 66171972	146 (65,8%)	70 (75,3%)
FGFR1	8p12	8: 38289074: 38488995	120 (54,1%)	69 (74,2%)
UNC5D	8p12	8: 35633502: 35844224	158 (71,2%)	68 (73,1%)
PCM1	8p22	8: 17784184: 17950943	179 (80,6%)	73 (78,5%)
OR4M2	15q11.2	15: 19791367: 19970461	172 (77,5%)	74 (79,6%)
USP22	17p11.2	17: 20824144: 21055083	176 (79,3%)	71 (76,3%)
YES1	18p11.32	18: 712331: 788605	160 (72,1%)	66 (71,0%)
MEF2B	19p13.11	19: 19024191: 19194051	92 (41,4%)	44 (47,3%)
CCNE1	19q12	19: 34942166: 35092631	83 (37,4%)	40 (43,0%)

Für alle folgenden Ergebnisse wurde neben der Ratio, der Genkopiezahl/Zentromeranzahl zusätzlich die Gene Copy, d.h. die reine Genkopiezahl, erhoben und aufgelistet.

3.3.1.1 Ergebnisse MLLT11

Bei 1q21.2 und dem gewählten Gen myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11 (MLLT11) konnten wir 6/57 (10,5%) Amplifikationen, eine davon hochgradig (siehe Tabelle 32), 8/57 (14%) Gains sowie 1/57 (1,8%) Deletion nachweisen. Die reine Genkopiezahl war bei 29/57 (50,9%) der HCCs erhöht. Es fand sich eine signifikante positive Korrelation zwischen dem pT Tumorstadium und der Genkopiezahl ($p=0,0272$). Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 32, ein Foto der Amplifikation in Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 32: MLLT11 Ergebnisse der FISH

MLLT11	n HCC	n	Gene copy ≤ 2	Gene copy > 2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 $<$ Ratio < 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	9	55,56	44,44	0	66,67	11,11	22,22
G2	41	26	34,62	65,38	3,85	69,23	15,38	11,54
G3	3	2	50	50	0	100	0	0
p			0,527		0,8529			
pT1	16	10	90	10	0	100	0	0
pT2	42	25	40	60	4	60	24	12
pT3	30	19	42,11	57,89	0	78,95	5,26	15,79
pT4	4	3	33,33	66,67	0	66,67	33,33	0
p			0,0272*		0,1773			

ERGEBNISSE

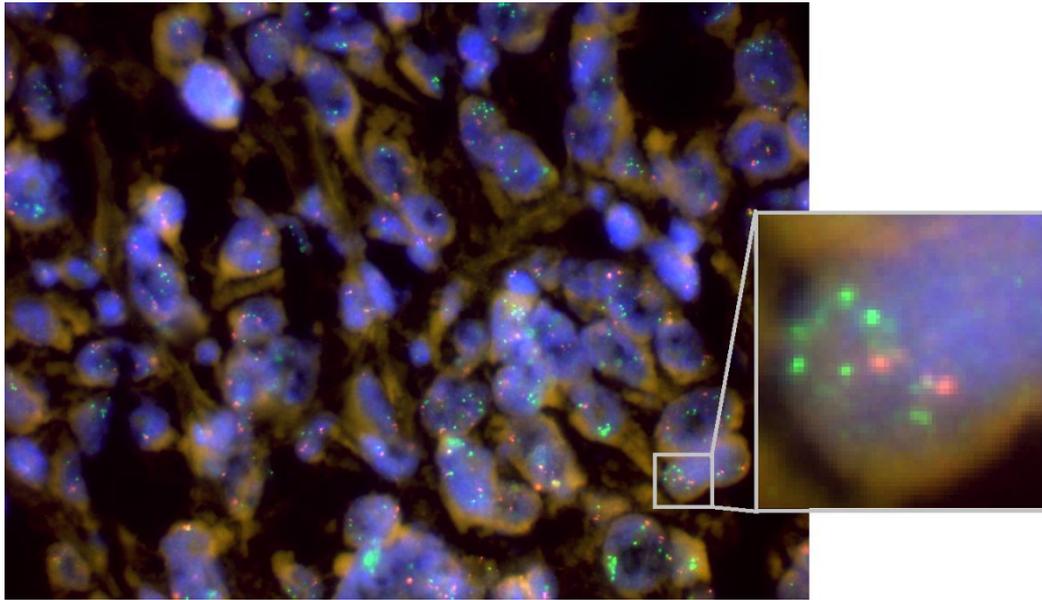


Abbildung 15: Amplifikation (Gen: MLLT11, Gewebe: Hepatozelluläres Karzinom 100fach vergrößert); die Zellkerne stellen sich blau, die Zielsonde grün und die Referenzsonde des Zentromers orange dar

3.3.1.2 Ergebnisse PTK7

Die Sonde, die im Genabschnitt der protein tyrosine kinase 7 (PTK7) (6p21.1) bindet, ergab 5/76 (6,6%) Amplifikationen, 5/76 (6,6%) Gains und 3/76 (3,9%) Deletionen sowie eine reine Genkopiezahlerhöhung bei 22/76 (28,9%) der Leberzellkarzinome auf dem Leber-Tissue Microarray. Es wurden keine Signifikanzen für das HCC gefunden. Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: PTK7 Ergebnisse der FISH

PTK7	n HCC	n	Gene copy ≤ 2	Gene copy > 2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 $<$ Ratio < 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	11	81,82	18,18	0	81,82	9,09	9,09
G2	41	33	60,61	39,39	6,06	81,82	9,09	3,03
G3	3	3	66,67	33,33	0	66,67	33,33	0
p			0,4102		0,7618			
pT1	16	11	90,91	9,09	0	100	0	0
pT2	42	36	69,44	30,56	2,78	83,33	5,56	8,33
pT3	30	26	65,38	34,62	3,85	80,77	11,54	3,85
pT4	4	3	66,67	33,33	33,33	33,33	0	33,33
p			0,38		0,2539			

3.3.1.3 Ergebnisse EYS

Im Bereich des eyes shut homolog (Drosophila) (EYS) auf 6q12 konnten wir 5/70 (7,1%) Amplifikationen nachweisen, 10/70 (14,3%) Gains sowie Genkopiezahlerhöhungen in 42/70 (60%) der Fälle. Eine Amplifikation ist verglichen mit einer normalen Genkopiezahl in Abbildung 16 und Abbildung 17 zu sehen. Eine signifikante positive Korrelation zwischen dem pT Tumorstadium und der Ratio wurde gefunden (p=0,0127). Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: EYS Ergebnisse der FISH

EYS	n HCC	n	Gene copy ≤2	Gene copy >2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 < Ratio < 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	10	60	40	0	80	0	20
G2	41	33	33,33	66,67	0	87,88	9,09	3,03
G3	3	3	0	100	0	66,67	0	33,33
p			0,0768		0,1923			
pT1	16	12	66,67	33,33	0	91,67	0	8,33
pT2	42	32	40,63	59,38	0	87,5	12,5	0
pT3	30	23	26,09	73,91	0	65,22	17,39	17,39
pT4	4	3	33,33	66,67	0	33,33	66,67	0
p			0,139		0,0127*			

ERGEBNISSE

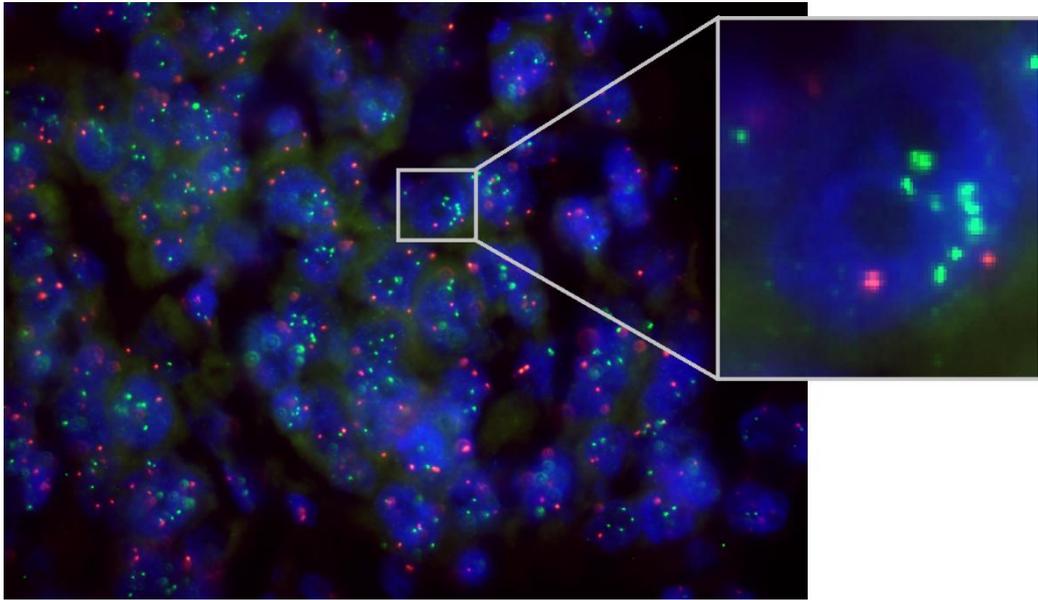


Abbildung 16: Amplifikation (Gen: EYS, Gewebe: Hepatozelluläres Karzinom, 100fach vergrößert); in blau sind hier die Zellkerne, in grün die Zielgensonden, in orange die Referenzsonden (Zentromer) zu sehen

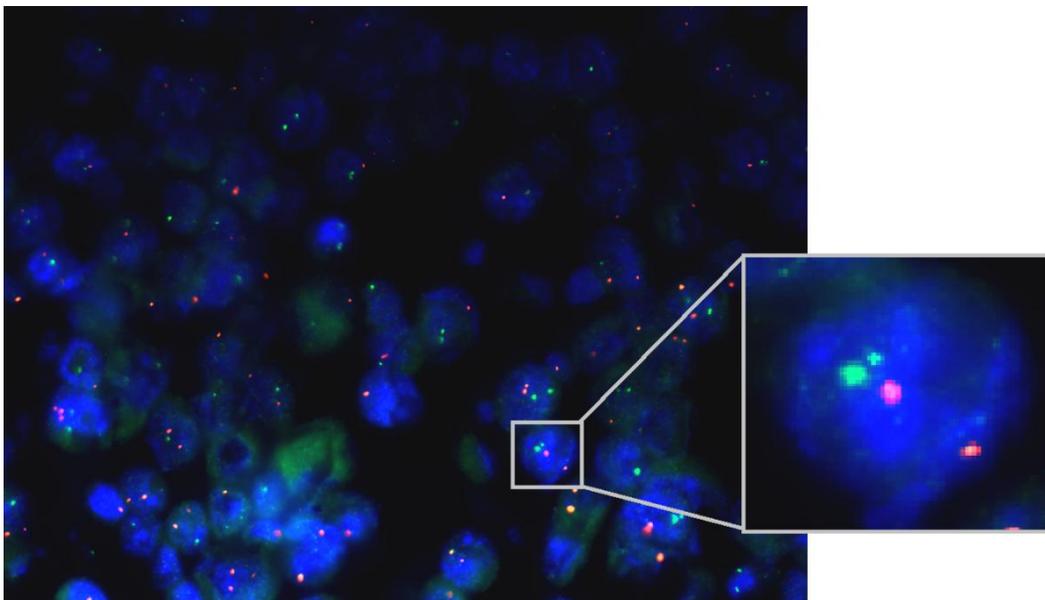


Abbildung 17: Normale Genkopiezahl (Gen: EYS, Gewebe: Hepatozelluläres Karzinom, 100fach vergrößert); Zellkerne blau, Genspezifische Sonde in grün, Referenzsonde in orange

ERGEBNISSE

3.3.1.4 Ergebnisse FGFR1

Der DNA-Bereich beim fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) auf 8p12 lieferte folgende Ergebnisse: Genkopiezahlerhöhung in 27/69 (39,1%) der Fälle, 6/69 (8,7%) Amplifikationen, 6/69 (8,7%) Gains und 5/69 (7,2%) Deletionen. Keine Signifikanzen wurden entdeckt. Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 35 dargestellt, ein Bild einer Amplifikation ist in Abbildung 18 zu sehen.

