

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

**hTERT Promoter-Mutationen
in humanen Tumoren der Leber**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Catina Klingefeld
aus Donostia/ Spanien

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.02.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Gisa Tiegs

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Björn Nashan

*Für
Rudolf Krause*

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung und Ziele der Arbeit	04
2. Einleitung	05
2.1. Telomere und Telomerase	05
2.2. Hepatozelluläres Karzinom	14
2.2.1. Epidemiologie	14
2.2.2. Ätiologie	15
2.2.3. Diagnostik	17
2.2.4. Therapie	17
2.3. Hepatozelluläres Adenom	17
2.4. Cholangiozelluläres Karzinom	18
2.4.1. Epidemiologie	18
2.4.2. Ätiologie	19
2.4.3. Diagnostik	19
2.5. Bestimmung der hTERT Promoter-Region-Mutationen -124C>T und -146C>T mittels PCR, Restriktionsfragment- Längenanalyse und Sequenzierung	20
2.6. Das Restriktionsenzym HpyAV	22
3. Material und Methoden	24
3.1. Material	24
3.1.1. Tumor-Proben	24
3.1.2. Geräte	24
3.1.3. Enzyme und Reaktionskits	25
3.1.4. Primer	25
3.2. Methoden	26
3.2.1. Übersicht	26
3.2.2. Isolierung der DNA	27
3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des hTERT Promoter-Abschnitts	28
3.2.4. Enzym-Verdau mit Hilfe des Restriktionsenzym HpyAV	28
3.2.5. Restriktionsfragment-Längen-Mutationsanalyse	28
3.2.6. Sequenzierung	29
4. Ergebnisse	30
4.1. hTERT Promoter-Mutationen im Hepatozellulären Karzinom	30
4.2. hTERT Promoter-Mutationen im Intrahepatischen Cholangiozellulären Karzinom	31
4.3. hTERT Promoter-Mutationen im Hepatozellulären Adenom	31

5. Diskussion	37
6. Zusammenfassung	42
7. Literaturverzeichnis	43
7.1. Quellenverzeichnis der Abbildungen	48
8. Danksagung	50
9. Lebenslauf	51
10. Eidesstattliche Versicherung	52

1. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Eine charakteristische Eigenschaft maligner Tumoren ist ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit. Diese beruht vermutlich unter anderem auf einer pathologischen Aktivität der Telomerase, die in über 90% aller Malignome nachgewiesen werden konnte. Durch welchen Mechanismus es zur Aktivierung dieses Enzyms in den Tumoren kommt, ist noch nicht hinreichend geklärt. Kürzlich wurden allerdings Mutationen des hTERT-Promoters beschrieben (kodierend für die funktionelle Untereinheit der Telomerase), die als eine mögliche Erklärung herangezogen werden könnten. Diese sogenannten „Hotspot-Mutationen“ konnten jedoch nur in einem kleinen Prozentsatz der bislang untersuchten Tumoren nachgewiesen werden. In Zukunft könnten diese Mutationen möglicherweise im Rahmen der Diagnostik und Therapie maligner Tumoren eine wichtige Rolle spielen; daher ist die Kenntnis darüber, in welchen Tumoren und Tumorsubtypen und in welcher Häufigkeitsverteilung diese Mutationen vorliegen, von großem Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb herauszufinden, ob und gegebenenfalls in welchem Prozentsatz hTERT Promoter-Mutationen in lebereigenen Tumoren (Hepatozellulären Karzinomen, Intrahepatischen Cholangiozellulären Karzinomen und Hepatozellulären Adenomen) nachgewiesen werden können. Die bereits vorhandene Studie, die eine hTERT Promoter-Mutation in Hepatozellulären Karzinomen nachweist (Nault et al. 2013), sollte anhand dieser Arbeit mit eigenen Daten ergänzt und weitere Daten hinsichtlich der hTERT Promoter-Mutationen in Hepatozellulären Adenomen gesammelt werden. In der Fachliteratur finden sich meines Wissens nach bislang keine Angaben zu hTERT Promoter-Mutationen bei Intrahepatischen Cholangiozellulären Karzinomen, weswegen ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit die erstmalige Untersuchung eben dieser Tumorentität darstellt.

Zusammenfassend sollte das Verständnis für die Genese dieser Tumoren vertieft und im Optimalfall der Grundstein für neue Therapieansätze und Diagnoseverfahren gelegt werden.

2. Einleitung

2.1. Telomere und Telomerase

Telomere sind hochspezialisierte DNA-Protein-Strukturen an den Enden der Chromosomen. Sie beinhalten nicht-kodierende DNA, besitzen aber dennoch mehrere äußerst wichtige Funktionen. So verhindern sie beispielsweise eine chromosomale Endfusion, eine irreguläre chromosomale Rekombination und sie sichern die chromosomale Position innerhalb des Zellkernes (Quaas 2006, Gramatges und Bertuch 2013).

In Wirbeltieren bestehen die Telomere aus einer repetitiven Abfolge aus den 6 Nukleotiden 5'-TTAGGG-3', deren Anzahl an Wiederholungen je nach Spezies variiert. Humane Telomere bestehen in etwa aus 500 – 2.000 Repetitionen, d.h. aus ca. 300 – 12.000 Basen (Gancarcíková et al. 2010, de Lange et al. 1990).

Größtenteils liegt die DNA der Telomere doppelsträngig vor, doch sie endet in einem Guanin-reichen 3'-Überhang, welcher üblicherweise an beiden Enden des Chromosoms vorkommt. Beim Menschen besitzt dieser 3'-Überhang in etwa eine Länge von 100 – 280 Nukleotiden (Webb et al. 2013, Wright et al. 1997).

Die Telomere bilden eine lassoförmige Schlaufe, welche „telomere loop“ (T-Loop) genannt wird (siehe Abbildung 1. A) und B)) (Webb et al. 2013, Griffith et al. 1999). Den Telomeren assoziiert ist der Shelterin-Komplex, eine Gruppe von 6 untereinander und mit anderen Zellkomponenten agierenden Proteinen (siehe Abbildung 1. C)). Vom Shelterin-Komplex wird angenommen, dass er unter anderem an der Regulation der Telomer-Länge beteiligt ist, die Struktur der Telomere schützt und eine Fusion der Chromosomen verhindert. Der Shelterin-Komplex besteht aus den Proteinen TRF1 und TRF2 („telomeric-repeat binding factor“ 1 und 2), POT1 („protection of telomeres“ 1), TPP1 („TIN2- and POT1-interacting protein“ 1), TIN2 („TRF1-interacting nuclear protein“ 2) und Rap1 („repressor/activator protein“ 1) (Dhaene et al. 2000, Quaas 2006, Cristofari et al. 2007, Abreu et al. 2010).

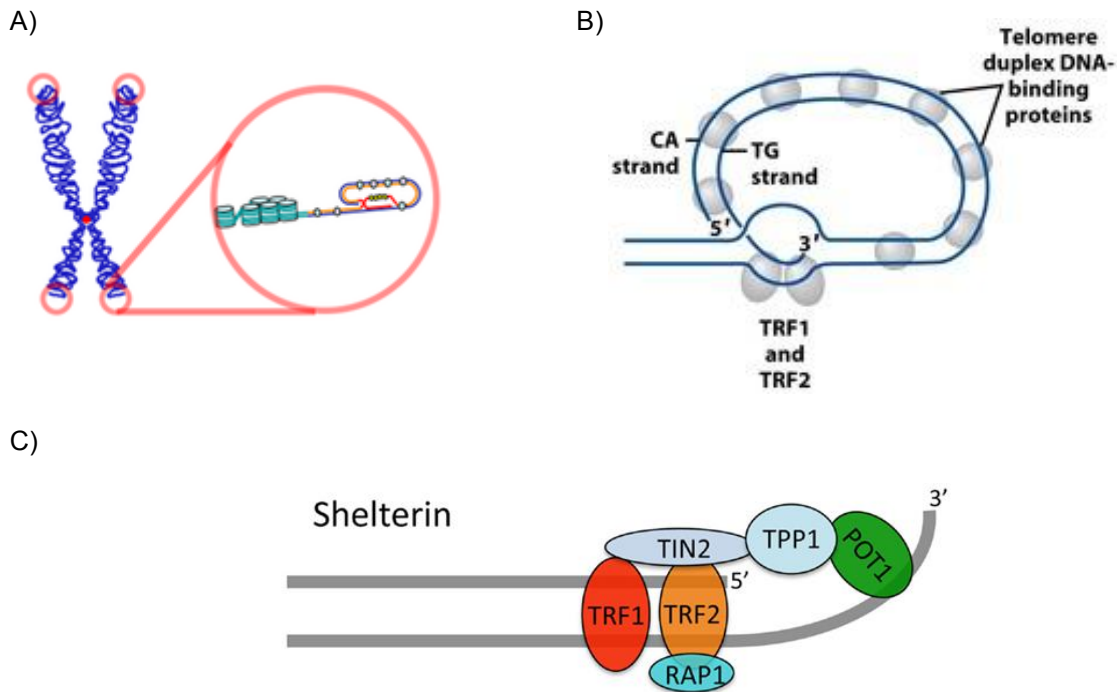


Abbildung 1.: **A)** Darstellung des Aufbaus der chromosomalen Enden (Telomeren) in Schlaufenform (T-Loop). Quelle: (A2). **B)** Darstellung der T-Loop und des 3'-Überhangs der Telomeren. Quelle: (A1). **C)** Aufbau des an die Telomeren gebundenen Shelterin-Komplexes aus den sechs Proteinen TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 und POT1. Quelle: (A3)

TRF1 und TRF2 binden an die doppelsträngige DNA der Telomere (Lewis und Wuttke 2012). TRF1 ist vermutlich für die Regulation der Länge der Telomere zuständig (Garton und Laughton 2013), während TRF2 eine wesentliche Rolle bei der Bildung der T-Loop spielt und somit den einzelsträngigen 3'-Überhang der Telomere vor DNA-Reperatur-Mechanismen und vor der Telomerase schützt. POT1 bindet an die Einzelstrang-DNA des 3'-Überhangs und scheint ebenfalls die Telomerase zu inhibieren. Rap1 bindet über TRF2 an das Telomer und ist unter anderem an der Regulation der Telomeren-Länge beteiligt und unterstützt die Stabilität der Telomere (Baumann und Price 2010, Cristofari et al. 2007, Duong und Sahin 2013).

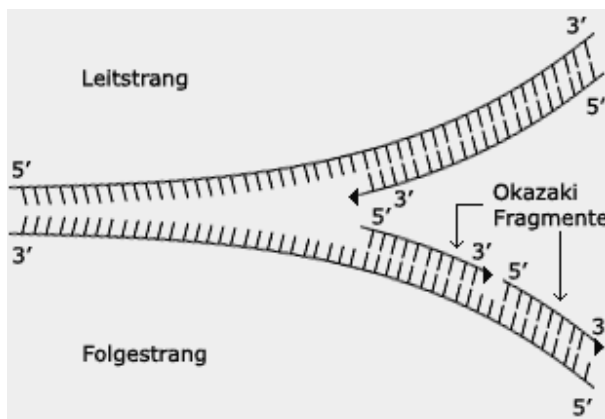
TPP1 verbindet mit Hilfe von TIN2 die am telomerischen Doppelstrang bindenden Proteine TRF1 und TRF2 (und das an TRF2 gebundene Rap1) und das am einzelsträngigen 3'-Überhang positionierte Protein POT1 und ermöglicht somit deren Zusammenspiel. So kann unter anderem eine Brücke zwischen Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA des Telomers gebildet werden, wodurch die oben erwähnte geschlossene T-Loop entsteht und somit der 3'-Überhang für die Telomerase unzugänglich gemacht wird (Baumann und Price 2010, Cristofari et al. 2007). TPP1 ist darüber hinaus die erste Komponente des Shelterin-Komplexes, für die eine direkte physische Interaktion mit der Telomerase nachgewiesen wurde – die Interaktion wirkt sich stimulierend auf die enzymatische Aktivität der Telomerase aus. Der TPP1- POT1-Komplex wurde vermutlich in seiner Struktur und Funktion im

Rahmen der Evolution konserviert, da er so auch heutzutage noch in Protozoen gefunden wird (Cristofari et al. 2007).

In kürzeren Telomeren ist der die einzelnen Proteine verbindende Shelterin-Komplex weniger stabil. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass das Telomer in linearer Form vorliegt und somit der Telomerase zugänglich gemacht wird (Baumann und Price 2010).

In der S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus wird die DNA repliziert. Dabei bindet die DNA-Polymerase am jeweiligen Matrizenstrang und wandert an ihm entlang in 3'-5' Richtung. Dabei synthetisiert die Polymerase einen komplementären Strang, welcher folglich in 5'-3' Richtung gebildet wird. Die Doppelstrang-DNA wird währenddessen nach und nach mit dem Fortschreiten der Polymerase in zwei Einzelstränge getrennt. Der Leitstrang wird kontinuierlich synthetisiert, während der Folgestrang diskontinuierlich in sogenannten Okazaki-Fragmenten komplementär synthetisiert wird (siehe Abbildung 2. A)). Die DNA-Polymerase benötigt ein Startmolekül, dieses wird Primer genannt und im weiteren Verlauf der Replikation wieder entfernt. Die Primer bestehen aus RNA-Nukleotiden und besitzen ein freies 3'-Ende, an das die neuen komplementären DNA-Nukleotide gebunden werden. Die aufgrund der diskontinuierlichen Synthese entstehenden Lücken im Folgestrang werden anschließend geschlossen, indem die Okazaki-Fragmente als Primer für die DNA-Polymerase fungieren. Beim Leitstrang liegt der Primer jedoch am Ende des linearen Chromosoms; die nach seiner Entfernung entstehende Lücke kann nicht gefüllt werden und verbleibt (siehe Abbildung 2. B)). Somit kommt es bei jeder Replikation zu einem Verlust von 50-200 Basenpaaren (bp) am 5'-Ende des Chromosoms. Dies wird solange toleriert, bis der kumulative Verlust das sogenannte Hayflick-Limit erreicht, das heißt eine kritische Telomerenlänge erreicht ist. Danach setzt ein Zellschädigungssignal ein, welches einen Replikationsstop oder eine Apoptose der Zelle bewirkt. Würde sich die Zelle dennoch über das Hayflick-Limit hinaus weiter teilen, käme es zu genetischer Instabilität (Fusion chromosomaler Enden, irreguläre Rekombination und Verlust genetischer (kodierender) Informationen) (Quaas 2006, Schneider-Stock et al. 2002).