Tabelle 35: FGFR1 Ergebnisse der FISH

FGFR1	n HCC	n	Gene copy ≤ 2	Gene copy > 2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 $<$ Ratio $<$ 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplifikation)
G1	13	10	60	40	0	80	10	10
G2	41	32	50	50	9,38	71,88	9,38	9,38
G3	3	2	100	0	0	100	0	0
p			0,2452		0,8229			
pT1	16	12	41,67	58,33	0	75	8,33	16,67
pT2	42	31	70,97	29,03	9,68	77,42	6,45	6,45
pT3	30	23	56,52	43,48	4,35	82,61	4,35	8,7
pT4	4	3	66,67	33,33	33,33	0	66,67	0
p			0,3334		0,0817			

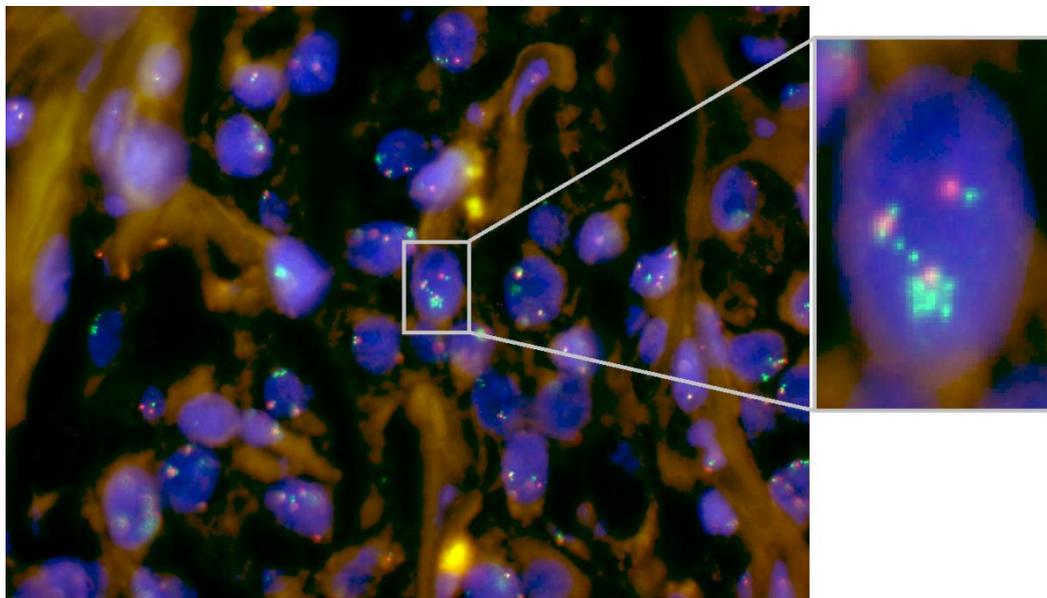


Abbildung 18: Amplifikation (Gen: FGFR1, Gewebe: Cholangiozelluläres Karzinom, 100fach vergrößert); blau: Zellkerne, grün: FGFR1-Sonde, orange: Referenzsonde

ERGEBNISSE

3.3.1.5 Ergebnisse UNC5D

Im Bereich des unc-5 homolog D (*C. elegans*) (UNC5D) bei 8p12 fanden wir 2/68 (2,9%) Amplifikationen und 7/68 (10,3%) Deletionen, eine Erhöhung der Genkopiezahl fand sich bei 12/68 (17,6%) hepatozellulären Karzinomen. Eine signifikante positive Korrelation wurde zwischen dem Grading und Genkopiezahl aufgedeckt ($p=0,0271$). Alle Ergebnisse für das HCC in diesem Bereich sind in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: UNC5D Ergebnisse der FISH

UNC5D	n HCC	n	Gene copy ≤ 2	Gene copy > 2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 $<$ Ratio $<$ 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	11	100	0	9,09	81,82	0	9,09
G2	41	30	70	30	13,33	83,33	0	3,33
G3	3	2	50	50	0	100	0	0
p			0,0271*		0,8543			
pT1	16	10	90	10	10	90	0	0
pT2	42	31	83,87	16,13	6,45	90,32	0	3,23
pT3	30	24	75	25	16,67	79,17	0	4,17
pT4	4	3	100	0	0	100	0	0
p			0,477		0,7977			

3.3.1.6 Ergebnisse PCM1

Im Bereich von 8p22, auf dem pericentriolar material 1 (PCM1) liegt, konnten wir erhöhte Genkopiezahlen in 11/73 (15,1%) der auswertbaren Fälle, 12/73 (16,4%) Deletionen und keine Amplifikationen aufzeigen. Eine rein statistische Assoziation, jedoch ohne klare Richtung konnten wir für PCM1 zwischen dem Grading und der Ratio aufdecken ($p=0,03$). Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37: PCM1 Ergebnisse der FISH

PCM1	n HCC	n	Gene copy ≤ 2	Gene copy > 2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 $<$ Ratio $<$ 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	11	100	0	0	100	0	0
G2	41	32	78,13	21,88	28,13	71,88	0	0
G3	3	2	100	0	0	100	0	0
p			0,0714		0,03*			

ERGEBNISSE

PCM1	n HCC	n	Gene copy ≤2	Gene copy >2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 < Ratio < 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
pT1	16	11	90,91	9,09	9,09	90,91	0	0
pT2	42	34	82,35	17,65	14,71	85,29	0	0
pT3	30	25	84	16	24	76	0	0
pT4	4	3	100	0	0	100	0	0
p			0,6787		0,4589			

3.3.1.7 Ergebnisse OR4M2

Bei 15q11.2, dem olfactory receptor, family 4, subfamily M, member 2 (OR4M2), gab es 11 Amplifikationen in 74 Fällen (14,9%), 20 von 74 Gains (27%) und eine reine Genkopiezahlveränderung bei insgesamt 47/74 (63,5%) der Tumoren. Eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Grading und der Ratio ist bei OR4M2 zu sehen ($p=0,041$). Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38: OR4M2 Ergebnisse der FISH

OR4M2	n HCC	n	Gene copy ≤2	Gene copy >2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 < Ratio < 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	11	45,45	54,55	0	72,73	27,27	0
G2	41	32	28,13	71,88	0	46,88	40,63	12,5
G3	3	3	0	100	0	33,33	0	66,67
p			0,1871		0,041*			
pT1	16	10	50	50	0	70	20	10
pT2	42	36	44,44	55,56	0	61,11	22,22	16,67
pT3	30	25	24	76	0	48	36	16
pT4	4	3	0	100	0	66,67	33,33	0
p			0,1007		0,7835			

3.3.1.8 Ergebnisse USP22

Das ubiquitin specific peptidase 22-Gen (USP22) bei 17p11.2 zeigte 1/71 (1,4%) Amplifikation im HCC sowie 6/71 (8,5%) Deletionen. Die Genkopiezahl war bei insgesamt 14/71 (19,7%) HCCs erhöht. Signifikanzen wurden nicht gefunden. Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 39 dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 39: USP22 Ergebnisse der FISH

USP22	n HCC	n	Gene copy ≤2	Gene copy >2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 < Ratio < 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	11	90,91	9,09	0	100	0	0
G2	41	32	75	25	15,63	84,38	0	0
G3	3	2	50	50	0	100	0	0
p			0,3313		0,1606			
pT1	16	11	81,82	18,18	0	100	0	0
pT2	42	33	81,82	18,18	9,09	87,88	0	3,03
pT3	30	24	75	25	12,5	87,5	0	0
pT4	4	3	100	0	0	100	0	0
p			0,6187		0,609			

3.3.1.9 Ergebnisse YES1

Der DNA-Bereich um das v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1 (YES1 bei 18p11.32) zeigte auf dem Array eine Genkopiezahlerhöhung in 13/66 (19,7%) der Leberzellkarzinome, jedoch keine Amplifikationen. Zusätzlich wurden 2/66 (3%) Deletionen nachgewiesen. Keine statistisch relevanten Assoziationen wurden entdeckt. Alle Ergebnisse für das hepatozelluläre Karzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40: YES1 Ergebnisse der FISH

YES1	n HCC	n	Gene copy ≤2	Gene copy >2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 < Ratio < 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	10	90	10	0	100	0	0
G2	41	31	77,42	22,58	3,45	96,55	0	0
G3	3	2	50	50	0	100	0	0
p			0,4214		0,7037			
pT1	16	11	100	0	0	100	0	0
pT2	42	31	77,42	22,58	0	100	0	0
pT3	30	23	73,91	26,09	4,55	95,45	0	0
pT4	4	3	100	0	33,33	66,67	0	0
p			0,0773		0,1162			

3.3.1.10 Ergebnisse MEF2B

Auf dem Chromosom 19p13.11, dem Gen myocyte enhancer factor 2B (MEF2B) entdeckten wir eine hochgradige Amplifikation im HCC in 44 Fällen (2,3%) sowie

ERGEBNISSE

eine Deletion (2,3%). Eine Übersicht der Amplifikation ist in Abbildung 19 dargestellt. Die reine Anzahl der Gewebe mit erhöhten Genkopiezahlen betrug 19/44 (43,2%). Eine signifikante inverse Assoziation ist bei MEF2B zwischen dem Grading und der Ratio zu sehen ($p=0,0415$). Aufgrund der geringen Fallzahl ist das Ergebnis jedoch mit Vorsicht zu werten. Alle Ergebnisse für das primäre Leberzellkarzinom in diesem Bereich sind in Tabelle 41 dargestellt.

Tabelle 41: MEF2B Ergebnisse der FISH

MEF2B	n HCC	n	Gene copy ≤ 2	Gene copy > 2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 $<$ Ratio $<$ 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	11	90,91	9,09	0	100	0	0
G2	41	33	63,64	36,36	0	100	0	0
G3	3	3	66,67	33,33	50	50	0	0
p			0,1766		0,0415*			
pT1	16	12	83,33	16,67	14,29	85,71	0	0
pT2	42	33	78,79	21,21	0	100	0	0
pT3	30	26	65,38	34,62	0	94,44	0	5,56
pT4	4	3	66,67	33,33	0	100	0	0
p			0,567		0,472			

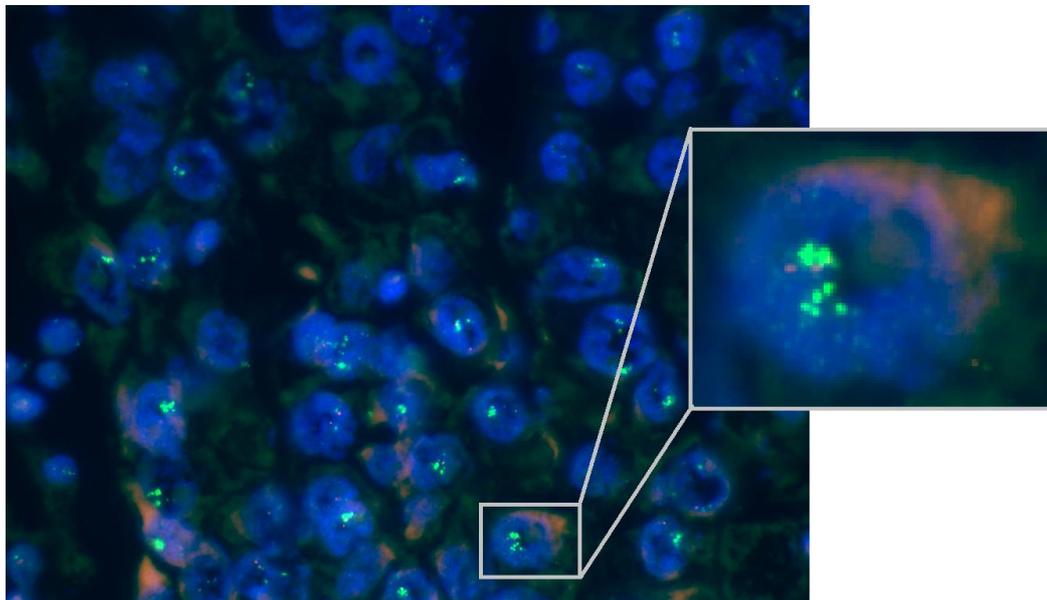


Abbildung 19: Amplifikation (Gen: MEF2B, Gewebe: HCC, 100fach vergrößert); blau: Zellkerne, grün: MEF2B-Sonde, orange: Referenzsonde

3.3.1.11 Ergebnisse CCNE1

Am Cyclin E1 (CCNE1 bei 19q12) fanden sich 6 erhöhte Genkopiezahlen in 40 auswertbaren HCC-Proben (15%), es konnten jedoch keine Amplifikationen nachgewiesen werden, siehe Tabelle 42. Eine signifikante positive Korrelation besteht zwischen dem Grading und der Genkopiezahl bei CCNE1 ($p=0,0028$).

Tabelle 42: CCNE1 Ergebnisse der FISH

CCNE1	n HCC	n	Gene copy ≤ 2	Gene copy > 2	Ratio < 1 (Deletion)	Ratio = 1 (Normal)	1 $<$ Ratio $<$ 2 (Gain)	Ratio ≥ 2 (Amplification)
G1	13	11	100	0	0	100	0	0
G2	41	27	92,59	7,41	0	100	0	0
G3	3	2	0	100	0	100	0	0
p			0,0028*					
pT1	16	10	80	20	0	100	0	0
pT2	42	29	96,55	3,45	0	100	0	0
pT3	30	21	90,48	9,52	0	100	0	0
pT4	4	2	50	50	0	100	0	0
p			0,1923					

3.3.2 Zelllinien-TMA

Zusätzlich untersuchten wir den Zelllinienarray mit einer Sonde, die im Bereich des Gens EYS bei 6q12 bindet. Von 140 Gewebeproben auf dem Array waren 15 aufgrund unzureichender SONDENSIGNALE, unzureichender Gewebequalität oder fehlendem Gewebeschnitt nicht auswertbar. Fünf (4%) der verbliebenen auswertbaren 126 Zelllinien zeigten eine Amplifikation: MOLT-4 (akute lymphatische Leukämie), NCI-H23 (H23, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom), NCI-H322M (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom), Hs 766T (duktales Pankreaskarzinom, zu sehen in Abbildung 20) und U-138 MG (Glioblastom, zu sehen in Abbildung 21). Das duktales Pankreaskarzinom Hs 766T sowie das Glioblastom U-138 MG zeigten sogar eine hochgradige Amplifikation mit durchschnittlich über 10 Gensignalen auf. 16 übrige Zelllinien (13,5%) wiesen einen Gain auf: IGROV1, RXF-393 (caki-1), SK-MEL-28, SK-MEL-5, BS 149, ECV-304, MRC-5, KU-19-19, A-172, U-87 MG, LN-405, B-CPAP, ONCO-DG-1, HT-29, SW480 (SW-480) und SW403 (SW-403). Die restlichen 105 (83,4%) Zelllinienspots konnten als normal klassifiziert werden.

ERGEBNISSE

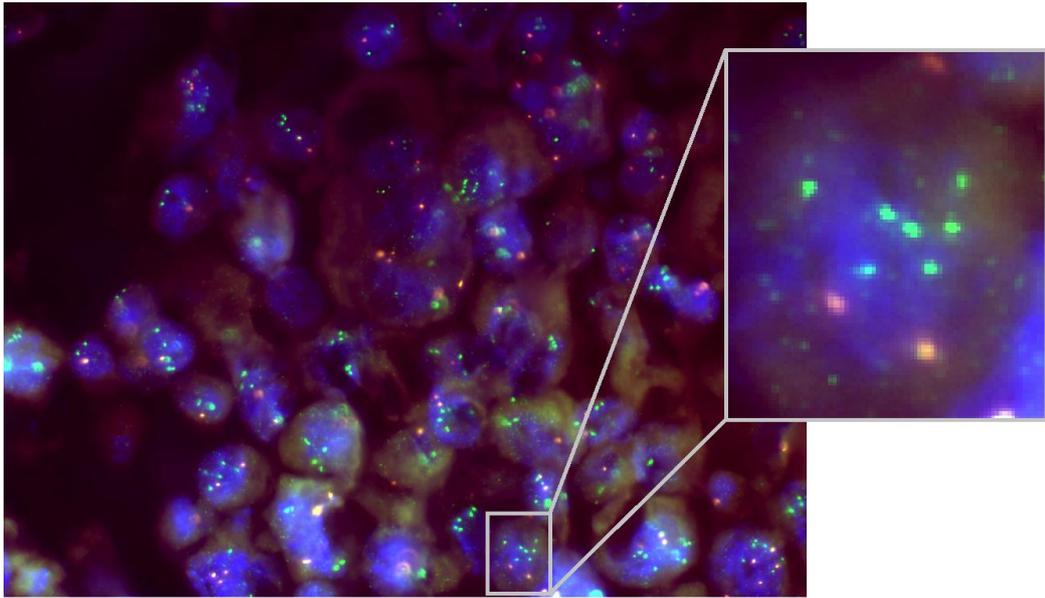


Abbildung 20: Highlevel-Amplifikation (Gen: EYS, Zelllinie duktales Pankreaskarzinom Hs 766T, 100fach vergrößert); blau: Zellkerne, grün: Sonde im Bereich des Zielgens, orange: Referenzsonde (Zentromer)

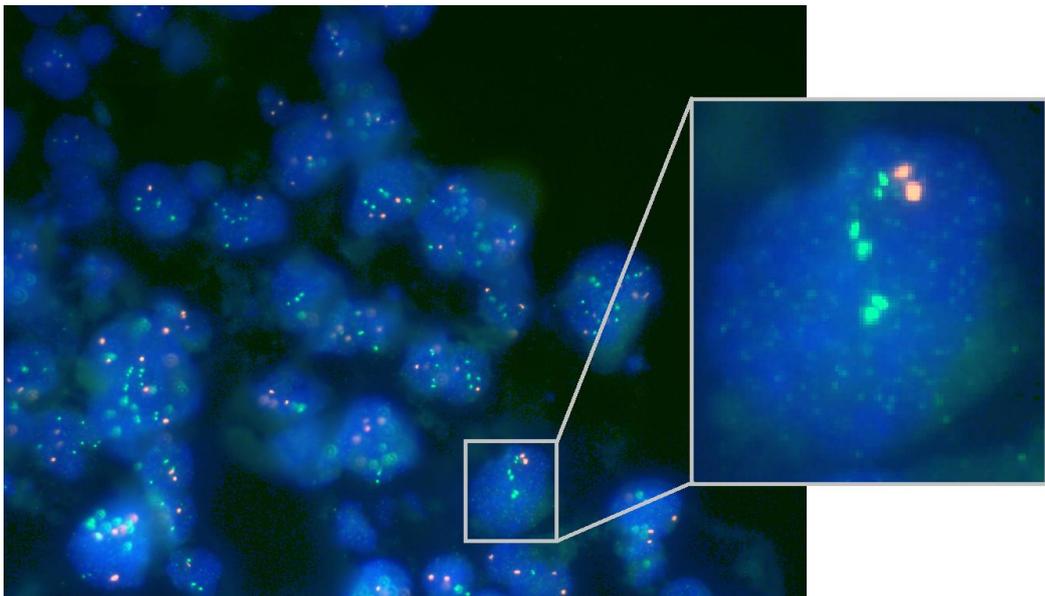


Abbildung 21: Highlevel-Amplifikation (Gen EYS, Zelllinie Glioblastom U-138 MG, 100fach vergrößert); blau: Zellkern, grün: Zielsonde, orange: Referenzsonde

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war es, neue Amplifikationsorte beim HCC zu finden, die auf bisher unbekannte Onkogene hindeuten könnten. Dazu wurde zunächst ein Genkopiezahlscreening von 118 hepatozellulären Karzinomen vorgenommen. Die heutigen hochauflösenden DNA-Arrays, wie z.B. der hier verwendete Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 erlauben eine Auflösung auf der Ebene einzelner Gene (ca. 4 Kilobasen) und sind somit hervorragend geeignet, um sowohl die Grenzen von amplifizierten Chromosomenabschnitten zu bestimmen, als auch die Kopiezahl der betroffenen Gene abzuschätzen.

Da Leberzellkarzinome allerdings relativ seltene Tumoren sind und für die SNP Array Analyse ausschliesslich sehr gut erhaltene DNA verwendet werden kann, wie sie z.B. in kryokonservierten Gewebeproben vorliegt, standen am UKE nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von geeigneten Gewebeproben zur eigenen Untersuchung zur Verfügung. Für diese Arbeit wurde daher die Gesamtzahl der ausgewerteten Proben durch Tumorproben erweitert, deren Kopiezahlprofil in der GEO-Datenbank öffentlich zugänglich abgelegt worden war. Durch die Kombination eigener und öffentlicher Daten konnten so insgesamt 118 HCCs in die Analysen einbezogen werden.