A)



B)

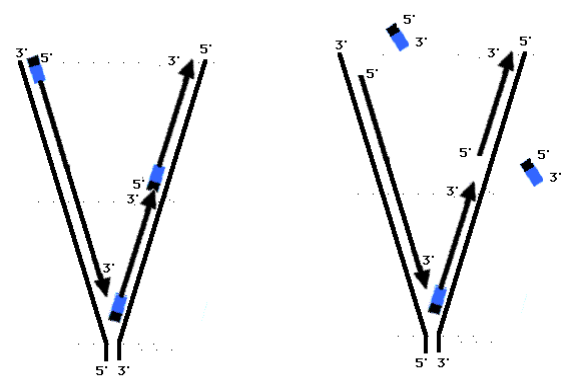


Abbildung 2.: **A)** Der DNA-Doppelstrang zum Zeitpunkt der Replikation. Aufspaltung in zwei Einzelstränge und Synthese des komplementären Stranges in 5'-3'-Richtung. Dabei wird der Leitstrang kontinuierlich gebildet und der Folgestrang diskontinuierlich, d.h. aus Okazaki-Fragmenten, welche anschließend durch die DNA-Polymerase und DNA-Ligase verbunden werden. Quelle: (A4) **B)** Der DNA-Doppelstrang zum Zeitpunkt der Replikation. Darstellung der Primer, welche als Startmolekül für die DNA-Polymerase benötigt werden und nach der Replikation wieder entfernt werden. Darstellung des dadurch entstehenden Verlustes von Basenpaaren am 5'-Ende des Chromosoms. Quelle: (A5)

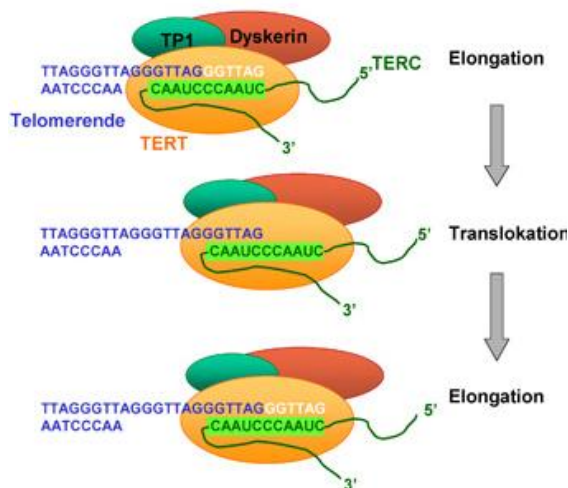
Zusammenfassend sind die Telomere unserer Chromosomen demnach nicht nur dafür zuständig, eine chromosomale Endfusion und eine irreguläre chromosomale Rekombination zu verhindern und die chromosomale Position innerhalb des Zellkernes zu sichern (Quaas 2006, Gramatges und Bertuch 2013), sondern sie stellen auch sicher, dass trotz häufiger Replikationen und damit einhergehender Verkürzung der DNA keine kodierenden Abschnitte der DNA verloren gehen.

In den meisten Geweben des adulten menschlichen Körpers können die Telomere nicht verlängert werden. Das heißt, dass es nur zu einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen kommen kann, bis das Hayflick-Limit erreicht ist. In Geweben mit hoher Proliferationsrate, wie beispielsweise Schleimhäute und Knochenmark oder auch während der Embryonalentwicklung, würde dies zu einer verfrühten Zellalterung führen. Deswegen sind hier Mechanismen nötig, durch die sich die verkürzenden Telomere immer wieder verlängern können.

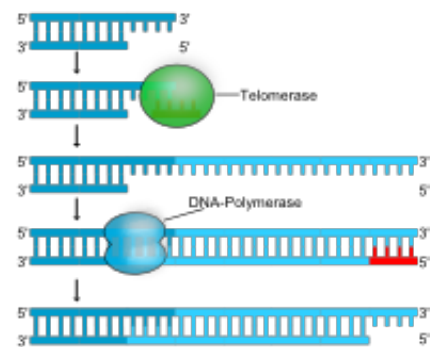
Die Verlängerung der Telomere kann auf zwei verschiedene Weisen erreicht werden: entweder über die – auch in mehr als 90% der malignen Tumoren nachweisbare – Expression der Telomerase (Hukezalie und Wong 2013, siehe unten) oder über eine telomeraseunabhängige alternative Telomerenverlängerung (ALT), bei der es zu einer homologen Rekombination kommt. Letztere ist nach heutigem Kenntnisstand jedoch relativ selten ursächlich für die unbegrenzte Teilungsfähigkeit von Tumorzellen (in etwa 3,73% aller Malignitäten), wobei sie vorzugsweise in Tumoren mesenchymaler und neuroepithelialer Herkunft gefunden wird (Heaphy et al. 2011).

Die Telomerase ist eine spezialisierte Reverse Transkriptase, deren Hauptaufgabe es ist, die Telomerenlänge aufrecht zu halten (Hukezalie und Wong 2013). Dieser etwa 1000kda große Ribonukleoproteinkomplex besitzt eine RNA-Matrize, die sogenannte humane Telomerase-RNA (hTR), welche aus den 11 Nukleotiden 3'-CAAUCCCAAUC-5' besteht. Sie wird als Vorlage verwendet, um an den 3'-Überhang der Telomeren repetitiv das Hexanukleotid 5'-GGTTAG-3' anzulagern und somit die Telomeren zu verlängern (siehe Abbildung 3 A)). Diese einzelsträngige Verlängerung der DNA am 3'-Ende der Telomeren wird anschließend mit Hilfe der zelleigenen DNA-abhängigen DNA-Polymerase komplementär zu einem Doppelstrang ergänzt (siehe Abbildung 3B)) (Hukezalie und Wong 2013, Quaas 2006). Die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase ist die sogenannte humane Telomerase reverse Transkriptase (hTERT), ein 127kDA Protein bestehend aus 1132 Aminosäuren. Das hierfür kodierende 40kb Gen befindet sich auf Chromosom 5 (5p15.33), das für die hTR kodierende DNA-Segment liegt auf Chromosom 3 (3q26.3). Beiden Untereinheiten sind Proteine angelagert; hTR assoziiert sind beispielsweise Dyskerin, NHP2, NOP10 und hTEP1, an hTERT gebunden finden sich unter anderem HSP 70, 90 und p23, C1 und C2 (siehe Abbildung 3C)). Diese Proteine spielen vermutlich unter anderem eine Rolle bezüglich der Stabilität, Aktivität und Lokalisation der Telomerase innerhalb der Zelle und schützen sie vor Angriffen von Proteasen (Dhaene et al. 2000, Quaas 2006).

A)



B)



C)

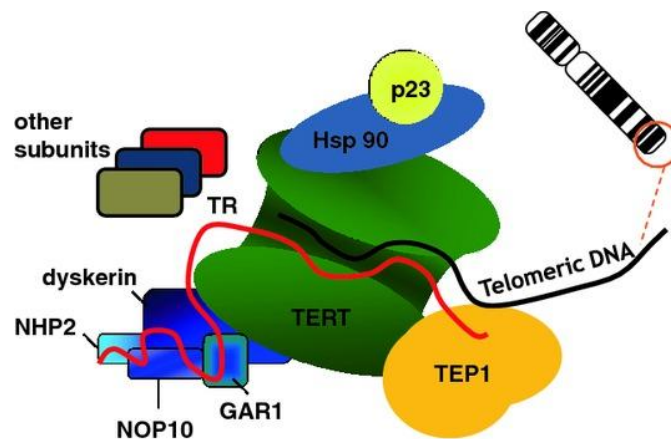


Abbildung 3.: A) Funktionsweise der Telomerase. Anlagerung der RNA-Matrize (hTR) am 3'-Überhang der Telomeren und dessen Verlängerung komplementär zur Matrize um das Hexanukleotid 5'-GGTTAG-3'. Quelle: (A6) **B)** Verlängerung des 3'-Überhangs durch die Telomerase. Anschließend komplementäre Ergänzung zum Doppelstrang durch die DNA-Polymerase. Der für die Arbeit der Polymerase benötigte Primer wird anschließend entfernt, wodurch das 5'-Ende des komplementär synthetisierten Stranges verkürzt ist. Quelle: (A7) **C)** Aufbau der Telomerase aus den Untereinheiten hTR (humane Telomerase-RNA), dem katalytischen Zentrum hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase) und angelagerten Proteinen. Quelle: (A8)

Physiologischerweise ist die Telomerase während der Embryonalentwicklung bis zur 20. Gestationswoche in fast allen Geweben aktiv. In der anschließenden

Fetalentwicklung sind hinsichtlich der Aktivität der Telomerase bereits Unterschiede zwischen den einzelnen Geweben nachweisbar. So ist eine Telomerase-Expression in Leber, Hoden, Lunge und Milz länger feststellbar als beispielsweise in Herz, Nieren und Gehirn. Die lange nachweisbare Aktivität der Telomerase in Leber und Milz hängt vermutlich mit der dort stattfindenden Hämatopoese während der Fetalzeit zusammen. Die Expression der Telomerase nimmt mit zunehmendem Alter ab, sodass sie beim Erwachsenen nur noch im Knochenmark, in aktivierten Lymphozyten, in den Epithelien der Haut und Schleimhäute, dem Endometrium und den Hoden nachweisbar ist (Collins und Mitchell 2002, Ulaner et al. 1998, Quaas 2006).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Telomerase physiologisch in jenen Geweben aktiv ist, die von einer hohen Proliferationsrate gekennzeichnet sind, wie dies während der menschlichen Entwicklungsphase beim Gewebewachstum und der Gewebsentwicklung und beim Adulten in einigen spezialisierten Geweben der Fall ist. Beim Erwachsenen bleibt in eben diesen Zellen mit hohem Teilungsbedarf die Telomerase aktiviert, um die Länge der Telomere konstant zu halten, doch im überwiegenden Teil der somatischen Zellen des Erwachsenen ist keine Telomerase-Aktivität mehr nachweisbar. Dies bedeutet, dass dort die Telomere mit jeder Zellteilung kürzer werden (Quaas 2006, Ulaner et al. 1998). Bedeutsam wird dies auch für das Abschätzen des Nebenwirkungspotentials im Rahmen eines möglichen therapeutischen Einsatzes Telomerase-hemmender Medikamente.

Kommt es zu einer pathologischen Aktivitätsminderung oder –steigerung der Telomerase, so kann dies schwerwiegende Folgen nach sich ziehen.

Eine Funktionseinschränkung der Telomerase spielt beispielsweise bei der Dyskeratosis congenita (DKC) eine wichtige Rolle. Bei dieser Erkrankung kommt es häufig zu einer Mutation im Gen DKC1 (Xq28), welches für das Protein Dyskerin kodiert. Dyskerin ist nicht nur für die Produktion von ribosomaler RNA notwendig, sondern bindet auch an die RNA-Matrize der Telomerase (hTR) und spielt dort eine wichtige Rolle bei deren Stabilisation und beim Aufbau des Telomerase-Komplexes. Bei der Dyskeratosis congenita kommt es unter anderem durch die gestörte Dyskerin-Funktion zu Funktionseinschränkungen der Telomerase und dadurch zu verkürzten Telomeren. Dies führt zu einem klinischen Bild, bei dem besonders die Gewebe mit einer hohen Proliferationsrate frühzeitig von pathologischen Erscheinungen betroffen sind. So imponieren Kinder mit Dyskeratosis congenita mit Panzytopenien, prämaligen Leukoplakien der Schleimhäute, Schleimhaut-ulcerationen, Nageldystrophien, Pigmentationsstörungen der Haut und schweren Lungengerüst- und -gefäßerkrankungen. Auch Knochenmarkdepressionen können auftreten und aus der mit verkürzten Telomeren einhergehenden genetischen Instabilität resultieren häufig Malignome. Andere Erkrankungen, die meist auf einer Insuffizienz der Telomerase und einer damit assoziierten Verkürzung der Telomere beruhen, sind etwa die Aplastische Anämie und die Idiopathische Lungenfibrose. Bei all diesen Erkrankungen wird deutlich, welche bedeutende Rolle die ausreichende

Funktionalität der Telomerase spielt (Dokal 2000, Dokal und Vulliamy 2003, Marrone und Dokal 2004, Quaas 2006).

Doch auch eine pathologische (Re-)Aktivierung und Aktivitätssteigerung der Telomerase kann dramatische Folgen haben. In den meisten somatischen Zellen liegt physiologisch eine Inaktivierung der Telomerase vor, die vermutlich durch ein Zusammenspiel zahlreicher Faktoren (unter anderem auf Ebene der Transkription mit Hilfe des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors MZF-2 und epigenetischer Prozesse, aber auch durch post-translationale Regulierung oder etwa alternatives Splicing von hTERT) erreicht wird (Cifuentes-Rojas und Shippen 2012). Die Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung stellt einen wichtigen tumorsuppressiven Mechanismus dar, denn durch sie wird die Proliferationskapazität der Zellen limitiert (Kong et al. 2013). Kommt es jedoch zu einer pathologischen (Re-)Aktivierung der Telomerase, können sich die Zellen unbegrenzt replizieren und somit Tumoren entstehen. Da die unbegrenzte Teilungsfähigkeit ein Kennzeichen maligner Zellen ist, überrascht es nicht, dass über 90% aller Tumoren eine Telomerase-Aktivität aufweisen (Hukezalie und Wong 2013).

Die Telomerase-(Re-)Aktivierung tritt in den verschiedenen Tumorentitäten zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. In manchen Fällen lässt sich eine Telomerase-Aktivität bereits in präneoplastischen oder in-situ-Veränderungen nachweisen, zum Teil lässt sich die Telomerase-Aktivität erst mit fortschreitender Tumorprogression dokumentieren (Hiyama und Hiyama 2003, Quaas 2006). Ob bei den Tumoren mit Telomerase-Aktivität die Telomerase-Expression reaktiviert wird oder ob die Tumoren möglicherweise von Stammzellen ausgehen, in denen die Expression ohnehin nie inaktiviert war, konnte bisher noch nicht hinreichend geklärt werden (Quaas 2006).

Nur hTERT und die RNA-Matrize (hTR) scheinen für eine Funktionsfähigkeit der Telomerase nötig zu sein, auf die assoziierten Proteine kann vermutlich verzichtet werden. Doch der Nachweis von hohen hTR-mRNA-Konzentrationen korreliert nicht zwangsweise mit einer Telomerase-Aktivität; somit kann dieses Merkmal nicht zur Telomerase-Aktivitätsbestimmung herangezogen werden. Welche Funktion hTR hier übernimmt ist bisher unklar (Collins und Mitchell 2002, Hiyama und Hiyama 2003, Quaas 2006, Hukezalie und Wong 2013).

Anders verhält es sich mit dem Nachweis der hTERT-mRNA. Gewebe, in denen die komplette hTERT-mRNA nachgewiesen werden kann, weisen gleichzeitig immer eine Telomerase-Aktivität auf. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass lediglich die Voll-Längen hTERT-mRNA mit der Telomerase-Aktivität korreliert; Splice-Produkte besitzen keine katalytische Funktion oder wirken sich teilweise gar negativ auf die Telomerase-Aktivität aus (Collins und Mitchell 2002, Krams et al. 2003, Quaas 2006).

Darüber hinaus kann die Telomerase-Aktivität zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Veränderungen und als prognostischer Faktor bei Malignomen herangezogen werden. Es ist anzunehmen, dass eine gesteigerte

Expression von hTERT eine entscheidende Rolle bei der (Re-)Aktivierung der Telomerase und damit bei der Tumorentstehung spielt. Ein wichtiger, erst kürzlich verstandener Mechanismus, der zur Steigerung der hTERT Expression führt, ist die Regulation der Promoterregion des entsprechenden Gens (Hiyama und Hiyama 2003, Quaas 2006).

Verschiedene Veröffentlichungen haben zuvor Mutationen im Promoter des telomeraseaktivierenden Gens hTERT auf Chromosom 5 nachgewiesen, wobei zwei bestimmte Mutationen gehäuft vorkommen und folglich als „Hotspot-Mutationen“ bezeichnet werden. Bei beiden handelt es sich um einen singulären Austausch der Base Cytosin gegen Thymin. Die häufigste bisher festgestellte hTERT Promoter-Mutation befindet sich an Position 1,295,228 (C228T) bzw. -124 bp vom Startcodon ATG (diese Mutation wird in der vorliegenden Arbeit durchgehend als „-124C>T“ bezeichnet). Ebenfalls häufig tritt eine Mutation an Position 1,295,250 (C250T) bzw. -146 bp vom Startcodon entfernt auf („-146C>T“). Beide Mutationen führen zu neuen Schnittstellen für Transkriptionsfaktoren (E-twenty six, Ets) und dadurch zu einer zwei- bis vierfachen Steigerung der Aktivität des hTERT Promoters. Da hTERT das katalytische Zentrum der Telomerase darstellt, kommt es konsekutiv zu einer erhöhten Telomeraseaktivität (Huang et al. 2013, Vinagre et al. 2013, Horn et al. 2013, Koelsche et al. 2014).

Die beiden Hotspot-Mutationen des hTERT Promoters lassen sich jedoch nur in einigen wenigen Tumorentitäten nachweisen. Dazu zählen vor allem das Maligne Melanom (ca. 71% der Fälle) und das Urothelkarzinom der Harnblase (ca. 59% der Fälle); seltener werden die Mutationen in Schilddrüsenkarzinomen (etwa 9%) und sehr selten in Magenkarzinomen (ca. 0,05%) gefunden. Auch in Tumoren des ZNS sind die Hotspot-Mutationen nachweisbar, allen voran in Glioblastomen (62% der Fälle), Anaplastischen Oligodendrogliomen (54%) und Oligodendrogliomen (45%), aber auch in Astrozytomen werden sie in einem geringen Anteil der Fälle (12%) gefunden (Huang et al. 2013, Vinagre et al. 2013).

Da in den genannten Tumoren jedoch nur zu einem bestimmten Prozentsatz jene hTERT Promoter-Mutationen nachgewiesen werden und diese Tumorentitäten ohnehin nur einen kleinen Teil aller Malignitäten ausmachen, müssen noch weitere, bisher unbekannte Mechanismen existieren, die zu der in über 90% aller Tumoren vorliegenden Steigerung der Telomeraseaktivität (Hukezalie und Wong 2013) führen. Vermutet wird, dass einige Transkriptionsfaktoren, unter denen sich auch bekannte Onkogene befinden, die Expression von hTERT und somit auch die Aktivität der Telomerase steigern. So wird von den Transkriptionsfaktoren Sp1, c-Myc, AP2 und HIF-1 angenommen, dass sie sich aktivitätssteigernd auf hTERT auswirken. Aber auch die Epigenetik gerät in diesem Zusammenhang immer mehr in den Blickpunkt der Forschung, da sie ebenfalls an der Regulation der Transkription von hTERT beteiligt scheint. Eine Demethylierung der DNA oder eine Methylierung der Histone in benachbarten Abschnitten der hTERT Promoterregion aktivieren die Histon-

Acetyltransferase (HAT), die ihrerseits eine Transkription von hTERT ermöglicht (Kyo et al. 2008).

Es konnte bisher jedoch nicht in allen malignen Tumoren eine Telomerase-Aktivität nachgewiesen werden. Demzufolge müssen noch andere Mechanismen existieren, die zu einer konstanten Telomerenlänge und damit einer dauerhaften Teilungsfähigkeit der Tumorzellen führen können. Ein Beispiel hierfür wäre der alternative Weg der homologen Rekombination (Quaas 2006).

In unserer Studie konzentrierten wir uns auf die Hotspot-Mutationen der hTERT Promoter-Region in den lebereigenen Tumoren, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.2. Hepatozelluläres Karzinom

2.2.1 Epidemiologie

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der fünfthäufigste maligne Tumor weltweit und besitzt ein hohes Maß an Morbidität und Mortalität. Es steht an dritter Stelle aller durch Malignome verursachten Todesfälle; jedes Jahr sterben etwa eine Million Menschen an den Folgen dieser Tumorerkrankung (Zhao et al. 2013).

Das HCC ist zudem der häufigste maligne lebereigene Tumor. Die Inzidenz zeigt große geographische Schwankungen. Die häufigsten Erkrankungsfälle sind in Ost-Asien und Afrika südlich der Sahara zu verzeichnen. Hier finden sich bis zu 35,5 Erkrankungsfälle/100.000/Jahr und damit stellt das HCC in diesen Ländern eine der häufigsten malignom-assoziierten Mortalitätsursachen überhaupt dar. In Nordamerika und Westeuropa findet sich eine deutlich geringere Inzidenz für das HCC mit 4.1/100.000/Jahr (Zahlen für die USA). Hier induziert das HCC immerhin aber noch 2.3% aller malignom-assoziierten Todesursachen. Auch der Erkrankungszeitpunkt variiert in den verschiedenen Regionen der Welt. In der Qidong Provinz in China, dem Ort der weltweit höchsten Inzidenz von HCCs, liegt er im 5. Lebensjahrzehnt; im Gegensatz dazu befindet sich der Häufigkeitsgipfel in Europa und den USA in der 7. Lebensdekade und in Taiwan in der 8. Dekade. In Südafrika beträgt das Durchschnittsalter der Patienten mit HCC 35 Jahre, wobei 40 % dieser Patienten 30 Jahre oder jünger sind. Gründe für die Unterschiede liegen insbesondere in der Häufigkeitsverteilung chronischer Virushepatitiden (v.a. Hepatitis B und Hepatitis C) und in einer Nahrungsmittelbelastung durch Aflatoxine begründet - hierauf gehe ich im Abschnitt „2.2.2. Ätiologie“ noch genauer ein. Weltweit einheitlich hingegen ist die überproportionale Häufung des HCCs bei Männern, die bis zu fünfmal häufiger am HCC erkranken als Frauen (bis zu 5:1) (Goodman et al. 2012).

Auffällig sind die gegenläufigen Tendenzen der Inzidenzen in verschiedenen Regionen der Welt. Während in stark betroffenen Gebieten wie China und Hongkong die Zahlen fallen – vermutlich aufgrund der eingeführten HBV-Impfung für Kinder und der verminderten Belastung durch Aflatoxine im Getreide – sind die Zahlen in den USA steigend. Dies wird auf die steigende Inzidenz von Hepatitis C und der sich aus Fettlebererkrankungen entwickelnden Zirrhose zurückgeführt (Goodman et al. 2012, Brunt et al. 2012). Weltweit betrachtet steigt die Inzidenz des Hepatozellulären Karzinoms. Insgesamt besteht eine positive Korrelation zwischen steigendem Lebensalter und Auftreten des HCC, jedoch können auch Jugendliche und bereits Kinder daran erkranken (Goodman et al. 2012, Paradis 2013).

2.2.2. Ätiologie

Die Ursachen des HCC sind vielfältig, doch über 80 % aller HCCs entwickeln sich auf dem Boden einer Leberzirrhose. Dadurch treten alle Faktoren in den Vordergrund, die diese verursachen; besonders relevant sind in diesem Zusammenhang chronisch-persistierende Infektionen mit Hepatitis B und C, Alkoholabusus und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) (Nault et al. 2013, Portincasa et al. 2006).

Weltweit gesehen ist eine Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV) die häufigste Ursache eines HCC, wobei es zurzeit in den westlichen Ländern zu einer deutlichen Zunahme der Infektionen durch Hepatitis C Virus (HCV) kommt. Bei beiden Virusinfektionen besteht das Risiko einer chronischen Verlaufsform, bei der der Körper das Virus nicht mehr selbständig eliminieren kann, mit dem Risiko einer persistierenden Hepatitis und Ausbildung einer Zirrhose. Rund 75% der HCV-Infizierten zeigen eine chronische Verlaufsform. Bei der Infektion mit Hepatitis B kommt es hingegen in nur circa 5-10% zu einer chronischen Hepatitis. Gemeinsam stellen HBV und HCV die häufigsten Ursachen einer chronischen Hepatitis dar. Die Chronifizierung wiederum steht bewiesenermaßen im kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung eines HCC. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass eine chronische Hepatitis B das HCC-Risiko auf das 5-15fache steigert; eine chronische Hepatitis C auf das bis zu 17fache (Goodman et al. 2012).

Auf welche Art diese Virusinfektionen die Entstehung eines HCC fördern, ist noch nicht zufriedenstellend geklärt. Vermutet werden unter anderem direkte Einflüsse der Viren auf das Genom, die Expression karzinogener viraler Proteine und die Unterbrechung bestimmter Signaltransduktionswege, welche Überleben, Proliferation, Migration und Transformation der Zellen regulieren. Auch eine indirekte Karzinogenese aufgrund des sich während einer Hepatitis ständig wiederholenden Ablaufs von Entzündung, Nekrose und Regeneration wird diskutiert und spielt sicher eine wichtige zusätzliche Rolle. Vermutet wird auch, dass HBV und HCV auf unterschiedlichen Wegen zum HCC führen (Goodman et al. 2012).

Eine weitere nicht außer Acht zu lassende Ursache des HCC ist die Belastung von Nahrungsmitteln mit Aflatoxin B1, dem Gift der Schimmelpilze der Aspergillus-Familie, welche vornehmlich Getreide und Erdnüsse befallen. Dies ist vor allem in China und dem südlichen Afrika häufig der Fall – den Regionen, in denen das HCC besonders zahlreich auftritt. Aflatoxin B1 ist als potentes Karzinogen bekannt; es kann die DNA schädigen und zu Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen führen, was wiederum die Entwicklung eines HCC begünstigt (Goodman et al. 2012).

Gerade in den westlichen Ländern spielt der Alkoholabusus eine verhältnismäßig große Rolle bei der HCC-Entstehung. Wenngleich Alkohol nicht als direkt karzinogen eingestuft wird, so führt der Abusus doch meist zu einer Leberzirrhose, die ihrerseits eine Grundlage für die Entwicklung eines HCC darstellt (Goodman et al. 2012).

Auch die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH, Fettleberhepatitis) stellt insbesondere aufgrund der großen Anzahl Erkrankter eine wichtige Ursache für die Entstehung des HCC dar. Die NASH wird als Manifestation des metabolischen Syndroms in der Leber angesehen, welches durch Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes Typ II, Hyperlipidämie und Hypertonus charakterisiert wird. Eine NASH entsteht durch die übermäßige Zufuhr bestimmter Fettsäuren (diskutiert werden hier beispielsweise Lysophosphatidylcholin und Diacylglycerol) und deren Abbau in hepatotoxische Metabolite, welche zu einer Leberfibrose führen können und diese kann ihrerseits in einer Zirrhose enden. Der teils epidemieartige Anstieg des metabolischen Syndroms besonders in der westlichen Welt und der wachsende Anteil an Diabetikern (bis zu 10% der Adipösen), werden in Zukunft durch die hiermit häufig einhergehende NASH eine zunehmend wichtige Rolle bei der Entstehung des HCC spielen (Brunt et al. 2012).

Eine sehr seltene, aber nicht zu vernachlässigende Ursache für das HCC ist die Hämochromatose; desweiteren stellen auch seltenere Erkrankungen wie Morbus Wilson oder eine Autoimmunhepatitis ein Risiko dar. Die Hämochromatose birgt das bis zu 29fache Risiko, an einem HCC zu erkranken, weshalb hier eine regelmäßige Vorsorgeuntersuchung zur Früherkennung dringend indiziert ist. Gerade bei der Hämochromatose ist das Risiko auch bereits im präzirrhotischen Stadium deutlich erhöht (Blonski et al. 2010).

Es existiert ein Subtyp des HCC, welcher aufgrund seiner mikroskopischen Charakteristika als „Fibrolamelläres Hepatozelluläres Karzinom“ (Fibrolamelläres HCC) bezeichnet wird. Dieses Karzinom tritt vorzugsweise bei jungen Menschen auf (Durchschnittsalter 25 Jahre) und ist nicht korreliert mit einer zirrhotischen Leber. Die Prognose des Fibrolamellären HCC ist deutlich besser als die des gewöhnlichen HCC; so beträgt die mittlere Überlebenszeit nach partieller Hepatektomie beim Fibrolamellären HCC 84.9 ± 15.8 Monate, verglichen mit nur 42.9 ± 6.5 Monaten beim nicht-fibrolamellären HCC (Njei et al. 2014).

2.2.3. Diagnostik

In der Diagnostik spielt der Serumspiegel des Alpha-Feto-Proteins (AFP) eine wichtige Rolle. Dieser Marker ist jedoch durch eine relativ geringe Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet, weshalb die Diagnostik durch bildgebende Verfahren ergänzt wird. Typischerweise findet sich ein charakteristisches Kontrastmittelverhalten in der Bildgebung. In schwierigen Fällen oder bei unklaren radiologischen Befunden wird eine histopathologische Primärdiagnostik angestrebt (Goodman et al. 2012, Bertino et al. 2011).

2.2.4. Therapie

Als Therapieoptionen kommen die Resektion des Tumors und bei nicht-resektablen Tumoren die Lebertransplantation entsprechend der Mailänder Kriterien oder die perkutane Radiofrequenzablation des Tumors in Betracht. Auch eine angiographische Embolisation der versorgenden Arterien und ein Einsatz des Tyrosinkinase-Hemmers Sorafenib sind häufige Therapieansätze. Da das HCC im Allgemeinen jedoch erst in einem späten Stadium diagnostiziert wird, kann häufig nicht mehr kurativ therapiert werden und die Prognose ist mit einer 5-Jahresüberlebensrate von ca. 5% entsprechend schlecht (Goodman et al. 2012, Bertino et al. 2011).

2.3. Hepatozelluläres Adenom

Das Hepatozelluläre Adenom (HCA) ist ein benigner primär-hepatischer Tumor, der im Gegensatz zum HCC meist in einer unauffälligen und nicht-zirrhatischen Leber auftritt. Betroffen sind vorwiegend junge Frauen im gebärfähigen Alter; in Zusammenhang gebracht wird die Erkrankung vor allem mit der Einnahme oraler Kontrazeptiva, aber auch mit anabolen Steroiden. Das HCA ist meist asymptomatisch, es kann jedoch zu teils schweren Komplikationen kommen. So kann eine Ruptur des Tumors eine lebensgefährliche Blutung hervorrufen. Selten kann es auch zu einer Transformation in ein HCC kommen. Therapeutisch kommt vor allem bei größeren Tumoren ab 5 cm Größe eine chirurgische Entfernung in Betracht (ab dieser Größe steigt das Risiko einer Ruptur und intratumoralen Blutungen) (Liau et al. 2013). Ferner sollte das auslösende Agens (orales Kontrazeptivum o.a.) gemieden werden.

Eingeteilt werden die Hepatozellulären Adenome in vier verschiedene Subtypen: das teleangiektatische bzw. inflammatorische Adenom (40-50% aller hepatischen Adenome), das HNF1-Alpha-inaktivierte Adenom (30-35%) und das Beta-Catenin-aktivierte Adenom (10-15% der Adenome). Die vierte Gruppe bilden die Adenome, die sich den vorigen Gruppen nicht zuordnen lassen. Gerade das immunhistochemisch nukleär Beta-Catenin überexprimierende (β -Catenin-mutierte) Adenom zeigt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation in ein HCC im Vergleich zu den anderen Gruppen (Goodman et al. 2012, Katabathina et al. 2011).

2.4. Cholangiozelluläres Karzinom

Das Cholangiozelluläre Karzinom (CC) ist ein von den Gallengangsepithelien ausgehendes Adenokarzinom. Es kann in mehrere Subtypen unterteilt werden: intrahepatische Cholangiozelluläre Karzinome (ICC), perihiläre Cholangiozelluläre Karzinome (sogenannte Klatskin-Tumoren) und extrahepatische Cholangiozelluläre Karzinome. Diesen epithelialen Tumoren ist gemeinsam, dass sie allesamt meist sehr spät diagnostiziert werden und eine schlechte Prognose haben (Goodman et al. 2012, Razumilava und Gores 2014). Wir untersuchten in unserer Kohorte ausschließlich intrahepatische Cholangiozelluläre Karzinome.