Zunächst wurden Kopiezahlprofile der einzelnen Tumoren erstellt und kombiniert, um Bereiche mit rekurrenten Amplifikationen zu entdecken. Hierbei wurde ein am Institut für Pathologie entwickeltes Programm (FISH-Oracle) zur Hilfe genommen um die Position von Kopiezahlveränderungen auf den Chromosomen möglichst genau zu bestimmen. In einem weiteren Schritt wurden darüber hinaus die individuellen Kopiezahlprofile „von Hand“ analysiert, um Bereiche mit hoher Kopiezahl zu identifizieren. Zusammen erbrachten diese Analysen einen Katalog von hochgradig amplifizierten, aber gleichzeitig räumlich begrenzten Bereichen.

Die Resultate der SNP Array Analysen zeigten Zugewinne und Verluste insbesondere in den chromosomalen Bereichen 1q, 3p, 4q, 8q, 9p, 10q, 11q, 14q, 15q, 16p, 16q, und Xq, (Deletionen), sowie 1q, 6p, 6q, 11q, 15q und 19p (Zugewinne). Hochgradige Amplifikationen fanden sich auf 1q, 3p, 3q, 4q, 5p, 5q, 6p, 6q, 7q, 8p, 9p, 11p, 11q, 12p, 13q, 14q, 15q, 16p, 17p, 17q, 18p, 19p, 19q, 22q und Xp.

Diese Ergebnisse passen gut mit bereits publizierten Daten aus Studien zusammen, die mit klassischer CGH oder Array CGH Leberzellkarzinome

DISKUSSION

untersucht haben. In diesen Arbeiten wurden z.B. typischerweise Zugewinne auf 1q in 38-78%, 6p in 33-35%, 8q in 30-67%, 17q in 30-37% und 20q in 30-41% der Fälle oder Verluste auf 1p in 30-36%, 4q in 30-75%, 8p in 30-80%, 13q in 30-37%, 16q in 30-70% und 17p in 30-52% der Fälle detektiert. Ein hochgradiger Kopiezahlgewinn bei 11q13 ist in etwa 5% der Fälle in den erwähnten Studien zu sehen (Villanueva et al., 2007).

Von den detektierten hochgradigen Amplifikationen in der vorliegenden Studie (1q21 in 1,7%, 3p14 in 0,8%, 3q12-13 in 0,8%, 4p11-q12 in 0,8%, 4q13 in 0,8%, 5p13 in 0,8%, 5q11 in 0,8%, 6p21 in 2,5%, 6q12 in 2,5%, 6q21 in 0,8%, 7q11 in 0,8%, 8p11-12 in 8,5%, 8p 22 in 0,8%, 8p23 in 0,8 %, 9p12 in 0,8%, 11p14 in 0,8%, 11p15 in 0,8%, 11q13 in 8,5%, 11q24 in 0,8%, 12q11-p11 in 0,8%, 12p13 in 0,8%, 13q14 in 0,8%, 13q34 in 1,7%, 14q12 in 1,7%, 15q11 in 0,8%, 16p11-12 in 0,8%, 17p11 in 2,5%, 17q11 in 0,8%, 17q12 in 0,8%, 17q21 in 4,2%, 17q24 in 0,8%, 18p11.21 in 0,8%, 18p11.32 in 1,7%, 19p12-13 in 3,3%, 19p13 in 0,8%, 19q12 in 2,5%, 19q13.11 in 0,8%, 19q13.31 in 0,8%, 22q11 in 0,8%, 22q12 in 0,8%, 22q11 in 0,8% und Xp22 in 7,6%) waren einige bereits aus der Literatur bekannt. So gilt z.B., das CCND1 auf Chromosom 11q13 als eines der hochgradig amplifizierten Gene (Zhang et al., 1993, Takahashi et al., 2007). Es handelt sich dabei um ein Gen, welches direkt den Zellzyklus durch Phosphorylierung des Retinoblastomproteins steuert (Bahnassy et al., 2011) und auch in kolorektalen sowie cholangiozellulären Karzinomen als amplifiziertes Gen auftritt (Sugimachi et al., 2001, Bondi et al., 2005). Mit gleicher Häufigkeit wurden in der vorliegenden Studie Genkopiezahlgewinne auf Chromosom 8p11-p21 gefunden. Auch dieser Genort wurde in der Literatur häufig vor allem bei anderen Tumorarten als amplifiziert beschrieben. So fanden unter anderem Gelsi-Boyer et al. eine Korrelation der Amplifikation mit dem histologischen Tumorgrad und schlechter Prognose bei Brusttumoren (Gelsi-Boyer et al., 2005), Kwek et al. ein komplexes Amplikon bei Brusttumoren, welches möglicherweise koamplifiziert mit der Region 11q ist (Kwek et al., 2009), Cooke et al neben Deletionen von 8p auch Amplifikationen in Pankreaszelllinien (Cooke et al., 2008) und Williams et al. neben Deletionen auch Amplifikationen in Urothelkarzinomen (Williams et al., 2010). In pleomorphen Adenomen der Speicheldrüsen wurde in dieser Region eine Amplifikation und ein genomischer Bruchpunkt von Persson et al. entdeckt (Persson et al., 2008). Das Zielgen dieser Amplifikation ist allerdings bis heute nicht eindeutig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gewebemikroarray-Technologie dazu eingesetzt, die identifizierten Genkopiezahlgewinne weiter zu validieren, deren Zielgene bislang nicht bekannt, oder die bisher noch nicht beschrieben worden sind. Zu den bekannten Amplifikationen mit unbekanntem Zielgenen zählen vor allem 1q, 17q und 20 q sowie Gains bei 5p, 5q, 7p, 7q, 9p, 10q, 19q (Villanueva

DISKUSSION

et al., 2007). Bereits benannte Zielgene gibt es für die Regionen 6p mit VEGFA, 8q mit MYC und 11q mit CCND1 als jeweils in Studien identifizierte Zielgene (Llovet and Bruix, 2008, Takahashi et al., 2007). Zu den bisher noch nicht beschriebenen Amplifikationen, welche in der vorliegenden Studie in zumindest einem Tumor gefunden wurden, zählen die chromosomalen Bereiche bei 3p, 3q, 4p, 4q, 6q, 8p, 11p, 12q, 12p, 13q, 14q, 15q, 16p, 17p, 18p, 19p, 22q und Xp.

Die von uns in dieser Studie genutzte TMA-Technologie hat den Vorteil, dass eine große Anzahl von Tumoren gleichzeitig analysiert werden kann. Zudem lagen uns von den Tumoren histopathologische Daten vor, die es erlaubten, nach möglichen Zusammenhängen zwischen Genkopiezahlveränderungen und dem Tumorphänotyp des HCC zu suchen.

Allerdings war es notwendig, für die TMA-Analyse Gene aus den amplifizierten Bereichen zu selektieren, gegen die anschließend entsprechende FISH-Sonden generiert wurden. Für die Auswahl dieser Gene wurde wiederum das Programm FISH-Oracle verwendet. Es erlaubt eine vergleichende Darstellung der Ausdehnung des Amplifikationsbereiches in verschiedenen Tumoren, sodass der kleinste gemeinsam amplifizierte Genombereich für jede Amplifikation bestimmt werden konnte. Allerdings zeigte sich, dass in der Regel in jedem kleinsten gemeinsam amplifizierten Bereich mehrere Gene lokalisiert waren. Eine Ausnahme war der amplifizierte Bereich bei Genort 6q12, in dem nur ein einziges Gen (EYS) lokalisiert war und das daher gezielt zur Herstellung einer FISH Sonde ausgewählt wurde. Für die übrigen Bereiche wurden die Gene zur Herstellung einer FISH Sonde mehr oder weniger willkürlich ausgewählt. Allerdings wurde ein Gen bevorzugt, wenn es aufgrund der Literaturdaten eine mögliche onkogene Funktion aufwies. Dies galt für die Gene MLLT11, PTK7, FGFR1, UNC5D, USP22, YES1, MEF2B und CCNE1, bei denen es sich um einen Apoptoseregulator (Co et al., 2008), drei Tyrosinkinase (Muller-Tidow et al., 2004, Chioni and Grose, 2012, Nakakuki et al., 2002), einen apoptoseinduzierenden Netrinrezeptor (Koed et al., 2005), eine Untereinheit eines Transkriptionsfaktorkomplexes (Zhang et al., 2008), einen Transkriptionsfaktor (Hidaka et al., 1995) und einen Zellzyklusregulator (Gurzov and Izquierdo, 2006) handelt. Es ist allerdings wichtig, dass es sich bei diesen ausgewählten Genen nicht zwingend auch um das tatsächliche, biologisch relevante Zielgen handeln muss. Zum Einen ist für viele andere Gene innerhalb der minimal amplifizierten Bereiche die Funktion nicht bekannt, zum Anderen könnte auch die bisher bekannte Funktion nicht immer zwingend richtig sein. Für die in dieser Studie durchgeführten Validierungsstudien ist es aber auch nicht zwingend nötig, das biologisch relevante Zielgen zu untersuchen, solange das untersuchte Gen innerhalb der typischerweise kleinsten Region der Amplifikation

DISKUSSION

liegt. Es ist zu erwarten, dass mit jedem beliebigen Gen innerhalb dieser Region die gleichen Ergebnisse erzielt werden können.

Die neben dem amplifizierten Bereich bei 11q13 mit dem bekannten Zielgen CCND1 am häufigsten aufgetretene Genkopiezahlveränderung (8,5%) in unserer SNP Array Analyse war auf 8p11-12 zu finden. Hier waren 16 Gene in der gemeinsam amplifizierten Region bei einem mehrgipfeligen Amplifikationsmuster. Die verwendeten FISH-Sonden gegen FGFR1 und UNC5D zeigten eine Amplifikation in 8,7% und 2,9 % der HCCs, die etwas unter der Literaturreate anderer Tumorentitäten, z.B. von 20% Amplifikationen in Lungenkarzinomen (Schildhaus et al., 2012) und 17,4% in oralen Plattenepithelkarzinomen (Freier et al., 2007) liegen. FGFR1 ist ein Wachstumsfaktorrezeptor, dessen Amplifikation mit einer onkogenen Funktion gut vereinbar ist. Dieser zeigte keine Assoziationen zwischen Amplifikationshöhe und Grad oder Stadium des Tumors. UNC5D ist ein Rezeptor, welcher bei Abwesenheit seines Liganden die Apoptose induzieren kann (Koed et al., 2005), auch dieses Gen stellt somit ein mögliches Onkogen dar. Eine Assoziation war für die Genkopiezahlerhöhung von UNC5D mit dem Tumorgrad zu sehen, was darauf hinweisen könnte, dass hier vorliegende Genkopiezahlinstabilitäten eine Tumorprogression begünstigen. Die Komplexität des in den SNP-Daten gefundenen Amplikons um 8p12 spricht für ein bereits veröffentlichtes Problem des komplexen Auftretens chromosomaler Aberrationen in dem Bereich (Pole et al., 2006), welches anhand unserer Daten auch für das HCC möglich ist. Um diesem weiter nachzugehen, würde sich im Rahmen einer weiteren Studie die Feinkartierung des gesamten amplifizierten Bereiches mithilfe der FISH auf ausgewählten Gewebeproben anbieten.