2.4.1. Epidemiologie

Weltweit sind hepatobiliäre Tumoren für 13 % der durch Malignitäten verursachten Todesfälle verantwortlich, wovon etwa 10-20 % auf die Cholangiokarzinome entfallen. Somit ist das CC eine relativ selten auftretende Erkrankung, es hat aber gleichzeitig eine infauste Prognose: die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 24 Monate, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 10 % (Rizvi und Gores 2013). In den meisten Studien konnte ein etwas vermehrtes Vorkommen des CC bei der männlichen Bevölkerung nachgewiesen werden (60-70% der Fälle). Das Durchschnittsalter bei Erkrankung liegt im 7. Lebensjahrzehnt; vereinzelt tritt das CC jedoch auch bei deutlich jüngeren Menschen auf (Goodman et al. 2012).

2.4.2. Ätiologie

Zu den Ursachen, die das Auftreten eines Cholangiozellulären Karzinoms begünstigen, ist bisher wenig bekannt. Typischerweise tritt das CC in einer nicht-zirrhatischen Leber auf, wobei die Leberzirrhose dennoch ein etwas erhöhtes CC-Risiko zu bergen scheint. Gerade eine durch Hepatitis C verursachte Zirrhose hat ein etwa 1000-fach erhöhtes ICC-Risiko. Sicher ist, dass die Inzidenz durch chronische Entzündungen des biliären Systems erhöht wird, so wie sie beispielsweise bei parasitären Erkrankungen (z.B. dem in Südost-Asien endemischen Parasiten *Clonorchis sinensis*) vorkommen. Auch die Gallengangslithiasis ist eine Ursache wiederkehrender Entzündungen, weshalb es nicht erstaunlich ist, dass ca. 10% der Erkrankten ein CC entwickeln. Die Hepatolithiasis ist in Ost-Asien auffallend häufig und könnte die Ursache des besonders in Japan gehäuften Auftretens des CC sein. Auch zystische Erkrankungen des biliären Systems scheinen eine Ursache für das CC zu sein, da ca. 3% dieser Patienten zusätzlich an einem CC erkranken. Zu den wenigen bekannten ätiologischen Faktoren zählt auch die Primär Sklerosierende Cholangitis, bei der es in etwa 12,2 % der Fälle zu einer Entwicklung eines CC kommt. Desweiteren stehen unter anderem der Alkoholabusus, Diabetes mellitus, Rauchen, eine Infektion mit HIV und die Einnahme von Anabolika und oralen Kontrazeptiva unter Verdacht, das Auftreten eines CC zu begünstigen (Goodman et al. 2012).

2.4.3. Diagnostik

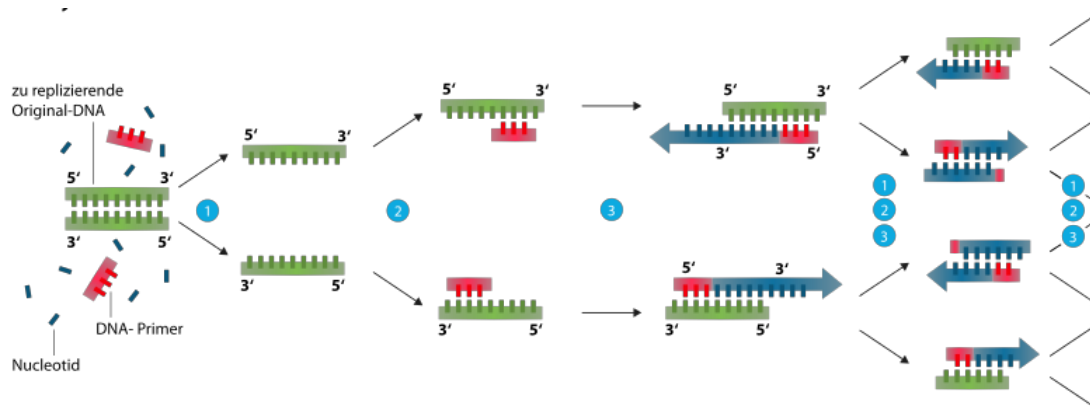
Die histomorphologische Diagnostik kann sich ausgesprochen schwierig gestalten, da das CC zwar den wichtigen Marker Zytokeratin 7 (CK7) exprimiert, sich dieses Zytokeratin allerdings auch bei diversen anderen Adenokarzinomen (z.B. Mammakarzinomen oder Adenokarziomen des oberen Gastrointestinaltrakts, des Pankreas oder der Lunge) findet. Schlecht differenzierte Cholangiokarzinome ohne Nachweis von Muzinen in der konventionellen Histomorphologie können darüber hinaus differentialdiagnostische Schwierigkeiten in der Abgrenzung zum HCC bereiten, da das CK7 auch im HCC nachgewiesen werden kann oder das CC dieses Zytokeratin nicht mehr exprimiert. Eine Unterscheidung ist dabei allerdings überaus wichtig, da beide Tumorentitäten unterschiedliche Therapieansätze nach sich ziehen (Goodman et al. 2012, Khan et al. 2012).

2.5. Bestimmung der hTERT Promoter-Region-Mutationen -124C>T und -146C>T mittels PCR, Restriktionsfragment-Längenanalyse und Sequenzierung

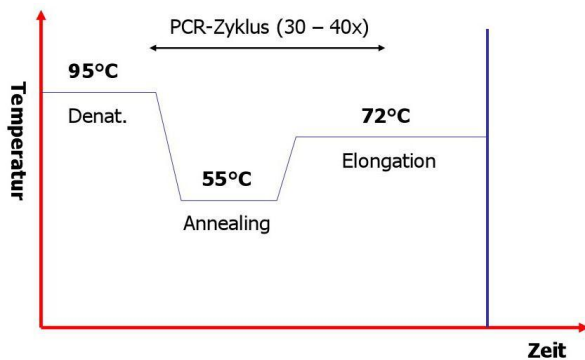
Bei dieser Arbeit wurde zur Detektion der beiden entscheidenden Hotspot-Mutationen die Polymerasekettenreaktion (englisch „polymerase chain reaction“, PCR) zu Hilfe genommen. Zu geringe Mengen an DNA stellen häufig ein Problem dar, denn sie sind nur schwer zu untersuchen oder weiterzuverwenden. Doch mit Hilfe der PCR wurde in den frühen achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts eine Methode gefunden, um gewünschte DNA-Abschnitte vervielfältigen zu können und damit weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen.

Das Prinzip der PCR beruht auf einer in vitro Amplifizierung eines DNA-Segments mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen. Hierfür wird die DNA, welche den zu amplifizierenden Abschnitt enthält (die sogenannte Template-DNA) zusammen mit Oligonukleotid-Primern, Nukleotiden, hitzestabiler DNA-Polymerase (z.B. der sogenannten Taq-Polymerase des in heißen Quellen lebenden Bakteriums *Thermus aquaticus*) und einem Puffer in das Reaktionsgefäß eines sogenannten Thermocyclers gegeben. Die beiden Primer werden so gewählt, dass sie auf beiden Einzelsträngen an den Start der zu vervielfältigenden DNA binden und somit das zu amplifizierende DNA-Segment von beiden Seiten eingrenzen. Das Gemisch wird nun auf 90° Celsius erhitzt, wodurch die doppelsträngige Template-DNA in zwei Einzelstränge denaturiert. Die anschließende Abkühlung auf ca. 55°C bewirkt eine Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die Starter. Danach wird das Gemisch auf 72°C, das Temperatur-Optimum der Taq-Polymerase, erwärmt, damit diese die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementieren kann. Dieser Zyklus aus den drei Schritten der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wird circa dreißig Mal wiederholt, wodurch die Anzahl der gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell wächst. Anschließend kann die DNA wie gewünscht untersucht werden.

A)



B)



C)

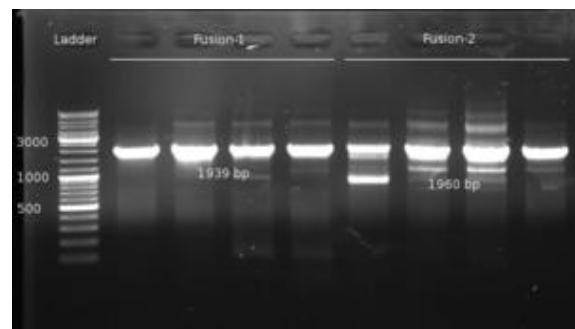


Abbildung 4.: **A)** Schematische Darstellung des Ablaufs einer PCR. 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei ca. 90°C. 2. Primerhybridisierung bei ca. 55°C. 3. Elongation bei ca. 72°C. Abschließend Wiederholung der einzelnen Schritte; dadurch wird ein gewünschter DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Quelle: (A9) **B)** Schematischer Verlauf der Temperaturkurve bei der PCR. Quelle: (A10) **C)** Das PCR-Produkt kann mittels Agarose-Gel untersucht werden. Die einzelnen Fragmente wandern nach Anlegen einer Spannung je nach Länge unterschiedlich schnell auf den Pluspol zu. Anhand der links im Bild dargestellten DNA-Leiter kann die Größe bzw. Anzahl der Basenpaare der einzelnen Fragmente festgestellt werden. Quelle: (A11)

Für diese Arbeit wurde mittels PCR ein Fragment der Länge 148 bp vervielfältigt und mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein (FAM) markiert. Anschließend wurde das gereinigte PCR-Produkt mit Hilfe des Restriktionsenzym HpyAV verdaut. Das Besondere an diesem Restriktionsenzym ist seine Fähigkeit, beide Hotspot-Mutationen zu erfassen. So generieren beide gesuchten Hotspot-Mutationen (-124C>T und -146C>T) jeweils zusätzlich zur Schnittstelle des Wildtyps eine neue Schnittstelle für HpyAV, wodurch für jede Mutation charakteristische Fragmentlängen entstehen (79 bp bei der Mutation -124C>T; 56 bp bei der Mutation -146C>T). Die Fragmentlängen des PCR-Produkts können anschließend mit Hilfe der Restriktionsfragment-Längen-Mutationsanalyse untersucht und dadurch die

gesuchten Mutationen detektiert werden. Die von uns verwendete neuartige Methode, das Restriktionsenzym HpyAV für die Suche nach den Hotspot-Mutationen einzusetzen, ist somit wesentlich weniger aufwändig und zugleich sensitiver als die üblicherweise durchgeführte Sequenzierung.

In fraglichen Fällen wurde zusätzlich eine Sequenzierung nach Sanger (sog. Kettenabbruchmethode der Sequenzierung) durchgeführt. Dabei wird nach Denaturierung der DNA-Stränge mit Hilfe eines Primers und der DNA-Polymerase der komplementäre Strang synthetisiert. Die hierfür benötigten Nukleotide werden dem Ansatz hinzugefügt, jedoch handelt es sich bei den Nukleotiden zum Teil um Didesoxynukleosidtriphosphate die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Nach deren Einbau kann der Strang nicht weiter synthetisiert werden, es kommt zum Kettenabbruch. Je nachdem, wann eines dieser Didesoxynukleosidtriphosphate eingebaut wird, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese Längenunterschiede können bei der anschließenden Kapillarelektrophorese dank der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe den einzelnen Basen zugeordnet werden. Somit wird die Basensequenz des komplementären Strangs entschlüsselt, durch die man auf die Basensequenz der Matritze schließen und bei bekannter Gensequenz Mutationen entdecken kann.

2.6. Das Restriktionsenzym HpyAV

Das Gen für das Restriktionsenzym HpyAV entstammt dem Bakterium *Helicobacter pylori* und wurde in einen *E. coli* Stamm kloniert. Es schneidet sechs Nukleotide downstream der Sequenz 5'-CCTTC-3' bzw. auf dem Gegenstrang fünf Nukleotide upstream der Sequenz 3'-GGAAG-5'. Eine optimale Aktivität des Enzyms liegt bei 37°C vor.

Beim Wildtyp liegt im Gen des hTERT-Promoters genau einmal die Erkennungssequenz für HpyAV vor, es existiert also nur eine Schnittstelle. Die Hotspotmutationen -124C>T und -146C>T des hTERT-Promoters bilden de novo Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym; konsekutiv kommt es bei beiden Mutationen jeweils zu einer zusätzlichen Schnittstelle für HpyAV (siehe Abbildung 5.). Die so entstehenden charakteristischen Fragmentlängen – und konsekutiv auch die Mutationen – können mittels Fragmentlängen-Analyse nachgewiesen werden. Fragmente, die durch Schneiden des Enzyms an der Schnittstelle des Wildtyps entstehen, dienen dabei als Kontrolle für die Aktivität von HpyAV.

1	GCGCTGTCGG	GGCCAGGCCG	GGCTCCCAGT	GGATTGCGCG	GCACAGACGC	CCAGGACCGC
61	GCTTCCCACG	TGGCGGAGGG	ACTGGGGACC	CGGGCACCCG	TCCTGCCCCT	TCACCTTCCA
121	GCTCCGCCTC	CTCCGCGCGG	ACCCCGCCCC	GTCCCAGACC	CTCCCGGGTC	CCCGGCCAG
181	CCCTCCCGG	GCCCTCCCAG	CCCCTCCCT	TCCTTTCCGC	GGCCCCGCCC	TCTCCTCGCG
241	GCGCGAGTTT	CAGGCAGCGC	TGCGTCCTGC	TGCGCACGTG	GGAAGCCCTG	GCCCCGGCCA
301	CCCCCGCG	ATGCCGCGCT	CCCCGCTGCC	GAGCCGTGCG	CTCCCTGCTG	CGCAGCCACT
361	ACCGCGAGGT	GCTGCCGCTG	GCCACGTTTC	TGCGGCGCCT	GGGGCCCCAG	GGCTGGCGGC
421	TGGTGCAGCG	CGGGGACCCG	GCGGCTTTCC	GCGCGCTGGT	GGCCCAGTGC	CTGGTGTGCG
481	TGCCCTGGGA	CGCACGGCCG	CCCCCGCCCG	CCCCTCCTT	CCGCCAG	

Abbildung 5: Mögliche Erkennungssequenzen (grün) und Schnittstellen (Pfeile) des Restriktionsenzym HpyAV. Das ATG-Startcodon ist in Gelb markiert. Die vorderen beiden Erkennungssequenzen werden nur bei Mutationen des hTERT-Promoters an den jeweiligen Stellen C228T (-124C>T) und C250T (-146C>T) vom Enzym erkannt. Quelle: (A12)

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Tumor-Proben

Wir untersuchten im Rahmen dieser Studie ausschließlich formalin-fixierte und paraffineingebettete menschliche Lebertumoren aus den Archiven der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Bei den 145 von uns untersuchten Tumoren aus den Jahren 1994 bis 2013 handelte es sich im Detail um 78 Hepatozelluläre Karzinome, 52 Intrahepatische Cholangiozelluläre Karzinome und 15 Hepatozelluläre Adenome.

3.1.2. Geräte

DNA-Ektrophorese	QIAxcel (QIAGEN)
DNA Konzentration	ND-1000 (Thermo-Scientific)
DNA Kapillarelektrophorese	ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems)
Thermocycler	C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
	C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
	Centrifuge 5804R (Eppendorf)

3.1.3. Enzyme und Reaktionskits

Restriktionsenzym HpyAV + CutSmart Buffer	(New England Biolabs)
QIAamp DNA Micro Kit	(QIAGEN)
QIAGEN Multiplex PCR-Kit	(QIAGEN)
ExoSAP-IT® For PCR Product Cleanup	(Affymetrix)
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	(Applied Biosystems)
BigDye XTerminator Purification Kit	(Applied Biosystems)
MinElute PCR Purification Kit	(QIAGEN)
GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD	(Applied Biosystems)

3.1.4. Primer

Zur Amplifikation des TERT-Promoter-Abschnitts, in dem die beiden möglichen Punktmutationen -124C>T und -146C>T liegen, wurden die in Tabelle 1.) aufgeführten Primer eingesetzt.

Tabelle 1.: Primer, die zur Amplifikation des TERT-Promoter-Abschnitts eingesetzt wurden

Primer-Bezeichnung	Start	Länge [bp]	T _m [°C]	GC-Gehalt [%]	Sequenz 5'-3'
M13-P-TERT_F1	100	36			tgtaaaacgacggccagtgctctgcccttcacctt
P-TERT_F2-FAM	115	18	62,98	66,67	FAM-cttcagctccgcctcct
P-TERT_R1	262	18	60,86	61,11	cagcgctgcctgaaactc

Zur Amplifikation von PCR-Produkten für eine anschließende Fragmentlängen-Analyse wurde das Primer-Paar P-TERT_F2-FAM - P-TERT_R1 verwendet, welches ein Produkt von 148 bp liefert. Der Forward-Primer ist mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein (FAM) markiert, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 485 nm absorbiert und Licht mit einer Wellenlänge von 515 nm emittiert.

Zur Amplifikation von PCR-Produkten für eine anschließende Sequenzierung wurde das Primer-Paar M13-P-TERT_F1 - P-TERT_R1 verwendet, welches ein Produkt der Länge 181 bp liefert. Die eigentliche F1-Primer-Sequenz wurde am 5'-Ende mit der

M13-Sequenz verlängert, um eine bessere Lesbarkeit der Sequenzierung zu erreichen. Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurde der folgende M13-Sequenzierprimer mit einer Länge von 18 bp verwendet: 5'-tgtaaaacgacggccagt-3'

3.2. Methoden

3.2.1. Übersicht

Beide untersuchten Hotspot-Mutationen der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) Promoter-Region (-124C>T und -146C>T) erzeugen dieselbe 5 bp lange Sequenz 5'-CCTTC-3'. Bei dieser Sequenz handelt es sich um eine zusätzliche Zielsequenz für das Restriktionsenzym HpyAV, wodurch es bei derartigen Mutationen zu einer zweiten Schnittstelle kommt. Im Gegensatz dazu enthält die DNA des Wildtyps in der hTERT Promoter-Region lediglich eine Sequenz, an der HpyAV schneidet.

Wird nun anschließend an die PCR das 148 bp Amplicon des hTERT Promoters mittels HpyAV verdaut, führt dies beim Wildtyp zur Spaltung der DNA in ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiertes 104 bp langes Fragment und ein unmarkiertes 44 bp langes Fragment. Im Falle der Mutation -124C>T führt der Verdau durch HpyAV zu einem FAM-markierten Restriktionsfragment der Länge 79 bp; die Mutation -146C>T führt zu einem Produkt von 56 bp (siehe Abbildung 6.).

Diese charakteristischen Fragmentlängen können anschließend mit Hilfe der Restriktionsfragment-Längen-Analyse untersucht werden, wodurch Rückschlüsse auf ein Vorhandensein der Hotspot-Mutationen gezogen werden können.

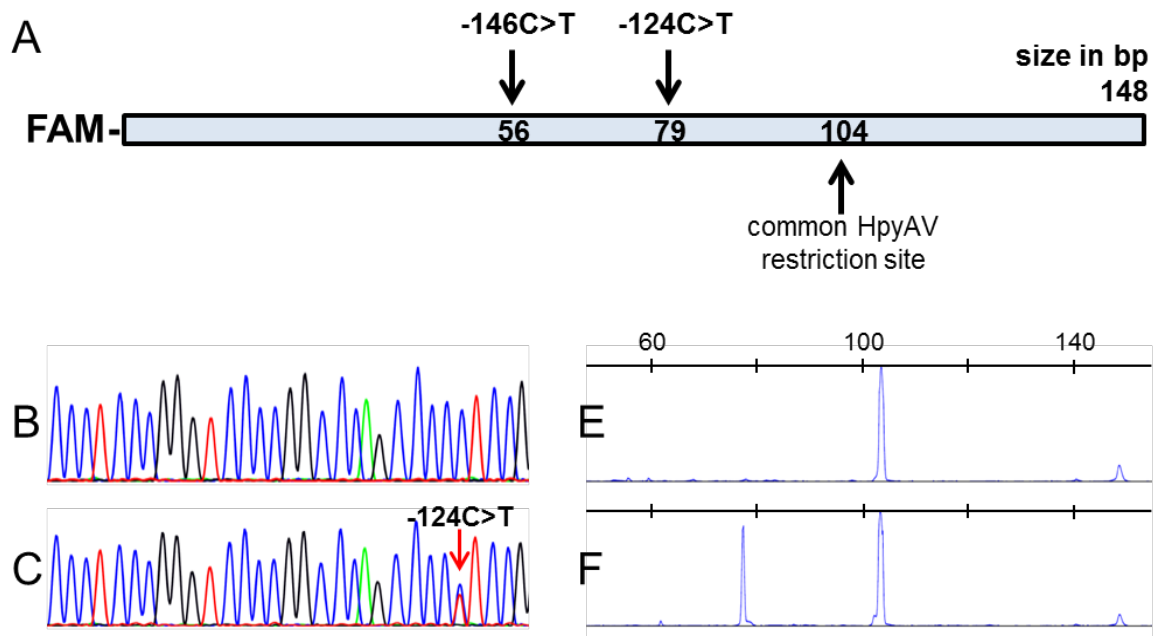


Abbildung 6.: **A)** Schematische Darstellung des 148 bp PCR-Amplicons der hTERT Promoter-Region, das die beiden Hotspot-Mutationen beinhaltet. Verdau durch das Restriktionsenzym HpyAV führt beim Wildtyp zu einem 104 bp FAM-markierten Fragment. Durch die Mutationen -124C>T und -146C>T entstehen de novo Erkennungssequenzen für HpyAV und konsekutiv FAM-markierte Fragmente der Länge 79 bp bzw. 56 bp. **B+C)** Sequenzierung der hTERT Promoter-Region nach Sanger. In B) ist der Wildtyp dargestellt, in C) ein Tumor, der die Mutation -124C>T aufweist. Da kein Tumor die Mutation -146C>T aufwies, hierzu keine Abbildung. **E+F)** Restriktionsfragment-Längen-Analyse der selben Gewebe. Es stellen sich in E) Fragmente der Länge 104 bp entsprechend dem Wildtyp dar; in F) erscheinen zusätzlich Fragmente der Länge 79 bp. Diese deuten auf die Mutation -124C>T hin. An der Schnittstelle des Wildtyps schneidet HpyAV hier ebenfalls. Der niedrige Peak bei 148 bp in E) und F) stellt ungeschnittene Amplicons dar.

3.2.2. Isolierung der DNA

Um einen möglichst hohen Anteil an Tumor-DNA für die Mutationsanalyse zu erhalten, wurden die Tumorzellen auf den Objektträgern mit dem Gewebe eingezeichnet. Die ungefärbten Schnitte (1-3 Schnitte pro Patient) wurden entparaffiniert (10 min in Xylol, zwei mal 5 min in 100% Ethanol). Anschließend wurde das Gewebe mit zu geringem bzw. ohne Tumorzell-Anteil mit einem Skalpell entfernt. Das übrige Gewebe wurde für die DNA Extraktion mit dem QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) eingesetzt. Die DNA Extraktion erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Tumor-DNA wurde in 20 µl H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde gemessen (ND-1000). Alle DNA Proben wurden anschließend auf eine Konzentration von 50 ng/µL verdünnt.

3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des hTERT Promoter-Abschnitts

Zur Amplifikation des hTERT Promoter-Abschnitts wurde aufgrund des hohen GC-Gehalts das QIAGEN Multiplex PCR-Kit mit Q-Solution verwendet. Für einen 25 µL Ansatz wurden 12,5 µL 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 4,5 µL H₂O, 1 µL Primer-Mix (M13-P-TERT_F1, P-TERT_R1, je 10 pmol/µl), 5 µL 5x Q-Solution und 2 µL Patienten-DNA (100 ng) pipettiert. Die PCR wurde im Thermocycler bei folgendem Programm durchgeführt:

- | | | |
|---|------------------------|--|
| 1 | T = 95°C 15 min | Initiale Aktivierung der HotStarTaq Polymerase |
| 2 | T = 94°C 30 sec | Denaturierung |
| 3 | T = 60°C 90 sec | Annealing |
| 4 | T = 72°C 30 sec | Extension |
| 5 | GOTO 2 repeat 39 times | |
| 6 | T = 72°C 10 min | Finale Extension |
| 7 | T = 10°C hold | |

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte anschließend im QIAxcel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.2.4. Enzym-Verdau mit Hilfe des Restriktionsenzym HpyAV

Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kit von QIAGEN, entsprechend den Herstellerangaben, aufgereinigt. Zum Schneiden der FAM-markierten PCR-Produkte wurden zu den 10 µL des aufgereinigten PCR-Produkts 34 µL H₂O, 5 µL 10x CutSmart™ Puffer und 1 µL HpyAV-Enzym (2U) pipettiert. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C und anschließend für 20 Minuten bei 65°C zur Inaktivierung des Enzyms inkubiert.

3.2.5. Restriktionsfragment-Längen-Mutationsanalyse

Für die Fragmentanalyse wurde Formamid mit dem internen Längenstandard ROX im Verhältnis 1:0,03 versetzt. Zu 12 µL dieses Ansatzes wurde 1 µL mit HpyAV verdautes PCR-Produkt gegeben (bei einer DNA-Konzentration ab 4 ng/µL (QIAxcel)

Enzymverdau 1:2 verdünnen) und für 2 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend für mindestens 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Fragmentanalyse wurde am Genetic Analyzer durchgeführt.

3.2.6. Sequenzierung

In allen Fällen, in denen nach der Restriktionsfragment-Längen-Mutationsanalyse keine eindeutigen Ergebnisse vorlagen, wurde eine direkte DNA-Sequenzierung der hTERT Promoter-Region mittels Genetic Analyzer vorgenommen. Dazu wurden die PCR-Produkte zunächst mit ExoSAP behandelt, um die Primer und sonstige kurze einzelsträngige Fragmente, welche bei der Sequenzierung stören können, zu entfernen. Hierfür wurde ein Ansatz von 7 µL Endvolumen mit 2 µL ExoSAP, ca. 1,2 ng PCR-Produkt (etwa 0,3 – 5 µL) und H₂O pipettiert. Die Reaktion wurde im Thermocycler bei folgendem Programm durchgeführt:

- 1 T = 37°C 15 min
- 2 T = 80°C 15 min
- 3 T = 10°C hold

Für die Sequenzierreaktion wurde anschließend zu dem 7 µL ExoSAP-Ansatz 6 µL H₂O, 4 µL 2,5x Puffer, 2 µL Big Dye und 1 µL Sequenzierprimer (M13) gegeben. Die Sequenzierreaktion wurde im Thermocycler bei folgendem Programm durchgeführt:

- 1 T = 95°C 10 min Initiale Aktivierung der Taq Polymerase
- 2 T = 95°C 10 sec Denaturierung
- 3 T = 55°C 10 sec Annealing
- 4 T = 60°C 2 min Extension
- 5 GOTO 2 repeat 34 times
- 6 T = 10°C hold

Das Produkt wurde anschließend mit dem BigDyeX Terminator® Purification Kit gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und mittels Kapillarelektrophorese auf dem Genetic Analyzer (ABI 3100) analysiert.

4. Ergebnisse

4.1. hTERT Promoter-Mutationen im Hepatozellulären Karzinom

Insgesamt untersuchten wir im Rahmen unserer Studie 78 Hepatozelluläre Karzinome (HCC) hinsichtlich der beiden hTERT-Promoter Hotspot-Mutationen -124C>T und -146C>T. Die Gruppe der HCC unterteilten wir weiter je nach Grading in Untereinheiten, wobei wir Tumoren mit dem Grading 3 und 4 aufgrund der geringen Fallzahl in einer Gruppe zusammenfassten. Die HCC vom fibrolamellären Typ betrachteten wir als gesonderte Entität.

Das Patientengut, dem das Tumorgewebe entnommen wurde, gliedert sich wie folgt: von den 78 untersuchten HCC stammten 11 Tumoren von weiblichen Patienten und 67 von männlichen Patienten. Das Durchschnittsalter dieser Patienten betrug 58 Jahre mit einer Spanne von 9 bis 76 Jahren (vergl. Tabelle 4.).

Von den 78 untersuchten HCC waren 38 Fälle (48,7%) positiv hinsichtlich einer -124C>T Mutation. Im bemerkenswerten Gegensatz dazu wies kein einziges HCC die Mutation -146C>T auf (vergl. Tabelle 2.).

Je nach Grading ergaben sich folgende Ergebnisse: von den 18 untersuchten G1-Tumoren besaßen 7 (38,9%) die hTERT Promoter-Mutation; unter den 38 untersuchten G2-Tumoren waren 20 (52,6%) positive Fälle und in der Gruppe der G3/4 Tumoren wiesen 10 von 14 Tumoren die genannte Mutation auf (71,4%) (vergl. Tabelle 2. und 3.).

Wenngleich aufgrund der Größe unserer Kohorte keine statistisch signifikanten Aussagen getroffen werden können ($p=0,188$ nach Pearson), so scheint doch ein schlechteres Tumorgrading (Grad 3 und 4) gehäuft mit einer hTERT-Promoter-Mutationen assoziiert zu sein. Diese wurde zuvor bereits von einer Arbeitsgruppe beschrieben (Nzeako et al. 1995). Unter den 8 HCC vom fibrolamellären Typ fand sich lediglich in einem Fall eine hTERT Promoter-Mutation (12,5%).

4.2. hTERT Promoter-Mutationen im Intrahepatischen Cholangiozellulären Karzinom

Insgesamt wurden 52 intrahepatische cholangiozelluläre Karzinome (ICC) hinsichtlich der beiden Hotspot-Mutationen der hTERT Promoter-Region gescreent. Die Tumorproben entstammten einem Patientengut von 30 weiblichen und 22 männlichen Patienten mit einem mittleren Alter von 61 Jahren (39 bis 76 Jahre). In markantem Gegensatz zu den Hepatozellulären Karzinomen wurde bei keinem einzigen der 52 untersuchten ICC eine Mutation des hTERT Promoters gefunden (siehe Tabelle 2., 4.).

4.3. hTERT Promoter-Mutationen im Hepatozellulären Adenom

Abschließend untersuchten wir 15 Hepatozelluläre Adenome (HCA) ohne jegliche Zeichen einer malignen Entartung. Alle evaluierten Proben entstammten weiblichen Patienten mit einem Altersdurchschnitt von 32 Jahren (21 bis 57 Jahre). Wie bei den ICCs, so konnte auch hier in keinem der Fälle eine hTERT Promoter-Mutation festgestellt werden (siehe Tabelle 2., 4.).