Als das am häufigsten amplifizierte Gen in der TMA-Analyse (14,9%) stellte sich das Gen OR4M2 heraus. In der SNP Array Analyse zeigte sich eine vielversprechende hochgradige Genkopiezahlerhöhung (0,8%), welche auf Chromosom 15q11.2 lag und 5 Gene im kleinsten gemeinsam amplifizierten Bereich aufwies. Das OR4M2, ein G-Protein gekoppelter, membranständiger und olfaktorischer Rezeptor (Lancet et al., 1996-2012), welcher in 14,9% der HCC-Fälle Amplifikationen und eine Korrelation zwischen dem Grading und der Ratio zeigte, wurde in bisherigen Studien nicht als Onkogen gehandelt. Die aufgetretene Amplifikationshöhe in beiden Analysen könnte einen Einfluss dessen in der HCC Tumorgenese aufzeigen oder die Theorie bestätigen, dass die olfaktorischen Proteine eine individuelle Diversität in Kopiezahl und Expressionsmuster aufweisen, welche einem vielfältigen Geruchssinn dient und in allen Zellen unseres Körpers nachzuweisen ist (Menashe et al., 2003, Young et al., 2008).

DISKUSSION

Der in der TMA-Analyse zweithäufigste von Amplifikationen (10,5%) betroffene Genort lag bei 1q21.2 mit 27 Genen im kleinsten gemeinsam amplifizierten Bereich, hochgradige Amplifikationen in der SNP-Analyse traten in 1,7% der Fälle auf. In der FISH zeigte das Gen MLLT11 Amplifikationen in 10,5% der hepatozellulären Karzinome mit einer Korrelation zwischen dem pT-stadium und der Genkopiezahl, wobei es hier keine Vergleichsdaten aus anderen Studien gibt. Das MLLT11 ist wichtig für die Apoptoseregulation und Medikamentenresistenz (Co et al., 2008) und wird bereits als ein Onkogen gehandelt, da es ein geläufiger Translokationspartner in Leukämien ist (Tse et al., 2004, Li et al., 2003). Es wurde mit der Progression und Metastasierung von Brustkrebs in Verbindung gebracht und scheint ebenfalls in die Entstehung von Keimzelltumoren des Hodens verwickelt zu sein (Skotheim et al., 2006, Chang et al., 2008, Li et al., 2006). Gains und Amplifikationen der Region gehören zu den am häufigsten genannten Kopiezahlveränderungen im HCC. Mit unseren Ergebnissen wird deutlich, dass MLLT11 das Zielgen dieser Veränderungen sein könnte.

Das nun folgende Gen, das EYS im Bereich 6q12, zeigte in 2,5% der Fälle eine hochgradige Genkopiezahlveränderung in der SNP Analyse und war dabei das einzige Gen im kleinsten amplifizierten Bereich. In der FISH zeigten sich Amplifikationen in 7,1% der HCCs auf dem TMA. Wir konnten eine signifikante positive Korrelation zwischen dem pT-Stadium und der Ratio ($p=0,0127$) nachweisen. Das EYS, das einzige Gen im amplifizierten Bereich bei 6q12 und eine epidermal growth factor-like-domain 11, wird auf der Retina exprimiert und ist kaum untersucht (Collin et al., 2008), Amplifikationen wurden in bisherigen Studien nicht beschrieben. Wir untersuchten das Gen zusätzlich auf einem Zelllinien TMA und konnten weitere Amplifikationen in Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms, Glioblastoms, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinoms und akuter lymphatischer Leukämie nachweisen. Eine weitere Analyse dieses vielversprechenden Gens in Bezug auf Tumorentstehung und -progression steht noch aus.

Die im Folgenden diskutierten Gene PTK7 (6p21.1), USP22 (17p11.2) und MEF2B (19p13.11) zeigten in 2,5% (PTK7 und USP22) und 3,3% (MEF2B) hochgradige Genkopiezahlveränderungen in der SNP Analyse und wurden für die FISH vor allem wegen ihrer zellzyklussteuernden Funktion ausgewählt. Das auf Chromosom 6p21.1 liegende PTK7 zeigte in der FISH-Analyse in 6,6% der Fälle Amplifikationen bei einem kleinsten gemeinsam amplifizierten Bereich mit insgesamt 70 anderen Genen. Die PTK7, eine Tyrosinkinase, welche für Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere zuständig ist, zeigt sich durch erhöhte Expressionswerte in Kolonkarzinomen sowie der akuten myeloischen Leukämie (AML) als möglicher Marker oder ein in die Tumorprogression

DISKUSSION

involviertes Gen (Muller-Tidow et al., 2004, Mossie et al., 1995). Amplifikationen wurden in 6% der untersuchten Fälle für das Magenkarzinom beschrieben (Kiyose et al., 2012). Signifikanzen konnten in unserer Studie leider nicht nachgewiesen werden.

USP22, welches auf Chromosom 17p11.2 liegt, war eines von 5 Genen im kleinsten gemeinsam vervielfältigten Bereich und in 2,5% der Fälle in der SNP Array Analyse amplifiziert. In der FISH erhielten wir Ergebnisse mit 1,4% Amplifikationen, jedoch einer höheren Anzahl an Genkopiezahlgewinnen (19,7%), wobei keine Assoziationen nachgewiesen werden konnten. USP22 ist eine Untereinheit eines Transkriptionsfaktorteilkomplexes und ist zusammen mit Onkogenen wie MYC zuständig für Transkription und Zellzyklusprogression (Zhang et al., 2008), aufgrund dessen es für unsere Studie ausgewählt wurde. Bisher veröffentlichte Studien zeigen bisher noch keine Amplifikationen in Tumoren auf.

Das Gen MEF2B gehört ebenfalls zu den Genen, welche zum größten Teil aufgrund ihrer Funktion in die weiteren Untersuchungen eingeflossen sind. Es ist ein Transkriptionsfaktor, liegend auf Chromosom 19p13.11, welcher in muskelspezifische bzw. wachstumsfaktorabhängige Transkription involviert ist. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung bei der Embryogenese und Zellentwicklung (Hidaka et al., 1995), Punktmutationen wurden in non-Hodgkin-Lymphomen beschrieben (Morin et al., 2011) jedoch gibt es bisher keine Berichte über Amplifikationen. Unsere Ergebnisse von MEF2B, eines von 15 Genen im kleinsten gemeinsam vervielfältigten Bereich der SNP-Analyse und in 3,3% der SNP-Daten vervielfältigt, zeigen eine Amplifikation in der FISH in 2,3% der Fälle mit einer inversen Assoziation zwischen dem Grading und der Ratio bei einer einmalig aufgetretenen Deletion und insgesamt geringer Fallzahl, sodass dieses Ergebnis mit Vorsicht zu werten ist.

Trotz häufigem Auftretens von Genkopiezahlgewinnen in der SNP Analyse konnten wir für die Gene PCM1 bei 8p22 (0,8% Amplifikationen in der SNP Analyse), YES1 bei 18p11.32 (1,7% Amplifikationen in der SNP analyse), und CCNE1 bei 19q12 (2,5% Amplifikationen in der SNP Analyse) in der weiterführenden FISH-Studie keine Amplifikationen, sondern lediglich Genkopiezahlerhöhungen aufzeigen. PCM1 mit einer Genkopiezahlerhöhung von 15,1% und Deletionsrate von 16,4% war eines von drei Genen im kleinsten gemeinsam amplifizierten Bereich bei 8p22 und für die Organisation der Mikrotubuli einer Zelle verantwortlich (Dammermann and Merdes, 2002). Es zeigte sich hierbei eine rein statistische Assoziation ohne klare Richtung zwischen dem Grading und der Ratio ($p=0,03$). Bisher wurde PCM1 als Translokationspartner in papillären Schilddrüsenkarzinomen und chronischer

DISKUSSION

myeloischer Leukämie erwähnt (Corvi et al., 2000, Bousquet et al., 2005). Auch unsere Daten lassen die Vermutung aufkommen, PCM1 liege im Bruchpunkt einer Translokation, welche neben den bisher beschriebenen Entitäten auch gehäuft im HCC auftritt.

Bei 18p11.32 lagen 10 Gene im Amplikon, davon das Gen THO complex 1 (THOC1) im kleinsten gemeinsamen Bereich. Wir wählten das nebendane liegende YES1 aufgrund seiner Funktion für die weitere Analyse aus, es wird auch Protoonkogen YES1 genannt und ist eine Tyrosinkinase, welche zur src-Familie (sarcoma) gehört und unter anderem für die Zellzyklusprogression sowie Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich ist (Roche et al., 1995, Jung et al., 2011, Tsukita et al., 1991). Es zeigte in unserer Studie lediglich 19,7% Genkopiezahlerhöhungen ohne Assoziationen in den untersuchten HCCs. Expression des Gens wurde unter anderem im kolorektalen Karzinom, Melanom und dem HCC nachgewiesen, Amplifikationen mit Überexpression des Genproduktes wurden in anderen Studien in Plattenepithelkarzinomen sowie chemotherapeutikaresistenten Zelllinien wie auch in bestimmten Brustkrebs-Zelllinien, gesichert (Nakakuki et al., 2002, Wang et al., 2001, Nonomura et al., 2007, Bilal et al., 2010). Der Mechanismus einer Amplifikation von YES1 scheint laut unserer Ergebnisse für die Entwicklung des HCC nicht von besonderer Bedeutung zu sein.

Der bei 19q12 liegende Genabschnitt zeigte in 3 Fällen eine hochgradige Genkopiezahlerhöhung in der SNP Analyse. Im kleinsten gemeinsam vervielfältigten Bereich befanden sich 8 Gene, von denen wir das CCNE1 ebenfalls aufgrund der Funktion auswählten und in der FISH keine Amplifikationen, jedoch Genkopiezahlerhöhungen in 15% der Fälle ermittelten, welche mit dem Grad der Tumoren korrelierten. Das CCNE1 ist eine Untereinheit einer cyclinabhängigen Kinase und in der Zellzyklussteuerung involviert (Mazumder et al., 2004). Aufgrund einer nur mäßigen Hybridisierung der Referenzsonde am Centromer von Chromosom 19 konnten viele Zellspots auf dem TMA nicht ausgewertet werden. In einer veröffentlichten Studie wurden Amplifikationen von CCNE1 unter anderem in 8-11% der Ovarialkarzinome und in 14% der Adenokarzinome des Magens nachgewiesen (Schraml et al., 2003), in unserer Studie konnten wir die Vermutung einer hochgradigen Amplifikation als die Tumorprogression begünstigenden Mechanismus nicht belegen.

Bei diesen drei Genen (PCM1, YES1 und CCNE1) gehen wir von einer multifaktoriellen Tumorgenese aus, bei der ein Einfluss der Genkopiezahleränderungen einen Faktor der Genese darstellen, jedoch aufgrund der nicht verifizierbaren Amplifikationen nicht unbedingt der treibende Mechanismus der Zellentartung sein muss.