Tabelle 2.: Anzahl der untersuchten Tumoren unterteilt nach Entität und Grading und jeweiliger Prozentsatz der hTERT Promoter-Mutationen

	n	mit hTERT Promoter- Mutation -124C>T	mit hTERT Promoter- Mutation -146C>T
Hepatozelluläres Karzinom	78	38 (48,7%)	0 (0%)
G1	18	7 (38,9%)	0 (0%)
G2	38	20 (52,6%)	0 (0%)
G3/4	14	10 (71,4%)	0 (0%)
fibrolamellärer Subtyp	8	1 (12,5%)	0 (0%)
Intrahepatisches Cholangio- zelluläres Karzinom	52	0 (0%)	0 (0%)
Hepatozelluläres Adenom	15	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.: Prozentualer Anteil der Mutation -124C>T beim HCC gegenüber der hTERT Promoter-Region vom Wildtyp

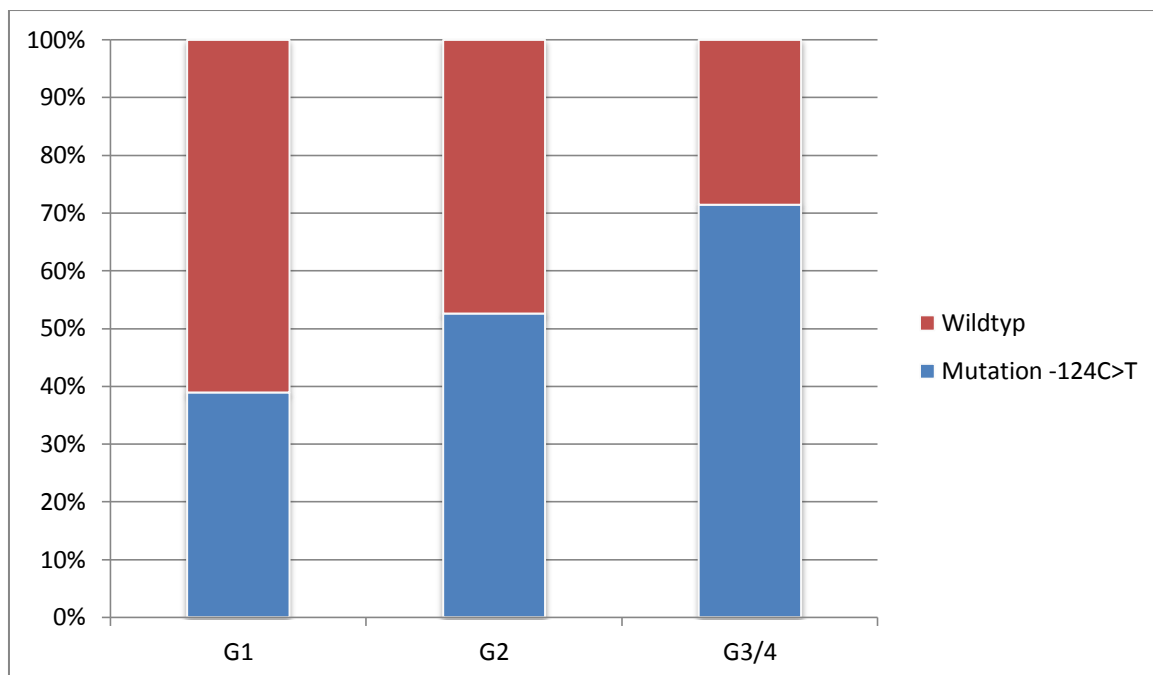


Tabelle 4.: Gliederung der untersuchten Tumoren nach Geschlecht und Durchschnittsalter der Patienten

	weiblich	männlich	gesamt	Durchschnittsalter in Jahren (Spanne)
Hepatozelluläres Karzinom	11	67	78	58 (9 – 76)
Intrahepatisches Cholangiozelluläres Karzinom	30	22	52	61 (39 – 76)
Hepatozelluläres Adenom	15	0	15	32 (21 – 57)

Tabelle 5.: Auflistung und Eigenschaften aller im Rahmen dieser Studie untersuchten Tumoren. Die Mutation C250T entspricht der Mutation -124C>T. WT = Wildtyp

Lab-ID	Entität	Jahr	Tumor-Anteil in %	Geschlecht	Alter	pT	Grading	Mutation
HEP002	HCC	2003	80	m	52,7		1	C250T
HEP003	HCC	1994	80	m	59,3	pT3	4	WT
HEP004	HCC	2002	80	m	54,3	pT2	2	C250T
HEP005	HCC	2002	80	m	71,5	pT2	2	WT
HEP006	HCC	2001	70	w	68,1	pT3	2	WT
HEP011	HCC	2003	70	m	50,6	pT1	2	C250T
HEP012	HCC	1999	60	m	50,0	pT1	1	WT
HEP013	HCC	2009	70	m	68,0		2	WT
HEP014	HCC	1999	80	m	67,1	pT2	2	C250T
HEP015	HCC	1999	70	m	57,5		2	C250T
HEP016	HCC	1999	70	m	68,4	pT2	4	C250T
HEP017	HCC	1999	70	m	61,1	pT2	3	C250T
HEP018	HCC	1996	80	m	45,2	pT3	3	WT
HEP020	HCC	1996	70	m	68,6		1	WT
HEP021	HCC	1996	70	w	58,6	pT4	2	WT
HEP022	HCC	1997	70	m	58,9	pT2	1	WT
HEP024	HCC	1997	90	m	65,5	pT2	2	WT
HEP025	HCC	1998	90	m	66,4	pT2	1	C250T
HEP026	HCC	1998	90	m	70,7	pT2	2	C250T
HEP027	HCC	1998	80	m	61,0	pT2	2	C250T
HEP028	HCC	1999	70	m	57,1		2	C250T
HEP029	HCC	2000	80	m	67,4	pT2	2	WT
HEP031	HCC	1997	80	m	56,4	pT2	2	C250T
HEP032	HCC	1996	70	m	76,3	pT3	3	C250T
HEP033	HCC	1997	80	m	67,6	pT2	1	C250T
HEP034	HCC	1996	80	w	71,3	pT3	2	WT
HEP035	HCC	1996	80	m	67,7	pT2	4	C250T
HEP036	HCC	1996	80	m	57,0	pT4	2	WT
HEP037	HCC	1996	80	m	60,3	pT3	3	C250T
HEP038	HCC	1996	60	m	53,9	pT4	3	C250T
HEP039	HCC	1995	70	m	66,3		2	C250T
HEP040	HCC	2003	70	m	67,0		2	WT
HEP041	HCC	2003	80	m	48,5	pT2	2	WT
HEP042	HCC	2003	90	m	9,6	pT2	2	WT
HEP043	HCC	2003	70	m	51,4		2	C250T
HEP044	HCC	2003	80	m	71,3	pT3	2	C250T
HEP045	HCC	1995	70	m	72,2		2	C250T
HEP046	HCC	2003		m	61,5	pT3	2	C250T
HEP047	HCC	2003	80	m	51,2		1	C250T

HEP048	HCC	1994	60	w	47,9	pT2	3	C250T
HEP049	HCC	2005	70	m	64,5	pT3	2	WT
HEP050	HCC	2005	80	m	61,0	pT3	2	WT
HEP051	HCC	2005	80	m	63,4	pT2	2	WT
HEP052	HCC	2005	80	w	59,3	pT2	3	C250T
HEP053	HCC	2004	40	m	60,5	pT2	1	WT
HEP054	HCC	2004	70	m	67,7	pT2	1	C250T
HEP055	HCC	2004	70	m	54,6	pT2	2	C250T
HEP056	HCC	2004	70	m	56,4	pT2	2	C250T
HEP057	HCC	2004	80	m	63,2	pT3	3	WT
HEP058	HCC	2004	80	w	68,0	pT1	1	WT
HEP059	HCC	1996	20	m	71,9		1	WT
HEP060	HCC	1995	70	m	24,8		2	WT
HEP061	HCC	1994	80	m	36,3		1	WT
HEP062	HCC	2004	80	m	68,9	pT3	1	WT
HEP063	HCC	2003	70	m	57,0		1	C250T
HEP064	HCC	2007	80	m	62,8	pT1	1	C250T
HEP065	HCC	2006	80	m	64,9	pT2	3	C250T
HEP066	HCC	2006	80	m	60,1	pT1	2	WT
HEP067	HCC	2005	70	m	35,0	pT3	3	WT
HEP068	HCC	2005	80	m	43,8	pT1	1	WT
HEP069	HCC	2004	80	m	47,0	pT3	2	C250T
HEP070	HCC	1997	80	m	70,9		2	C250T
HEP071	HCC	1996	70	m	68,6	pT3	3	C250T
HEP072	HCC	1996	70	m	71,5	pT3	2	C250T
HEP073	HCC	2004	70	w	63,7		2	C250T
HEP074	HCC	2001	80	m	56,5	pT4	2	WT
HEP075	HCC	2005	80	m	67,4	pT2	2	WT
HEP076	HCC	2001	80	m	59,3		2	C250T
HEP302	HCC	2003		w	63,2		1	WT
HEP409	HCC	2000		m	65,3		1	WT
HEP301	FL	1999		m	17,5	pT1	FL	WT
HEP303	FL	1997		w	18,9	pT4	FL	WT
HEP304	FL	1998		w	73,0	pT3	FL	WT
HEP305	FL	1995		m	17,9		FL	WT
HEP306	FL	2012		w	14,3	pT3a	FL	C250T
HEP307	FL	2013		m	76,2	pT1	FL	WT
HEP019	FL	1996	60	m	34,3		FL	WT
HEP030	FL	2000	60	m	64,4	pT3	FL	WT
HEP401	HCA	1997		w	33,3			WT
HEP402	HCA	2003		w	37,3			WT
HEP403	HCA	2004		w	27,9			WT
HEP404	HCA	2006		w	40,1			WT
HEP405	HCA	2008		w	36,1			WT

HEP406	HCA	2005		w	21,6			WT
HEP407	HCA	2008		w	49,0			WT
HEP408	HCA	2008		w	32,3			WT
HEP410	HCA	2013		w	36,9			WT
HEP411	HCA	2012		w	26,5			WT
HEP412	HCA	2009		w	38,9			WT
HEP413	HCA	2009		w	25,8			WT
HEP414	HCA	2009		w	24,5			WT
HEP415	HCA	2012		w	26,7			WT
HEP416	HCA	2013	90	w	22,9			WT
HEP201	ICC	2001	70	m	73,7	pT2	G2	WT
HEP202	ICC	2001	70	m	72,9	pT3	G2	WT
HEP203	ICC	2010	70	w	59,5		G2	WT
HEP204	ICC	1999	50	m	56,9	pT4	G3	WT
HEP205	ICC	2010	60	w	72,9	pT4	G2	WT
HEP206	ICC	2001	80	w	62,2		G3	WT
HEP207	ICC	2007	80	m	72,9		G2	WT
HEP208	ICC	2004	60	m	51,7	pT2	G2	WT
HEP209	ICC	2005	60	w	48,2	pT3	G3	WT
HEP210	ICC	2009	70	w	52,7	pT1	G2	WT
HEP211	ICC	2003	60	w	73,2		G3	WT
HEP212	ICC	2008	80	w	46,4		G2	WT
HEP213	ICC	2010	70	m	60,6	pT1	G2	WT
HEP214	ICC	2007	60	m	68,2	pT3	G2	WT
HEP215	ICC	2006	70	w	66,6		G2	WT
HEP216	ICC	2002	70	w	60,7	pT2	G3	WT
HEP217	ICC	2008	70	w	67,5	pT3	G2	WT
HEP218	ICC	2008	80	m	71,0	pT3	G2	WT
HEP219	ICC	2006	60	w	59,2		G1	WT
HEP220	ICC	2001	60	w	66,6	pT3	G2	WT
HEP221	ICC	2002	60	m	63,9		G2	WT
HEP222	ICC	2008	60	w	75,5	pT2	G2	WT
HEP224	ICC	2007	60	m	54,5	pT1	G3	WT
HEP225	ICC	2008	70	m	46,5	pT2	G3	WT
HEP226	ICC	2001	80	w	55,1		G2	WT
HEP227	ICC	2008	60	m	63,1	pT3	G2-3	WT
HEP229	ICC	2010	70	m	65,1	pT2b	G3	WT
HEP230	ICC	2007	70	w	64,0	pT1	G3	WT
HEP232	ICC	1998	80	w	54,0	pT3	G2	WT
HEP233	ICC	1997	60	w	55,6	pT2	G3	WT
HEP237	ICC	2010		w	65,8	pT2	G2	WT
HEP238	ICC	2010	60	w	39,2		G3	WT
HEP240	ICC	1998	80	w	48,4	pT3	G2	WT
HEP241	ICC	2005	60	m	60,8		G2	WT

HEP242	ICC	2005	40	w	71,5		WT
HEP243	ICC	2005	60	w	65,0	G3	WT
HEP245	ICC	2000	60	m	54,3	G2-3	WT
HEP249	ICC	2001	70	m	67,0	G2	WT
HEP250	ICC	1997	60	m	48,2	G3	WT
HEP251	ICC	1998	80	w	51,8	pT2 G2	WT
HEP252	ICC	2007	70	m	65,1	G3	WT
HEP255	ICC	2006	70	w	73,6	G3	WT
HEP257	ICC	2006	70	w	68,0	G1-2	WT
HEP259	ICC	1996	60	m	62,6	G2	WT
HEP264	ICC	1997	70	w	55,1	pT4 G3	WT
HEP266	ICC	2009	80	w	61,9		WT
HEP268	ICC	2003	80	m	64,4		WT
HEP269	ICC	2002	80	w	53,2	pT3 G2	WT
HEP275	ICC	2003	70	w	67,5	pT2 G3	WT
HEP276	ICC	2013	80	m	48,8	pT2b G2	WT
HEP007	ICC	2001	60	m	62,1	pT3 G2	WT
HEP023	ICC	1998	70	w	54,0	pT3 G2	WT

5. Diskussion

H-TERT-Promotermutationen sind erst kürzlich als ein seltener, aber bedeutsamer Mechanismus der Kanzerogenese humaner maligner Tumoren beschrieben worden (Nault et al. 2013, Huang et al. 2013, Vinagre et al. 2013, Horn et al. 2013). Im Wesentlichen wurden diese Mutationen bei malignen Melanomen, Urothelkarzinomen und einigen primären Hirntumoren (vor allem beim Glioblastom, Oligodendrogliom und anaplastischen Oligodendrogliom) gefunden (Vinagre et al. 2013). Bei vielen anderen malignen Tumoren und insbesondere bei Karzinomen finden sich diese Mutation nicht oder nur sehr selten. So konnte die Arbeitsgruppe um J. Vinagre (Vinagre et al. 2013) beispielsweise in 26 untersuchten Nierenkarzinomen keine einzige hTERT-Promotermutation feststellen, auch unter den untersuchten 36 Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) fand sich keine derartige Mutation. Die jeweils 8 von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Zelllinien von Magen- bzw. kolorektalen Karzinomen waren ebenfalls allesamt negativ hinsichtlich einer hTERT-Promotermutation und von 291 untersuchten Schilddrüsenkarzinomen wiesen lediglich 27 Fälle (9,28%) eine solche Mutation auf (Vinagre et al. 2013). In Anbetracht der herausragenden Bedeutung der Telomeraseaktivität bei malignen Tumoren ist es erstaunlich, dass die Promotermutation als ein Weg der Aktivitätssteigerung des Enzyms vergleichsweise selten anzutreffen ist.

Bislang hat lediglich eine französische Arbeitsgruppe (Nault et al. 2013) die Rolle der hTERT-Promotermutationen bei hepatozellulären Karzinomen und Leberzelladenomen untersucht und kam dabei zu Ergebnissen, die mit unseren Resultaten übereinstimmen. Demnach spielt eine hTERT-Promotermutation beim hepatozellulären Karzinom eine bedeutsame Rolle – circa jedes zweite HCC „wählt“ diesen Weg der Telomeraseaktivierung.