DISKUSSION

Nicht immer konnten wir hohe Amplifikationsraten sowie Korrelationen mit Tumorstufen in den Ergebnissen nachweisen. Keine signifikante Assoziation von Amplifikationshäufigkeit zum Stadium und Grad des Tumors bedeutet, dass das gewählte Zielgen keinen Einfluss auf die Prognose des Tumors zu haben scheint. Andererseits ist es bei einer kleinen Datenmenge möglich, dass bei selten auftretenden Amplifikationen eine Signifikanz anhand der kleinen Gesamtdatenmenge nicht erreicht werden kann oder diese gar nicht in der Analyse auftauchen.

Bei allen untersuchten Zielgenen war eine Tendenz zu sehen, in der Amplifikationen in fortgeschrittenen Tumorstadien und mit größerem Entdifferenzierungsgrad häufiger anzutreffen sind als in frühen Stadien mit geringen Gradeinteilungen. Dieses war bereits zu erwarten, da in anderen Tumorentitäten, unter anderem in Endometriumkarzinomen (Saffari et al., 1995), Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches (Chung et al., 2006) sowie des Ösophagus (Sato-Kuwabara et al., 2009) und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Go et al., 2010) eine grundsätzliche Assoziation zwischen schlechter Prognose, fortgeschrittenem Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Vorhandensein bzw. Anzahl der Amplifikationen bewiesen wurde. Dieses ist aus dem Grund ersichtlich, da Amplifikationen Kopiezahlveränderungen bestimmter Genabschnitte sind, häufig mit Deletionen anderer Abschnitte einhergehen und somit einen Marker für genomische Instabilität darstellen.

Die vorliegenden Daten zum HCC stellen einen Katalog der genomischen Veränderungen dieses Tumortypes dar. In dieser Studie wurde allerdings nur ein kleiner Teil dieser Daten berücksichtigt. Die Fokussierung auf amplifizierte Bereiche hat den Vorteil, dass relativ rasch besonders potentiell relevante Gene identifiziert werden können. So zählen – basierend auf den Ergebnissen dieser Studie – die Gene MLLT11, FGFR1, EYS, PTK7, UNC5D, USP22 und MEF2B zu möglichen Kandidaten, die sowohl aufgrund ihrer wiederkehrenden Amplifikation als auch ihrer potentiell onkogenen Funktion mögliche neue Angriffspunkte für genspezifische Therapien darstellen könnten. Allerdings müssen hier weiterführende Analysen durchgeführt werden, um z.B. im Zellkulturmodell zu überprüfen, ob die Amplifikation und Überexpression dieser Gene tatsächlich zur Malignität des HCC beiträgt.

Auf der anderen Seite sind viele potentiell interessante Kandidatenbereiche nicht untersucht worden. So könnten die Daten verwendet werden, um gezielt nach Genorten für Tumorsuppressorgene zu suchen. Diese sollten sich – analog zu den Onkogenen – innerhalb der minimal deletierten Regionen befinden. Mit Hilfe der Software FISH-Oracle wäre es relativ einfach möglich, auch hier die minimal

DISKUSSION

deletierten Regionen zu identifizieren und somit den Katalog der möglicherweise für das HCC relevanten Gene um putative Tumorsuppressorgene zu erweitern.

Die Kombination der SNP Array Technologie mit der TMA Technologie stellt eine effiziente und kostengünstige Strategie dar, um neue tumrorelevante Gene zu identifizieren. Aufgrund der immer noch relativ hohen Kosten für SNP-Array Analysen (zurzeit ca. 400 Euro je Probe für den Array und die benötigten Reagenzien) können in der Regel nur relativ wenige Proben in einer Studie untersucht werden. Eine weitere Limitierung liegt in der hohen DNA-Qualität, die für solche Studien verwendet werden muss. So sind – insbesondere bei selteneren Tumortypen wie dem HCC – oftmals keine Proben in grosser Zahl oder in repräsentativer Form (z.B. von allen Tumorstadien) vorhanden. Im Gegensatz dazu sind formalinfixierte Gewebeprobe in den Pathologiearchiven typischerweise in grosser Zahl vorhanden und können zur Konstruktion von TMAs verwendet werden, die repräsentativ eine Tumorentität über alle Stadien und Grade abdecken. Die Identifizierung einer Amplifikation in nur einer einzigen Probe mit den SNP-Array ermöglicht es daher in Kombination mit dem TMA, die Häufigkeit sowie mögliche Assoziationen mit dem Tumortyp in einer grossen Anzahl von Tumoren zu analysieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das HCC gehört zu den fünf häufigsten Malignitäten weltweit und belegt Platz drei der weltweit krebsbedingten Todesfälle. Die Therapiemöglichkeiten sind begrenzt, bis auf das fibrolamelläre Karzinom sind alle HCCs mit einer schlechten Überlebensprognose verbunden. Neue Therapieziele sind dringend erforderlich. Amplifizierte Gene, welche häufig vermehrt exprimiert werden, stellen eine gute Möglichkeit des zielgerichteten Angriffes auf Tumorzellen dar. Ein Gen mit diesen Eigenschaften ist das ERBB2 im Mammakarzinom, wessen Nachweis heutzutage eine zielgenaue Therapie ermöglicht.

Wir verwendeten einen SNP-Array für kryokonservierte Gewebe und analysierten bereits publizierte Rohdaten in insgesamt 118 HCCs. Die anschließende FISH auf einem Leber-TMA mit 93 HCC-Proben sowie einem Zelllinien-TMA mit über 100 Zelllinien verschiedenster Entitäten diente zur Validierung der Ergebnisse. Mit dem SNP-Array fanden wir Deletionen in 13,6% und Amplifikationen in 43,2% der HCCs und konzentrierten die weiteren Analysen auf die amplifizierten Bereiche, aus den wir elf Gene aufgrund möglicher onkogener Funktion auswählten. Die Validierung auf dem TMA bestätigte alle Genkopiezahlerhöhungen und zeigte Assoziationen einer erhöhten Amplifikationsrate mit höheren Tumorstadien und Graden aufgrund der genomischen Instabilität fortgeschrittener Tumoren. Keines der ausgewählten Kandidatengene war in der Mehrheit der HCCs amplifiziert. Die Ergebnisse der gewählten Gene sprechen eher für eine individuelle Entwicklung und Progression jedes Tumors. Geringgradig erhöhte Genkopiezahlen waren dabei deutlich häufiger anzutreffen als hochgradige Amplifikationen. Die Häufigkeit der Amplifikationen betrug 14,9% für das OR4M2, 10,5% für MLLT11, 8,7% für FGFR1, 7,1% für EYS, 6,6% für PTK7, 2,9% für UNC5D, 1,4% für USP22 und 2,3% für MEF2B sowie jeweils 0% für PCM1, YES1 und CCNE1.

Die Studie zeigt, dass die Kombination von SNP-Array Analysen und der FISH mit TMAs erfolgreich angewendet werden kann und sich für Identifikation und Validierung von Amplifikationen in verschiedenen Geweben sehr gut eignet. Wir konnten kein spezielles Gen finden, welches gehäuft in HCCs amplifiziert wird, haben jedoch eine individuelle Auswahl von Genen mit unterschiedlichen Amplifikationsraten gezeigt. Dies verstärkt die bisherige Vermutung, dass der Entstehung von Leberzellkarzinomen kein gemeinsamer genetischer Weg zugrunde liegt, sondern in der Entwicklung dessen ein mehrstufiger Prozess onkogener Aktivierung durch genetische Instabilität vorherrschend ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ADEN, D. P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I. & KNOWLES, B. B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282, 615-6.
- BADVIE, S. (2000) Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J*, 76, 4-11.
- BAHNASSY, A. A., ZEKRI, A. R., LOUTFY, S. A., MOHAMED, W. S., MONEIM, A. A., SALEM, S. E., SHETA, M. M., OMAR, A. & AL-ZAWAHRY, H. (2011) The role of cyclins and cyclin dependent kinases in development and progression of hepatitis C virus-genotype 4-associated hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 91, 643-52.
- BILAL, E., ALEXE, G., YAO, M., CONG, L., KULKARNI, A., GINJALA, V., TOPPMEYER, D., GANESAN, S. & BHANOT, G. (2010) Identification of the YES1 Kinase as a Therapeutic Target in Basal-Like Breast Cancers. *Genes Cancer*, 1, 1063-73.
- BONDI, J., HUSDAL, A., BUKHOLM, G., NESLAND, J. M., BAKKA, A. & BUKHOLM, I. R. (2005) Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol*, 58, 509-14.
- BOUSQUET, M., QUELEN, C., DE MAS, V., DUCHAYNE, E., ROQUEFEUIL, B., DELSOL, G., LAURENT, G., DASTUGUE, N. & BROUSSET, P. (2005) The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene. *Oncogene*, 24, 7248-52.
- BRUIX, J. & SHERMAN, M. (2005) Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 42, 1208-36.
- CHANG, X. Z., LI, D. Q., HOU, Y. F., WU, J., LU, J. S., DI, G. H., JIN, W., OU, Z. L., SHEN, Z. Z. & SHAO, Z. M. (2008) Identification of the functional role of AF1Q in the progression of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 111, 65-78.
- CHIANG, D. Y., VILLANUEVA, A., HOSHIDA, Y., PEIX, J., NEWELL, P., MINGUEZ, B., LEBLANC, A. C., DONOVAN, D. J., THUNG, S. N., SOLE, M., TOVAR, V., ALSINET, C., RAMOS, A. H., BARRETINA, J., ROAYAIE, S., SCHWARTZ, M., WAXMAN, S., BRUIX, J., MAZZAFERRO, V., LIGON, A. H., NAJFELD, V., FRIEDMAN, S. L., SELLERS, W. R., MEYERSON, M. & LLOVET, J. M. (2008) Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 68, 6779-88.
- CHIONI, A. M. & GROSE, R. (2012) FGFR1 cleavage and nuclear translocation regulates breast cancer cell behavior. *J Cell Biol*, 197, 801-17.
- CHUNG, C. H., ELY, K., MCGAVRAN, L., VARELLA-GARCIA, M., PARKER, J., PARKER, N., JARRETT, C., CARTER, J., MURPHY, B. A., NETTERVILLE, J., BURKEY, B. B., SINARD, R., CMELAK, A., LEVY, S., YARBROUGH, W. G., SLEBOS, R. J. & HIRSCH, F. R. (2006) Increased

LITERATURVERZEICHNIS

- epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol*, 24, 4170-6.
- CO, N. N., TSANG, W. P., WONG, T. W., CHEUNG, H. H., TSANG, T. Y., KONG, S. K. & KWOK, T. T. (2008) Oncogene AF1q enhances doxorubicin-induced apoptosis through BAD-mediated mitochondrial apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther*, 7, 3160-8.
- COLLIN, R. W., LITTINK, K. W., KLEVERING, B. J., VAN DEN BORN, L. I., KOENEKOOP, R. K., ZONNEVELD, M. N., BLOKLAND, E. A., STROM, T. M., HOYNG, C. B., DEN HOLLANDER, A. I. & CREMERS, F. P. (2008) Identification of a 2 Mb human ortholog of *Drosophila* eyes shut/spacemaker that is mutated in patients with retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*, 83, 594-603.
- COLOTTA, F., ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C. & MANTOVANI, A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30, 1073-81.
- COOKE, S. L., POLE, J. C., CHIN, S. F., ELLIS, I. O., CALDAS, C. & EDWARDS, P. A. (2008) High-resolution array CGH clarifies events occurring on 8p in carcinogenesis. *BMC Cancer*, 8, 288.
- CORVI, R., BERGER, N., BALCZON, R. & ROMEO, G. (2000) RET/PCM-1: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*, 19, 4236-42.
- COUSSENS, L. M. & WERB, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.
- DAMMERMANN, A. & MERDES, A. (2002) Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol*, 159, 255-66.
- EL-SERAG, H. B., MARRERO, J. A., RUDOLPH, L. & REDDY, K. R. (2008) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 134, 1752-63.
- EL-SERAG, H. B. & MASON, A. C. (1999) Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 340, 745-50.
- EL-SERAG, H. B. & RUDOLPH, K. L. (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132, 2557-76.
- FARAZI, P. A., GLICKMAN, J., JIANG, S., YU, A., RUDOLPH, K. L. & DEPINHO, R. A. (2003) Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 63, 5021-7.
- FLICEK, P. & SEARLES, S. (2009) Ensembl 53. *Ensembl Genome Browser*. Hinxton, United Kingdom, European Bioinformatics Institute (EBI) and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [Online im Internet] URL: <http://www.ensembl.org/index.html> [Stand: 12.03.2009, 13:20].
- FLICEK, P. & SEARLES, S. (2012a) Ensembl. *Chromosome Summary*. 69 ed. Hinxton, United Kingdom, European Bioinformatics Institute (EBI), Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [Online im Internet] URLs: <http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/T/L/QTLcBGWaBAZeUAAALUV.png>, [http://static.ensembl.org/img-](http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/T/L/QTLcBGWaBAZeUAAALUV.png)

LITERATURVERZEICHNIS

tmp/KCQ/Q/d/XeRfcfEaDOQQUAAANKA.png,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/d/eKOeLSfeDODDcAAAOYM.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/e/DRSXYVQKCLdLcAAANIG.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/e/IJXAXZKYCABBAAAKZA.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/e/MDFRFdeIARLEcAAAHXB.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/e/OScMIFBYAKWXIAAAMBD.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/e/SaQeKALIBbDSYAAAXCK.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/e/WIBWeWclCMVcAAAAO Ae.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/e/abcaYBCKBSfDMAALJK.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/f/BUfHcQNSCYOBIAAAVBA.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCO/a/X/KaHFFUYSDBQLQAAAaHa.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/f/HfSOKEGWBVMRUAAAMAQ.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/Q/f/MLFHEJDaDFQaEAAADHd.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/R/A/fCFEELCUAQIKEAAASPC.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/R/B/BfHSWWJaCXONUAAA OFS.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCO/e/b/GPfHeYKQCYSAAAAYUT.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/R/B/KMHeFeVMAaSVQAAASHJ.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/R/B/OUddQJXICKOGEAAASKP.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/R/B/WCccYfPIAJLUMAAADHd.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCP/J/O/DaKPJDOCALFKYAAAQFH.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/R/B/fTMfUDLOAUNKYAAAHWT.png>,
<http://static.ensembl.org/img-tmp/KCQ/R/C/DWPYYEVWBDXeUAAA OFS.png> [Stand: 12.11.2012, 19:00].

FLICEK, P. & SEARLES, S. (2012b) Ensembl. *Human Karyotype*. 69 ed. Hinxton, United Kingdom, European Bioinformatics Institute (EBI), Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [Online im Internet] URL:

LITERATURVERZEICHNIS

- <http://static.ensembl.org/img-tmp/KCO/V/V/bicMVBMUDBILQAAAYLW.png> [Stand: 12.11.2012, 18:05].
- FREIER, K., SCHWAENEN, C., STICHT, C., FLECHTENMACHER, C., MUHLING, J., HOFELE, C., RADLWIMMER, B., LICHTER, P. & JOOS, S. (2007) Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncol*, 43, 60-6.
- GELSI-BOYER, V., ORSETTI, B., CERVERA, N., FINETTI, P., SIRCOULOMB, F., ROUGE, C., LASORSA, L., LETESSIER, A., GINESTIER, C., MONVILLE, F., ESTEYRIES, S., ADELAIDE, J., ESTERNI, B., HENRY, C., ETHIER, S. P., BIBEAU, F., MOZZICONACCI, M. J., CHARAFE-JAUFFRET, E., JACQUEMIER, J., BERTUCCI, F., BIRNBAUM, D., THEILLET, C. & CHAFFANET, M. (2005) Comprehensive profiling of 8p11-12 amplification in breast cancer. *Mol Cancer Res*, 3, 655-67.
- GO, H., JEON, Y. K., PARK, H. J., SUNG, S. W., SEO, J. W. & CHUNG, D. H. (2010) High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 5, 305-13.
- GOMAA, A. I., KHAN, S. A., TOLEDANO, M. B., WAKED, I. & TAYLOR-ROBINSON, S. D. (2008) Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 14, 4300-8.
- GOODMAN ZD, T. L. (2007) Tumours and tumour-like lesions of the liver. IN BURT AD, P. B., FERRELL LD (EDS) (Ed.) *MacSween's pathology of the liver*. London, Churchill Livingstone.
- GURZOV, E. N. & IZQUIERDO, M. (2006) Cyclin E1 knockdown induces apoptosis in cancer cells. *Neurol Res*, 28, 493-9.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HIDAKA, K., MORISAKI, T., BYUN, S. H., HASHIDO, K., TOYAMA, K. & MUKAI, T. (1995) The MEF2B homologue differentially expressed in mouse embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 213, 555-60.
- HOYER, J., DREWEKE, A., BECKER, C., GOHRING, I., THIEL, C. T., PEIPPO, M. M., RAUCH, R., HOFBECK, M., TRAUTMANN, U., ZWEIER, C., ZENKER, M., HUFFMEIER, U., KRAUS, C., EKICI, A. B., RUSCHENDORF, F., NURNBERG, P., REIS, A. & RAUCH, A. (2007) Molecular karyotyping in patients with mental retardation using 100K single-nucleotide polymorphism arrays. *J Med Genet*, 44, 629-36.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., HAO, Y., XU, J. & THUN, M. J. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59, 225-49.
- JUNG, J., LEE, M. K., JIN, Y., FU, S. B., ROSALES, J. L. & LEE, K. Y. (2011) Clues for c-Yes involvement in the cell cycle and cytokinesis. *Cell Cycle*, 10, 1502-3.
- KALLIONIEMI, A., KALLIONIEMI, O. P., SUDAR, D., RUTOVITZ, D., GRAY, J. W., WALDMAN, F. & PINKEL, D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258, 818-21.
- KIYOSE, S., NAGURA, K., TAO, H., IGARASHI, H., YAMADA, H., GOTO, M., MAEDA, M., KURABE, N., SUZUKI, M., TSUBOI, M., KAHYO, T.,

LITERATURVERZEICHNIS

- SHINMURA, K., HATTORI, N. & SUGIMURA, H. (2012) Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence in situ hybridization. *Pathol Int*, 62, 477-84.
- KOED, K., WIUF, C., CHRISTENSEN, L. L., WIKMAN, F. P., ZIEGER, K., MOLLER, K., VON DER MAASE, H. & ORNTOFT, T. F. (2005) High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors. *Cancer Res*, 65, 34-45.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KWEK, S. S., ROY, R., ZHOU, H., CLIMENT, J., MARTINEZ-CLIMENT, J. A., FRIDLAND, J. & ALBERTSON, D. G. (2009) Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis. *Oncogene*, 28, 1892-903.
- LANCET, D., SAFRAN, M., ROSEN, N., DALAH, I., STELZER, G., NATIV, N., INY-STEIN, T., SHMOISH, M., SIROTA, A., BAHIR, I., BELINKY, F., RAPPAPORT, N. & TWIK, M. (1996-2012) GeneCards *The GeneCards Human Gene Database*. Rehovot, Israel, Weizmann Institute of Science, [Online im Internet] URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=OR4M2> [Stand: 02.09.2012, 17:30].
- LAU, S. H. & GUAN, X. Y. (2005) Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 26, 659-65.
- LAU, W. Y. & LAI, E. C. (2009) The current role of radiofrequency ablation in the management of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Ann Surg*, 249, 20-5.
- LEVSKY, J. M. & SINGER, R. H. (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci*, 116, 2833-8.
- LI, D. Q., HOU, Y. F., WU, J., CHEN, Y., LU, J. S., DI, G. H., OU, Z. L., SHEN, Z. Z., DING, J. & SHAO, Z. M. (2006) Gene expression profile analysis of an isogenic tumour metastasis model reveals a functional role for oncogene AF1Q in breast cancer metastasis. *Eur J Cancer*, 42, 3274-86.
- LI, Z. G., WU, M. Y., ZHAO, W., LI, B., YANG, J., ZHU, P. & HU, Y. M. (2003) [Detection of 29 types of fusion gene in leukemia by multiplex RT-PCR]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 24, 256-8.
- LLOVET, J. M. & BRUIX, J. (2008) Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48, 1312-27.
- LLOVET, J. M., DI BISCEGLIE, A. M., BRUIX, J., KRAMER, B. S., LENCIONI, R., ZHU, A. X., SHERMAN, M., SCHWARTZ, M., LOTZE, M., TALWALKAR, J. & GORES, G. J. (2008a) Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 100, 698-711.
- LLOVET, J. M., RICCI, S., MAZZAFERRO, V., HILGARD, P., GANE, E., BLANC, J. F., DE OLIVEIRA, A. C., SANTORO, A., RAOUL, J. L., FORNER, A., SCHWARTZ, M., PORTA, C., ZEUZEM, S., BOLONDI, L., GRETEN, T. F., GALLE, P. R., SEITZ, J. F., BORBATH, I., HAUSSINGER, D.,