Leberzelladenome stellen echte, benigne, Tumoren der Leber dar, die typischerweise bei jüngeren Frauen in Assoziation zur Einnahme von Kontrazeptiva entstehen. Eine maligne Entartung in ein HCC ist selten, aber in circa 5% der Leberzelladenome beschrieben (Bioulac-Sage et al. 2013). Insofern war auch bei Leberzelladenomen die Statuserhebung hinsichtlich der Promotermutation aus zwei wesentlichen Gründen sinnvoll: Ein Nachweis einer hTERT-Promotermutation in konventionell morphologisch eindeutigen Adenomen wäre 1.) als ein starkes Indiz für eine (möglicherweise kurz bevorstehende) maligne Entartung zu werten und damit ein gutes Argument für eine operative Entfernung dieses Tumors, auch wenn die üblicherweise herangezogenen Kriterien (Größe, Abwarten nach Absetzen der Kontrazeptiva u.a.) noch nicht erfüllt sind und 2.) ein guter Hinweis dafür, dass zumindest in der Adenom-Karzinom-Sequenz der HCC-Entstehung die hTERT-Promotermutation ein frühes Ereignis darstellt. Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass Leberzelladenome heutzutage in vier verschiedene

Subtypen eingeteilt werden (1. Tumoren mit HNF1 α -Mutation; 2. Tumoren vom teleangiektatischen bzw. inflammatorischen Typ; 3. β -Catenin-mutierte Tumoren; 4. Tumoren ohne bekannte Mutationen oder spezielle histologische Merkmale); von diesen gilt insbesondere das immunhistochemisch nukleär β -Catenin überexprimierende (β -Catenin-mutierte) Adenom als das „high risk“ Adenom (Goodman et al. 2012). Möglicherweise sind neben der nur kleinen Fallzahl (n=15) auch die zur Verfügung stehenden Adenom-Subgruppen (die wir in dieser Studie nicht weiter identifiziert haben) Ursache des fehlenden hTERT-Mutationsnachweises.

Auf der anderen Seite decken sich unsere Ergebnisse mit denen der französischen Arbeitsgruppe um JC Nault et al., die bei Leberzelladenomen ohne Zeichen der malignen Transformation (hier n=60) ebenfalls keine Mutationen gefunden hat. Im Gegensatz dazu fanden sich unter den 16 hepatozellulären Adenomen mit maligner Transformation, die von der französischen Arbeitsgruppe untersucht worden waren („nodule in nodule“, bzw. HCA mit HCC Foci) in 7 Fällen (44%) eine hTERT-Promotermutation (Nault et al. 2013). Eine Subgruppenanalyse der Adenome ist der Veröffentlichung allerdings nicht zu entnehmen, vermutlich dürfte es sich dabei aber zu einem größeren Anteil um β -Catenin-mutierte (nukleär immunhistochemisch β -Catenin-überexprimierende) Leberzelladenome gehandelt haben. In den nicht β -Catenin mutierten Leberzelladenomen (die bislang jedoch nicht explizit untersucht wurden) ist eine Mutation der untersuchten Promoterregion nicht zu erwarten, da sich die bisher in Leberzelladenomen festgestellten Telomeraseaktivitäten in vernachlässigbaren Größenordnungen befanden (Kojima et al. 1999). Die Aktivität der Telomerase wird zwar nur zu einem Teil über die hTERT-Promotermutation reguliert, dennoch wäre der Nachweis von hTERT-Promotermutationen in telomerase-inaktiven Tumoren überraschend.

Eine weitere Fragestellung dieser Dissertation galt der Unterteilung der HCCs nach ihrem Grading und einem möglichen Bezug zum hTERT-Promotermutations-Status. Dieser Fragestellung hatte sich die französische Arbeitsgruppe um J.C. Nault (Nault et al. 2013) meines Wissens nach nicht gewidmet. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass ein schlechtes Grading mit dem Vorhandensein einer hTERT-Promotermutation vergesellschaftet ist, wenngleich keine statistische Signifikanz erzielt wurde (p=0,188 nach Pearson). Vermutlich ist die fehlende Signifikanz trotz der recht großen untersuchten Gesamtanzahl an HCCs (n=78) auf die notwendige Aufsplittung in vier Subgruppen (G1=18; G2=38; G3/4=14; fibrolamelläre HCCs=8) mit dann jeweils kleinen Fallzahlen zurückzuführen, welche keine rechnerische Signifikanz mehr ermöglichen. Die Tendenz, hTERT-Promotermutationen in schlecht differenzierten HCCs zu finden, passt insofern zur Literatur, als auch das hochmaligne Glioblastom (Glioblastoma multiforme, WHO-Grad-4) im Vergleich zu gering malignen Hirntumoren (WHO-Grad 1-2) weitaus häufiger eine derartige Mutation aufweist (Vinagre et al. 2013).

Die hTERT-Promotermutationen sind typischerweise bei zwei weiteren Tumortypen zu finden (maligne Melanome und Urothelkarzinome), welche ebenso wie das HCC

sehr häufig tumorbiologisch aggressive und mit einer hohen Mortalität vergesellschaftete Tumoren sind. Demzufolge kann vermutet werden, dass das Vorhandensein einer hTERT-Promotermutation eine tumorbiologisch ungünstige Konstellation sein könnte. In zukünftigen Untersuchungen gilt es nun festzustellen, ob der Nachweis bzw. fehlende Nachweis einer hTERT-Promotermutation innerhalb einer Tumorentität (z.B. maligne Melanome, bei denen bis zu 71% der Tumoren eine derartige Mutation aufweisen (Huang et al. 2013)) einen eigenständigen Prognoseparameter darstellt, wobei der Nachweis einer derartigen Mutation dann ggf. mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist.

Für diese bislang eher spekulative Hypothese (wurde bereits von Killela et al. (Killela et al. 2013) und Rachakonda et al. (Rachakonda et al. 2013) aufgestellt) könnte jene tumorbiologische Rolle sprechen, die eine hTERT-Promotermutation vermutlich für die Tumoren spielt. Demnach ermöglicht eine derartige Mutation einem Malignom, die Telomerase dauerhaft hochzuregulieren und sich damit zuverlässig einer vorzeitigen Telomerenverkürzung mit Chromosomeninstabilität bzw. Zellteilungsstop zu entziehen. Diese Annahme unterstützen unter anderem die Untersuchungen von Vinagre et al. (Vinagre et al. 2013), und Huang et al. (Huang et al. 2013), die nachwiesen, dass eine Mutation des hTERT Promoters die Telomeraseaktivität um das Vielfache steigern kann.

Abgesehen von einer Erhöhung der Telomeraseaktivität durch eine hTERT-Promotermutation gibt es noch diverse andere Wege, über die ein Tumor die Telomeraseaktivität hochregulieren kann um somit seine Zellen vor dem Hayflick-Limit zu bewahren. Beispielsweise können vermutlich einige Transkriptionsfaktoren, welche zum Teil bekannte Onkogene darstellen, hTERT aktivieren und somit die Telomeraseaktivität steigern. Zu diesen Transkriptionsfaktoren zählen unter anderem c-Myc, Sp1, HIF-1, AP2. Auch epigenetische Regulationsmechanismen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle. So löst eine Demethylierung der DNA oder eine Methylierung der Histone in benachbarten Abschnitten der hTERT Promoterregion die Aktivierung der Histon-Acetyltransferase (HAT) aus, welche wiederum eine Transkription von hTERT ermöglicht (Kyo et al. 2008).

Die Tatsache, dass auch im Rahmen dieser Dissertation in Leberzelladenomen im Gegensatz zum HCC keine hTERT-Promotermutationen nachweisbar waren, lässt sich auch diagnostisch nutzen. Die Unterscheidung zwischen einem Leberzelladenom und einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom kann sowohl konventionell morphologisch als auch unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Zusatzuntersuchungen (siehe unten) sehr schwierig und zum Teil – insbesondere am Tumorbiopsiematerial – gar nicht beantwortbar sein (Goodman et al. 2012). Tumorbiopsien werden jedoch insbesondere in radiologisch unklaren Fällen empfohlen und spielen neoadjuvant zur Diagnoseverifizierung eine immer bedeutsamere Rolle. In den vergangenen wenigen Jahren wurden deshalb auf immunhistochemischer Ebene einige Marker etabliert, die eine Diagnosestellung objektivieren sollen (hier sind insbesondere Glypican 3, Glutaminsynthetase 6 und

das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) zu nennen). Allerdings sind auch diese Marker gerade bei gut differenzierten HCCs nur von eingeschränktem Nutzen, da deren Messung hier gehäuft negativ ausfällt (Goodman et al. 2012, Khan et al. 2012). Die gleiche Limitierung beim gut differenzierten HCC findet sich zwar möglicherweise auch beim verwendeten Mutationsnachweis, allerdings würde der positive Nachweis einer Promotermutation von hTERT stark für ein HCC sprechen und diagnostisch hilfreich sein.

Das gleiche gilt in noch einem weiteren diagnostischen Kontext der Lebertumorbiopsien. Die Unterscheidung zwischen einem HCC und einem Cholangiokarzinom (CC) ist eine häufige und zentrale Fragestellung an den Pathologen. Diese Unterscheidung ist für das weitere therapeutische Vorgehen entscheidend (Wahl der Therapeutika, Möglichkeit der Transplantation beim HCC). Diese Unterscheidung kann allerdings gerade bei schlecht differenzierten Tumoren mit den üblicherweise zur Verfügung stehenden (immunhistochemischen) Methoden schwierig bis unmöglich sein (Goodman et al. 2012), zumal auch die Immunhistochemie von nur sehr eingeschränkter Aussagekraft bei schlecht differenzierten Tumoren ist (die Zytokeratin 7 (CK7)- Positivität, die typischerweise beim CC nachweisbar ist, verliert sich bei zunehmender Entdifferenzierung des Tumors (Khan et al. 2012) und nahezu jedes zweite HCC zeigt Literaturangaben zufolge ebenfalls zumindest fokal eine CK7 Positivität (Goodman et al. 2012); sogenannte HCC-assoziierte Marker wie HepPar-1 und Arginase-1 sind bei schlecht differenzierten HCCs erschwerend häufig negativ (Timek et al. 2012, Radwan und Ahmed 2012). In diesem Fall ist die Tatsache, dass gerade in der Gruppe der schlecht differenzierten HCCs die hTERT-Promotermutation gehäuft gefunden wurde und im Gegensatz dazu diese Mutation bei Cholangiokarzinomen fehlt, diagnostisch von großem Wert.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse dieser Dissertation auch in diagnostischer Hinsicht zeigen, dass am Biopsat eines Lebertumors der positive Nachweis einer hTERT-Promotermutation differentialdiagnostisch außerordentlich hilfreich sein kann.

Diese Arbeit hat meiner Kenntnis nach erstmals den Status der hTERT-Promotermutationen am Cholangiokarzinom ermittelt (s.o.) – wie dargelegt war in keinem der 52 untersuchten Cholangiokarzinome eine derartige Mutation nachweisbar. Dies ist insofern im Einklang mit den Ergebnissen der Literatur, da auch in anderen Adenokarzinomen (wie z.B. Magenkarzinomen und Mammakarzinomen) keine oder nahezu keine hTERT-Promotermutationen gefunden wurden (Vinagre et al. 2013).

Es muss hier nochmals darauf hingewiesen werden, dass hTERT-Promotermutationen nach bisherigem Kenntnisstand nur bei wenigen Karzinomen überhaupt eine Rolle spielen (wie beispielsweise beim Urothelkarzinom (Vinagre et al. 2013) oder wie in dieser Dissertation gezeigt, beim HCC). Auch diese Erkenntnis ist diagnostisch nutzbar. So konnten in jüngster Zeit die Ergebnisse dieser Arbeit

dazu beitragen, eine Peritonealkarzinose einer 75jährigen Patientin hinsichtlich des Primarius weiter einzugrenzen. Bei der Patientin war ein Jahr zuvor anhand einer Harnblasenbiopsie ein Urothelkarzinom diagnostiziert worden. Die nun neu diagnostizierte Peritonealkarzinose ließ sich trotz aufwändiger Untersuchungen (einschließlich einer vergleichenden p53 Mutationsanalyse, die in beiden Tumoren negativ verlief) in einem externen Universitätsklinikum nicht näher subtypisieren. Aufgrund des Ausbreitungsmusters des Tumors wurde extern eine Therapie wie bei metastasiertem Magenkarzinom eingeleitet, obwohl in einer Gastroskopie kein Magenkarzinom gesichert werden konnte. Die daraufhin im Institut für Pathologie des UKE veranlasste vergleichende hTERT-Promotermutationsanalyse (des zuvor diagnostizierten Urothelkarzinoms mit der Peritonealkarzinose) ergab sowohl, wie zu erwarten, einen Mutationsnachweis im Urothelkarzinom, als auch in der Peritonealkarzinose (was bei einem metastasierten Magenkarzinom sehr unwahrscheinlich wäre). In beiden Tumoren fand sich ferner der gleiche Mutationstyp (-124C>T). Es ist somit mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit von einem metastasierten Urothelkarzinom auszugehen. Diese Ergebnisse führten mittlerweile zu einer Therapieanpassung.

Dieser Fall stellt ein eindrucksvolles Beispiel einer praktischen Anwendung der hTERT-Promotermutationsanalyse im Alltag pathomorphologischer Diagnostik dar. Die hTERT-Promotermutationsanalyse kann aufgrund der relativen Spezifität der hTERT-Promotermutation auch bei anderen metastasierten Tumoren Anwendung finden (z.B. bei schlecht differenzierten HCCs oder Urothelkarzinomen) und in der Diagnostik sehr hilfreich eingesetzt werden.

Beim malignen Melanom und beim Urothelkarzinom befinden sich die hTERT Promotermutationen hauptsächlich auf den Positionen -124 (C>T) und -146 (C>T) (Horn et al. 2013, Rachakonda et al. 2013, Vinagre et al. 2013). Somit stellt eine Unterscheidung hinsichtlich des Mutationstyps nur im Falle der Mutation -146C>T eine diagnostische Möglichkeit dar, da dieser Mutationstyp ein HCC so gut wie ausschließt. Kann lediglich die Mutation -124C>T nachgewiesen werden, liefert dies keinen weiteren Hinweis zur Unterscheidung dieser drei Tumorentitäten.

Im Gegensatz dazu könnte der hTERT Promoter an sich zukünftig eine wichtige Rolle in der Therapie maligner Tumoren spielen. Die Forschergruppe um S. Kyo (Kyo et al. 2008) entwickelte beispielsweise einen telomerase-abhängigen replikationsfähigen Adenovirus Typ 5 Vektor (Telomelysin), mit dessen Hilfe hTERT-exprimierende Gewebe effektiv am Wachstum gehindert bzw. sogar lysiert werden können. Das Virus könnte sich nach Lyse der Tumorzellen weiter im Körper verteilen und so auch Metastasen therapieren (Kyo et al. 2008). Ferner sind bereits Hemmer der Telomerase (u.a. Imetelstat (GRN163L), welches die RNA-Matrize der Telomerase blockiert) entwickelt worden (Burchett et al. 2014). Es ist gut vorstellbar, dass diese Medikamente ggf. einen blockierenden Effekt auf den Tumor induzieren. Inwieweit dies durch die nachgewiesene Promotermutation beeinflusst wird, ist aber zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

6. Zusammenfassung

Die beiden häufigsten malignen Tumoren der Leber sind das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) und das Intrahepatische Cholangiokarzinom (ICC). Beide Tumoren sind mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert, wobei in den letzten Jahren die Prognose des HCC durch Einführung moderner Behandlungsstrategien (Lebertransplantation, Chemoembolisation, Sorafenib u.a) etwas gebessert werden konnte. Aufgrund der unterschiedlichen Behandlungsregime dieser Tumorentitäten ist besonders bei unklaren radiologischen Befunden eine histopathologische Unterscheidung überaus wichtig, doch gerade bei schlecht differenzierten Tumoren ist eine Abgrenzung nach wie vor sehr schwierig. Das Hepatozelluläre Adenom (HCA) dagegen ist ein benigner Lebertumor, der allerdings in bis zu 5% der Fälle eine maligne Transformation in ein HCC aufweisen kann.