LITERATURVERZEICHNIS

- GIANNARIS, T., SHAN, M., MOSCOVICI, M., VOLIOTIS, D. & BRUIX, J. (2008b) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359, 378-90.
- MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. & BALKWILL, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-44.
- MAZUMDER, S., DUPREE, E. L. & ALMASAN, A. (2004) A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 4, 65-75.
- MCCARROLL, S. A., KURUVILLA, F. G., KORN, J. M., CAWLEY, S., NEMESH, J., WYSOKER, A., SHAPERO, M. H., DE BAKKER, P. I., MALLER, J. B., KIRBY, A., ELLIOTT, A. L., PARKIN, M., HUBBELL, E., WEBSTER, T., MEI, R., VEITCH, J., COLLINS, P. J., HANDSAKER, R., LINCOLN, S., NIZZARI, M., BLUME, J., JONES, K. W., RAVA, R., DALY, M. J., GABRIEL, S. B. & ALTSHULER, D. (2008) Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet*, 40, 1166-74.
- MENASHE, I., MAN, O., LANCET, D. & GILAD, Y. (2003) Different noses for different people. *Nat Genet*, 34, 143-4.
- MOINZADEH, P., BREUHahn, K., STUTZER, H. & SCHIRMACHER, P. (2005) Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis. *Br J Cancer*, 92, 935-41.
- MORIN, R. D., MENDEZ-LAGO, M., MUNGALL, A. J., GOYA, R., MUNGALL, K. L., CORBETT, R. D., JOHNSON, N. A., SEVERSON, T. M., CHIU, R., FIELD, M., JACKMAN, S., KRZYWINSKI, M., SCOTT, D. W., TRINH, D. L., TAMURA-WELLS, J., LI, S., FIRME, M. R., ROGIC, S., GRIFFITH, M., CHAN, S., YAKOVENKO, O., MEYER, I. M., ZHAO, E. Y., SMAILUS, D., MOKSA, M., CHITTARANJAN, S., RIMSZA, L., BROOKS-WILSON, A., SPINELLI, J. J., BEN-NERIAH, S., MEISSNER, B., WOOLCOCK, B., BOYLE, M., MCDONALD, H., TAM, A., ZHAO, Y., DELANEY, A., ZENG, T., TSE, K., BUTTERFIELD, Y., BIROL, I., HOLT, R., SCHEIN, J., HORSMAN, D. E., MOORE, R., JONES, S. J., CONNORS, J. M., HIRST, M., GASCOYNE, R. D. & MARRA, M. A. (2011) Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*, 476, 298-303.
- MOSSIE, K., JALLAL, B., ALVES, F., SURES, I., PLOWMAN, G. D. & ULLRICH, A. (1995) Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene*, 11, 2179-84.
- MULLER-TIDOW, C., SCHWABLE, J., STEFFEN, B., TIDOW, N., BRANDT, B., BECKER, K., SCHULZE-BAHR, E., HALFTER, H., VOGT, U., METZGER, R., SCHNEIDER, P. M., BUCHNER, T., BRANDTS, C., BERDEL, W. E. & SERVE, H. (2004) High-throughput analysis of genome-wide receptor tyrosine kinase expression in human cancers identifies potential novel drug targets. *Clin Cancer Res*, 10, 1241-9.
- NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T. & SATO, J. (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 42, 3858-63.

LITERATURVERZEICHNIS

- NAKAKUKI, K., IMOTO, I., PIMKHAOKHAM, A., FUKUDA, Y., SHIMADA, Y., IMAMURA, M., AMAGASA, T. & INAZAWA, J. (2002) Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*, 23, 19-24.
- NONOMURA, T., MASAKI, T., MORISHITA, A., JIAN, G., UCHIDA, N., HIMOTO, T., IZUSHI, K., IWAMA, H., YOSHIJI, H., WATANABE, S., KUROKOHCHI, K. & KURIYAMA, S. (2007) Identification of c-Yes expression in the nuclei of hepatocellular carcinoma cells: involvement in the early stages of hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol*, 30, 105-11.
- OKEN, M. M., CREECH, R. H., TORMEY, D. C., HORTON, J., DAVIS, T. E., MCFADDEN, E. T. & CARBONE, P. P. (1982) Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5, 649-55.
- PARKIN, D. M. (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*, 2, 533-43.
- PERSSON, F., WINNES, M., ANDREN, Y., WEDELL, B., DAHLENFORS, R., ASP, J., MARK, J., ENLUND, F. & STENMAN, G. (2008) High-resolution array CGH analysis of salivary gland tumors reveals fusion and amplification of the FGFR1 and PLAG1 genes in ring chromosomes. *Oncogene*, 27, 3072-80.
- POLE, J. C., COURTAY-CAHEN, C., GARCIA, M. J., BLOOD, K. A., COOKE, S. L., ALSOP, A. E., TSE, D. M., CALDAS, C. & EDWARDS, P. A. (2006) High-resolution analysis of chromosome rearrangements on 8p in breast, colon and pancreatic cancer reveals a complex pattern of loss, gain and translocation. *Oncogene*, 25, 5693-706.
- ROCHE, S., FUMAGALLI, S. & COURTNEIDGE, S. A. (1995) Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science*, 269, 1567-9.
- SAFFARI, B., JONES, L. A., EL-NAGGAR, A., FELIX, J. C., GEORGE, J. & PRESS, M. F. (1995) Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival. *Cancer Res*, 55, 5693-8.
- SATO-KUWABARA, Y., NEVES, J. I., FREGNANI, J. H., SALLUM, R. A. & SOARES, F. A. (2009) Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. *BMC Cancer*, 9, 6.
- SCHILDHAUS, H. U., HEUKAMP, L. C., MERKELBACH-BRUSE, S., RIESNER, K., SCHMITZ, K., BINOT, E., PAGGEN, E., ALBUS, K., SCHULTE, W., KO, Y. D., SCHLESINGER, A., ANSEN, S., ENGEL-RIEDEL, W., BROCKMANN, M., SERKE, M., GERIGK, U., HUSS, S., GOKE, F., PERNER, S., HEKMAT, K., FRANK, K. F., REISER, M., SCHNELL, R., BOS, M., MATTONET, C., SOS, M., STOELBEN, E., WOLF, J., ZANDER, T. & BUETTNER, R. (2012) Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol*.

LITERATURVERZEICHNIS

- SCHRAML, P., BUCHER, C., BISSIG, H., NOCITO, A., HAAS, P., WILBER, K., SEELIG, S., KONONEN, J., MIHATSCH, M. J., DIRNHOFER, S. & SAUTER, G. (2003) Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J Pathol*, 200, 375-82.
- SHINAWI, M. & CHEUNG, S. W. (2008) The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*, 13, 760-70.
- SKOTHEIM, R. I., AUTIO, R., LIND, G. E., KRAGGERUD, S. M., ANDREWS, P. W., MONNI, O., KALLIONIEMI, O. & LOTHE, R. A. (2006) Novel genomic aberrations in testicular germ cell tumors by array-CGH, and associated gene expression changes. *Cell Oncol*, 28, 315-26.
- SUGIMACHI, K., AISHIMA, S., TAGUCHI, K., TANAKA, S., SHIMADA, M., KAJIYAMA, K. & TSUNEYOSHI, M. (2001) The role of overexpression and gene amplification of cyclin D1 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*, 35, 74-9.
- TAKAHASHI, Y., KAWATE, S., WATANABE, M., FUKUSHIMA, J., MORI, S. & FUKUSATO, T. (2007) Amplification of c-myc and cyclin D1 genes in primary and metastatic carcinomas of the liver. *Pathol Int*, 57, 437-42.
- TSE, W., MESHINCHI, S., ALONZO, T. A., STIREWALT, D. L., GERBING, R. B., WOODS, W. G., APPELBAUM, F. R. & RADICH, J. P. (2004) Elevated expression of the AF1q gene, an MLL fusion partner, is an independent adverse prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*, 104, 3058-63.
- TSUKITA, S., OISHI, K., AKIYAMA, T., YAMANASHI, Y. & YAMAMOTO, T. (1991) Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol*, 113, 867-79.
- VERSLYPE, C., VAN CUTSEM, E., DICATO, M., ARBER, N., BERLIN, J. D., CUNNINGHAM, D., DE GRAMONT, A., DIAZ-RUBIO, E., DUCREUX, M., GRUENBERGER, T., HALLER, D., HAUSTERMANS, K., HOFF, P., KERR, D., LABIANCA, R., MOORE, M., NORDLINGER, B., OHTSU, A., ROUGIER, P., SCHEITHAUER, W., SCHMOLL, H. J., SOBRERO, A., TABERNERO, J. & VAN DE VELDE, C. (2009) The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008. *Ann Oncol*, 20 Suppl 7, vii1-vii6.
- VILLANUEVA, A., NEWELL, P., CHIANG, D. Y., FRIEDMAN, S. L. & LLOVET, J. M. (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 27, 55-76.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10, 789-99.
- WANG, W., MARSH, S., CASSIDY, J. & MCLEOD, H. L. (2001) Pharmacogenomic dissection of resistance to thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res*, 61, 5505-10.
- WILLIAMS, S. V., PLATT, F. M., HURST, C. D., AVEYARD, J. S., TAYLOR, C. F., POLE, J. C., GARCIA, M. J. & KNOWLES, M. A. (2010) High-resolution analysis of genomic alteration on chromosome arm 8p in urothelial carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 49, 642-59.

LITERATURVERZEICHNIS

- YOUNG, J. M., ENDICOTT, R. M., PARGHI, S. S., WALKER, M., KIDD, J. M. & TRASK, B. J. (2008) Extensive copy-number variation of the human olfactory receptor gene family. *Am J Hum Genet*, 83, 228-42.
- ZHANG, X. Y., VARTHI, M., SYKES, S. M., PHILLIPS, C., WARZECHA, C., ZHU, W., WYCE, A., THORNE, A. W., BERGER, S. L. & MCMAHON, S. B. (2008) The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol Cell*, 29, 102-11.
- ZHANG, Y. J., JIANG, W., CHEN, C. J., LEE, C. S., KAHN, S. M., SANTELLA, R. M. & WEINSTEIN, I. B. (1993) Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 196, 1010-6.

7 ANHANG

7.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich vor allem Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter und Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon für die Möglichkeit dieser Arbeit, die Betreuung und Unterstützung danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Gisa Tiegs und dem Graduiertenkolleg "Entzündung und Regeneration" mit allen Beteiligten für die Rahmenbedingungen sowie die fortwährende interdisziplinäre Betreuung.

Frau Dipl. Biol. Antje Krohn möchte ich ganz besonders erwähnen und danken. Ihr Fachwissen und die Professionalität im Umgang mit den Methoden haben zu einem großen Teil dieser Arbeit beigetragen.

Dr. rer. nat. Pierre Tennstedt danke ich für die Richtungsweisung und Unterstützung der Auswertung.

Vielen Dank ebenfalls an Dr. A. Quaas und Dr. T. Grob für die Antworten bei den klinisch-pathologischen Fragestellungen.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern Frederik Holst und Malte Mader gebührt mein Dank für Hilfestellungen im Labor, am Mikroskop und im EDV-Bereich.

Danken möchte ich zusätzlich den Mitarbeitern im Labor der klinischen Chemie für die Möglichkeit der Nutzung ihrer Geräte und die Hilfsbereitschaft, sowie allen Mitarbeitern des IHC- und FISH-Labors der Pathologie.

Schließlich geht mein Dank an alle Mitarbeiter und Doktoranden der Molekularpathologie, besonders Xiaopeng Gao, Max Wiechmann und Axel Wiechmann für die tatkräftige Unterstützung sowie alle Kollegiaten des Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“.

Dank öffentlich zugänglichen Datenbanken konnten wir eine Vielzahl bereits untersuchter Gewebe in unsere Analyse miteinschließen. Der Umfang dieser Arbeit ist zu verdanken der Gene Expression Omnibus Datenbank des National Center for Biotechnology Information, die wir mit freundlicher Genehmigung von Chiang et al. verwenden durften sowie dem Cancer Genome Project des Wellcome Trust Sanger Instituts aus Cambridge.

7.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werks kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Marta Anna Swiatkowska