Charakteristisch für maligne Tumoren ist die unbegrenzte Replikationsfähigkeit ihrer Zellen, die unter anderem durch eine pathologische Aktivität des Enzyms Telomerase erreicht wird. Kürzlich entdeckte Mutationen in der Promoter-Region der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT), sind vermutlich in einigen Fällen die Ursache dieser Aktivität; sie konnten allerdings bislang nur in wenigen Tumorentitäten überhaupt nachgewiesen werden (keine Daten gab es bislang zum Status des ICC). Da sich aus dieser Erkenntnis neue Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie ergeben, war es das Ziel dieser Arbeit, in lebereigenen Tumoren ein eventuelles Vorkommen dieser Mutationen festzustellen. Wir untersuchten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) 145 formalinfixierte und paraffineingebettete Lebertumoren (78 HCC, 52 ICC, 15 HCA), stammend aus den Archiven des Instituts für Pathologie am UKE und analysierten die beiden am häufigsten vorkommenden Mutationen, die sogenannten „Hotspot-Mutationen“ -124C>T und -146C>T.

Die Mutation -146C>T konnte in keiner der Proben festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fand sich die Mutation -124C>T in 38 von 78 untersuchten HCCs (48,7%), jedoch weder in den 52 untersuchten ICCs noch in den 15 untersuchten HCAs. Das Auftreten der Mutation -124C>T scheint ferner mit einem schlechteren Grading der HCCs zu korrelieren; eine statistische Signifikanz fand sich allerdings nicht ($p=0,188$ nach Pearson), was möglicherweise auf die geringe Fallanzahl zurückzuführen ist.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass hTERT Promoter-Mutationen häufig beim HCC nachweisbar sind und im Gegensatz dazu keine relevante Rolle beim ICC spielen. Dies kann in Fällen, in denen mit den bislang zur Verfügung stehenden Mitteln eine histomorphologische Diagnosestellung nicht gelang, auch diagnostisch genutzt werden. Zusätzlich eröffnen sich dadurch therapeutische Optionen, da bei einer zukünftigen Entwicklung von Medikamenten, die an einer Mutation der hTERT Promoter-Region ansetzen, in etwa die Hälfte der HCCs für diese Therapeutika sensibel sein könnte.

7. Literaturverzeichnis

Abreu E, Aritonovska E, Reichenbach P, Cristofari G, Culp B, Terns RM, Lingner J, Terns MP (2010) TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol Cell Biol.* 30(12):2971-82.

Atanassov BS, Evrard YA, Multani AS, Zhang Z, Tora L, Devys D, Chang S, Dent SY (2009) Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol Cell.* 35(3):352-64.

Baumann P, Price C (2010) Pot1 and Telomere Maintenance. *FEBS Lett.* 584(17):3779-84.

Bertino G, Neri S, Bruno CM, Ardiri AM, Calvagno GS, Malaguarnera M, Toro A, Malaguarnera M, Clementi S, Bertino N, Di Carlo I (2011) Diagnostic and prognostic value of alpha-fetoprotein, des-γ-carboxy prothrombin and squamous cell carcinoma antigen immunoglobulin M complexes in hepatocellular carcinoma. *Minerva Med.* 102(5):363-71.

Bioulac-Sage P, Sempoux C, Possenti L, Frulio N, Laumonier H, Laurent C, Chiche L, Frédéric Blanc J, Saric J, Trillaud H, Le Bail B, Balabaud C (2013) Pathological Diagnosis of Hepatocellular Cellular Adenoma according to the Clinical Context. *Int J Hepatol.* 2013:253261.

Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA (2010) Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 16(29):3603-15.

Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Burt AD (2012) Fatty liver disease: alcoholic and non-alcoholic. In: *MacSween's Pathology of the Liver*. Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD (Hrg.) 6. Auflage. Elsevier LTD, Oxford. Imprint: Churchill Livingstone, 318-339

Burchett KM, Yan Y, Ouellette MM (2014) Telomerase inhibitor Imetelstat (GRN163L) limits the lifespan of human pancreatic cancer cells. *PLoS One.* 9(1):e85155.

Cifuentes-Rojas C, Shippen DE (2012) Telomerase regulation. *Mutat Res.* 730(1-2):20-7.

Collins K, Mitchell JR (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene.* 21(4):564-79.

Cristofari G, Sikora K, Lingner J (2007) Telomerase Unplugged. *ACS Chem Biol.* 2(3):155-8.

- Dhaene K**, Van Marck E, Parwaresch R (2000) Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch.* 437(1):1-16.
- Dokal I** (2000) Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol.* 110(4):768-79.
- Dokal I**, Vulliamy T (2003) Dyskeratosis congenita: its link to telomerase and aplastic anaemia. *Blood Rev.* 17(4):217-25.
- Duong MT**, Sahin E (2013) RAP1: Protector of Telomeres, Defender against Obesity. *Cell Rep.* 3(6):1757-8.
- Gancarcíková M**, Zemanová Z, Brezinová J, Berková A, Vcelíková S, Smigová J, Michalová K (2010) The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: the length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease. *Prague Med Rep.* 111(2):91-105.
- Garton M**, Laughton C (2013) A comprehensive model for the recognition of human telomeres by TRF1. *J Mol Biol.* 425(16):2910-21.
- Gomez D**, Guédin A, Mergny JL, Salles B, Riou JF, Teulade-Fichou MP, Calsou P (2010) A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells. *Nucleic Acids Res.* 38(20):7187-98.
- Goodman ZD**, Terracciano LM, Wee A (2012) Tumours and tumour-like lesions of the liver. In: *MacSween's Pathology of the Liver*. Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD (Hrg.) 6. Auflage. Elsevier LTD, Oxford. Imprint: Churchill Livingstone, 761-809
- Gramatges MM**, Bertuch AA. (2013) Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. *Transl Res.* 162(6):353-63.
- Griffith JD**, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 97(4):503-14.
- Heaphy CM**, Subhawong AP, Hong SM, Goggins MG, Montgomery EA, Gabrielson E, Netto GJ, Epstein JI, Lotan TL, Westra WH, Shih IeM, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Li QK, Eberhart CG, Taube JM, Rakheja D, Kurman RJ, Wu TC, Roden RB, Argani P, De Marzo AM, Terracciano L, Torbenson M, Meeker AK (2011) Prevalence of the Alternative Lengthening of Telomeres Telomere Maintenance Mechanism in Human Cancer Subtypes. *Am J Pathol.* 179(4):1608-15.
- Hiyama E**, Hiyama K (2003) Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett.* 194(2):221-33.
- Horn S**, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. (2013) TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.* 339(6122):959-61.

Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA (2013) Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 339(6122):957-9.

Hukezalie KR, Wong JM (2013) Structure–function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *FEBS J*. 280(14):3194-204.

Katabathina VS, Menias CO, Shanbhogue AK, Jagirdar J, Paspulati RM, Prasad SR (2011) Genetics and Imaging of Hepatocellular Adenomas: 2011 Update. *Radiographics*. 31(6):1529-43.

Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, Rosenberg WM, Tait P, Taylor-Robinson SD, Thillainayagam AV, Thomas HC, Wasan H (2012) Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*. 61(12):1657-69.

Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih IeM, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(15):6021-6.

Koelsche C, Renner M, Hartmann W, Brandt R, Lehner B, Waldburger N, Alldinger I, Schmitt T, Egerer G, Penzel R, Wardelmann E, Schirmacher P, von Deimling A, Mechttersheimer G (2014) TERT promoter hotspot mutations are recurrent in myxoid liposarcomas but rare in other soft tissue sarcoma entities. *J Exp Clin Cancer Res*. 33(1):33.

Kojima H, Yokosuka O, Kato N, Shiina S, Imazeki F, Saisho H, Shiratori Y, Omata M (1999) Quantitative evaluation of telomerase activity in small liver tumors: analysis of ultrasonography-guided liver biopsy specimens. *J Hepatol*. 31(3):514-20.

Kong CM, Lee XW, Wang X (2013) Telomere shortening in human diseases. *FEBS J*. 280(14):3180-93.

Krams M, Hero B, Berthold F, Parwaresch R, Harms D, Rudolph P (2003) Full-length telomerase reverse transcriptase messenger RNA is an independent prognostic factor in neuroblastoma. *Am J Pathol*. 162(3):1019-26.

Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M (2008) Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci*. 99(8):1528-38.

Lange de T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol.* 10(2):518-27.

Lewis KA, Wuttke DS (2012) Telomerase and Telomere-Associated Proteins: Structural Insights into Mechanism and Evolution. *Structure.* 20(1):28-39.

Liau SS, Qureshi MS, Praseedom R, Huguet E (2013) Molecular Pathogenesis of Hepatic Adenomas and Its Implications for Surgical Management. *J Gastrointest Surg.* 17(10): 1869–1882.

Marrone A, Dokal I (2004) Dyskeratosis congenita: molecular insights into telomerase function, ageing and cancer. *Expert Rev Mol Med.* 6(26):1-23.

Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, Laurent A, Cherqui D, Balabaud C, Zucman-Rossi J (2013) High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun.* 4:2218.

Njei B, Konjeti VR, Ditah I (2014) Prognosis of Patients With Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma Versus Conventional Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastrointest Cancer Res.* 7(2):49-54.

Nzeako UC, Goodman ZD, Ishak KG (1995) Comparison of tumor pathology with duration of survival of North American patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 76(4):579-88.

Paradis V (2013) Histopathology of hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 190:21-32.

Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, Palasciano G (2006) Current pharmacological treatment of nonalcoholic fatty liver. *Curr Med Chem.* 13(24):2889-900.

Quaas A (2006) Aktivität und Expression von Telomerase in Neuroblastomen – eine molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchung. *Med. Dissertation.* Universität Hamburg

Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, Wiklund NP, Steineck G, Schadendorf D, Hemminki K, Kumar R (2013) TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(43):17426-31.

Radwan NA, Ahmed NS (2012) The diagnostic value of arginase-1 immunostaining in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma and cholangiocarcinoma as compared to HepPar-1. *Diagn Pathol.* 7:149.

Razumilava N, Gores GJ (2014) Cholangiocarcinoma. Rochester, MN, USA [Online im Internet] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Razumilava+N%2C+Gores+GJ+Cholangiocarcinoma.+Lancet>. [Stand: 14.06.2014, 19:35]

Rizvi S, Gores GJ (2013) Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 145(6):1215-29.

Schneider-Stock R, Boltze C, Roessner A. (2002) Telomerase und neue Aspekte in der Tumorbilogie. *Pathologe*. 23(3):177-82.

Timek DT, Shi J, Liu H, Lin F (2012) Arginase-1, HepPar-1, and Glypican-3 Are the Most Effective Panel of Markers in Distinguishing Hepatocellular Carcinoma From Metastatic Tumor on Fine-Needle Aspiration Specimens. *Am J Clin Pathol*. 138(2):203-10.

Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR (1998) Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*. 58(18):4168-72.

Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M, Lima J, Máximo V, Soares P (2013) Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 4:2185.

Walker JR, Zhu XD (2012) Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance, *Mech Ageing Dev*. 133(6):421-34.

Webb CJ, Wu Y, Zakian VA (2013) DNA Repair at Telomeres: Keeping the Ends Intact. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5(6).

Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev*. 11(21):2801-9.

Zhao YJ, Ju Q, Li GC (2013) Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 1(4):593-598.

7.1. Quellenverzeichnis der Abbildungen

- A1: Nelson DL, Cox MM (2008) Lehninger Principles of Biochemistry, 5. Auflage, Verlag: W.H. Freeman and Company, Wisconsin, Madison, USA [Online im Internet] URL: http://o.quizlet.com/6jeZA32DnaZMELtwP3slKA_m.jpg [Stand: 30.06.2014, 18:02]
- A2: Wikipedia contributors (23.06.2014) Telomere. In: Wikipedia, The Free Encyclopedia. [Online im Internet] URL: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Telomere&oldid=614045324> [Stand: 30.06.2014, 18:06]
- A3: Raffa GD, Cenci G, Ciapponi L, Gatti M (2013) Organization and Evolution of Drosophila Terminus: Similarities and Differences between Drosophila and Human Telomeres. Front Oncol. 3:112.
- A4: Jakob Bossek (2006) Identische DNA – Replikation. Wie die DNA verdoppelt wird? [Online im Internet] URL: <http://www.biolk-gsg.de/buch/kap5/replikation.html> [Stand: 01.07.2014, 13:28]
- A5: Autor unbekannt (1999) [Online im Internet] URL: <http://web.pdx.edu/~newmanl/DNArep4.GIF> [Stand: 01.07.2014, 13:46]
- A6: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (22.04.2014) Telomerase. [Online im Internet] URL: http://www.uke.de/kliniken/medizinische-klinik-1/index_22623.php?id=-1_-1_-1&as_link=http%3A//www.uke.de/kliniken/medizinische-klinik-1/index_22623.php [Stand: 01.07.2014, 13:57]
- A7: Kats I (26.09.2008) Bei der Replikation der DNA sind viele Enzyme im Einsatz. [Online im Internet] URL: <http://ilinsekt.bplaced.net/artikel.php?lektion=9> [Stand: 01.07.2014, 14:06]
- A8: Wojtyla A, Gladych M, Rubis B (2011) Human telomerase activity regulation. Mol Biol Rep. 38(5):3339-49.
- A9: Wikipedia-Autoren (29.06.2014) Polymerase-Kettenreaktion. [Online im Internet] URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Polymerase-Kettenreaktion&oldid=131703124> [Stand: 01.07.2014, 14:55]
- A10: Courts C (04.04.2011) Basics – Die Polymerase-Kettenreaktion. Konradin Medien GmbH [Online im Internet] URL: <http://scienceblogs.de/bloodnacid/2011/04/04/basics-die-polymerasekettenreaktion/> [Stand: 01.07.2014, 15:07]
- A11: Schleich K (26.10.2008) [Online im Internet] URL: http://2008.igem.org/wiki/index.php?title=Team:Heidelberg/Notebook/Sensing_Group/Notebook/6thweek&oldid=80687 [Stand: 01.07.2014, 16:43]

- A12: Oldopp T (2013) Untersuchung von Harnblasenkarzinomen sowie Karzinomen aus der Leber hinsichtlich der Mutationen C228T und C250T im Promotor des Telomerase-Gens (TERT-Promotor). Projektstudie im Studiengang Molecular Life Sciences. Universität Hamburg.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, deren Hilfe dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit überhaupt entstehen konnte.

Ich danke ganz herzlich meinem Doktorvater Dr. Alexander Quaas für seine ausdauernde Unterstützung bei der Realisation dieser Arbeit. Ich bin ihm sehr dankbar, dass er mir bei Fragen und Problemen jederzeit und immer schnellstmöglich mit Rat und viel Humor zur Seite stand, immer sehr bemüht war und ich mich nie allein gelassen gefühlt habe. Danke für das „I love Hamburg“ – Bonbon und die ansteckende Begeisterung für die Pathologie und Epigenetik.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter als Leiter des Instituts für Pathologie am UKE dafür, dass er mir ermöglichte, die vorliegende Arbeit unter seiner Leitung zu erstellen.

Außerdem danke ich Dr. Tobias Grob für die engagierte Unterstützung und Beratung bei allen Fragen bezüglich der Laborabläufe und Materialien. Ebenso danke ich Theresa Oldopp für die Laborprotokolle und Christina Koop für ihre koordinierende Hilfe, wann immer es in der Anfangsphase hakte und der rote Faden und die Nerven zwischen Archiv-Schränken und den Karton-Stapeln voller Leber-Blöcke verloren zu gehen drohten.

Ganz lieb danke ich auch meinen Eltern, ohne deren großartige langjährige Unterstützung mir mein Studium der Humanmedizin wahrscheinlich nicht möglich gewesen wäre und ohne die diese Arbeit wohl niemals entstanden wäre.

Zuletzt danke ich Eike für die technische Unterstützung und sein Netbook, auf dem diese Arbeit entstand und Eike und Lenz gemeinsam für die motivierte Suche nach Fehlern, Unverständlichkeiten und Murks.

Danke.

9. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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 Werkes 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: