

**Applikation der retroviralen Insertionsmutagenese zur
Identifikation relevanter molekularer Mechanismen in
der humanen Hepatokarzinogenese**

Dissertationsschrift zur Erlangung des
akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

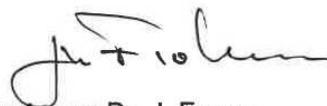
im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Denise Heim
aus Greifswald

Hamburg, Oktober 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. T. DOBNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. T. BRÜMMENDORF
Tag der Disputation: 07. Oktober 2011

Hamburg, den 22. September 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Fromm', written in a cursive style.

Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

**Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.
Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.
Wer nichts prüft, entdeckt nichts.
Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.**

-Teilhard de Chardin-

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Das hepatozelluläre Karzinom	4
2.2	Molekulare Pathogenese des HCC	5
2.3	Telomerase und Telomere.....	7
2.4	Die Rolle der Telomerase in der Hepatokarzinogenese.....	13
2.5	Modellsystem zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese.....	14
2.6	Insertionsmutagenese im Rahmen der HBV-assoziierten Karzinogenese	16
2.7	Retroviren	18
2.8	Replikationsinkompetente retrovirale Vektoren	21
2.9	Retrovirale Insertionsmutagenese.....	21
2.10	Zielsetzung	25
3	Material und Methoden.....	27
3.1	Zellbiologische Methoden	27
3.1.1	Zelllinien.....	27
3.1.2	Zellkultur	28
3.1.3	Durchflusszytometrie.....	29
3.1.4	Retrovirale Transduktion mit SF11 α EGFP ν ev	30
3.1.5	Isolation von Einzelzellklonen	33
3.1.6	Zellproliferation und Serumabhängigkeit (<i>CellTiter 96</i>).....	33
3.1.7	Zellzyklusanalyse	34
3.1.8	Softagarassay	35
3.1.9	Nacktmausassay.....	35
3.1.10	Dualer Luziferase-Reporterassay.....	36
3.2	Molekularbiologische Methoden	37
3.2.1	Konzentrationsbestimmung und Analyse von RNA und DNA	37
3.2.2	LM-PCR	38
3.2.3	Platinum-PCR.....	45
3.2.4	EGFP-Kopienzahlanalyse.....	46
3.2.5	RNA-Isolierung und Reverse Transkription.....	48
3.2.6	qRT-PCR	49
3.2.7	Überprüfung der Relevanz.....	50
3.3	Statistische Auswertung.....	50
4	Ergebnisse	51

4.1	Retrovirale Transduktion mit SF11αEGFP_{Prev}	52
4.2	Isolation von Einzelzellklonen	53
4.2.1	Mischkulturen	53
4.2.2	Einzelzellklone	55
4.3	Bestimmung der Insertionsstellen von SF11αEGFP_{Prev}	57
4.3.1	LM-PCR	57
4.3.2	Sequenzierung	59
4.3.3	Platinum-PCR	61
4.4	EGFP-Kopienzahlanalyse	62
4.5	Charakterisierung der Klone	64
4.5.1	Zellproliferation	64
4.5.2	Serumabhängigkeit	66
4.5.3	Zellzyklusanalyse zur Bestimmung der Kontaktinhibition	68
4.5.4	Softagarassay	70
4.5.5	Nacktmausassay	71
4.5.6	Zusammenfassung der Charakterisierung	71
4.6	Expression betroffener Gene in Klon 4, 6 und 9	72
4.6.1	Klon 4	73
4.6.2	Klon 6	74
4.6.3	Klon 9	75
4.7	Überprüfung der Relevanz	77
4.8	Dualer Luziferase-Reporterassay zur Bestimmung der NF-κB-Aktivität	78
5	Diskussion	80
5.1	FH-hTERT als Zellkultursystem	81
5.2	Retrovirale Insertionsmutagenese zur Entschlüsselung relevanter Mechanismen in der Hepatokarzinogenese	83
5.3	Einzelzellklone mit verändertem Phänotyp	85
5.4	Bestimmung der Insertionsstellen von SF11 α EGFP _{Prev}	87
5.5	Charakterisierung der Klone	88
5.6	Expression betroffener Gene in Klon 4, 6 und 9	89
5.7	RIPK4 und PLAG1 und deren Bedeutung für die Karzinogenese	91
5.8	HCC-Datenbankanalysen	93
5.9	Auswirkungen der Expressionsänderung von RIPK4 auf NF- κ B in Klon 4	96
5.10	Zusammenfassung und Ausblick	101

6	Literatur.....	103
7	Abkürzungen	113
8	Kongressbeiträge.....	115
9	Danksagung	116

1 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit das fünfthäufigste Malignom und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Während die klinischen Risikofaktoren gut definiert sind, sind die molekularen Mechanismen, die zur Tumorentstehung und -entwicklung beitragen, bisher nicht im Detail verstanden. Die Hepatokarzinogenese wird als ein mehrstufiger Entartungsprozess beschrieben. Eine effektive Telomerstabilisierung und somit unbegrenzte Proliferation (Immortalität) werden dabei als eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung eines HCC betrachtet. Die alleinige Aktivierung der Telomerase ist jedoch nicht ausreichend, um eine maligne Transformation zu induzieren. Zusätzliche genetische Alterationen in weiteren Signalwegen sind notwendig, um die Transformation in proliferierenden Hepatozyten voranzutreiben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Telomerase-immortalisierte humane fetale Hepatozyten (FH-hTERT) als Zellkulturmodell für proliferierende Hepatozyten mit Telomeraseaktivierung als „*First hit*“ im mehrstufigen Modell der humanen Hepatokarzinogenese eingesetzt. Um weitere Schlüsselereignisse im Übergang von einer reparierenden in eine dysregulierte Regeneration zu definieren, wurden in diesen Zellen genetische Veränderungen mittels retroviraler Insertionsmutagenese ausgelöst. Dazu wurden FH-hTERT mit einem replikationsinkompetenten γ -retroviralen Vektor transduziert und Klone mit verändertem Phänotyp (Hyperproliferation) abgeleitet. Um weitere Phänotypveränderungen funktionell zu charakterisieren, wurden Serumabhängigkeit und Kontaktinhibition in den Klonen untersucht. Außerdem wurden ein verankerungsunabhängiges Wachstum mittels Softagarassay und ein mögliches Tumorstadium mittels Nacktmausassay ermittelt. Des Weiteren wurden LM-PCR und

qRT-PCR durchgeführt, um die viralen Insertionsstellen zu identifizieren und Veränderungen in der Expression der getroffenen bzw. angrenzenden Gene zu detektieren. Zur Validierung der Relevanz in der humanen Hepatokarzinogenese wurde die Genexpression der von der Insertion des Provirus betroffenen Gene in humanen HCC-Proben untersucht und mit einer humanen HCC-Datenbank verglichen.

Von insgesamt 16 abgeleiteten hyperproliferierenden Klonen wurden drei Klone vollständig charakterisiert (Klon 4, 6 und 9). Neben einer gesteigerten Proliferation zeigten die Klone weitere Phänotypveränderungen. Für alle drei Klone konnte im Softagarassay, ein etablierter *in vitro* Marker für Tumorzellwachstum, ein verankerungsunabhängiges Wachstum festgestellt werden. Mittels Zellzyklusanalysen konnte für Klon 9 zusätzlich eine vollständig aufgehobene Kontaktinhibition, ein Merkmal von Tumorzellen, gezeigt werden. Für Klon 4 wurde eine Insertionsstelle +150 kb von RIPK4 (*Receptor-interacting serine-threonine kinase 4*) entfernt detektiert, die eine 10-fache Suppression der RIPK4-Expression zur Folge hatte. In Klon 6 liegt das Provirus im Intron 23 des Gens MYCBP2 (*MYC binding protein 2*). Diese Insertion führte jedoch nicht zu einer Änderung in der Expression des Gens. In Klon 9 wurde die Expression von PLAG1 (*Pleiomorphic adenoma gene 1*) aufgrund einer Virusinsertion im Intron 2 um das 20-fache gesteigert. Die Ergebnisse aus der qRT-PCR mit HCC-Proben und die Datenbankanalysen zeigten für PLAG1 keinen Anstieg in der Expression, so dass eine Aktivierung scheinbar keine Rolle in der Bildung eines HCC hat. Jedoch wurde kürzlich eine treibende Rolle für PLAG1 in der Bildung eines Hepatoblastoms beschrieben. Für RIPK4 konnte in der qRT-PCR mit HCC-Proben, wie auch in Klon 4, eine Suppression in der Expression nachgewiesen werden. Die Datenbankanalysen bestätigten dieses Ergebnis in einer größeren Anzahl von HCC-Proben, insbesondere für Hepatitis B-assoziierte Tumoren. Eine RIPK4-Suppression

scheint demzufolge eine funktionell relevante und treibende genetische Veränderung in der humanen Hepatokarzinogenese darzustellen. In Klon 4 wurde außerdem eine Inaktivierung von NF- κ B (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene in B-cells 1*) nachgewiesen. Da RIPK4 NF- κ B aktivieren kann, könnte eine RIPK4-Suppression eine Inhibierung von NF- κ B zur Folge gehabt haben. Die Inhibierung des NF- κ B-Signalwegs kann in der Leber, ähnlich wie eine aberrante Aktivierung, zu entzündlich bedingten Schädigungen und zur Tumorentstehung führen. Die Inhibierung von NF- κ B in Klon 4 könnte somit zu dem veränderten Phänotyp mit Tumormerkmalen beigetragen haben. Damit wurde in dieser Arbeit RIPK4 als möglicher Tumorsuppressor mit einer treibenden Rolle in der frühen humanen Hepatokarzinogenese identifiziert. Weitere funktionelle Analysen mittels RNA-Interferenz und in Mausmodellen sind nun notwendig, um die Rolle von RIPK4 in der Hepatokarzinogenese weiter zu untermauern.

Zusammenfassend bietet die Applikation der retroviralen Insertionsmutagenese die Möglichkeit, genetische Veränderungen in FH-hTERT auszulösen, die eine maligne Transformation propagieren. Mittels dieses Ansatzes können bisher nicht bekannte Signalwege (z. B. Inhibierung von NF- κ B über RIPK4) mit Relevanz in der humanen Hepatokarzinogenese identifiziert und funktionell untersucht werden. Das übergeordnete Ziel dabei ist, beteiligte Signalwege aufzudecken und den Übergang von Immortalität zu Malignität zu definieren.

2 Einleitung

2.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit das fünfthäufigste Malignom mit steigender Inzidenz in den westlichen Industrieländern.¹⁻⁴ Jährlich treten weltweit 500.000 neue Fälle auf, davon etwa 50.000 in Europa.⁵ Untersuchungen der Deutschen Krebsgesellschaft bestätigen, dass derzeit etwa sieben bis acht von 100.000 Menschen in Deutschland betroffen sind. Jährlich kommen circa 6.000 Neuerkrankungen in Deutschland hinzu, wobei Männer zwei- bis dreimal häufiger betroffen sind als Frauen. Inzwischen stellt das HCC die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit dar und ist Hauptursache für das Versterben von Patienten mit Leberzirrhose.⁴

Das HCC ist eines der wenigen Malignome mit gut definierten klinischen Risikofaktoren. Am Anfang der Entwicklung eines HCC steht in den überwiegenden Fällen (85-90%) eine chronische Entzündung der Leber mit andauernder Regeneration und Proliferation von Hepatozyten. Im fortgeschrittenen Stadium der Leberschädigung gilt die Leberzirrhose als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC, wobei insbesondere eine chronische Hepatitis B oder C das Risiko für eine maligne Transformation zusätzlich erhöhen.⁶ Der Prozess von der beginnenden Leberschädigung bis zum HCC verläuft dabei über mehrere Jahrzehnte.

Eine kurative Therapie ist häufig nur in den frühen und asymptomatischen Stadien erfolgreich. Für fortgeschrittene Stadien wird die Hoffnung auf die Entwicklung neuer molekularer zielgerichteter Therapien gelegt. Dabei werden Substanzen eingesetzt, die wachstumsfördernde intrazelluläre Signalwege in den Tumorzellen blockieren. Zurzeit ist

zur Behandlung des HCC nach erfolgreicher klinischer Testung nur der Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib zugelassen.⁷ Zur weiteren Entwicklung effektiver Präventions- und Therapieansätze sind ein fundiertes Verständnis der mehrstufigen molekularen Pathogenese des HCC und eine genaue Kenntnis der verantwortlichen Signalwege erforderlich, die eine Transformation von proliferierenden Leberzellen im entzündlichen Milieu auslösen bzw. fördern.

2.2 Molekulare Pathogenese des HCC

Bisher ist die molekulare Pathogenese des HCC noch nicht im Detail aufgeklärt. Nach heutigem Wissensstand geht man davon aus, dass die Hepatokarzinogenese ein mehrstufiger Prozess ist. Aus normalen Zellen bildet sich durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen über präneoplastische Stadien ein invasiver Tumor. Dabei muss sich zunächst neben einer unbegrenzten Proliferation, auch ein von Wachstumsfaktoren bzw. -inhibitoren unabhängiges Wachstum entwickeln. Außerdem müssen transformierende Zellen eine Resistenz gegen die Auslösung von Apoptose erlangen. Um den entstehenden Tumor zu versorgen, muss schließlich die Angiogenese vorangetrieben werden und die Tumorzellen müssen die Fähigkeit entwickeln, invasiv zu wachsen und zu metastasieren.⁸

In den letzten zehn Jahren wurden verschiedene Schlüsselgene und verantwortliche Signalwege identifiziert. So wurden Alterationen in den Rezeptoren unterschiedlicher Tyrosinkinasen und Änderungen in durch Wachstumsfaktoren vermittelten Signalwegen der Angiogenese beschrieben. Die Angiogenese ist essentiell für Tumorstadium, Angioinvasion und Metastasierung.⁹ Verschiedene Wachstumsfaktoren der Angiogenese, wie VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*), ANGPT2 (*Angiopoietin 2*) und PDGF

(*Platelet-derived growth factor*), werden im HCC überexprimiert bzw. wurden im Plasma von HCC-Patienten in höheren Proteinmengen im Vergleich zu Patienten mit einer Zirrhose detektiert.¹⁰ Diese Wachstumsfaktoren induzieren Signalwege der Angiogenese. So kommt es zum Beispiel zur Aktivierung des RAF/MEK/ERK- und des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs.¹¹ VEGF ist ein bereits gut untersuchter Wachstumsfaktor. Eine hohe Expression gibt Aufschluss über das Tumorstadium.¹² Außerdem werden hohe VEGF-Mengen mit einer schlechten Prognose nach Tumorresektion, mit einer geringen Heilungs- und Überlebensrate und mit einer Angioinvasion und Portalvenenthrombose in Verbindung gebracht.¹³⁻¹⁶ Ein weiterer Wachstumsfaktor, der in der Hepatokarzinogenese eine Rolle spielt, ist IGF (*Insulin-like growth factor*). Eine Überexpression von beispielsweise IGF2 findet in 16 bis 40% der HCC statt.¹⁷ Da der PI3K/AKT/mTOR-, RAF/MEK/ERK- und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg über IGF-Rezeptoren aktiviert werden, kann es im Falle einer Überexpression von IGF und IGF-Rezeptoren zur Aktivierung dieser Signalwege kommen.^{18,19} Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kann jedoch auch auf andere Weise aberrant aktiviert werden. In normalem Gewebe wird dieser Signalweg negativ durch PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) reguliert.¹¹ Die Expression von PTEN ist in der Hälfte der HCC reduziert, was eine aberrante Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs zur Folge hat.²⁰ Die Aktivierung des Signalwegs scheint eine sehr entscheidende Rolle in der Pathogenese des HCC zu spielen. So wurden in 15% der HCC eine erhöhte Proteinmenge der aktiven phosphorylierten Form von mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) und in 45% der Fälle hohe Konzentrationen von Kinase p70 S6, ein Substrat des phosphorylierten mTOR, detektiert.²¹ In 20 bis 48% der HCC wurde eine erhöhte c-MET-Expression nachgewiesen.²²⁻²⁶ Der Tyrosinkinaserzeptor c-MET reguliert Proliferation, Migration, Viabilität und Angiogenese und wird durch das Zytokin HGF (*Hepatocyte growth factor*) aktiviert. Patienten mit einer

c-MET-Überexpression entwickeln einen aggressiven Phänotyp mit einer schlechten Prognose.²⁷ Ein weiterer betroffener Signalweg, der ERK/MAPK-Signalweg, ist beteiligt an zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und Viabilität.²⁸ Eine Aktivierung trägt in verschiedenen soliden Tumoren, so auch beim HCC, zur Tumorprogression und Metastasierung bei.²⁹ Für die Entstehung eines HCC wurde außerdem eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beschrieben, entweder durch *Gain-of-function* Mutationen im Gen von β -Catenin oder durch *Loss-of-function* Mutationen in AXIN1 und AXIN2.³⁰ Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist in Zellproliferation, Angiogenese, anti-apoptischen Signalen und in die Formation der extrazellulären Matrix involviert.³¹ Etwa 50 bis 70% der HCC zeigen erhöhte β -Catenin-Konzentrationen.^{31,32}

Die bisher beschriebenen Alterationen (siehe oben) lassen sich jedoch nur in einem Teil der Patienten nachweisen, so dass bisher kein überzeugendes Modell, wie z. B. für das Kolonkarzinom, für die molekularen Grundlagen der Entstehung des HCC entwickelt werden konnte. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass eine frühzeitige Stabilisierung der Telomere (in 90% der Fälle durch Reaktivierung der Telomerase) eine notwendige Voraussetzung für eine unbegrenzte zelluläre Proliferation und damit für die maligne Transformation ist.³³

2.3 Telomerase und Telomere

Die Telomerase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die Chromosomenenden stabilisiert und den zellteilungsbedingten Telomerverlust ausgleicht.³⁴ Telomere sind die Endstrukturen eukaryotischer Chromosomen, die aus einer kurzen sich hundert- bis tausendfach wiederholenden DNA-Sequenz bestehen. Diese nicht-kodierende

Sequenz ist evolutionär konserviert, wobei Variationen beschrieben wurden. So besitzen höhere Pflanzen die Sequenz 5'-TTTAGGG-3' und Vertebraten 5'-TTAGGG-3'.³⁵⁻³⁷ Telomere weisen unterschiedliche Längen auf. So findet man in humanen Zellen einige tausend Wiederholungen des Hexanukleotids, während bei einigen Mausarten die Telomere ein Vielfaches dieser Länge aufweisen. Darüber hinaus variiert die Telomerlänge auch zwischen den Individuen einer Art und selbst zwischen einzelnen Geweben.³⁸ Es gibt eine Vielzahl von telomerbindenden Proteinen, z. B. TRF1 und 2 (*Telomeric repeat binding factor 1* und 2) sowie POT1 (*Protection of telomeres 1 homolog*).³⁹ Zusammen mit der Telomersequenz bilden diese Proteine einen Nukleoproteinkomplex, der häufig auch als Telosom bezeichnet wird und der die Chromosomenenden zur so genannten *Loop structure* aufrollt (Abbildung 1).^{40,41} Die so gebildeten molekularen Kappen schützen die kodierenden Bereiche des Chromosoms vor enzymatischer Degradation, homologer Rekombination und die linearen Chromosomen vor Fusion der Enden. Intakte Telomerkappen sind demnach notwendig, um eine chromosomale Instabilität in eukaryotischen Zellen zu verhindern.^{42,43}

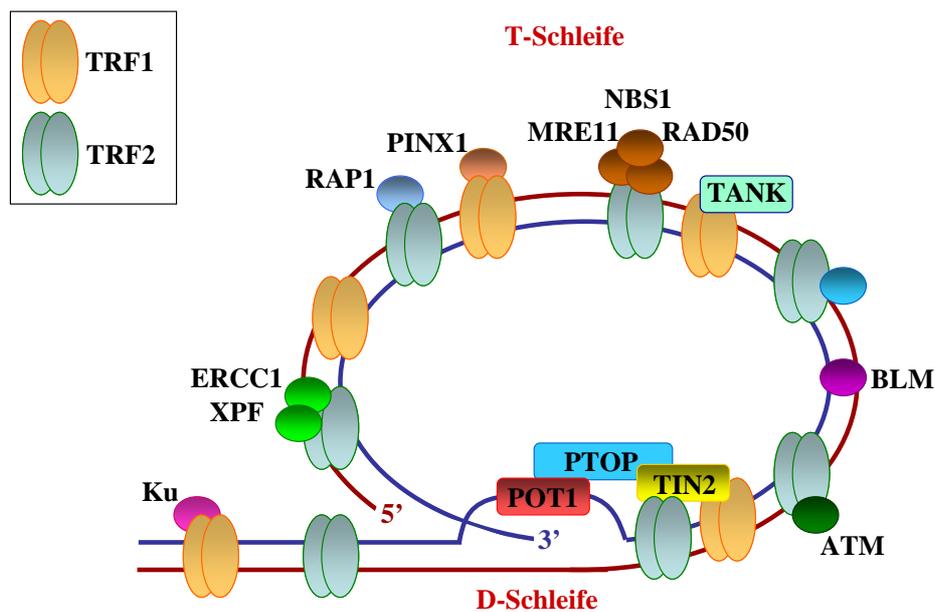


Abbildung 1: Das Telosom (modifiziert nach Wege und Brümmendorf⁴⁴). Die telomerbindenden Proteine bilden zusammen mit der Telomersequenz einen Nukleoproteinkomplex, der die Chromosomenenden zur so genannten *Loop structure* (D- und T-Schleife) aufrollt.

Aufgrund der unvollständigen semikonservativen DNA-Replikation, sowie aktiver enzymatischer Prozesse während der S-Phase des Zellzyklus, kommt es bei jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomere und somit zum replikationsbedingten Verlust von Bindungsstellen für die stabilisierenden Proteine.⁴⁵ Nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen, wird eine kritische Telomerlänge erreicht, welche die Bildung der schützenden Kappen nicht mehr zulässt. Die Zellen treten in die Seneszenz ein - ein irreversibler postmitotischer Ruhezustand mit Erhalt der Stoffwechselaktivität.^{46,47} Die teilungsbedingte Telomerverkürzung und die dadurch begrenzte Proliferationsfähigkeit von normalen differenzierten Zellen, wurde von Harley *et al.* anschaulich auch als „mitotische Uhr“ bezeichnet.⁴⁸

Im Gegensatz zu somatischen Zellen mit einer geringen Telomeraseaktivität weisen Keimbahn- und Tumorzellen stabile oder sich nur langsam ändernde Telomerlängen auf.

Das Ribonukleoprotein Telomerase synthetisiert in diesen immortalisierten Zellen neue Telomersequenzen *de novo* direkt an das Chromosomenende. Der Telomerverlust wird so ausgeglichen und die Telomere stabilisiert. Das Enzym besteht zum einen aus einer RNA-Komponente (TERC - *Telomerase RNA component*), welche zur Bindung an das Chromosomenende und als Matrize für die Neusynthese von Telomersequenzen dient, und zum anderen aus einer reversen Transkriptase (TERT - *Telomerase reverse transcriptase*), deren Expression entscheidend für die Aktivität des Holoenzym ist.^{49,50} Die Verlängerung der Telomere geschieht nach folgendem Prinzip: Das Enzym hängt an den überhängenden G-reichen Einzelstrang TTAGGG-Repeats an, indem das freie 3'-Ende des Chromosoms an die RNA-Komponente der Telomerase bindet. Nach Translokation der Telomerase beginnt die Elongation erneut. Der C-reiche Strang am 5'-Ende wird durch die konventionelle DNA-Polymerase verlängert (Abbildung 2).⁵¹

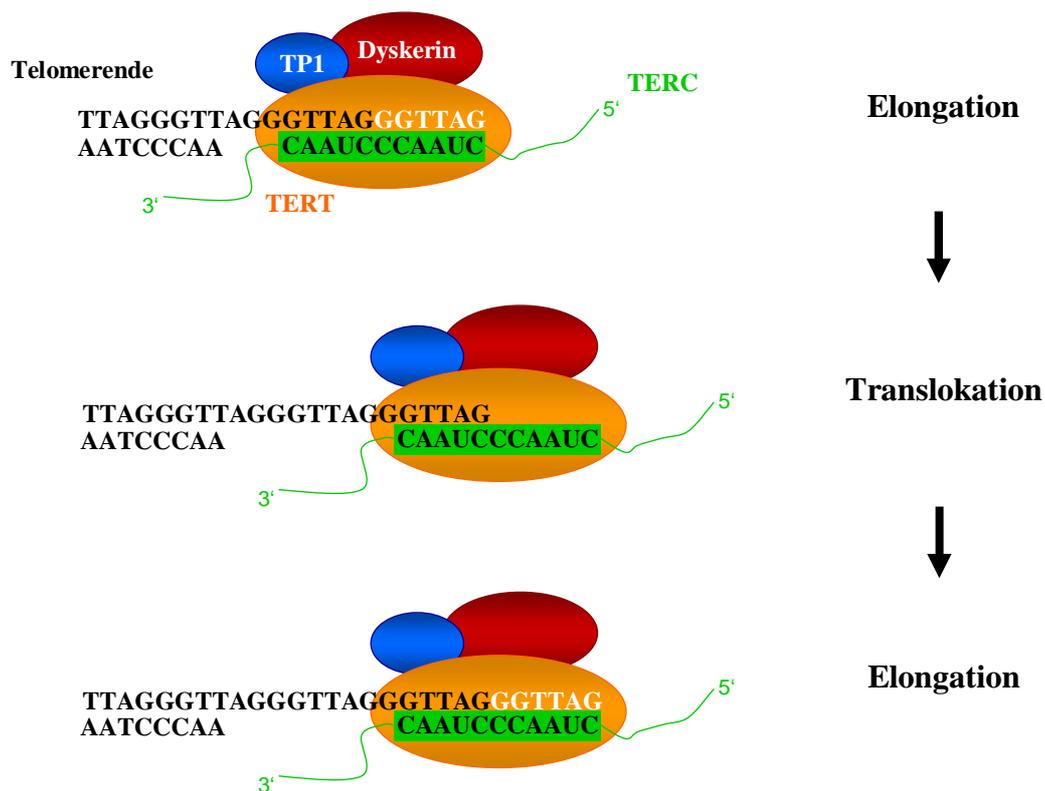


Abbildung 2: Funktion der Telomerase (modifiziert nach Wege und Brümmendorf⁴⁴). Die RNA-Komponente (TERC) bindet zunächst an das 3'-Ende des Telomers und dient somit als Matrize für die Neusynthese der Telomersequenz. Nach reverser Transkription (Elongation) durch die katalytische Untereinheit der Telomerase (TERT) verschiebt sich der Telomerasekomplex (Translokation) in Richtung 5'-Ende und eine erneute Elongation beginnt.

Während der Embryonalentwicklung des Menschen ist die Telomerase in allen Geweben aktiv und wird normalerweise zum Zeitpunkt der Geburt in somatischen Zellen supprimiert.^{52,53} Untersuchungen haben gezeigt, dass die Telomerase teilweise im Rahmen von Regenerationsprozessen transient reaktiviert werden kann. So wurde in einem Leberregenerationsmodell in Schweinen, deren Telomerbiologie dem Mensch ähnelt, eine Aktivierung der Telomerase nach einer Resektion von 70 bis 80% der Leber nachgewiesen. Die Telomeraseaktivität korrelierte dabei mit der Anzahl der mitotischen Hepatozyten.⁵⁴ Im Gegensatz dazu wird TERT in den Keimbahn- und in den meisten Tumorzellen dauerhaft exprimiert. 90% aller humanen Tumoren, unabhängig ihrer Art,

zeigen eine hohe Telomeraseaktivität, während im umliegenden nicht-malignen Gewebe keine Aktivität zu verzeichnen ist.^{33,55,56} Der Telomerase und den Telomeren wird in der Karzinogenese eine duale Rolle zugeschrieben.^{57,58} So führt, laut Hypothese, eine kritische Verkürzung der Telomere zunächst zu instabilen Chromosomen mit einem deutlich erhöhten Risiko an chromosomalen Aberrationen, wie Fusionen und Aneuploidien.^{59,60} In Folge dessen kommt es zu weiteren Mutationen, welche die maligne Transformation fördern. Um dann eine „mitotische Katastrophe“ mit Proliferationsarrest und Zelltod zu umgehen, wird die Telomerase dauerhaft aktiviert, die Telomere stabilisiert und so die unbegrenzte Expansion der entarteten Zellen ermöglicht (Abbildung 3).⁸ Die Regulation der Telomerlänge ist jedoch nicht immer von der Aktivität der Telomerase abhängig. Während 90% der humanen Tumore eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen, stabilisieren die restlichen 10%, insbesondere Sarkome, ihre Chromosomenenden auf eine andere Art.⁶¹ 1995 wurde dieser telomeraseunabhängige Prozess der Telomerstabilisierung postuliert und als ALT-Mechanismus (*Alternative lengthening of telomeres*) bezeichnet.⁶²

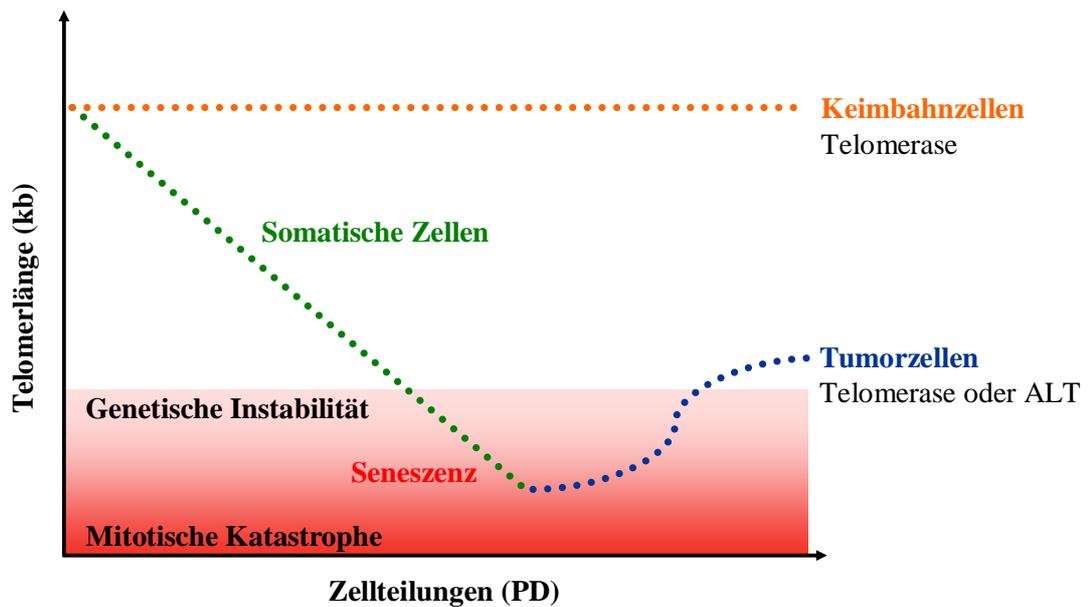


Abbildung 3: Replikationsbedingte Telomerverkürzung (modifiziert nach Wege und Brümmendorf⁴⁴). Keimbahnzellen mit dauerhaft aktivierter Telomerase halten während der Zellteilung die Telomerlänge konstant. In somatischen Zellen nimmt aufgrund der inaktiven Telomerase die Telomerlänge mit jeder Zellteilung stetig ab. Die genetische Instabilität nimmt damit zu bis die Zellen in die Seneszenz eintreten. Da das Risiko für genetische Alterationen steigt, können sich in den somatischen Zellen Mutationen ansammeln. Die entarteten Zellen stabilisieren dann ihre Telomerlänge mit Hilfe der Telomerase oder dem ALT-Mechanismus.

2.4 Die Rolle der Telomerase in der Hepatokarzinogenese

Die Aktivierung der Telomerase wurde als ein essentieller Schritt in der Hepatokarzinogenese beschrieben. So konnte 1997 gezeigt werden, dass etwa 85% der Leberzellkarzinome eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen, wobei die Telomerlänge von 2,0 bis 16,0 Kilobasen (kb) variiert.⁶³ Außerdem haben verschiedene Gruppen gezeigt, dass eine Telomeraseaktivierung bereits in präkanzerösen hepatischen Knoten stattfindet.^{64,65} Zusätzlich wurde eine Überexpression von TRF1, TRF2 und TIN2 (*TRF-1-Interacting nuclear factor 2*) in hochgradig dysplastischen Knoten detektiert.⁶⁶ Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Aktivierung der Telomerase frühzeitig in der mehrstufigen Hepatokarzinogenese auftritt.

Die alleinige Aktivierung ist jedoch nicht ausreichend, um eine maligne Transformation zu induzieren.⁶⁷ Zusätzliche genetische Alterationen in weiteren Signalwegen sind notwendig, um die Transformation in proliferierenden Hepatozyten voranzutreiben. Dabei ist man nach heutigem Kenntnisstand überzeugt, dass neben der Telomeraseaktivierung eine relativ kleine Anzahl zellulärer Signalwege gestört sind. So konnten Hahn *et al.* zeigen, dass sich normale epitheliale Vorläuferzellen durch die ektope Expression von TERT, sowie dem Simian Virus 40 großem T-Onkoprotein (SV40T) und einem onkogenen Allel von H-ras (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) in Tumorzellen umwandeln lassen.⁶⁸

2.5 Modellsystem zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese

Um weitere Schlüsselereignisse im Übergang von einer reparierenden in eine dysregulierte und entartete Regeneration zu definieren, ist es aufgrund der komplexen Interaktionen zwischen zelleigenen und auf die Zellen einwirkenden Faktoren zunächst erforderlich, eine Vereinfachung des experimentellen Systems vorzunehmen. Bisher wurden jedoch funktionelle Untersuchungen zu den molekularen Grundlagen der Hepatokarzinogenese durch das Fehlen geeigneter Zellkulturmodelle limitiert. Primäre humane Hepatozyten können zwar aus Spenderlebern isoliert und für einen kurzen Zeitraum kultiviert werden, lassen sich jedoch nicht in Zellkultur vermehren. Andererseits sind die etablierten Hepatomazelllinien HepG2 und HuH7 bereits maligne transformiert und weisen einen komplex alterierten Karyotyp auf, so dass in diesen Zellen funktionelle Untersuchungen zu den entscheidenden Schritten der Hepatokarzinogenese nur durch Inhibition definierter Signalwege möglich sind.

Da die Proliferation von humanen Hepatozyten in Zellkultur durch eine fortschreitende Verkürzung der Telomere begrenzt wird, wurden von Wege *et al.*, zur Generierung einer

Leberzelllinie, fetale Hepatozyten (FH) aus 22 bis 24 Wochen alten humanen Feten isoliert. Diese Zellen wurden aufgrund ihrer von Wachstumsfaktoren unabhängigen spontanen Proliferation in Zellkultur verwendet. Durch ektope Expression von TERT, der aktivitätsbestimmenden katalytischen Untereinheit der Telomerase, wurde dann in FH die Telomerase aktiviert und so die Telomere stabilisiert (Immortalisierung).⁶⁹ Auf mRNA- und Proteinebene, sowie in funktionellen Analysen, konnten verschiedene Marker für hepatozelluläre Funktionen wie Albuminproduktion, Harnstoffentstehung, Glukose-6-Phosphatase-Aktivität, Glykogensynthese und Expression von Genen der Cytochrom P450 1 und 2 Familie bei den immortalisierten Hepatozyten (FH-hTERT) nachgewiesen werden.⁶⁹ Intrahepatische Zelltransplantationsstudien zeigten eine Integration von FH-hTERT in das Lebergewebe, wobei die transplantierten Hepatozyten außerdem ihr phänotypisches Differenzierungspotenzial beibehielten.⁶⁹ Inzwischen konnten die immortalisierten Hepatozyten bis zu über 800 Populationsverdopplungen (PD) in Zellkultur expandiert werden. Dagegen zeigen Telomerase-negative FH nach nur 35 bis 40 PD eine abnehmende Wachstumsgeschwindigkeit und einen seneszenten Phänotyp.⁷⁰

Bezüglich der malignen Transformation konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der Telomerase *per se* keine maligne Transformation induziert.⁷¹ FH-hTERT haben kein verankerungsunabhängiges Wachstum, ein Merkmal von Tumorzellen, und sind somit nicht in der Lage Kolonien im Softagarassay zu bilden. Auch mittels des Nacktmausmodells konnte *in vivo* kein Tumorwachstum beobachtet werden. Bei Erreichen einer Konfluenz von 100%, sowie bei Abwesenheit von Serum, kommt es bei FH-hTERT, wie für nicht-transformierte Zellen üblich, zum Zellzyklusarrest. Außerdem kann nach Auslösung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Bestrahlung eine ungestörte Schadensantwort via p53 (*Tumor protein p53*) und p21 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor*

IA) ausgelöst werden. Es kommt zu einem erhöhten Zellzyklusarrest der Zellen in der G₀/G₁-Phase mit einer signifikanten Reduktion der S-Phase. Eine Behandlung von FH-hTERT mit Camptothecin, ein DNA Topoisomerase I Inhibitor, der zu Brüchen an der Replikationsgabel führt, induziert ebenfalls eine Stabilisierung von p53 und eine erhöhte Expression von p21. Die immortalisierten Hepatozyten sind somit aufgrund der unbegrenzten Proliferation und des nicht transformierten Phänotyps hervorragend zur funktionellen Untersuchung der mehrstufigen Hepatokarzinogenese geeignet und wurden in dieser Arbeit als Zellkultursystem für proliferierende Hepatozyten mit Telomeraseaktivierung als „*First hit*“ im mehrstufigen Modell der Hepatokarzinogenese eingesetzt.

2.6 Insertionsmutagenese im Rahmen der HBV-assoziierten Karzinogenese

Die chronische Hepatitis B ist, wie bereits erwähnt, ein maßgeblicher Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC.⁷²⁻⁷⁵ So steigt das Risiko einer HCC-Entwicklung bei einer chronischen Hepatitis B-Infektion um das 5- bis 15-fache.² 53% der primären Leberkarzinome weltweit werden mit einer chronischen Hepatitis B in Verbindung gebracht.⁷⁶ Dabei wird dem Hepatitis B Virus (HBV) eine direkte und eine indirekte Rolle in der Karzinogenese zugeschrieben.

Bei dem indirekten Effekt kommen zu einer chronischen Inflammation der Leber verschiedene virale Proteine hinzu, die die Transformation zusätzlich vorantreiben können. So stört zum Beispiel HBx (*Hepatitis B virus X protein*) verschiedene zytoplasmatische Signalwege, die bei Regulation von Wachstum und Viabilität eine Rolle spielen. Zu diesen Signalwegen gehören u. a. der JAK/STAT-Signalweg, der NF-κB-Signalweg und auch der

Wnt/ β -Catenin-Signalweg.^{77,78} Bei dem direkten Effekt kommt es zur Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle. Die Integration des viralen Genoms ist nicht essentiell für die Virusreplikation, führt allerdings zu einer Persistenz im Wirtsgenom. HBV-Integrationen findet man bei 85 bis 90% der HCC-Patienten mit einer chronischen Hepatitis B, wobei die Integration der Virus-DNA nicht auf das HCC beschränkt ist. So wurden auch im umliegenden Lebergewebe Virusinsertionen nachgewiesen.^{79,80} Oxidativer Stress oder Einflüsse, die zu DNA-Schäden führen, erhöhen dabei die Frequenz der HBV-Integration.⁸¹ Außerdem wird die Integration des Virus durch vermehrt auftretende DNA-Schäden und eine erhöhte Replikation während der chronischen Entzündung gefördert.⁸² Die HBV-Integration induziert verschiedene genetische Alterationen im Wirtsgenom. So wurden chromosomale Deletionen, Translokationen, Transkriptfusionen, Amplifikationen zellulärer DNA und genomische Instabilität beschrieben.^{77,82} Die genetische Instabilität kann dann zu Veränderungen in der Expression von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und microRNAs (miRNA) führen.⁷⁷ Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass HBV-Integrationen vor allem in Regionen auftreten, die Signaltransduktion, Proliferation und Viabilität regulieren.⁸³

Um solche Alterationen zu induzieren und so weitere Signalwege der Hepatokarzinogenese zu identifizieren, wurden FH-hTERT in dieser Arbeit mit einem γ -retroviralen Vektor transduziert. Retrovirale Vektoren sind gezielt veränderte Viruspartikel, die in der Lage sind, analog zu HBV, in das Genom zu integrieren und damit Mutationen auszulösen. Im folgenden Abschnitt werden Retroviren ausführlicher behandelt.

2.7 Retroviren

Retroviren (*Retroviridae*) wurden erstmals 1911 von Rous *et al.* beschrieben.⁸⁴ Er und Kollegen konnten zeigen, dass mit filtrierten Extrakten aus Geflügelsarkomen gesunde Hühner infiziert werden können, die daraufhin ebenfalls Tumore entwickeln. Retroviren lassen sich in zwei Unterfamilien aufteilen. Zu der Unterfamilie der Orthoretroviren (*Orthoretrovirinae*) gehören die Gattungen α -Retroviren (z. B. RSV - Rous-Sarkom-Virus), β -Retroviren (z. B. MMTV - Maus-Mammatumovirus), γ -Retroviren (z. B. MLV - Maus-Leukämie-Virus), δ -Retroviren (z. B. HTLV-1 - humanes T-Zell-Leukämie-Virus-Typ 1), ϵ -Retroviren (Fisch-Retroviren, z. B. WDSV - *Walleye dermal sarcoma virus*) und Lentiviren (z. B. HIV-1 - humanes Immundefizienz-Virus-Typ 1). Zu der Unterfamilie der Spumaviren (*Spumaretrovirinae*) gehört die Gattung Foamyvirus (z. B. HFV - humanes Foamyvirus).⁸⁵

Retroviren sind behüllte Viren mit einem Durchmesser von etwa 100 nm (Abbildung 4). Sie besitzen ein Kapsid, das in eine Matrix eingebettet und von einer Virushülle umgeben ist. Die Virushülle, eine Doppellipidmembran, enthält Rezeptorliganden, die an Rezeptoren der Zielzelle binden können. Als Erbinformation enthalten die Retroviren RNA, die im Kapsid verpackt ist. Dabei liegt die RNA als linearer Einzel-(+)-Strang vor und wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Die DNA kann dann mittels Integrase in das Wirtsgenom eingebaut werden. Beide Enzyme sind zusammen mit der Protease im Kapsid verpackt und werden bei Infektion mit in die Zielzelle transportiert.

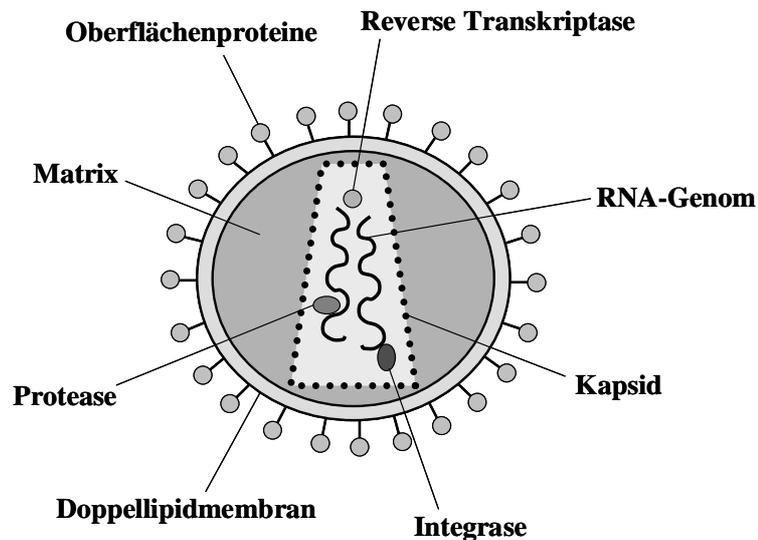


Abbildung 4: Aufbau eines Retroviruspartikels. Retroviren bestehen aus einer Doppellipidmembran mit Oberflächenproteinen, die als Rezeptorliganden fungieren und an Rezeptoren der Wirtszelle binden. Im Inneren der Hülle, eingebettet in die Matrix, liegt das Kapsid, das die beiden identischen, einzelsträngigen RNA-Moleküle und die Proteine reverse Transkriptase, Integrase und Protease enthält.

Retroviren sind die einzigen RNA-Viren, die diploid angelegt sind. So besteht das Genom der Retroviren aus zwei identischen RNA-Molekülen. Diese weisen am 5'-Ende eine CAP-Struktur und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz auf und gleichen so einer zellulären mRNA (Abbildung 5). Die virale RNA enthält die Gene *gag*, *pol* und *env*. *Gag* kodiert für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. *Pol* (*Polymerase*) kodiert für die virale Protease, reverse Transkriptase und Integrase und *env* (*Envelope*) für die Hüllproteine. Die kodierenden Sequenzen sind von regulatorischen Sequenzen umgeben, die eine wichtige Rolle bei der reversen Transkription und der Integration des Virus in das Wirtsgenom spielen. Die sogenannte R-Region (R - redundant) beinhaltet den Transkriptionsstart und das Polyadenylierungssignal und liegt an beiden Enden des Virusgenoms. Am 5'-Ende befindet sich die U5-Region (U - *Unique*), die eine der beiden Bindungsstellen (*att* - *Attachment site*) für die Integrase enthält. Am 3'-Ende befindet sich die U3-Region,

welche die zweite Bindungsstelle der Integrase aufweist, sowie Promotor- und *Enhancer*-Sequenzen für die Transkription der viralen Gene. Zwischen 5'-LTR und den kodierenden Sequenzen liegt die *Leader*-Region, die wichtige regulatorische Elemente wie das Verpackungssignal (ψ), die Primerbindungsstelle (PB) als Startpunkt für die reverse Transkription und eine Spleißdonorsequenz (SD) enthält. Vor dem 3'-LTR liegt der Polypurin-Trakt (PPT), der essentiell für die reverse Transkription ist. Bei der reversen Transkription werden die 5'-R- und die U5-Region an das 3'-Ende und die U3-Region an das 5'-Ende kopiert. So entstehen homologe *Long terminal repeats* (LTR) an beiden Enden des Virus.⁸⁵

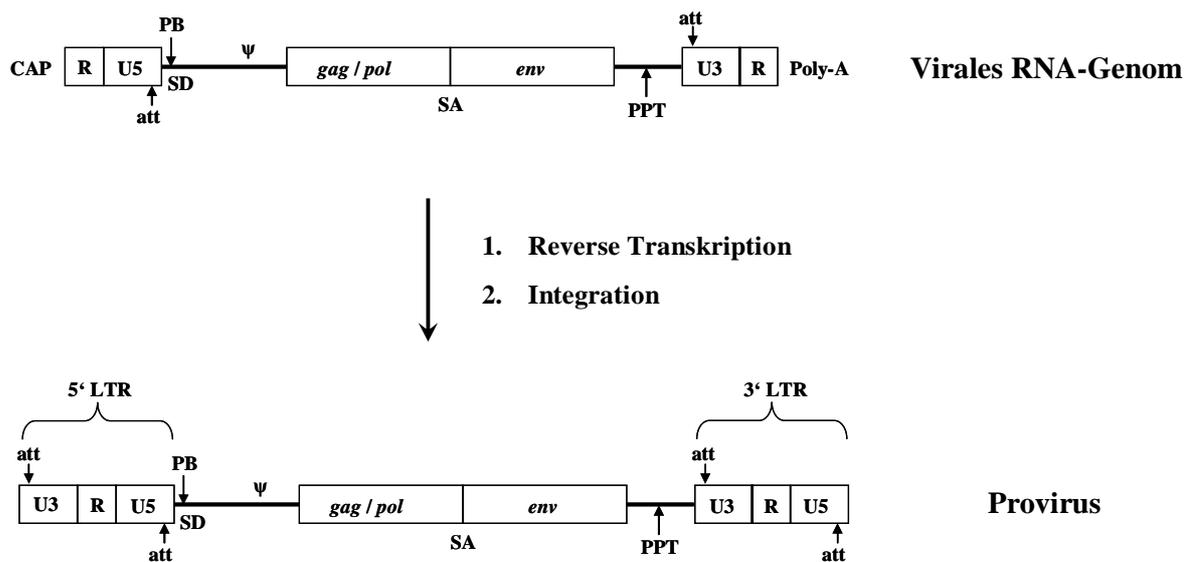


Abbildung 5: Aufbau des retroviralen Genoms und des Provirus (modifiziert nach Modrow et al.⁸⁵). Das retrovirale RNA-Genom weist am 5'-Ende eine CAP-Struktur und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz auf. Während der reversen Transkription werden die R- und die U5-Region an das 3'-Ende und die U3-Region an das 5'-Ende kopiert. Die sogenannten *Long terminal repeats* (LTR) mit Integrasebindestellen (att) flankieren nun die viralen Gene *gag*, *pol* und *env*, sowie die regulatorischen Elemente Verpackungssignal (ψ), Primerbindestelle (PB), Spleißdonor- (SD) und Spleißakzeptorsequenz (SA).

2.8 Replikationsinkompetente retrovirale Vektoren

Retroviren werden aufgrund ihrer stabilen Integration in das Wirtsgenom zur Expression eines Transgens u. a. in der Gentherapie eingesetzt. Die retroviralen Vektorsysteme wurden dabei so entwickelt, dass replikationsinkompetente Viruspartikel entstehen, die nicht in der Lage sind, sich in den Wirtszellen zu vermehren. Dazu werden die Gene *gag*, *pol* und *env* durch die Verwendung von Plasmiden und Verpackungszelllinien entfernt und getrennt. Die restliche virale Sequenz enthält u. a. das Verpackungssignal (ψ) und befindet sich auf einem Plasmid, das als retroviraler Vektor bezeichnet wird. Durch das Entfernen der *gag*-, *pol*- und *env*-Gene entsteht genug Platz für eine bis zu 8 kb große Transgensequenz. Das Vektorplasmid und die Plasmide mit den Genen *gag*, *pol* und *env* werden dann durch Transfektion in eine Verpackungszelllinie geschleust. Diese kann die für die Virusproduktion erforderlichen Proteine *gag*, *pol* und *env* zur Verfügung stellen, so dass nun die Viruspartikel zusammengebaut werden können. Die Viruspartikel enthalten die RNA des retroviralen Vektors, die dann in den Zielzellen in DNA umgeschrieben und in das Genom integriert wird. Da die Zielzellen keine eigenen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene besitzen, können in den transduzierten Zellen keine neuen Viruspartikel entstehen.

2.9 Retrovirale Insertionsmutagenese

Die Integration eines Retrovirus kann theoretisch überall erfolgen. Jedoch ist bekannt, dass der Ort nicht rein zufällig ist. Der Zugang zur DNA scheint dabei eine wesentliche Rolle zu spielen, da Integrationen sehr viel häufiger im offenen Chromatin zu finden sind als im Heterochromatin der Zentromere. Da verschiedene Retroviren unterschiedliche Präferenzen für den Integrationsort zeigen, kann die Chromatinstruktur allein nicht ausschlaggebend für den Integrationsort sein. So integrieren Lentiviren, wie beispielsweise

HIV, bevorzugt in Regionen mit hoher Gendichte oder in transkribierte Bereiche, wohingegen γ -Retroviren, wie MLV, vor allem in Promotorregionen aktiver Gene detektiert werden.⁸⁶ Zelluläre und virale Proteine, wie die Integrase, sollen dabei den Ort der Integration beeinflussen.^{87,88} Auch Transkriptionsfaktoren der Zelle und das Zellzyklusstadium können ausschlaggebend für den Integrationsort sein.^{89,90}

Jede Integration eines Provirus in das zelluläre Genom zerstört die genomische Organisation und wird daher als Insertionsmutagenese bezeichnet. Es besteht bei jeder Virusintegration die Gefahr, dass die Expression angrenzender Gene beeinflusst wird. Eine Veränderung eines Genproduktes oder der Genexpression geschieht dann, wenn Gene direkt oder deren regulatorische Elemente, wie Promotor-, *Enhancer*- oder Terminator-Bereiche, sowie Lokus-Kontroll- und Matrix-Anheftungs-Regionen, getroffen sind. Die (In-)Aktivierung von Genen durch das Provirus kann auf verschiedene Arten erfolgen:

Promotor-Insertion. Liegt das Provirus vor einem Gen in der gleichen transkriptionellen Orientierung, kann der virale Promotor in der 5'- oder 3'-LTR-Region den zellulären Promotor ersetzen und zu einer veränderten Transkription des Gens führen. Wenn der Promotor der 5'-LTR-Region genutzt wird, kann ein Fusionstranskript entstehen. Dabei wird das Polyadenylierungssignal in der 3'-LTR-Region überlesen und die virale Splice-Donor-Sequenz genutzt. Der 5'-LTR-Bereich kann jedoch auch deletiert sein, wodurch der Promotor im 3'-LTR-Bereich aktiv ist.⁹¹ Der virale Promotor kann ebenfalls aktivierend wirken, wenn das Provirus im ersten Intron des Gens liegt. Das endogene Transkript ist durch das virale Polyadenylierungssignal trunziert, jedoch werden alle folgenden Exons durch den viralen Promotor transkribiert. Ist der Translationsstart im

zweiten Exon lokalisiert, wird ein Protein mit normaler Länge translatiert. Das Provirus kann sogar zu einem verkürzten Transkript führen. So sind für das Gen c-Myb (*v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog*) Insertionen beschrieben, die ein verkürztes Protein mit einem alternativen Startcodon zur Folge hatten.⁹²

Enhancer-Insertion. Die Transkription der zellulären Gene kann außerdem durch die Bindung von zellulären Transkriptionsfaktoren an virale *Enhancer* in der U3-Region des LTR-Bereichs erhöht werden.^{93,94} Dabei können diese viralen Verstärkerelemente über große Entfernungen sowohl vor als auch nach einem Gen wirksam sein. So konnte gezeigt werden, dass das Protoonkogen c-Myc (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) durch einen Retrovirus aktiviert werden konnte, wobei die Integrationsstelle einmal 30 kb und einmal 270 kb vom Gen entfernt liegt.⁹⁵

Verkürzung durch Insertion. Liegt das Provirus innerhalb eines Gens in gegensätzlicher Orientierung, kann das Protein durch ein Polyadenylierungssignal verkürzt werden. Das wiederum kann entweder zu einem inaktiven oder zu einem konstitutiv aktiven Protein mit fehlenden regulatorischen Sequenzen führen. So führte die Zerstörung der Genstruktur durch virale Insertion zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53.^{96,97} Im Gegensatz dazu kam es durch eine retrovirale Insertion im Intron 7 des Gens Tpl-2 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8*) zur Expression einer konstitutiv aktiven und verkürzten Serin/Threonin-Kinase.^{98,99}

Insertion in regulatorische Bereiche. Eine (In-)Aktivierung kann ebenfalls durch eine Virusinsertion in regulatorische Bereiche der Gene zustande kommen. So können Promotor- oder andere Regulationsbereiche zerstört werden, was zur Inaktivierung des

Gens führt. Gene können dabei jedoch auch aktiviert werden, indem durch die Integration destabilisierende Elemente, wie z. B. miRNA zerstört werden.¹⁰⁰

Wird durch die Insertion ein Protoonkogen aktiviert, kann es zur Entstehung von Tumoren kommen. Im Fall von c-Myc führte die Aktivierung schließlich zu T-Zell-Lymphomen im Rattenmodell.⁹⁵ Unkontrolliertes Wachstum durch die Aktivierung von Protoonkogenen durch Retroviren konnten auch Haywald und Kollegen bei Hühner-Bursa-Lymphomen zeigen. Die Entstehung dieser Lymphome wird ebenfalls eindeutig auf die unkontrollierte Überexpression von c-Myc, verursacht durch eine retrovirale Insertion, zurückgeführt.¹⁰¹ Retrovirale Vektoren werden nun im Sinne einer induzierten Insertionsmutagenese experimentell eingesetzt. Aufgrund der bekannten Sequenz des Provirus, lässt sich die Insertionsstelle und damit potentielle Protoonkogene über verschiedene Methoden identifizieren (z. B. LM-PCR - *Ligation-mediated polymerase chain reaction*).¹⁰² So konnten mit Hilfe der experimentellen Insertionsmutagenese bereits erfolgreich Protoonkogene, die beispielsweise in die Entstehung von Leukämien involviert sind, identifiziert werden.^{103,104}

2.10 Zielsetzung

Basierend auf den bisherigen Untersuchungen, wurde für dieses Projekt die Hypothese aufgestellt, dass es während eines chronischen Leberschadens zur permanenten Aktivierung der Telomerase kommen kann, die den Hepatozyten ein unbegrenztes Wachstum (Immortalität) ermöglicht. Dabei scheint dieser Vorgang ein essentieller und früher Schritt in der mehrstufigen Hepatokarzinogenese zu sein. Für den Übergang von Immortalität zu Malignität sind dann weitere genetische Alterationen erforderlich (Abbildung 6).

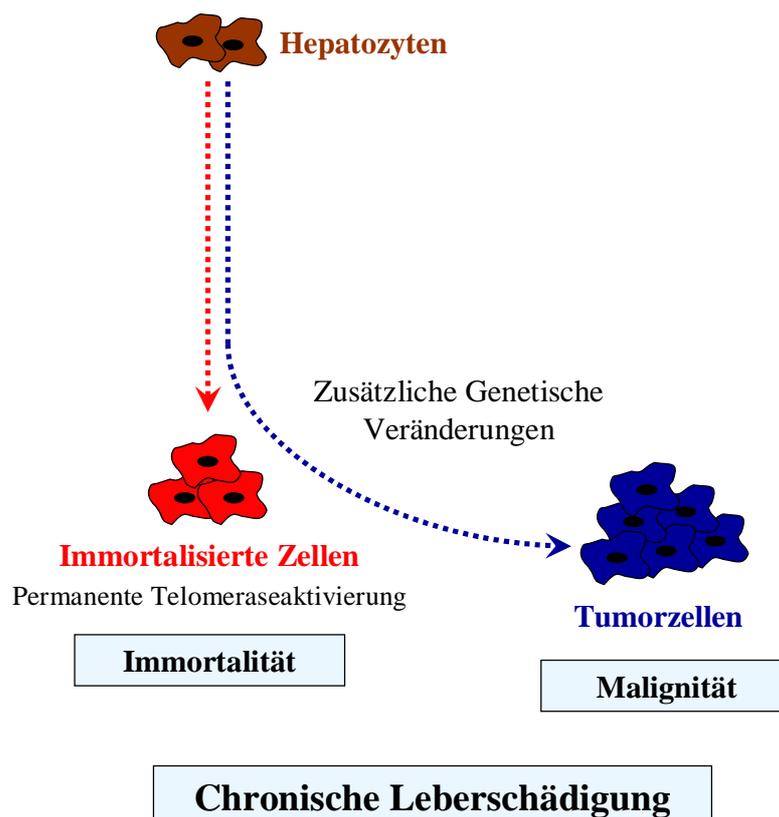


Abbildung 6: Arbeitshypothese. Bei einem chronischen Leberschaden kann es zur permanenten Aktivierung der Telomerase in den proliferierenden Hepatozyten kommen, was den Zellen ein unbegrenztes Wachstum ermöglicht. Für den Übergang von Immortalität zu Malignität sind wenige zusätzliche Alterationen erforderlich.

Für diese Arbeit wurden Telomerase-immortalisierte humane fetale Hepatozyten als Zellkulturmodell für proliferierende Hepatozyten mit Telomeraseaktivierung als „*First hit*“ im mehrstufigen Modell der Hepatokarzinogenese eingesetzt. Um weitere an der HCC-Entstehung beteiligte Signalwege zu identifizieren, sollten in FH-hTERT, durch Transduktion mit einem γ -retroviralen Vektor, genetische Veränderungen im Sinne einer induzierten Insertionsmutagenese ausgelöst werden.

Das übergeordnete Ziel ist es, beteiligte Signalwege und ihre hierarchischen und redundanten Beziehungen zueinander aufzudecken. Durch Beantwortung dieser Fragen sollen die Schlüsselereignisse im Übergang von einer reparierenden zu einer dysregulierten und entarteten Regeneration definiert werden. Ein fundiertes Verständnis der wirksamen Mechanismen würde die Möglichkeit zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer sowie möglicherweise auch präventiver Verfahren eröffnen, um z. B. eine Transformation frühzeitig zu erkennen oder bei hohem Risiko gezielt zu unterbinden.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zelllinien

HuH7. Die Tumorzelllinie HuH7 wurde aus einem gut differenzierten HCC eines 57 Jahre alten Japaners etabliert. Die Zelllinie weist eine unbegrenzte Proliferation mit einer PD in circa 36 h auf. Während die Zellen im serumfreien Medium ein Monolayerwachstum zeigen, ist bei Anwesenheit von Serum sogar ein Multilayerwachstum zu beobachten. HuH7 Zellen sind Telomerase-positiv und zeigen eine Telomerlänge von 24,9 kb.¹⁰⁵

HepG2. HepG2 Zellen wurden aus einem HCC eines 15-jährigen Jugendlichen isoliert. Die Zellen weisen ein unbegrenztes Wachstum bei einer PD von 48 h auf. Bei Anwesenheit von Serum sind bei dieser Tumorzelllinie ein Monolayer- sowie ein Multilayerwachstum zu beobachten. HepG2 zeigen eine Telomeraseaktivierung. Die Telomerlänge liegt bei 5 kb.¹⁰⁶

FH-hTERT. Bei FH-hTERT handelt es sich um fetale Hepatozyten, die von menschlichen Feten im Rahmen einer elektiven Abtreibung in der 22. bis 24. Schwangerschaftswoche isoliert wurden. Die isolierten Zellen zeigen keine Telomeraseaktivität. Nach circa 35 bis 40 PD nimmt die proliferative Aktivität der Zellen mit Eintritt in die Seneszenz ab. Durch die ektope Expression von TERT wurde die Telomerase reaktiviert und die Hepatozyten so immortalisiert.⁶⁹ Die Telomeraseaktivität der immortalisierten fetalen Hepatozyten ist etwa 30-mal so hoch wie in HepG2 und die Telomerlänge liegt bei circa 11,5 kb. Die Zellen zeigen ein reines Monolayerwachstum und es kommt bei unbegrenztem Wachstum circa alle 24 h zu einer PD. Die Verwendung der FH-hTERT Zellen wurde von der

Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (Genehmigungsnummer OB-034/06).

3.1.2 Zellkultur

Als Zellkulturmodell wurden die bereits etablierten und charakterisierten FH-hTERT bei einer PD von 30 bis 75 verwendet.⁶⁹ Wie zuvor beschrieben, zeigen die immortalisierten Hepatozyten keinen malignen Phänotyp während der Expansion in Langzeitkultur bis PD 150.⁷¹ Humane Tumorzelllinien wie HuH7 und HepG2 wurden als positive Kontrollen verwendet. Die murine Verpackungszelllinie PG13 diente zur Generation der replikationsinkompetenten γ -retroviralen Vektoren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mit Hilfe der humanen Medulloblastomzelllinie TE671. Alle Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (Invitrogen) sowie den Antibiotika Gentamycin und Amphotericin B (Endkonzentration: 10 μ g/ml Gentamycin, 0,25 μ g/ml Amphotericin B; Invitrogen) kultiviert. Für FH-hTERT wurde das Medium zusätzlich mit 5 μ g/ml Insulin and 2,4 μ g/ml Hydrocortison (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) versetzt. Alle Zellen wurden im Zellinkubator (Heraeus BB 16; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37°C, 5%-iger CO₂-Atmosphäre und 95%-iger relativer Luftfeuchtigkeit in 25 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen (T25 bzw. T75; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert. Bei einer Generationszeit von 24 bis 48 h wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 bis 100% passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7,4; Invitrogen) gewaschen. Danach folgte der Verdau mit 0,25% Trypsin-EDTA (Invitrogen) im Zellinkubator für 2 bis 5 min. Zum Abstoppen der Trypsinierung wurden die Zellen anschließend mit serumhaltigem Medium resuspendiert und schließlich in der

gewünschten Dichte ausgesät und mit Medium wieder aufgefüllt. Um die Zellzahl und die daraus folgende Zellteilungsrate zu bestimmen, wurden die Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) und ein Mikroskop (DM IL; Leica, Wetzlar, Deutschland) benutzt. Für die Langzeitlagerung im flüssigen Stickstoff wurden 1 bis 3×10^6 Zellen in 1 ml Gefriermedium (80% DMEM, 10% fetales Rinderserum, 10% Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich) aufgenommen und zunächst für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen in einem *Freezing container* (Nalgene, Rochester, NY, USA) für 24 h bei -80°C gelagert, bevor sie für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem 37°C Wasserbad (GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) aufgetaut und direkt in eine Zellkulturflasche gegeben und mit Medium resuspendiert. Das Abzentrifugieren der Zellen erfolgte jeweils bei $500 \times g$ und 4°C für 3 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an einer sterilen Werkbank (Heraeus HS 12; Thermo Scientific). Gentechnische Arbeiten mit der Sicherheitsstufe 2 wurden in der Anlage E34-11/91 durchgeführt und zuvor von der zuständigen Behörde genehmigt (Genehmigungsnummer IB24-210/07).

3.1.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS - *Fluorescence activated cell sorting*) ist es möglich, einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom zu zählen und anhand ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde eine fluoreszenzaktivierte Zellanalyse mit dem Durchflusszytometer FACSCanto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt, um das fluoreszierende intrazelluläre Protein EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*) bzw. mit Propidiumjodid gefärbte DNA nachzuweisen. Die Farbstoffe werden mittels eines

monochromatischen Laserstrahls angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, was durch einen Detektor registriert wird. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Größe und Struktur der Zellen gewonnen, so dass tote Zellen und Dubletten für die Analyse herausgenommen werden können. Die Auswertung erfolgte mit der Software FACSDiva5 (BD Biosciences).

3.1.4 Retrovirale Transduktion mit SF11 α EGFP_{Prev}

Für die induzierte Insertionsmutagenese wurde in dieser Arbeit SF11 α EGFP_{Prev} als replikationsinkompetenter γ -retroviraler Vektor eingesetzt. Das retrovirale Expressionsplasmid pSF11 α EGFP_{Prev} enthält als Basisplasmid pUC19 (Abbildung 7). Die *Leader*-Region stammt von pSF11 (NCBI AJ132035) und die zwei flankierenden DNA-Wiederholungseinheiten (LTR) wurden von den murinen Retroviren MPSV (*Myeloproliferative sarcoma virus*) und SFFVp (*Spleen focus-forming virus plasmid*) abgeleitet. Zusätzlich ist EGFP als Selektionsmarker enthalten.

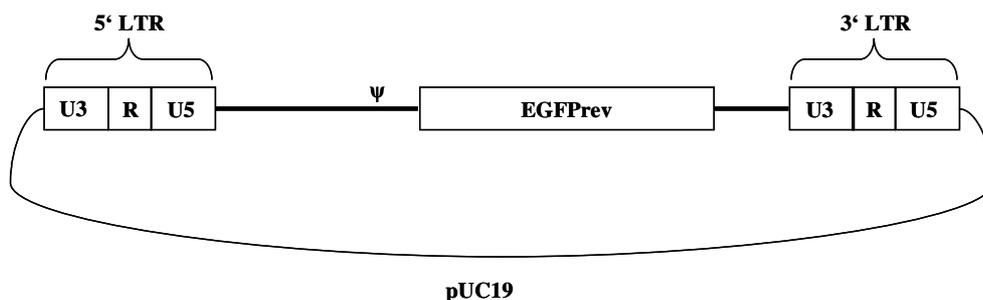


Abbildung 7: Aufbau von pSF11 α EGFP_{Prev}. Das retrovirale Expressionsplasmid pSF11 α EGFP_{Prev} enthält als Basisplasmid pUC19. Die *Leader*-Region stammt von pSF11 (NCBI AJ132035) und die LTR wurden von den murinen Retroviren MPSV und SFFVp abgeleitet. Zusätzlich ist EGFP als Selektionsmarker enthalten.

Herstellung von SF11 α EGFP_{Prev}. Die retroviralen Vektoren SF11 α EGFP_{Prev} wurden mit Hilfe der murinen Verpackungszelllinie PG13 generiert. Dazu wurde das Expressionsplasmid pSF11 α EGFP_{Prev} und die Plasmide, welche die Gene *gag*, *pol* und

env enthalten, stabil transfiziert (freundlicherweise von Prof. Dr. B. Fehse durchgeführt und zur Verfügung gestellt, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg). Die transfizierten PG13 Zellen verpacken das virale genomische Transkript in retrovirale Partikel. Die dafür erforderlichen Proteine *gag*, *pol* und *env* werden ebenfalls von PG13 zur Verfügung gestellt. Die fertigen Partikel sind aufgrund der fehlenden *gag*-, *pol*- und *env*-Gene replikationsinkompetent und können zur retroviralen Transduktion der Zielzellen verwendet werden. Zur Produktion von SF11 α EGFP_{prev} wurden PG13 Zellen in T75 ausgesät. Die Virusernte erfolgte bei einer Konfluenz von 80 bis 90%, wobei das Medium zunächst gewechselt wurde. Nach 8 h wurden die mit retroviralen Partikeln durchsetzten Überstände abgenommen, durch einen 0,45 μ m-Filter (Filtropur S; Sarstedt) gegeben und schließlich bei -80°C gelagert.

Ermittlung des Virustiters. Um den Virustiter zu ermitteln, wurden 2×10^5 TE671 Zellen in 12-Well-Platten (Sarstedt) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch 1 ml Medium mit Zusatz von Polybrenen (Hexadimethrinbromid, 8 μ g/ml; Sigma-Aldrich) ausgetauscht. Dieses Polykation neutralisiert die Ladungen der Zelloberfläche und der retroviralen Vektoren und verbessert somit die Bindung der Viren an die Zelloberfläche. Dann wurden 20, 50 bzw. 100 μ l Virusüberstand und erneut 1 ml Medium mit 8 μ g/ml Polybrenen hinzugefügt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1000 x g für 1 h bei 20°C und 24 h Inkubation im Zellinkubator erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet. Die Anzahl der erfolgreich transduzierten und damit EGFP-positiven Zellen wurde anschließend prozentual mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt. Zur Titerbestimmung wurden nur FACS-Ergebnisse einbezogen, bei denen maximal 30% EGFP-positive Zellen vorhanden waren, da höhere Transduktionsraten zu mehreren

Insertionen pro Zelle und somit zu unterbestimmten Virustitern führen.¹⁰⁷ Folgende Formel wurde für die Titerberechnung verwendet:

$$\frac{\text{x Viren}}{\text{ml}} = \frac{\text{Eingesetzte Zellzahl} * \text{Anteil EGFP-positiver Zellen (\%)}}{100} * \left(\frac{1000}{\text{Volumen des Virusüberstands}} \right) * 2$$

Um die Virusanzahl in 1 ml zu bestimmen, wird zunächst die Gesamtzellzahl der erfolgreich transduzierten Zellen (EGFP-positiv) ermittelt ((Eingesetzte Zellzahl * Anteil EGFP-positiver Zellen in %)/100). Jede EGFP-positive Zelle enthält eine Virusintegration, so dass damit die Virusanzahl in dem eingesetzten Volumen des Virusüberstands bestimmt ist. Nun kann die Anzahl der Viren pro ml errechnet werden (1000 / Volumen des Virusüberstands in μl). Da γ -Retroviren nur bei der Zellteilung integrieren können und so nur eine Tochterzelle betroffen ist, muss abschließend mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

Retrovirale Transduktion von FH-hTERT. Zur retroviralen Transduktion von FH-hTERT wurden zunächst 6-Well-Platten (Sarstedt) mit jeweils 2 ml Virusüberstand beladen und bei 1000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt zusätzlich 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene. Nach Verwerfen des Überstands wurden $0,5 \times 10^6$ FH-hTERT Zellen (in 0,5 ml Medium) pro Well ausgesät und mit neuem Virusüberstand beschichtet (2 ml Virusüberstand + 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene). Nach 24 h Inkubation wurde die Virusbeladung wiederholt (2 ml Virusüberstand + 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene) mit einem Mediumwechsel nach weiteren 24 h. Nach insgesamt 72 h wurden die Zellen aus einem Well geerntet und die Transduktionseffizienz mit Hilfe der FACS-Analyse ermittelt. Die Zellen aus den restlichen Wells wurden zusammengefasst und für die weiteren Analysen

verwendet. Der Virustiter wurde so eingestellt, dass sich durch die gesamte Transduktion eine *Multiplicity of infection* (MOI - Anzahl der Viruspartikel pro Zelle) von 20 ergab.

3.1.5 Isolation von Einzelzellklonen

Um Einzelzellklone mit relevantem Phänotyp (gesteigerte Proliferation) zu isolieren, wurden EGFP-positive und EGFP-negative, nicht-transduzierte Zellen zu etwa gleichen Teilen gemischt und bei einer Passage von 1:6 bei Konfluenz kultiviert. Mittels FACS-Analyse wurde die Mischkultur etwa 80 Tage lang überwacht und der Anteil an EGFP-positiven Zellen ermittelt. Nach Detektion einer oligoklonalen Dominanz (Zunahme der EGFP-positiven Zellen und Reduktion des CV-Wertes), wurden je 100 Zellen in 60 mm-Zellkulturschalen (Sarstedt) ausgesät. Nach 2 bis 3 Wochen wurden EGFP-positive Kolonien, entstanden aus Einzelzellen, mit Klonierungsringen (Sigma-Aldrich) aufgenommen und für die weitere Charakterisierung expandiert.

3.1.6 Zellproliferation und Serumabhängigkeit (*CellTiter 96*)

Serumabhängigkeit und Proliferation wurden mit Hilfe des *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, WI, USA) bestimmt. Hierbei wird colorimetrisch die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt. Dazu wurden in 96-Well-Platten (0,3 cm²/Well; Sarstedt) 2500 Zellen in 100 µl Medium pro Well ausgesät. Zur Bestimmung der Serumabhängigkeit wurde 24 h nach Aussaat das Medium gewechselt und nach einmaligem Waschen mit PBS mit 0 bzw. 2% serumhaltigem Medium ersetzt. Für jeden Zeitpunkt wurden 8 Wells mit 20 µl *CellTiter 96*-Lösung versetzt und für 1 h im Zellinkubator inkubiert. Die Absorption wurde anschließend mittels Photometer (Ultra Microplate Reader EL 808; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) bei 490 nm

gemessen und damit ein Maß für die Zellzahl bestimmt. Die optische Dichte wurde bis zum Tag 10 ermittelt.

3.1.7 Zellzyklusanalyse

FH-hTERT zeigen, im Gegensatz zu verschiedenen Tumorzelllinien, ein reines Monolayerwachstum. Bei Erreichen einer Konfluenz von 100%, kommt es bei den immortalisierten Hepatozyten, wie für nicht-transformierte Zellen üblich, zur Kontaktinhibition und damit zum Zellzyklusarrest. Um die Kontaktinhibition der abgeleiteten Klone zu untersuchen, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Dazu wurde die DNA der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI; Sigma-Aldrich) markiert und der DNA-Gehalt mit Hilfe der FACS-Analyse ermittelt. Durch die Bestimmung des DNA-Gehalts können die Zellen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zugeordnet und die Anzahl der Zellen in den einzelnen Phasen bestimmt werden. Während die Zellen in der G1-Phase einen einfachen DNA-Gehalt (diploid, $n=2$) besitzen, verdoppelt sich dieser in der S-Phase und liegt schließlich vor der Teilung in der G2 bzw. M-Phase tetraploid ($n=4$) vor.

Es wurden von 40 bis 60% bzw. 100% konfluenten Kulturen jeweils 1×10^6 Zellen geerntet und durch ein $70 \mu\text{m}$ -Zellsieb gegeben, um Zellklumpen abzutrennen. Nach Abzentrifugieren wurde das Zellpellet einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und behutsam in 0,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Danach wurden 5 ml 70% EtOH (-20°C) tröpfchenweise unter Schwenken auf die Zellen gegeben und diese für 2 h auf Eis inkubiert. Mit 5 ml kaltem PBS wurden die Zellen dann rehydriert und anschließend abzentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich mit 0,5 ml

Färbelösung (50 µg/ml PI und 500 U/ml RNase A in PBS) resuspendiert und bei 37°C im Dunkeln für 30 min inkubiert. Danach erfolgte direkt die FACS-Analyse. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 500 x g und 4°C für 5 min. Mit der Analysesoftware ModFit (Verity Software House) wurden die DNA-Histogramme ausgewertet und der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt.

3.1.8 Softagarassay

Zur Überprüfung auf verankerungsunabhängiges Wachstum, ein etablierter *in vitro* Marker für Tumorzellwachstum, wurden Softagarassays durchgeführt.¹⁰⁸ Dazu wurden jeweils 50, 500 und 5000 Zellen in 0,33%-igem Agar verdünnt und auf eine 0,5%-ige Agarschicht in 60 mm-Zellkulturschalen (Sarstedt) ausgesät. Nach 3 Wochen im Zellinkubator wurde das Koloniewachstum durch Auszählen unter dem Mikroskop quantifiziert. HuH7 und HepG2 dienten als positive Kontrollen.

3.1.9 Nacktmausassay

Als *in vivo* Marker für eine maligne Transformation wurde der Nacktmausassay durchgeführt.¹⁰⁹ Dazu wurden 4 bis 10 Wochen alte thymusaplastische Nacktmäuse (*nu/nu*) verwendet, die aufgrund eines eingeschränkten Immunsystems nicht in der Lage sind die transplantierten Zellen abzustößen. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 100 µl DMEM mit 2% Serum und 100 µl ECM Gel (extrazelluläre Matrix vom murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom; Sigma-Aldrich) resuspendiert und subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert. Als Positivkontrolle wurden HuH7 Zellen verwendet. Die Tiere wurden zweimal pro Woche kontrolliert und 1 Jahr lang auf Tumorwachstum untersucht. Zellen mit einem malignen Potenzial entwickelten Tumore, deren Größe mittels Messschieber bestimmt wurde. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 1 cm^3

wurden die Tiere mittels Kohlendioxid getötet. Die Tiere wurden von der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen und dort unter tiergerechten Aspekten und strenger Hygieneüberwachung gehalten. Alle Tierexperimente wurden von der zuständigen Behörde genehmigt und gemäß den geltenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen durchgeführt (Genehmigungsnummer 25/06).

3.1.10 Dualer Luziferase-Reporterassay

Das NF- κ B-Reporterplasmid pB2LUC (NF- κ B; *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene in B-cells 1*) wurde freundlicherweise von PD Dr. G. Sass (Institut für Experimentelle Immunologie und Hepatologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt. pB2LUC enthält 2 NF- κ B-Bindestellen, die bei Bindung von NF- κ B zur Expression der *Firefly*-Luziferase führen. Das zweite Reporterplasmid pRL-CMV mit CMV-getriebener Expression der *Renilla*-Luziferase (Promega) wurde als Kontrolle für die Transfektionseffizienz verwendet. Die Co-Transfektion erfolgte durch Lipofektion (JetPEI; Polyplus Transfection, Illkirch, Frankreich). JetPEI verpackt die DNA in positiv geladene Partikel, die dann mit anionischen Proteoglykanen der Zelloberfläche interagieren und durch Endozytose aufgenommen werden können. Dazu wurden 1×10^5 Zellen pro *Well* in 24-*Well*-Platten ausgesät und nach 24 h mit 1 μ g DNA (Verhältnis pB2LUC/pRL-CMV: 20/1) nach Anweisungen des Herstellers transfiziert. Als Kontrollplasmid wurde das Plasmid M51 verwendet (Verhältnis M51/pRL-CMV: 20/1). 24 h nach Lipofektion wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* (Promega) ausgewertet. Die NF- κ B-Aktivität wurde schließlich anhand der Luziferaseaktivität ermittelt und mit der Transfektionseffizienz korrigiert (pB2LUC/pRL-CMV).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmung und Analyse von RNA und DNA

Absorptionsmessung. Die Konzentrationen von RNA bzw. DNA wurden mittels Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer (Eppendorf BioPhotometer; Eppendorf AG) in einer Verdünnung von 1:100 (2 µl Probe + 198 µl A. bidest.) bestimmt. Durch die BioPhotometer Software wurden die entsprechenden Konzentrationen ermittelt. Zusätzlich wurde der Absorptionskoeffizient 260/280 nm gemessen, der Aufschluss über die Reinheit von Nukleinsäuren gibt. Reine RNA weist einen Quotienten von 1,8 bis 2 auf.¹¹⁰

Agarosegelelektrophorese. Die Agarosegelelektrophorese wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Integrität der RNA zu untersuchen und um DNA-Fragmente analytisch oder präparativ zu trennen. Für die DNA-Analyse wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet. Dazu wurde 2 g Agarose (Sigma-Aldrich) in 100 ml 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM Eisessig) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde 100 µg Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) hinzugegeben und die Agaroselösung in eine Gießvorrichtung (12 x 14 cm; Thermo Scientific) gegossen. Nach Verfestigung des Gels, wurde dieses in ein Gelsystem (Owl B2 EasyCast Mini Gel System; Thermo Scientific) überführt, das mit 1 x TAE-Puffer gefüllt war. Neben einem DNA-Standard (*TrackIt 25 bp DNA Ladder*, Invitrogen; *TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen und peqGOLD Leiter Mix Orange G, Peqlab, Erlangen, Deutschland) wurden die DNA-Proben mit einem 6 x Auftragspuffer (Peqlab) versetzt und aufgetragen. Die Trennung der RNA-Fragmente fand in einem 1%-igen Agarosegel statt. 1 g Agarose (Sigma-Aldrich) wurden hier mit 10 ml 10 x FA-Puffer (200 mM MOPS pH 7, 50 mM Natriumacetat,

10 mM EDTA) versetzt, mit RNase-freiem A. bidest. auf 100 ml aufgefüllt und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurden 100 µg Ethidiumbromid und 1,8 ml 37%-iges Formaldehyd zugegeben und die Lösung in die Gießvorrichtung (12 x 14 cm; Thermo Scientific) gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es für mindestens 30 min in 1 x FA-Puffer (100 ml 10 x FA-Puffer, 20 ml 37%-iges Formaldehyd auf 1000 ml A. bidest.) in dem Gelsystem (Thermo Scientific) äquilibriert. Die RNA-Proben wurden mit einem 2 x Auftragspuffer (0,05% (w/v) Bromphenolblau, 80 µl 500 mM EDTA, 720 µl 37%-iges Formaldehyd, 2 ml 100%-iges Glycerin, 3084 µl Formamid, 4 ml 200 mM MOPS, 116 µl A. bidest.) versetzt, 5 min bei 65°C inkubiert und neben einen RNA-Standard (*0,5-10 Kb RNA Ladder*; Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 140 V in 1 x FA-Puffer bei RNA und in 1 x TAE-Puffer bei DNA. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (ChemiDocTM XRS+ Imaging Systems; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) analysiert.

3.2.2 LM-PCR

Die Integrationsstellen des Provirus in das Genom der Klone wurden mit Hilfe der *Ligation-mediated polymerase chain reaction* (LM-PCR) ermittelt (Abbildung 8).¹⁰² Da die LTR-Sequenz des integrierten retroviralen Vektors bekannt ist, kann ein vektorspezifischer Primer verwendet werden. Nach Bindung und Verlängerung des LTR-Primers entsteht ein DNA-Strang, der die Sequenz der unbekannt flankierenden genomischen DNA enthält. Durch Ligation eines Linkers an das 3'-Ende des synthetisierten DNA-Fragments, kann dieses nun amplifiziert werden. Das Produkt lässt sich anschließend direkt sequenzieren, so dass der Integrationsort des Vektors in das

Genom bestimmt werden kann.

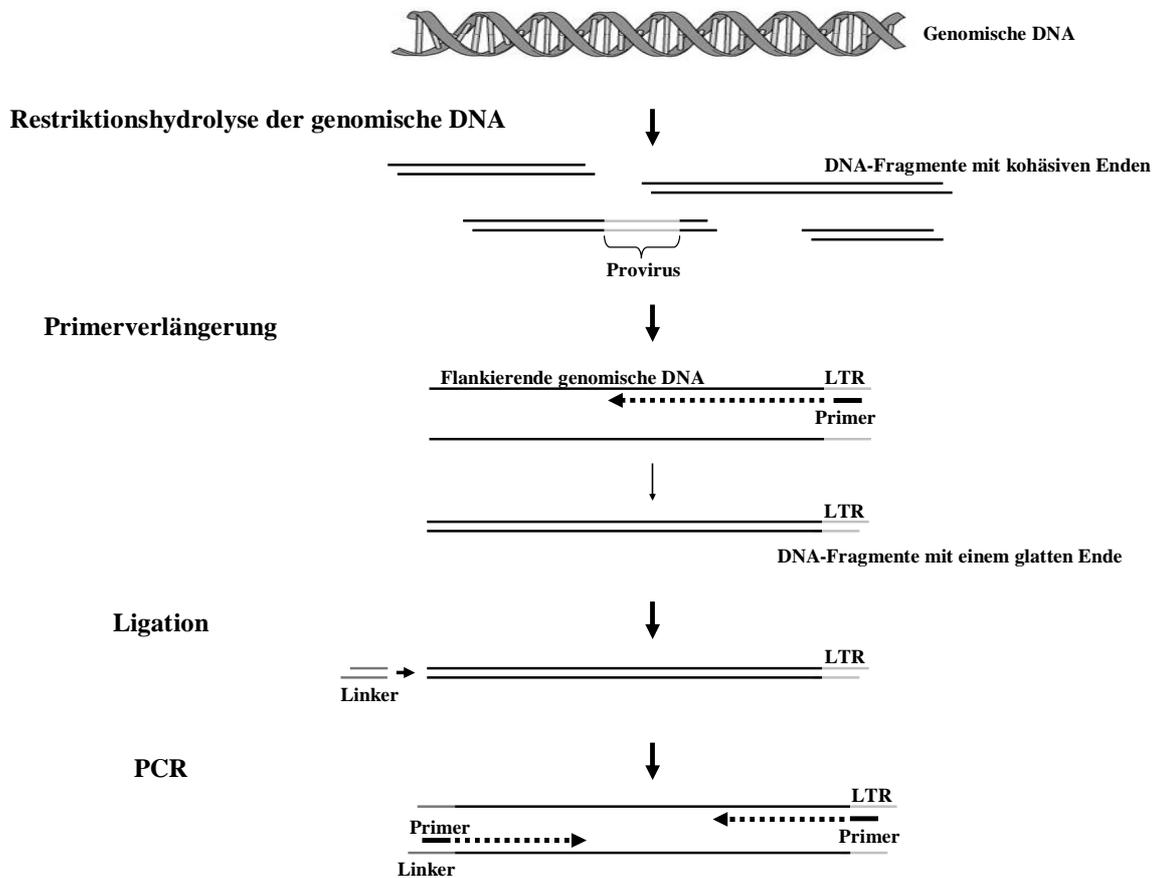


Abbildung 8: Ablauf der LM-PCR. Durch Restriktionshydrolyse der genomischen DNA entstehen verschieden große Fragmente mit kohäsiven Enden (Restriktionshydrolyse). Aufgrund der bekannten Sequenz des Vektors kann ein Primer genutzt werden, der an die 5'-LTR-Region des Provirus bindet. Dieser kann dann in 3'-Richtung bis in die unbekannte genomische DNA verlängert werden (Primerverlängerung). Es entstehen doppelsträngige DNA-Fragmente mit einem glatten Ende. An dieses Ende wird in der nächsten Reaktion ein Linker angefügt (Ligation). Da die Sequenz des Linkers bekannt ist, kann nun das entstandene DNA-Fragment durch eine PCR amplifiziert werden. Die Primer binden dabei an die Linker- bzw. an die 5'-LTR-Sequenz (PCR). Die unbekannte genomische DNA-Sequenz, die den Integrationsort des Provirus identifiziert, wird durch die PCR amplifiziert und kann anschließend mit Hilfe einer Sequenzierung analysiert werden.

Restriktionshydrolyse. Zunächst erfolgte eine Restriktionshydrolyse der genomischen DNA. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Für den Verdau wurden so genannte *4-Cutter*-Enzyme verwendet. Diese weisen eine Erkennungssequenz von 4 Basen auf und erzeugen somit

durchschnittlich DNA-Fragmente von etwa 256 bp. Die Enzyme wurden mit dem vom Hersteller angegebenen optimalen Puffer (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, Deutschland) angewendet.

Die Ansätze enthielten 10 µl genomische DNA (~ 0,2 µg), 0,5 µl Restriktionsenzym Tsp509I (10 U/µl), 3 µl 10 x Restriktionspuffer, 0,5 µl RNase (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) auf 30 µl A. bidest.. Die Inkubation fand zunächst für 15 min bei 37°C statt, gefolgt von 2 h bei 65°C (T3 Thermocycler; Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Durch den Verdau mit Tsp509I werden DNA-Fragmente mit kohäsiven Enden erzeugt. Um die DNA anschließend von Enzymen und Puffern zu reinigen, wurde eine Fällung durchgeführt. Dazu wurden die Restriktionsansätze mit 3 µl 0,3 M Na-Acetat pH 5, 75 µl 100%-igem Ethanol und 1 µl Glycogen (20 µg/µl; Roche Applied Science) vermischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 4°C und 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 R; Eppendorf AG) wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit 70 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm und 4°C und Verwerfen des Überstandes, wurde das DNA-Pellet getrocknet und die DNA anschließend mit 10 µl A. bidest. resuspendiert.

Primerverlängerung. Bei der Primerextension werden die DNA-Fragmente zunächst denaturiert. Dann folgt die Bindung eines spezifischen und mit Biotin konjugierten Primers an die 5'-LTR-Region und schließlich die Verlängerung des Primers in 3'-Richtung vom Provirus aus in das Zellgenom. Es entstehen DNA-Doppelstränge, die aus LTR- und provirusflankierenden Sequenzen und einem glatten Ende bestehen. Aufgrund der identischen Sequenz von 3'- und 5'-LTR-Region bindet der biotinylierte Primer ebenfalls

an der 3'-LTR-Region. Das verwendete Restriktionsenzym Tsp509I schneidet auch innerhalb der Provirussequenz von SF11 α EGFP_{prev}. So entsteht mit der Verlängerung des biotinylierten Primers an der 3'-LTR-Region ein Fragment, das nur die Sequenz des Provirus enthält. In diesem Fall ist das Fragment 162 bp groß und dient als interne Kontrolle. Der biotinylierte Primer (Tabelle 1) wurde mit einer Konzentration von 0,25 pmol/ μ l verwendet. Die Ansätze wurden bei 95°C für 5 min, gefolgt von 30 min bei 64°C und schließlich bei 72°C für 15 min wie folgt inkubiert: 10 μ l DNA, 1 μ l *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/ μ l; Stratagene, La Jolla, CA, USA), 2 μ l 10 x *Pfu* Puffer (Stratagene), 0,4 μ l 10 mM dNTPs (Stratagene), 1 μ l biotinylierter Primer auf 20 μ l A. bidest..

Reinigung der DNA. Nach der Verlängerung des mit Biotin gekoppelten Primers erfolgte eine Reinigung der DNA mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die von DNA-Polymerase, Salzen und Puffer befreite DNA wurde dann in 40 μ l A. bidest. resuspendiert und in die Biotin-Streptavidin-Reaktion eingesetzt.

Biotin-Streptavidin-Reaktion. Durch die Biotinylierung der doppelsträngigen DNA kann diese nun an magnetisierte und mit Streptavidin gekoppelte Partikel gebunden und somit von anderen DNA-Fragmenten, die keine Vektorsequenz enthalten, abgetrennt werden. Pro Ansatz wurden 20 μ l Magnetpartikel (Dynabeads M-280 Streptavidin; 10 mg/ml; Dynal, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die *Beads* wurden zunächst zweimal mit einem magnetischen Reaktionsgefäßhalter (MagnaRack; Invitrogen) mit 100 μ l 2 x BW Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl) gewaschen. Die gewaschenen Magnetpartikel wurden anschließend in 40 μ l 2 x BW Puffer resuspendiert. Danach wurden jeweils 40 μ l DNA mit 40 μ l gewaschenen *Beads* vermischt und für etwa 3 h bei Raumtemperatur rotierend inkubiert (Rotator; Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland),

um die Magnetpartikel und die biotinylierten DNA-Fragmente zu binden. Durch 2-maliges Waschen mit dem magnetischen Reaktionsgefäßhalter mit jeweils 100 µl A. bidest. wurde schließlich nicht-biotinylierte von biotinylierter DNA getrennt. Das DNA-*Bead*-Konjugat wurde anschließend in 5 µl A. bidest. resuspendiert.

Ligation der Linker. Für die Ligation wurde ein doppelsträngiger Polylinker verwendet. Um diesen herzustellen, wurden 20 µl Polylinker *Forward* (200 pmol/µl) und 20 µl Polylinker *Reverse* (200 pmol/µl) (Tabelle 1) mit 40 µl A. bidest. vermischt und für 5 min bei 70°C in einem Wasserbad (GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH) inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 20 µl 5 x *Annealing* Puffer (0,5 M Tris-HCl pH 7,4-7,5, 0,35 M MgCl₂) versetzt und für weitere 5 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Wasserbad ausgeschaltet, der Ansatz über Nacht im Wasserbad gelassen und schließlich bei -20°C gelagert. Bei Hybridisierung der beiden Sequenzen entsteht ein Doppelstrang mit einem glatten und einem kohäsiven Ende. Dadurch wird sichergestellt, dass es nur zur Ligation der glatten Enden kommt. Eine falsche Orientierung wird so verhindert. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 µl. Die Ansätze enthielten 5 µl DNA-*Bead*-Konjugat, 0,2 µl T4 DNA Ligase (400 U/µl), 1 µl entsprechender T4-Ligasepuffer, 1 µl Polylinker und 2,8 µl A. bidest.. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert, zweimal mit 100 µl A. bidest. mit dem magnetischen Reaktionsgefäßhalter gewaschen und schließlich in 10 µl A. bidest. resuspendiert. Als Produkt der Ligation entstehen doppelsträngige DNA-Fragmente verschiedener Länge, deren terminale Regionen identisch sind. So besteht der eine Terminus aus der Sequenz des Linkers, während der andere der Basenabfolge des biotinylierten Primers entspricht. In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR - *Polymerase chain reaction*) ist es nun möglich

die DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren.¹¹¹

PCR. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe einer zweistufigen PCR (*Nested-PCR*). Dabei werden in einer ersten PCR-Reaktion die DNA-Fragmente zunächst amplifiziert, die dann in einer zweiten PCR als Matrize dienen. Die *Nested-PCR* bietet hohe Sensitivität und hohe Spezifität. So können gewünschte Sequenzen, die relativ zur Gesamt-DNA nur in geringer Menge in der Probe vorhanden sind, amplifiziert werden. Die *Nested-PCR* generiert dabei ausreichend DNA-Mengen, die für weitere Prozeduren, wie etwa für die Sequenzierung, genutzt werden können. Außerdem kann es bei der einstufigen PCR, aufgrund von unspezifischer Bindung der Primer, zu unerwünschten Produkten kommen. Bei der *Nested-PCR* wird dies reduziert, da in der zweiten PCR ein anderes Primerpaar als in der ersten PCR verwendet wird.

Zur Amplifikation der DNA-Fragmente in der ersten PCR wurde ein Mastermix (*Extensor Hi-Fidelity PCR Mastermix*; ABgene, Hamburg, Deutschland) verwendet. Der Mix enthält ein Gemisch aus Polymerasen mit *Proofreading*-Funktion, Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl₂ und Auftragspuffer für die Gelelektrophorese. Die Primer wurden so gewählt, dass diese in der Region des Linkers bzw. der LTR-Sequenz binden (Tabelle 1). Die 25 µl Ansätze enthielten 1 µl DNA-*Bead*-Konjugate, 12,5 µl Mastermix, 1 µl 1st Linkerprimer (25 pmol/µl), 1 µl 1st Vektorprimer (25 pmol/µl) auf 25 µl A. bidest.. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Der initiale Denaturierungsschritt erfolgte für 2 min bei 94°C, woran sich 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 15 s, *Annealing* bei 60°C für 30 s und Polymerisation bei 68°C für 2 min anschlossen. Mit einem 10-minütigen Polymerisationsschritt bei 68°C wurde die Reaktion beendet. Das PCR-Produkt aus der ersten PCR wurde nun als Matrize unter gleichen Bedingungen in die zweite PCR

eingesetzt. Dabei wurde das Produkt 1:300 verdünnt und als Primer wurden je 25 pmol/μl *Nested*-Linkerprimer und *Nested*-Vektorprimer (Tabelle 1) verwendet, die weiter innen liegen, so dass das Amplifikat der zweiten PCR eine kürzere Basenpaarlänge als das Produkt aus der ersten PCR aufweist. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (T3 Thermocycler; Biometra GmbH) durchgeführt.

Agarosegelelektrophorese. Um die entstandenen PCR-Produkte präparativ in der Agarosegelelektrophorese zu trennen, wurde die gesamte Probe aus der *Nested*-PCR auf ein 2%-iges Agarosegel geladen. Neben dem Standard (*TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder*; Invitrogen) wurden die Proben direkt aufgetragen, da der Mastermix bereits Auftragspuffer enthielt. Der Gellauf wurde, wie in 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Das Ausschneiden der dominanten DNA-Banden erfolgte schließlich auf dem UV-Schirm mit einem Skalpell und die Extraktion der DNA aus dem Gel gemäß den Herstellerangaben mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

Sequenzanalyse. Um die einzelnen DNA-Fragmente zu sequenzieren und so die unbekannt genomischen Sequenzen, in die das Provirus integriert hat, zu identifizieren, wurden die Proben bei der DNA-Extraktion in jeweils 50 μl A. bidest. eluiert und anschließend mit einem Thermoblock (Eppendorf Thermomixer Comfort; Eppendorf AG) bei 55°C und geöffnetem Deckel auf etwa 12 μl eingedampft. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt, wobei der LTR-spezifische Sequenzierprimer RASEQ (12 μl Probe + 3 μl 10 pmol/μl RASEQ) (Tabelle 1) verwendet wurde. Mit Hilfe von verschiedenen Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und <http://www.ensembl.org/index.html>) konnten die erhaltenen Sequenzen mit dem humanen Genom (NCBI 37,1 human genome build,

Oktober 2009; Ensemble GRCh37, Februar 2009) verglichen und die Integrationsstellen so identifiziert werden. Die LM-PCR wurde für jeden Klon zweimal durchgeführt, um das Bandenmuster zu reproduzieren. Nur reproduzierbare DNA-Banden wurden aus dem Gel extrahiert und sequenziert.

Tabelle 1: Primer der LM-PCR. In Tabelle 1 sind die in der LM-PCR verwendeten Primer dargestellt. Die Sequenzen wurden in Anlehnung an Paruzynski *et al.* ausgesucht und von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.¹¹²

Name	Basensequenz (5' - 3')
Biotinylierter Primer	Biotin-CTG GGG ACC ATC TGT TCT TGG CCT C
Polylinker <i>Forward</i>	<u>GAC CCG</u> GGA GAT CTG AAT TCA GTG GCA CAG CAG TTA GG*
Polylinker <i>Reverse</i>	CCT AAC TGC TGT GCC ACT GAA TTC AGA TCT CCC G*
1 st Linkerprimer	GCC CTT GAT CTG AAC TTC TC
1 st Vektorprimer	GAC CCG GGA GAT CTG AAT TC
<i>Nested</i> -Linkerprimer	CCA TGC CTT GCA AAA TGG C
<i>Nested</i> -Vektorprimer	AGT GGC ACA GCA GTT AGG
RASEQ	CTT GCA AAA TGG CGT TAC

* Bei Aneinanderlagerung der beiden Polylinkersequenzen entsteht ein Doppelstrang mit einem glatten und einem kohäsiven Ende (Überhang ist unterstrichen).

3.2.3 Platinum-PCR

Mit Hilfe der LM-PCR wurden für Klon 4, aufgrund einer sehr kurzen Sequenz, zwei mögliche Insertionsstellen identifiziert. Um die richtige Integrationsstelle in das Genom herauszufinden, wurde jeweils 1 neuer *Antisense*-Primer (Tabelle 2), der in Richtung 3'-Ende der identifizierten Sequenz lag, synthetisiert. Die Primer wurden so gewählt, dass die eventuellen PCR-Produkte eine Länge von 306 bzw. 207 bp aufwiesen. Als *Sense*-Primer wurde für beide Ansätze der bereits für die Sequenzierung verwendete RASEQ Primer (siehe Tabelle 1) genutzt, der in der LTR-Region des Provirus bindet. Für die PCR wurde der *Platinum PCR SuperMix* (Invitrogen) verwendet, der neben einer

Taq DNA-Polymerase, Mg^{2+} , dNTPs und Reaktionspuffer enthält. Die 25 μ l Ansätze enthielten 1 μ l DNA (80-100 ng/ μ l), 22,5 μ l Mastermix (1,1 x), 0,75 μ l RASEQ (6,67 pmol/ μ l), 0,75 μ l *Antisense-K4-1* bzw. *Antisense-K4-2* (6,67 pmol/ μ l). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Der initiale Denaturierungsschritt erfolgte für 2 min bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, *Annealing* bei 46°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 1 min. Die Auswertung erfolgte in einem 2%-igen Agarosegel.

Tabelle 2: Primer der Platinum-PCR. Neben der Sequenz der Primer sind die Größen der erwarteten PCR-Produkte angegeben. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Als *Sense*-Primer wurde der bereits für die Sequenzierung verwendete RASEQ Primer (siehe Tabelle 1) genutzt.

Name	Basensequenz (5' - 3')	PCR-Produkt
<i>Antisense-K4-1</i>	ATG CTT CGG TCA CAA ATG	306 bp
<i>Antisense-K4-2</i>	GAG GAT AAT TCC AAG AGC	207 bp

3.2.4 EGFP-Kopienzahlanalyse

Um die tatsächliche Anzahl der Virusinsertionen zu bestimmen, wurde eine EGFP-Kopienzahlanalyse durchgeführt. Die quantitative Messung der EGFP-Kopien fand im *Light Cycler System* (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) statt. Dazu wurde zunächst die DNA der einzelnen Klone mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Als Standard für den EGFP-Lauf wurde der Vektor LeGO-G2 verwendet, der als Insert eine Kopie des EGFP-Gens enthält.¹¹³ Dieser Vektor besitzt 7137 bp mit einem Gewicht von $7,89 \times 10^{-6}$ pg ($1,1 \times 10^{-21}$ g = 1 bp), was $6,34 \times 10^6$ EGFP-Kopien pro 50 pg Vektor entspricht. Die Standardreihe, bei der 1:10-Verdünnungen des Vektors eingesetzt wurden, wurde vorher erstellt und für weitere Läufe importiert. Zur Kontrolle wurden bei jedem Lauf zwei Standards mitgeführt. Die Reaktionen mit einem

Gesamtvolumen von 20 µl enthielten neben 2 µl Mastermix (*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*; Roche Diagnostics), 1 µl genomische DNA der Klone (25 ng), 1 µl Primer-Mix (Endkonzentration 0,5 µM) (Tabelle 3), 1,6 µl MgCl₂ (Endkonzentration 3 mM) und 14,4 µl A. bidest.. Das Programm des EGFP-Laufs war wie folgt: 95°C für 10 min, 45 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 10 min, *Annealing* bei 62°C für 7 min und Elongation bei 72°C für 5 min, schließlich das Abkühlen für 30 min bei 40°C. Mit Hilfe der Standardkurve konnte dann die EGFP-Kopienzahl in der eingesetzten genomischen DNA bestimmt werden. Anschließend wurde im *Light Cycler System* die der eingesetzten DNA entsprechende Zellzahl ermittelt, um dann die Anzahl der EGFP-Kopien pro Zelle zu bestimmen. Dazu wurde genomisches β-Globin in den Proben amplifiziert. Die Ansätze enthielten jeweils 20 µl mit 200 ng genomische DNA, 2 µl Mastermix (*LightCycler FastStart DNA Master HybProbe*; Roche Diagnostics), 1 µl Primer-Mix (Endkonzentration 0,5 µM) (Tabelle 3), 2,4 µl MgCl₂ (Endkonzentration 4 mM), jeweils 2 µl Hybridisierungssonden LC (Endkonzentration 0,4 µM) und FL (Endkonzentration 0,2 µM) (Tabelle 3) und A. bidest.. Der interne Standard für den β-Globin-Lauf war *Human Genomic DNA Template for Control Reaction* aus dem β-Globin Kit (Roche Diagnostics). 60 ng Kontroll-DNA entsprechen 1×10^4 Zellen. Zur Erstellung einer Standardreihe wurden 1:10-Verdünnungen des Standards eingesetzt. Wie zuvor wurde die Standardreihe vorher erstellt und in den Lauf importiert. Als Kontrolle wurden zwei Standards bei jedem Lauf mitgeführt. Das Programm des β-Globin-Laufs bestand aus: 95°C für 10 min, 45 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 10 min, *Annealing* bei 55°C für 10 min und Elongation bei 72°C für 5 min und schließlich das Abkühlen für 30 min bei 40°C. Die der eingesetzten DNA entsprechende Zellzahl wurde mit Hilfe der Standardreihe ermittelt. Mit der Gesamt-EGFP-Kopienzahl und der Gesamtzellzahl wurde abschließend

die EGFP-Kopienzahl pro Zelle berechnet.

Tabelle 3: Primer bzw. Hybridisierungssonden der EGFP-Kopienzahlanalyse. Tabelle 3 enthält die Sequenzen der Primer bzw. Hybridisierungssonden, die in der Kopienzahlanalyse verwendet wurden. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Hybridisierungssonden, markiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff, stammen aus dem LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche Diagnostics).

Name	Basensequenz (5' - 3')
GFP <i>Forward</i>	TGC AGT GCT TCA GCC GCT A
GFP <i>Reverse</i>	GGT GCG CTC CTG GAC GTA G
β -Globin <i>Forward</i>	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
β -Globin <i>Reverse</i>	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
FL	CAA ACA GAC ACC ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GA -FL
LC	LC-AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AA -p*

* Die LC-Sonde ist am 3'-Ende phosphoryliert, damit es zu keiner Verlängerung durch die Polymerase kommt.

3.2.5 RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem *NucleoSpin RNA II Kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Ein zusätzlicher DNase-Verdau zur Eliminierung genomischer DNA erfolgte im Verlauf der Isolierung nach Angaben des Herstellers. Nach Bestimmung der Konzentration im Spektralphotometer und Überprüfung der Integrität mittels Gelelektrophorese, erfolgte die reverse Transkription. Diese wurde mit dem *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde 1 μ g totale RNA pro Ansatz eingesetzt und der *Thermocycler* von Applied Biosystems (GeneAmp PCR System 9700, Foster City, CA, USA) verwendet. Die cDNA-Endkonzentration betrug anschließend 50 ng/ μ l pro Ansatz.

3.2.6 qRT-PCR

In den abgeleiteten Klonen wurden verschiedene Gene auf eine Änderung in der Expression untersucht. HuH7 wurde dabei als zusätzliche Kontrolle verwendet. Ein Vergleich der Expression in den untersuchten Klonen mit dieser Tumorzelllinie war jedoch kein Kriterium für eine relevante Expressionsänderung, da das HCC ein sehr heterogener Tumor ist und HuH7 nur ein Teil der möglichen Veränderungen der Hepatokarzinogenese repräsentiert. Um die Veränderungen in der Expression zu detektieren, wurde eine quantitative *Real time*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dazu wurden *QuantiTect Primer Assays* (Qiagen), die bereits validierte Primersets für spezifische Gene enthalten, in Kombination mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen) verwendet. Das Ansatzvolumen betrug jeweils 10 µl: 5 µl 2 x *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, 1 µl 10 x *QuantiTect Primer Assay*, 1 µl cDNA (50 ng/µl) und 3 µl A.bidest.. Die PCR wurde in 384-Well-Platten (Sarstedt) mit dem ABI Prism 7900H Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt, wobei die Polymeraseaktivierung für 15 min bei 95°C stattfand. Danach folgten 40 Zyklen aus Denaturierung für 15 s bei 94°C, *Annealing* der Primer für 30 s bei 55°C und Elongation für 30 s bei 72°C. Anschließend wurde für jedes Amplikon die PCR-Effizienz (E) berechnet und dann die relative Expression der zu untersuchenden Gene mit dem effizienzkorrigiertem Model der relativen Quantifizierung ermittelt ($E^{\Delta C_t[\text{zu untersuchendes Gen}]} / E^{\Delta C_t[\text{Basket Housekeeper}]}$).¹¹⁴ Als interne Kontrolle wurden verschiedene Referenzgene als sogenannte *Basket housekeeper* zusammengefasst: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ribosomales Protein L13a (RPL13A), β -2-Microglobulin (B2M), TATA-Bindungsprotein (TBP).

3.2.7 Überprüfung der Relevanz

Die Genexpression der durch die LM-PCR detektierten Gene wurde zusätzlich in humanen HCC-Proben im Vergleich zu gesundem Lebergewebe mittels qRT-PCR ermittelt, um die Relevanz in der humanen Hepatokarzinogenese zu überprüfen. Dazu wurden in einer Pilotstudie humane HCC-Proben gesammelt (Σ 5 Proben). Die Ethikkommission genehmigte die Verwendung dieser Proben (Genehmigungsnummer PV3578). Die Extraktion und reverse Transkription der Gesamt-RNA erfolgte, wie in 3.2.5 beschrieben. Bei 2 HCC-Proben wurde RNA aus dem Randbereich und dem Zentrum des Tumors gewonnen. Außerdem wurde die RNA aus insgesamt 4 Proben gesundem Lebergewebe isoliert. Eine dieser Proben diente daraufhin als Kontrolle in der qRT-PCR, die, wie in 3.2.6 beschrieben, durchgeführt wurde.

3.3 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens mit drei separaten Ansätzen durchgeführt und zweimal wiederholt. Die gezeigten Daten sind die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Student-t-Test für unpaarige Stichproben. Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn der p-Wert unter 0,05 lag.

4 Ergebnisse

Das HCC stellt weltweit das häufigste direkt mit einer chronischen Entzündung assoziierte Malignom dar. Im Rahmen der mehrstufigen Hepatokarzinogenese kommt es bei anhaltender Schädigung des Lebergewebes mit permanenter Regeneration und Proliferation von Hepatozyten im entzündlichen Milieu zu genetischen Veränderungen. Dabei wird die Aktivierung der Telomerase als ein früher Schritt im Transformationsprozess angesehen. Die Stabilisierung der Telomere stellt eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Voraussetzung für die maligne Transformation humaner Hepatozyten dar. Zusätzliche genetische Alterationen sind nötig, um eine vollständige Transformation auszulösen. In diesem Projekt wurden Telomerase-immortalisierte humane fetale Hepatozyten als nicht-malignes Zellkulturmodell für proliferierende Hepatozyten eingesetzt. Um weitere für die Hepatokarzinogenese wichtige Signalwege und somit den Übergang von einer reparierenden in eine dysregulierte Regeneration zu identifizieren, wurden mittels retroviraler Insertionsmutagenese genetische Veränderungen induziert, die in den immortalisierten Zellen eine Transformation auslösen. Nach Isolation von Einzelzellklonen wurden mittels LM-PCR und qRT-PCR die Insertionen der einzelnen Klone identifiziert, funktionell charakterisiert und zu den phänotypischen Veränderungen in Beziehung gesetzt.

4.1 Retrovirale Transduktion mit SF11 α EGFP β

Um mittels Insertionsmutagenese genetische Veränderungen in FH-hTERT auszulösen, wurde in dieser Arbeit SF11 α EGFP β als replikationsinkompetenter γ -retroviraler Vektor mit EGFP als Marker eingesetzt. Die immortalisierten Hepatozyten wurden in 2 Ansätzen jeweils mit einer MOI von 20 transduziert und die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse ermittelt (Abbildung 9).

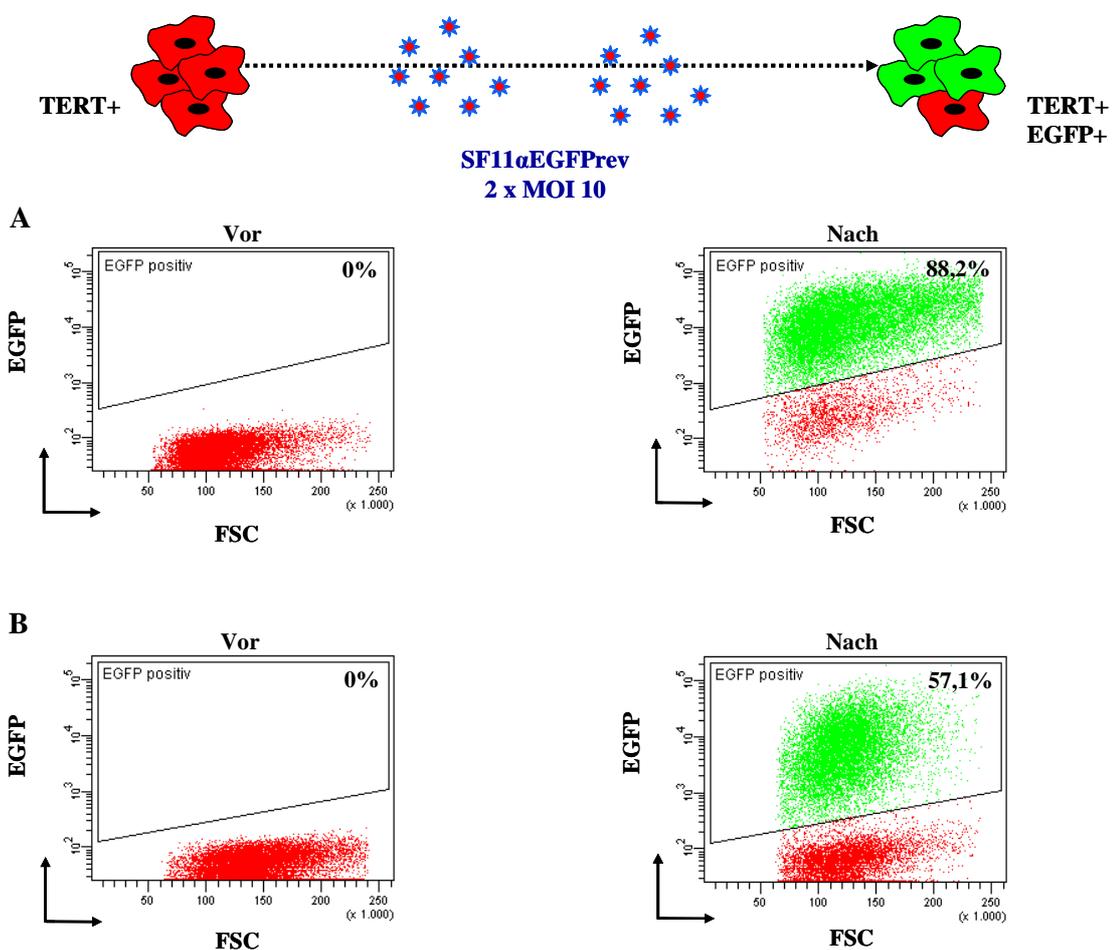


Abbildung 9: Transduktion von FH-hTERT mit SF11 α EGFP β . FACS-Plot (EGFP gegen FSC). **A** Anteil (%) EGFP-positiver Zellen vor und nach Transduktion von FH-hTERT mit SF11 α EGFP β im ersten Ansatz. **B** Anteil EGFP-positiver Zellen vor und nach Transduktion im zweiten Ansatz.

Nach Transduktion waren im ersten Ansatz 88,2% und im zweiten Ansatz 57,1% der Zellen EGFP-positiv (FH-hTERT EGFP).

4.2 Isolation von Einzelzellklonen

4.2.1 Mischkulturen

Nach Transduktion wurden je Ansatz 3 Mischkulturen (M1-M6) angesetzt, indem EGFP-positive und EGFP-negative, nicht-transduzierte Zellen zu etwa gleichen Teilen gemischt und bei einer Passage von 1:6 bei Konfluenz kultiviert wurden. Mittels FACS-Analyse wurden die Mischkulturen etwa 80 Tage lang überwacht und der Anteil an EGFP-positiven Zellen ermittelt. Ziel war es, die Zellklone mit relevanter Änderung im Phänotyp (gesteigerte Proliferation) in den Kulturen anzureichern, um dann von diesen Kulturen Einzelzellklone abzuleiten (Abbildung 10 und 11).

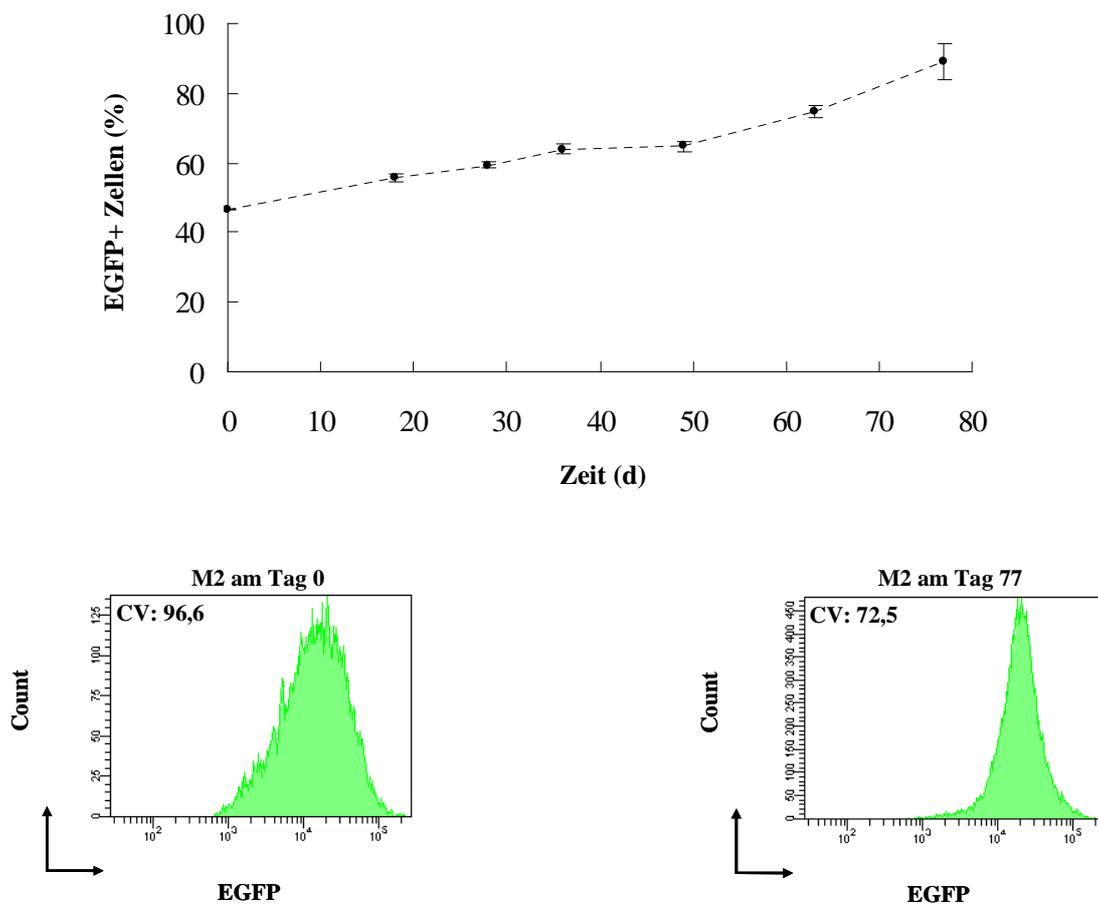


Abbildung 10: Mischkultur. Zunahme (%) der EGFP-positiven Zellen in den Mischkulturen M1 bis 3. EGFP-Streuung (Count gegen EGFP) mit CV-Werten am Tag 0 bzw. 77 exemplarisch für Mischkultur M2.

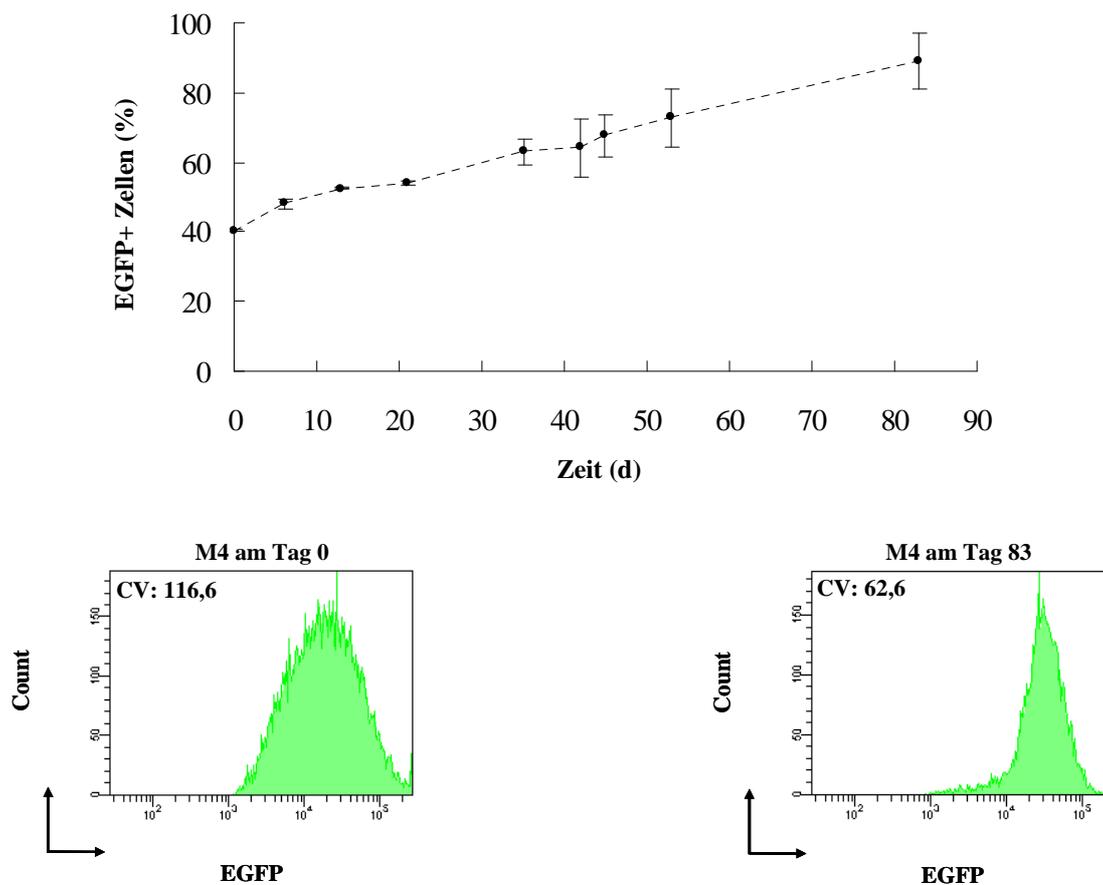


Abbildung 11: Mischkultur. Zunahme (%) der EGFP-positiven Zellen in den Mischkulturen M4 bis 6. EGFP-Streuung (Count gegen EGFP) mit CV-Werten am Tag 0 bzw. 83 exemplarisch für Mischkultur M4.

Nach 77 Tagen war in den Mischkulturen (M1-3) aus dem ersten Ansatz ein Anstieg der EGFP-positiven Zellfraktion von $46,4\% \pm 0,1\%$ auf $89\% \pm 5,1\%$ (M2: $46,5\%$ auf $92,7\%$) zu beobachten. In den Mischkulturen (M4-6) des zweiten Ansatzes war nach 83 Tagen ein Anstieg von $40,3\% \pm 0,4\%$ auf $89\% \pm 8\%$ (M4: $50,5\%$ auf $95,4\%$) zu verzeichnen. Außerdem zeigte sich eine signifikante Reduktion in der EGFP-Streuung (Reduktion des CV-Wertes), was auf eine oligoklonale Dominanz EGFP-positiver Zellen mit Hyperproliferation hinweist. So reduzierte sich im ersten Ansatz der CV-Wert von 96,6 auf 72,5 (M2 exemplarisch) nach 77 Tagen. Der zweite Ansatz zeigte eine Reduktion des CV-Wertes von 116,6 auf 62,6 (M4 exemplarisch) nach 83 Tagen.

4.2.2 Einzelzellklone

Um Einzelzellklone zu isolieren, wurden die Zellen aus den Mischkulturen M2, M3 und M4 in sehr geringer Dichte ausgesät. Die nach etwa 2 bis 3 Wochen entstandenen EGFP-positiven Kolonien wurden schließlich mit Klonierungsringsen aufgenommen und mittels FACS-Analyse ausgewertet (Abbildung 12 und 13). Insgesamt wurden 16 Einzelzellklone (K1-16) abgeleitet und expandiert.

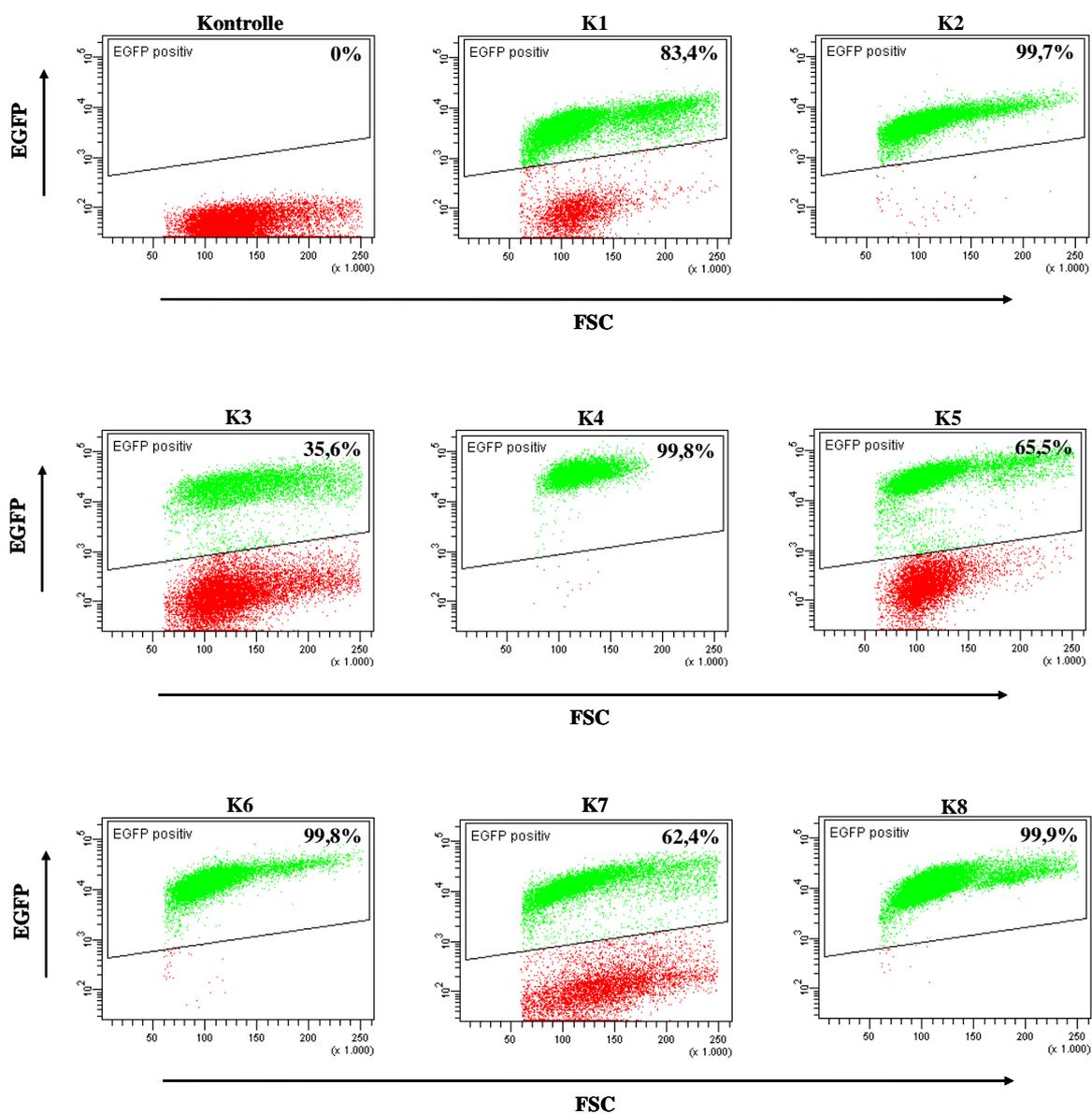


Abbildung 12: Einzelzellklone. FACS-Plot (EGFP gegen FSC). Anteil (%) EGFP-positiver Zellen der einzelnen Klone (K1-K8) aus Mischkultur M2 und M3.

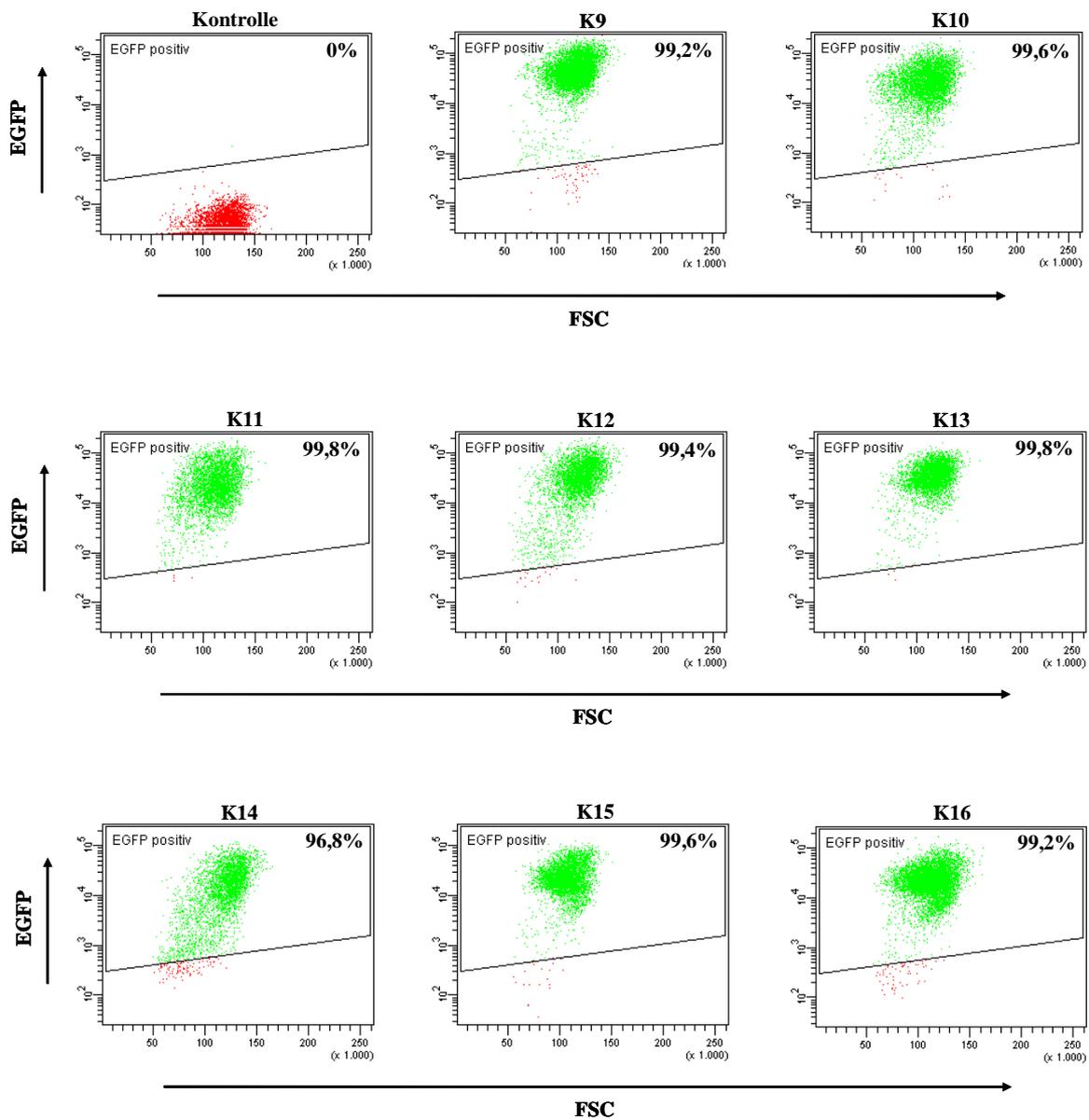


Abbildung 13: Einzellzellklone. FACS-Plot (EGFP gegen FSC). Anteil (%) EGFP-positiver Zellen der einzelnen Klone (K9-K16) aus Mischkultur M4.

Für die weiteren Experimente wurden die Klone verwendet, die über 99% EGFP-positive Zellen aufwiesen. Im ersten Ansatz wurden Klon 2 (99,7%), Klon 4 (99,8%), Klon 6 (99,8%) und Klon 8 (99,9%) für weitere Analysen identifiziert. Aus dem zweiten Ansatz wurden Klon 9 (99,2%), Klon 10 (99,6%), Klon 11 (99,8%), Klon 12 (99,4%), Klon 13 (99,8%), Klon 15 (99,6%) und Klon 16 (99,2%) weiterverwendet.

4.3 Bestimmung der Insertionsstellen von SF11 α EGFP_{rev}

4.3.1 LM-PCR

Die Integrationsorte des Provirus in das Genom der 16 abgeleiteten Einzelzellklone wurden mit Hilfe der LM-PCR ermittelt. Dabei wird ein sequenzspezifischer Primer verwendet, der an die LTR-Region bindet und bis in die unbekannte flankierende genomische DNA verlängert wird. So entsteht ein DNA-Strang, der aus einem Teil der LTR-Sequenz und der angrenzenden genomischen DNA-Sequenz besteht. Nach Ligation eines Linkers an das 3'-Ende des DNA-Fragments, kann dieses nun amplifiziert werden. Die PCR-Produkte werden schließlich in einem Agarosegel präparativ getrennt (Abbildung 14 und 15) und sequenziert. Die LM-PCR wurde dabei zweimal durchgeführt, um das Bandenmuster zu reproduzieren. Nur reproduzierbare DNA-Banden wurden aus dem Gel extrahiert und sequenziert.

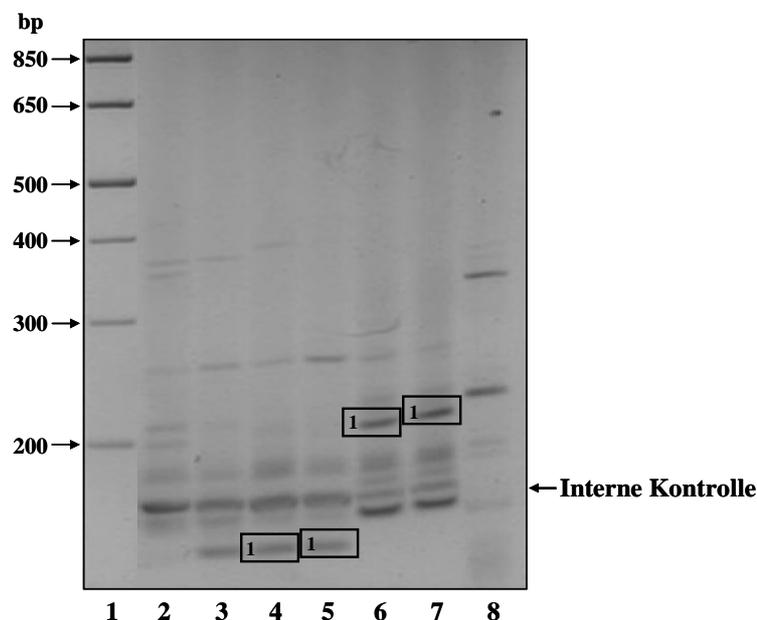


Abbildung 14: Gel aus der LM-PCR. 2%-iges Agarosegel. Die Pfeile auf der linken Seite markieren die Laufstrecken der Marker-DNA, der Pfeil auf der rechten Seite zeigt auf die interne Kontrolle. **Spur 1** DNA-Größenstandard; **Spur 2** Mischkultur M2; **Spur 3** Mischkultur M3; **Spur 4** Klon 2; **Spur 5** Klon 4; **Spur 6** Klon 6; **Spur 7** Klon 8; **Spur 8** H₂O-Kontrolle. Banden, die reproduzierbar waren (Kasten), wurden extrahiert und sequenziert.

Im ersten Ansatz zeigten Klon 2 und 4 bzw. Klon 6 und 8 ein identisches DNA-Bandenmuster. Pro Klon konnte 1 DNA-Bande reproduziert werden. Diese wurden aus dem Gel extrahiert und sequenziert.

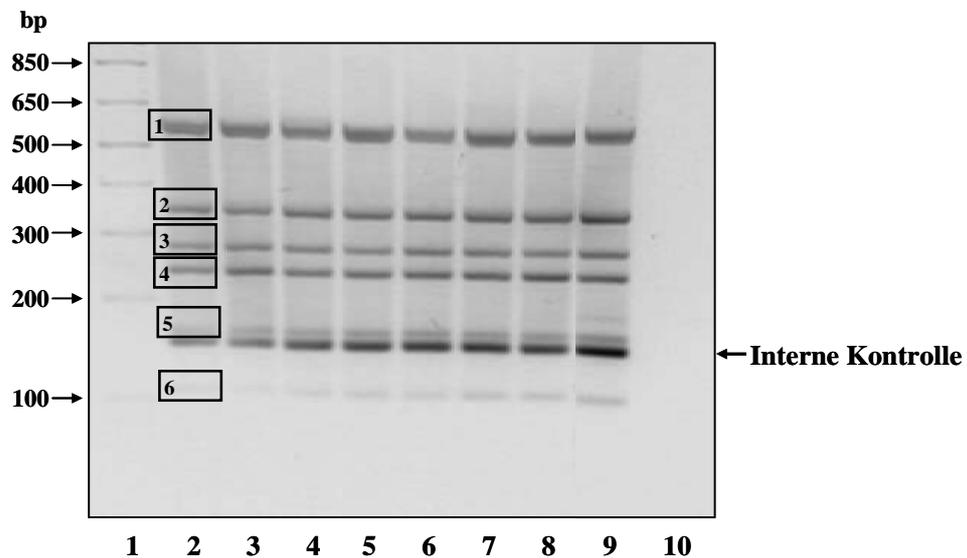


Abbildung 15: Gel aus der LM-PCR. 2%-iges Agarosegel. Die Pfeile auf der linken Seite markieren die Laufstrecken der Marker-DNA, der Pfeil auf der rechten Seite zeigt auf die interne Kontrolle. **Spur 1** DNA-Größenstandard; **Spur 2** Klon 9; **Spur 3** Klon 10; **Spur 4** Klon 11; **Spur 5** Klon 12; **Spur 6** Klon 13; **Spur 7** Klon 15; **Spur 8** Klon 16; **Spur 9** Mischkultur M4; **Spur 10** H₂O-Kontrolle. Banden, die reproduzierbar waren (Kasten), wurden extrahiert und sequenziert.

Im zweiten Ansatz zeigten die 7 Klone und die Mischkultur M4 das gleiche Bandenmuster.

6 DNA-Banden wurden jeweils reproduziert, extrahiert und anschließend sequenziert.

4.3.2 Sequenzierung

Um die unbekannte genomische Sequenz, die das Provirus flankiert, zu identifizieren und somit den Integrationsort ins Genom zu bestimmen, wurden die aus den Gelen extrahierten PCR-Produkte mit Hilfe eines LTR-spezifischen Primers sequenziert. Die unbekannte genomische Sequenz kann nun aufgrund der bekannten LTR- und Linker-Sequenz, die zu beiden Seiten der unbekanntes Sequenz liegen, ermittelt und mit Hilfe von verschiedenen Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und <http://www.ensembl.org/index.html>) verglichen werden (Abbildung 16). Die Integrationsstelle ist somit identifiziert.

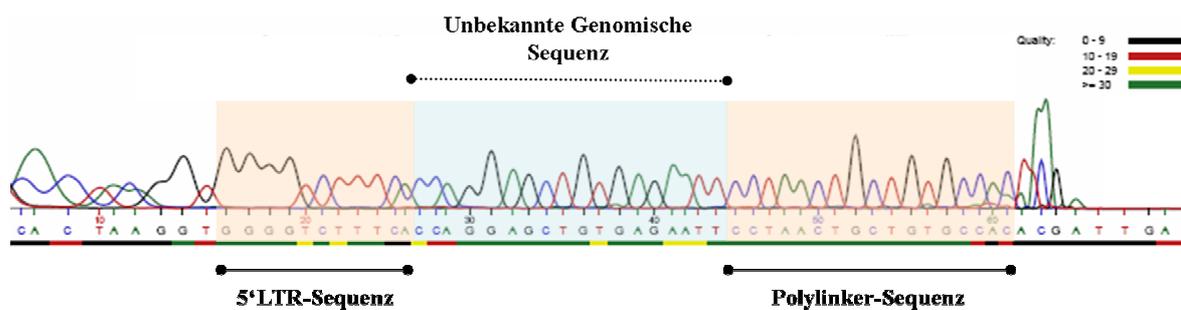


Abbildung 16: Sequenzierung des PCR-Produkts aus der LM-PCR und Ermittlung der unbekanntes genomischen Sequenz (exemplarisch für Klon 4 dargestellt). Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Die farblichen Balken unterhalb der Basen zeigen die Qualität der Sequenzierung. Die roten Kästen markieren die bekannten Sequenzen. Der blaue Kasten zeigt die unbekanntes, zu identifizierende genomische Sequenz.

Im ersten Ansatz zeigten Klon 2 und 4 bzw. Klon 6 und 8 übereinstimmende Insertionsstellen des Provirus, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um identische Klone handelt. In der weiteren Durchführung wurde demnach nur mit Klon 4 bzw. 6 weitergearbeitet. Im zweiten Ansatz waren alle identifizierten Insertionsstellen in Klon 9 bis 16 identisch, so dass auch hier nur Klon 9 für weitere Analysen verwendet wurde (Tabelle 4).

Tabelle 4: Durch das Provirus betroffene Gene. In Tabelle 4 sind die angrenzenden Gene, die eventuell durch die Insertion des retroviralen Vektors beeinflusst wurden, zusammengefasst. Dargestellt sind außerdem die Identifikationsnummern (ID), die Lage auf den Chromosomen (Chr) mit Orientierung der jeweiligen Gene (Ori) und die Entfernung des Provirus zum Transkriptionsstart (TSS) in kb.

Klon*	Bande**	Gen	ID	Chr	Ori	Provirus →TSS
K4	1	INPP4B (<i>Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II</i>)	8821	4q31.21	R	-132
	1	RIPK4 (<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 4</i>)	54101	21q22.3	R	+150
K6	1	MYCBP2 (<i>MYC binding protein 2 (=PAM)</i>)	23077	13q22	R	+118 (23. Intron)
K9	1	IL9RP2 (<i>Interleukin 9 receptor pseudogene 2</i>)	439945	10p15.3	R	+0,4 (1. Intron)
	2	SNX7 (<i>Sorting nexin 7</i>)	51375	1p21.3	F	-336
	3	MYOF (<i>Myoferlin</i>)	26509	10q24	R	+22 (1. Intron)
	4	MAML3 (<i>Mastermind-like 3</i>)	55534	4q28	R	-23
	5	PLAG1 (<i>Pleiomorphic adenoma gene 1</i>)	5324	8q12	R	+38 (2. Intron)
	6	PEX2 (<i>Peroxisomal biogenesis factor 2</i>)	5828	8q21.1	R	-197

* Klon 2 und 4 bzw. Klon 6 und 8 zeigten identische Insertionsstellen, ebenso wie Klon 9 bis 16. Infolgedessen wurden nur Klon 4, 6 und 9 weiter verwendet. Die Klone sind hier aufgelistet.

** Es wurden die DNA-Banden sequenziert, die sich in der LM-PCR reproduzieren ließen (siehe Abbildung 14 und 15).

Mit Hilfe der LM-PCR wurden für Klon 4, aufgrund einer sehr kurzen Sequenz, zwei mögliche Insertionsorte identifiziert. Die erste mögliche Insertionsstelle lag auf dem Chromosom 4 in der Nähe (TSS -132 kb) des Gens INPP4B (*Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II*; Chromosom 4q31.21). Die zweite Insertion wurde auf dem

Chromosom 21 identifiziert. Die mögliche Insertionsstelle liegt hier +150 kb vom Transkriptionsstart des Gens RIPK4 entfernt (*Receptor-interacting serine-threonine kinase 4*; Chromosom 21q22.3). Um die richtige Integrationsstelle im Genom herauszufinden, wurde eine weitere PCR-Analyse durchgeführt (siehe 4.3.3). In Klon 6 ist das Gen MYCBP2 (*MYC binding protein 2*; Chromosom 13q22) direkt von dem Provirus getroffen. So wurde die Integration in Intron 23 identifiziert (TSS +118 kb). In Klon 9 wurden insgesamt 6 Insertionen identifiziert. Die erste Insertion befindet sich im Intron 1 (TSS +0,4 kb) des Pseudogens IL9RP2 (*Interleukin 9 receptor pseudogene 2*; Chromosom 10p15.3). Direkt getroffen sind ebenfalls das Gen MYOF (*Myoferlin*; Chromosom 10q24; TSS +22 kb, Intron 1) und PLAG1 (*Pleiomorphic adenoma gene 1*; Chromosom 8q12; TSS +38 kb, Intron 2). Weitere Insertionen befinden sich in der Nähe der Gene SNX7 (*Sorting nexin 7*; Chromosom 1p 21.3; TSS -336 kb), MAML3 (*Mastermind-like 3*; Chromosom 4q28; TSS -23 kb) und PEX2 (*Peroxisomal biogenesis factor 2*; Chromosom 8q21.1; TSS -197 kb).

4.3.3 Platinum-PCR

Aufgrund einer sehr kurzen Sequenz wurden zwei Lokalisationen für eine mögliche Insertion des Provirus in das Genom von Klon 4 detektiert. Die erste mögliche Insertionsstelle lag auf dem Chromosom 4 nahe INPP4B, während sich die zweite mögliche Insertion des retroviralen Vektors in der Nähe von RIPK4 auf dem Chromosom 21 befand. Um die richtige Insertionsstelle zu identifizieren, wurden zwei neue *Antisense*-Primer (*Antisense-K4-1* für die erste mögliche Insertion bei INPP4B; *Antisense-K4-2* für die zweite mögliche Insertion bei RIPK4), die in 3'-Richtung der jeweiligen identifizierten genomischen Sequenz lagen, synthetisiert. Als *Sense*-Primer wurde der bereits für die Sequenzierung verwendete LTR-spezifische Primer genutzt. Die

Antisense-Primer wurden so gewählt, dass die eventuellen PCR-Produkte eine Länge von etwa 306 (INPP4B) bzw. 207 bp (RIPK4) aufwiesen (Abbildung 17).

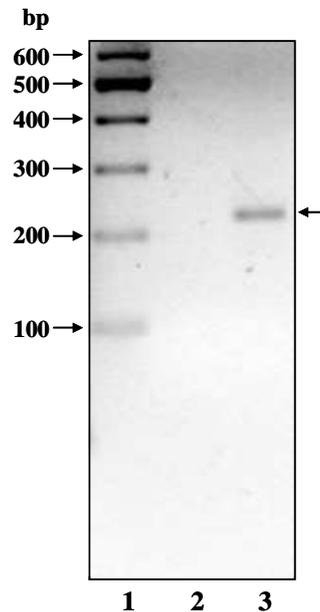


Abbildung 17: Bestimmung der Insertion in Klon 4. 2%-iges Agarosegel. Die Pfeile auf der linken Seite markieren die Laufstrecken der Marker-DNA, der Pfeil auf der rechten Seite zeigt auf das PCR-Produkt. **Spur 1** DNA-Größenstandard; **Spur 2** PCR-Ansatz mit Primer *Antisense-K4-1*; **Spur 3** PCR-Ansatz mit Primer *Antisense-K4-2*.

Eine Amplifikation konnte nur bei dem PCR-Ansatz mit dem Primer *Antisense-K4-2* festgestellt werden. Die Größe des PCR-Produkts stimmt mit der erwarteten Größe überein, so dass die Insertion nun eindeutig identifiziert wurde. Das Provirus befindet sich auf dem 21. Chromosom in der Nähe von RIPK4.

4.4 EGFP-Kopienzahlanalyse

Wird in der LM-PCR nur ein Restriktionsenzym verwendet, werden theoretisch nur etwa 65% der Insertionen erfasst. Um die tatsächliche Anzahl der Virusinsertionen in den einzelnen Klonen zu bestimmen, wurde die Anzahl der EGFP-Genkopien quantitativ ermittelt. Nach Extraktion der DNA, wurde zunächst eine PCR mit EGFP-spezifischen Primern durchgeführt. Als Standard wurde der Vektor LeGO-G2 verwendet, der als Insert

eine Kopie das EGFP-Gens enthält.¹¹³ Mit Hilfe einer Standardkurve konnte dann die EGFP-Kopienzahl in der eingesetzten genomischen DNA bestimmt werden. Anschließend wurde die der eingesetzten DNA entsprechende Zellzahl ermittelt, um die Anzahl der EGFP-Kopien pro Zelle zu bestimmen. Dazu wurde genomisches β -Globin in den Proben amplifiziert. Der interne Standard für den β -Globin-Lauf war *Human Genomic DNA Template for Control Reaction* aus dem β -Globin Kit (Roche Diagnostics). Die den DNA-Proben entsprechende Zellzahl konnte so mittels Standardreihe ermittelt werden. Abschließend wurde mit Hilfe der Gesamt-EGFP-Kopienzahl und der Gesamtzellzahl die Kopienzahl pro Zelle errechnet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bestimmung der EGFP-Kopienzahl in den einzelnen Klonen. Dargestellt ist die der eingesetzten DNA entsprechende Gesamtzellzahl und Gesamt-EGFP-Kopienzahl der einzelnen Klone. Daraus konnte nun die Kopienzahl pro Zelle ermittelt werden.

Zellklon	Zellzahl	EGFP-Kopien	EGFP-Kopien x 8*	Kopienzahl/Zelle
FH-hTERT	19300	179	1431	0,1
K4	11840	8065	64520	5,4
K6	11930	23150	185200	15,5
K9	18020	49170	393360	21,8

* In der EGFP-PCR wurden 25 ng DNA eingesetzt, während in der β -Globin-PCR 200 ng DNA verwendet wurden.

Die EGFP-Kopienzahlanalyse zeigt, dass mit der LM-PCR nicht vollständig alle Virusinsertionen erfasst werden können. Während Klon 4 und 6 in der LM-PCR jeweils eine reproduzierbare DNA-Bande aufwiesen, wurden in der EGFP-Kopienzahlanalyse für Klon 4 etwa 5 Insertionen und für Klon 6 etwa 16 Insertionen ermittelt. Für Klon 9 wurden sogar etwa 22 Insertionen detektiert. Wohingegen für Klon 9 in der LM-PCR 6 Banden reproduzierbar waren. Die Kontrolle FH-hTERT wies, wie erwartet, keine Insertionen auf (Kopienzahl pro Zelle 0,1).

4.5 Charakterisierung der Klone

Die Ableitung der Einzelzellklone erfolgte aus den Mischkulturen. In den Mischkulturen wurden hyperproliferierende Zellklone nach der Behandlung mit den retroviralen Vektoren angereichert. Folglich war das für die Studie festgesetzte Kriterium für einen im Rahmen des Transformationsprozesses interessanten Phänotyp eine gesteigerte Proliferation. Um weitere Phänotypveränderungen der Klone funktionell zu charakterisieren, wurden Proliferation, Serumabhängigkeit und Kontaktinhibition untersucht. Außerdem wurden ein verankerungsunabhängiges Wachstum mittels Softagarassay und ein mögliches Tumorstadium mittels Nacktmausassay ermittelt. Die Ausgangszellen zeigen kein Wachstum im Softagar und keine Tumorbildung in immundefizienten Mäusen.

4.5.1 Zellproliferation

Die Proliferation der einzelnen Klone wurde untersucht, indem colorimetrisch die Anzahl der lebenden Zellen täglich ermittelt wurde. Das Wachstum der Klone wurde dabei über einen Zeitraum von 10 Tagen überwacht (Abbildung 18).

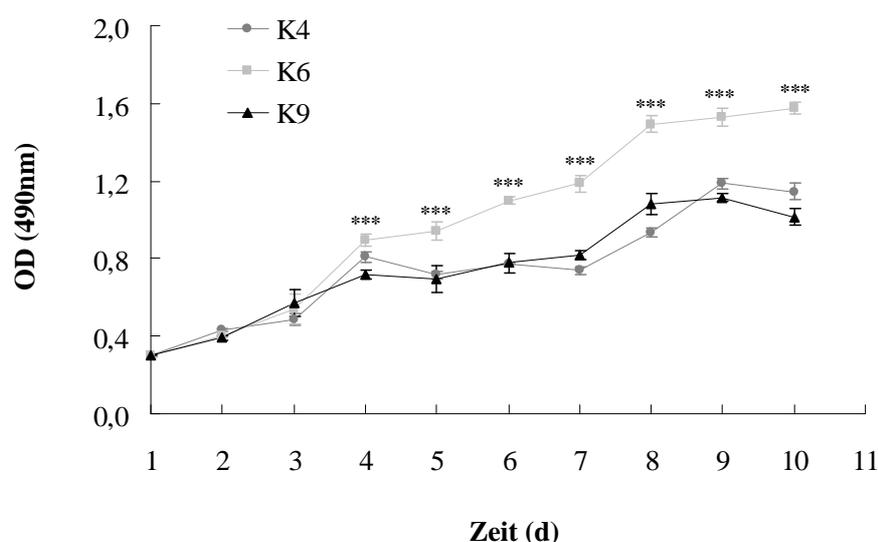


Abbildung 18: Proliferation der einzelnen Klone. Änderung der OD (490 nm) mit zunehmender Zeit (d). Proliferation von Klon 4 (●), Klon 6 (■) und Klon 9 (▲). P-Werte unter 0,001 (***).

Die Wachstumsuntersuchungen zeigten eine signifikant gesteigerte Proliferation von Klon 6 im Vergleich zu Klon 4 und Klon 9 ab Tag 4 ($p < 0,001$). Klon 4 und Klon 9 wiesen ein identisches Zellwachstum auf.

4.5.2 Serumabhängigkeit

Viele Tumorzellen zeigen eine reduzierte bis nicht mehr vorhandene Serumabhängigkeit, wohingegen nicht-maligne Zellen, so auch FH-hTERT, nicht in der Lage sind in Abwesenheit von Serum (und den darin enthaltenen nicht definierten Wachstumsfaktoren) zu proliferieren. In serumfreier Kultur kommt es in nicht-transformierten Zellen zum Zellzyklusarrest. Um die Serumabhängigkeit der einzelnen Klone zu bestimmen, wurde 24 h nach Aussaat das Medium gewechselt und mit 0 bzw. 2% serumhaltigem Medium ersetzt. Die Proliferation wurde durch colorimetrische Messungen an Tag 3 nach Mediumwechsel bestimmt. Abbildung 19 zeigt die Proliferation der einzelnen Klone am Tag 3 nach Mediumwechsel mit 0 bzw. 2% Serum. Dargestellt ist außerdem das errechnete relative Wachstum bei 0% Serum im Vergleich zu dem Wachstum bei 2% Serum (=100%) (Abbildung 20).

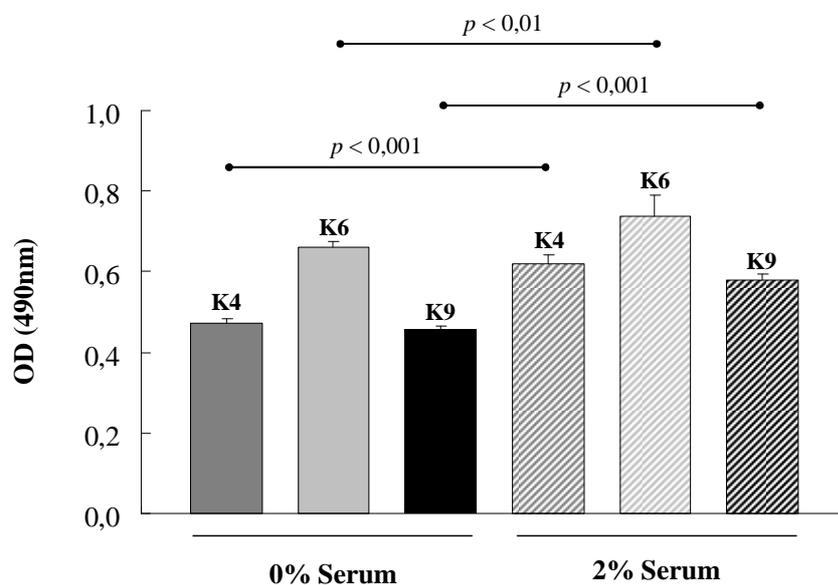


Abbildung 19: Proliferation der einzelnen Klone mit und ohne Serum. OD (490 nm) bei 0 bzw. 2% Serum an Tag 3 nach Mediumwechsel.

Durch das Entfernen des Serums kommt es bei allen Klonen, wie bei FH-hTERT (nicht

dargestellt), zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl und somit des Wachstums im Vergleich zum Wachstum bei 2% Serum (K4: $p < 0,001$; K6: $p < 0,01$; K9: $p < 0,001$; FH-hTERT: $p < 0,001$). Damit ist die Proliferation der Klone weiterhin abhängig von der Zugabe von Serum zum Zellkulturmedium.

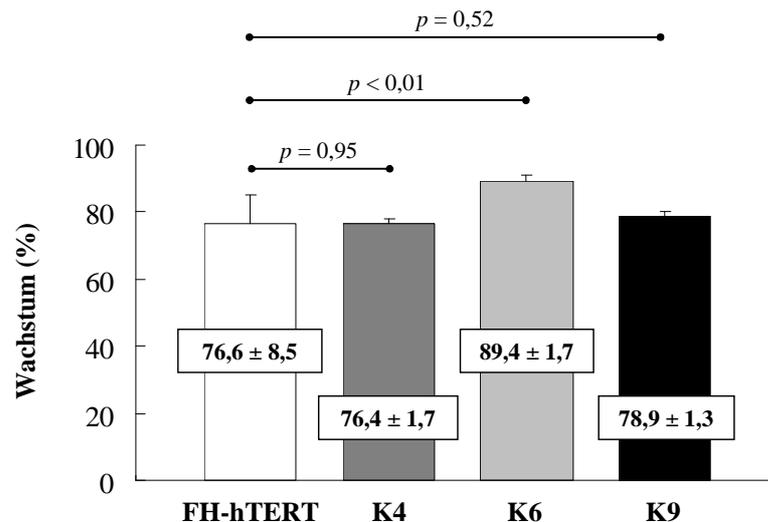


Abbildung 20: Noch vorhandenes Wachstum an Tag 3 nach Mediumwechsel bei 0% Serum im Vergleich zu dem Wachstum bei 2% Serum.

Im Vergleich zur Kontrolle FH-hTERT kommt es bei Klon 4 und 9 durch die Abwesenheit von Serum im Vergleich zur Proliferation bei 2% Serum zu einer ähnlichen Wachstumsreduktion (K4: $p = 0,95$; K9: $p = 0,52$). So ist bei fehlendem Serum bei Klon 4 ein noch vorhandenes Wachstum von 76,4% ± 1,7% und Klon 9 von 78,9% ± 1,3% zu verzeichnen (FH-hTERT 76,6% ± 8,5%). Bei Klon 6 wirkt sich das fehlende Serum nicht so stark auf die Proliferation aus. So zeigt Klon 6 ein signifikant höheres noch vorhandenes Wachstum (89,4% ± 1,7%; $p < 0,01$) im Vergleich zu FH-hTERT.

4.5.3 Zellzyklusanalyse zur Bestimmung der Kontaktinhibition

Ein Merkmal vieler Tumorzellen ist eine reduzierte bis nicht mehr vorhandene Kontaktinhibition. Im Gegensatz dazu kommt es bei FH-hTERT bei Erreichen einer Konfluenz von 100%, wie für nicht-transformierte Zellen beschrieben, durch Zell-Zell-Kontakte zum Proliferationsstopp und damit zum Zellzyklusarrest. Um die Kontaktinhibition der abgeleiteten Klone zu untersuchen, wurde die DNA mit PI gefärbt und eine Zellzyklusanalyse mittels FACS durchgeführt. Dabei wurden die S-Phase Fraktionen (S-Phase = aktive DNA-Replikation) von konfluenten Zellen (3 Tage nach Erreichen von 100% Konfluenz) mit proliferierenden Zellen in der log-Phase (40-60% Konfluenz) verglichen (Abbildung 21).

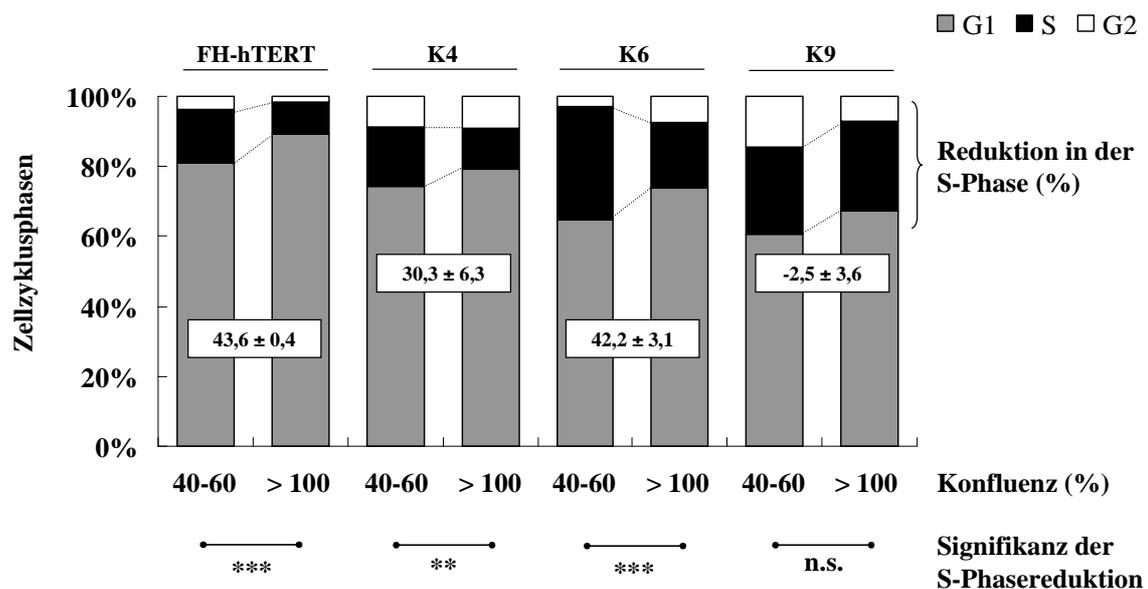


Abbildung 21: Kontaktinhibition der einzelnen Klone. Zellzyklusphasen (%) der einzelnen Klone bzw. FH-hTERT bei einer Konfluenz von 40-60% bzw. 100%. Die Werte in den Kästen zeigen die Reduktion der Zellfraktion in S-Phase (%) bei einer Konfluenz von 100% im Vergleich zu der S-Phase-Fraktion bei 40-60% Konfluenz. Dargestellt ist außerdem die Signifikanz der S-Phasereduktion. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) und nicht signifikant (n.s.).

Bei Klon 4 und 6 kommt es bei 100% Konfluenz zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl, die in der S-Phase vorliegen, im Vergleich zu der S-Phase-Zellfraktion in der

log-Phase (K4: $p < 0,01$; K6: $p < 0,001$). So lag bei Klon 4 der Anteil der sich in der S-Phase befindenden Zellen bei $17,1\% \pm 0,7\%$ in der log-Phase und bei $11,9\% \pm 1,1\%$ bei 100% Konfluenz. Klon 6 zeigte einen S-Phasenanteil von $32,6\% \pm 0,8\%$ in der log-Phase und einen Anteil von $18,8\% \pm 1\%$ bei 100% Konfluenz. Demnach war für Klon 4 eine Reduktion der S-Phase-Zellfraktion von $30,3\% \pm 6,3\%$ und für Klon 6 eine Reduktion von $42,2\% \pm 3,1\%$ zu verzeichnen. Eine signifikante Reduktion des S-Phase-Zellanteils bei 100% Konfluenz, im Vergleich zur S-Phase-Zellfraktion in der log-Phase, konnte auch bei FH-hTERT festgestellt werden ($p < 0,001$). Die S-Phase-Zellfraktion bei 40 bis 60% Konfluenz lag bei $15,6\% \pm 0,3\%$, während bei 100% konfluenten Zellen $8,8\% \pm 0,1\%$ der Zellen in der S-Phase vorlagen. Dies bedeutet eine Reduktion der S-Phase-Zellfraktion von $43,6\% \pm 0,4\%$. In Klon 4 und 6, wie auch in FH-hTERT, kam es in den 100% konfluenten Kulturen zum Zellzyklusarrest. Die Kontaktinhibition ist demnach erhalten geblieben. Klon 9 hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,55$) in dem Anteil der Zellen in der S-Phase bei 40 bis 60% Konfluenz (S-Phase-Zellfraktion $24,9\% \pm 1,4\%$) zu dem Anteil der S-Phase-Zellen bei 100% Konfluenz (S-Phase-Zellfraktion $25,6\% \pm 0,9\%$). Die Kontaktinhibition war somit in diesem Klon vollständig aufgehoben. Außerdem war der Anteil der Zellen, die während der log-Phase in der S-Phase vorlagen, bei Klon 6 am größten, was mit den Proliferationsmessungen korrelierte. Bei schnell wachsenden Zellen findet häufiger die Replikation mit anschließender Teilung statt, so dass der Anteil der in S-Phase vorliegenden Zellen steigt.

4.5.4 Softagarassay

Verankerungsunabhängiges Wachstum, ein etablierter *in vitro* Marker für Tumorzellwachstum, wurde mit Hilfe des Softagarassays untersucht. Dazu wurden jeweils 50, 500 und 5000 Zellen in 0,33%-igem Agar verdünnt auf eine 0,5%-ige Agarschicht in 60 mm-Zellkulturschalen ausgesät. Das Koloniewachstum wurde nach 3 Wochen durch Auszählen unter dem Mikroskop quantifiziert (Abbildung 22).

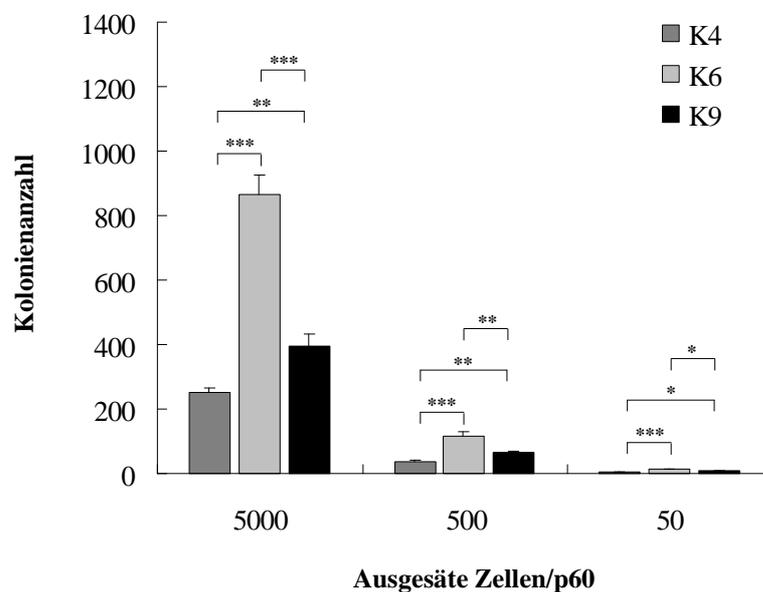


Abbildung 22: Softagarassay. Kolonienanzahl bei 50, 500 bzw. 5000 ausgesäten Zellen auf 60 mm-Zellkulturschalen (p60) nach 3 Wochen. Dargestellt sind außerdem die p-Werte. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)

FH-hTERT zeigten, wie zuvor beschrieben, kein verankerungsunabhängiges Wachstum (nicht dargestellt), während die FH-hTERT EGFP-Klone die Fähigkeit entwickelten, Kolonien im Softagar zu bilden. Die Kolonienanzahl korrelierte bei allen Klonen mit der Anzahl der ausgesäten Zellen, wobei Klon 6 die höchste Frequenz aufwies (Kolonien/5000 ausgesäte Zellen: K4: 251 ± 16 ; K6: 865 ± 61 ; K9: 396 ± 37).

4.5.5 Nacktmausassay

Um die Transformation *in vivo* zu bestätigen, wurden die Klone subkutan in immundefiziente Nacktmäuse transplantiert. Bis ein Jahr nach Transplantation (Ende des Beobachtungszeitraums) konnte bei keinem Klon ein Tumorwachstum beobachtet werden. Als Positivkontrolle wurden HuH7 Zellen transplantiert, die bereits nach etwa 8 Wochen mit einer Frequenz von 87,5% Tumoren entwickelten.

4.5.6 Zusammenfassung der Charakterisierung

Durch die Charakterisierung konnte in allen 3 Klonen eine mit der malignen Transformation assoziierte Veränderung des Wachstumsverhaltens (Phänotyp) festgestellt werden. So entwickelten alle 3 Klone ein verankerungsunabhängiges Wachstum und waren somit in der Lage, Kolonien im Softagar zu bilden. Bei Erreichen einer Konfluenz von 100% kam es bei Klon 4 und 6, wie für nicht-transformierte Zellen üblich, zum Zellzyklusarrest. Wohingegen Klon 9 eine vollständig aufgehobene Kontaktinhibition zeigte. In Zellkultur kam es bei diesem Klon zu einem Multilayerwachstum. Allerdings blieb die Serumabhängigkeit in allen 3 Klonen erhalten, war jedoch in Klon 6 vermindert. Im Nacktmausmodell konnte für keinen der abgeleiteten Einzelzellklone ein Tumorwachstum beobachtet werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammenfassung der Charakterisierung. Die charakterisierten Klone zeigen Merkmale von Tumorzellen.

Charakterisierung	FH-hTERT	K4	K6	K9	Tumor
Serumabhängigkeit	+	+	(+)	+	-
Kontaktinhibition	+	+	+	-	-
Koloniewachstum	-	+	+	+	+
Tumorwachstum	-	-	-	-	+

4.6 Expression betroffener Gene in Klon 4, 6 und 9

Um Veränderungen in der Expression der möglicherweise von der Insertion des Provirus betroffenen und für den veränderten Phänotyp verantwortlichen Gene (siehe Tabelle 4) zu detektieren, wurde eine Effizienz-korrigierte qRT-PCR zur Messung der Genexpression durchgeführt. Dazu wurde die Gesamt-RNA der einzelnen Klone (Klon 4, 6 und 9) extrahiert, cDNA generiert, die Expression der jeweiligen Gene ermittelt und mit der Kontrolle verglichen. Als Vergleichsprobe (relative Expression = 1) wurde FH-hTERT verwendet. Werte über 1 zeigen eine erhöhte Expression des jeweiligen Gens, Werte unter 1 eine erniedrigte Expression im Vergleich zu FH-hTERT. HuH7 wurde dabei als zusätzliche Kontrolle für die qRT-PCR verwendet. Ein Vergleich der Expression in den untersuchten Klonen mit dieser Tumorzelllinie war jedoch kein Kriterium für eine relevante Expressionsänderung, da das HCC ein sehr heterogener Tumor ist und HuH7 nur ein Teil der möglichen Veränderungen der Hepatokarzinogenese repräsentiert. Aufgrund der Variabilität der Messdaten durch die qRT-PCR wurde eine Expressionsänderung ab Faktor 3 (*Cut off*) als relevante Veränderung angesehen.

4.6.1 Klon 4

In Klon 4 wurde das Provirus auf dem 21. Chromosom detektiert. Das Gen RIPK4, das eventuell durch die Insertion beeinflusst wurde, liegt +150 kb von der Insertion entfernt. Die in der Abbildung 23 dargestellten Werte zeigen die relative Expression von RIPK4 in Klon 4 und in der Tumorzelllinie HuH7 im Vergleich zu FH-hTERT.

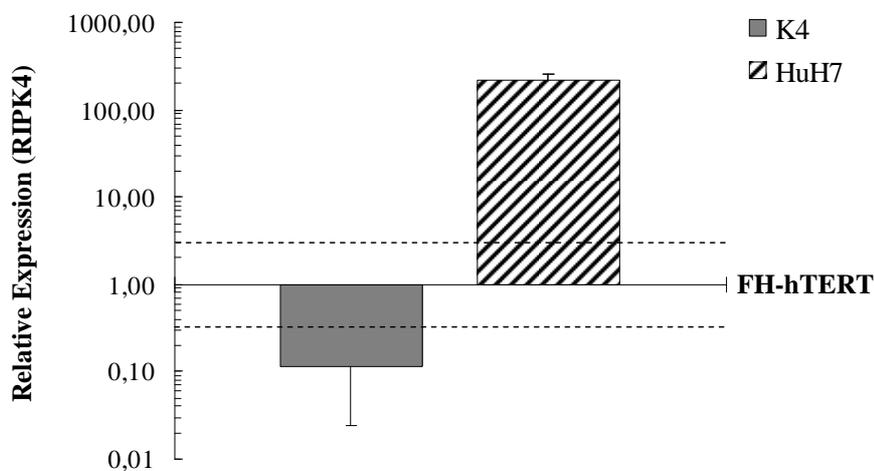


Abbildung 23: Relative Genexpression von RIPK4. Relative Expression von RIPK4 in Klon 4 und HuH7 im Vergleich zu FH-hTERT (=1). Die gestrichelte Linie stellt den *Cut off* dar.

Durch die Insertion kam es in Klon 4 zu einer 10-fachen Suppression (relative Expression $0,12 \pm 0,09$) der Expression von RIPK4 und so zu einer relevanten Änderung. In HuH7 war im Vergleich zu FH-hTERT eine erhöhte Expression von RIPK4 zu beobachten (relative Expression $216,47 \pm 35,91$).

4.6.2 Klon 6

In Klon 6 liegt das Provirus auf dem Chromosom 13 im 23. Intron (TSS +118 kb) des Gens MYCBP2. In Abbildung 24 ist die relative Expression von MYCBP2 in Klon 6 und in der Tumorzelllinie HuH7 im Vergleich zu FH-hTERT dargestellt.

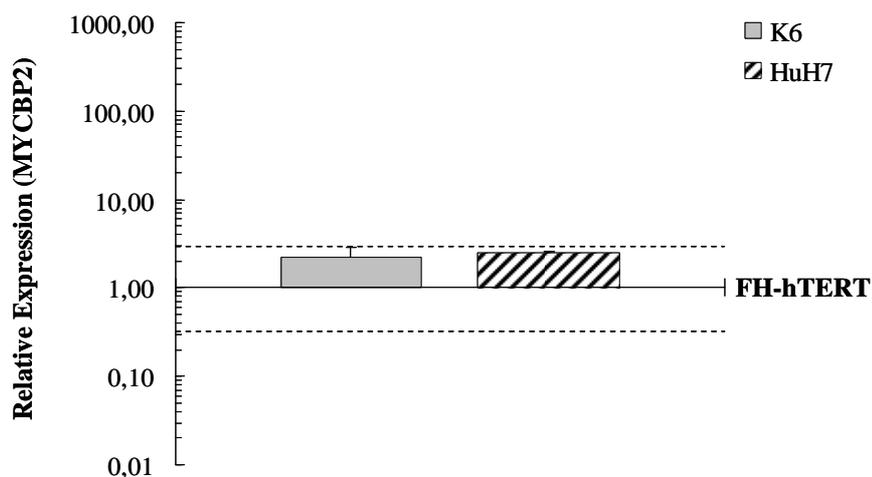


Abbildung 24: Relative Genexpression von MYCBP2. Relative Expression von MYCBP2 in Klon 6 und HuH7 im Vergleich zu FH-hTERT (=1). Die gestrichelte Linie stellt den *Cut off* dar.

In Klon 6 wurde die Expression von MYCBP2 durch die Insertion nicht beeinflusst. Die relative Expression von MYCBP2 in Klon 6 lag bei $2,21 \pm 0,71$ und war somit gemäß unserer gesetzten Definition (Veränderung um den Faktor 3) nicht relevant verändert. In HuH7 wurde eine relative Expression von $2,52 \pm 0,02$ im Vergleich zu FH-hTERT detektiert.

4.6.3 Klon 9

In Klon 9 wurden mittels LM-PCR insgesamt 6 Insertionen identifiziert. Die Insertionen befinden sich auf dem Chromosom 10 im Intron 1 (TSS +0,4 kb) von IL9RP2, auf Chromosom 10 im Intron 1 (TSS +22 kb) von MYOF und auf Chromosom 8 im Intron 2 (TSS +38 kb) von PLAG1. Weitere Insertionen wurden auf Chromosom 1 in der Nähe (TSS +38 kb) von SNX7, auf Chromosom 4 in der Nähe (TSS -23 kb) von MAML3 und auf Chromosom 8 in der Nähe (TSS -197 kb) von PEX2 detektiert. Veränderungen in der Genexpression der betroffenen Gene in Klon 9 und in der Tumorzelllinie HuH7 im Vergleich zu FH-hTERT sind in Abbildung 25 dargestellt.

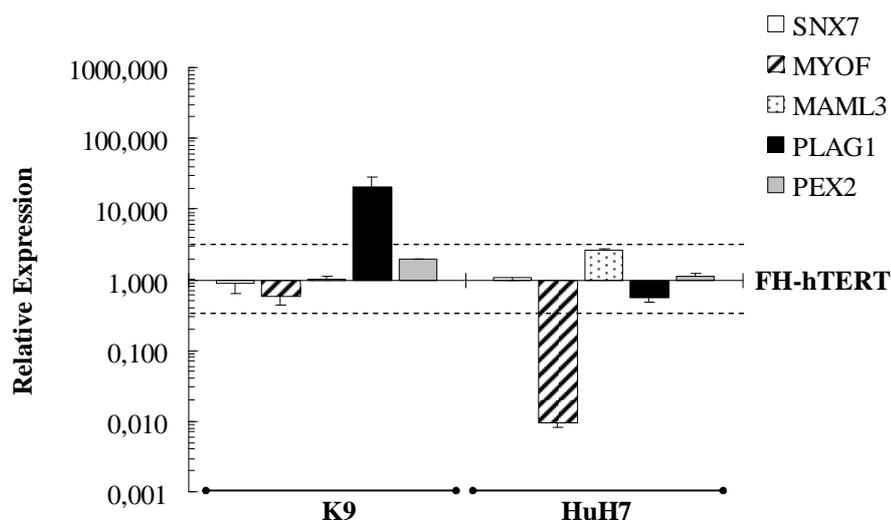


Abbildung 25: Relative Genexpression von SNX7, MYOF, MAML3, PLAG1 und PEX2. Relative Expression von SNX, MYOF, MAML3, PLAG1 und PEX2 in Klon 9 und HuH7 im Vergleich zu FH-hTERT (=1). Die gestrichelte Linie stellt den *Cut off* dar.

In Klon 9 kam es durch die Insertion des retroviralen Vektors bei den Genen SNX7, MYOF, MAML3 und PEX2 zu keinen relevanten Änderungen in der Genexpression im Vergleich zu FH-hTERT (relative Expression SNX7: $0,89 \pm 0,26$; MYOF: $0,59 \pm 0,14$; MAML3: $1,03 \pm 0,11$; PEX2: $2 \pm 0,02$), wohingegen bei PLAG1 die Expression relevant

verändert war und um das 20-fache gesteigert wurde (relative Expression $20,3 \pm 7,64$). In den HuH7 Zellen zeigte sich nur in MYOF eine relevante Veränderung in der Genexpression. Im Vergleich zu FH-hTERT war die Expression hier um das 100-fache runterreguliert (relative Expression $0,01 \pm 0,001$). Die Expression der anderen Gene blieb nahezu unverändert (relative Expression SNX7: $1,07 \pm 0,08$; MAML3: $2,63 \pm 0,09$; PLAG1: $0,57 \pm 0,08$; PEX2: $1,13 \pm 0,08$). Sequenzanalysen haben gezeigt, dass IL9RP2 nicht für ein funktionelles Protein kodiert. Verschiedene Punktmutationen und Deletionen führten zu Stop-Codons innerhalb des ORFs und somit zur Inaktivierung des Gens.¹¹⁵ Da bisher nicht bekannt ist, ob das Pseudogen IL9RP2 transkribiert wird, wurde die Expression in dieser Arbeit nicht überprüft.

4.7 Überprüfung der Relevanz

Um die Relevanz der durch die Virusinsertion veränderten Gene RIPK4 und PLAG1 in der humanen Hepatokarzinogenese zu überprüfen, wurde die Expression dieser Gene in humanen HCC-Proben im Vergleich zu gesundem Lebergewebe mittels qRT-PCR überprüft (Abbildung 26 und 27). Dazu wurde in einer Pilotstudie die Gesamt-RNA humaner HCC-Proben (Σ 5 Proben) extrahiert, cDNA generiert, die Expression der jeweiligen Gene ermittelt und mit der Kontrolle verglichen. Bei 2 HCC-Proben wurde RNA aus dem Randbereich und dem Zentrum des Tumors gewonnen. Als Kontrolle wurde gesundes Lebergewebe verwendet, wobei die RNA aus insgesamt 4 Proben isoliert wurde. Eine Kontrollprobe wurde daraufhin als Vergleichsprobe verwendet (relative Expression = 1). Werte über 1 zeigen eine erhöhte Expression des jeweiligen Gens, Werte unter 1 eine erniedrigte Expression.

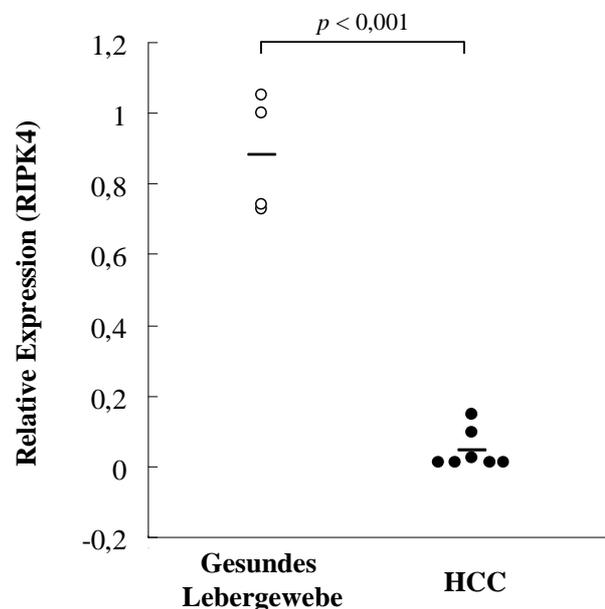


Abbildung 26: Relative Genexpression von RIPK4 in HCC-Proben. Relative Expression von RIPK4 in HCC-Proben (●) und in gesundem Lebergewebe (○). Dargestellt ist außerdem der Mittelwert (–).

Mittels qRT-PCR wurde eine signifikante RIPK4-Suppression in humanen HCC-Proben im Vergleich zu gesundem Lebergewebe detektiert (relative Expression $0,05 \pm 0,06$ vs. $0,88 \pm 0,17$; $p < 0,001$), was in Übereinstimmung mit Klon 4 steht.

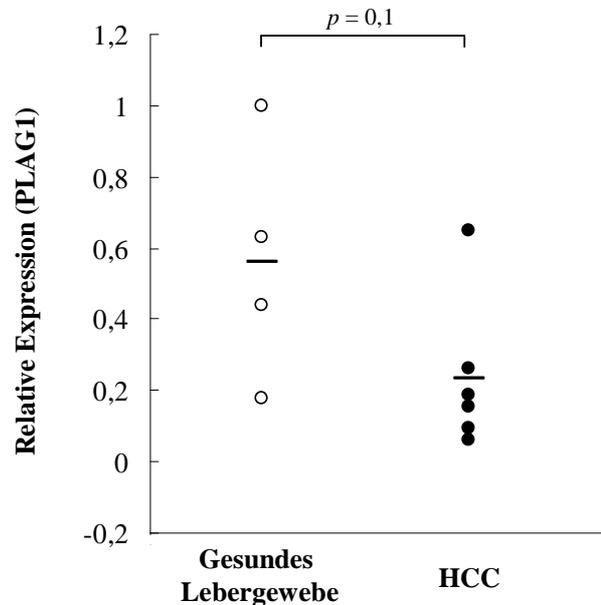


Abbildung 27: Relative Genexpression von PLAG1 in HCC-Proben. Relative Expression von PLAG1 in HCC-Proben (●) und in gesundem Lebergewebe (○). Dargestellt ist außerdem der Mittelwert (–).

Im Gegensatz zu Klon 9 konnte für PLAG1 in den humanen HCC-Proben keine signifikante Änderung in der Expression im Vergleich zur Kontrolle (gesundes Lebergewebe) festgestellt werden (relative Expression $0,24 \pm 0,22$ vs. $0,56 \pm 0,35$; $p = 0,1$).

4.8 Dualer Luziferase-Reporterassay zur Bestimmung der NF-κB-Aktivität

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass RIPK4 NF-κB aktivieren kann.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Um die Auswirkungen der Expressionsänderung von RIPK4 auf NF-κB in Klon 4 zu untersuchen, wurde ein dualer Luziferase-Reporterassay durchgeführt. Dazu wurde das

NF- κ B-Reporterplasmid pB2LUC verwendet, das 2 NF- κ B-Bindestellen enthält und bei Bindung von NF- κ B zur Expression der *Firefly*-Luziferase führt. Das Plasmid M51 wurde als Kontrollplasmid eingesetzt. Ein zusätzliches Reporterplasmid pRL-CMV mit CMV-getriebener Expression der *Renilla*-Luziferase diente als Kontrolle für die Transfektionseffizienz, wobei die Co-Transfektion durch Lipofektion erfolgte. Die NF- κ B-Aktivität konnte so mit Hilfe der Luziferaseaktivität (RLU - *Relative light unit*) ermittelt und mit der Transfektionseffizienz korrigiert werden (Abbildung 28).

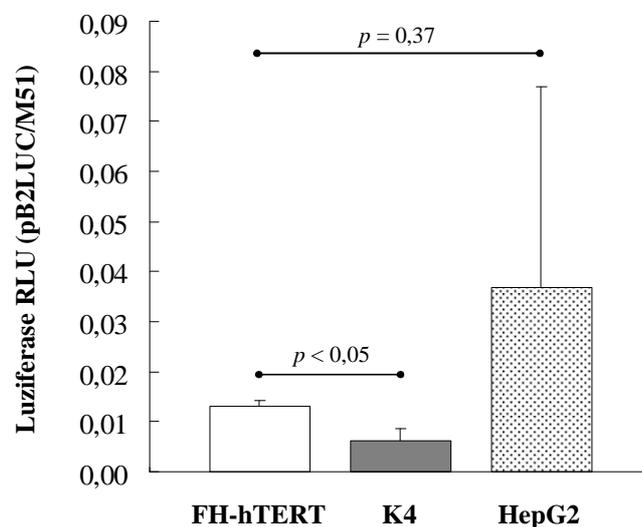


Abbildung 28: NF- κ B Luziferase-Reporterassay. NF- κ B-Aktivität in FH-hTERT, Klon 4 und HepG2. NF- κ B-Aktivität ist als RLU der Luziferase dargestellt.

Im Vergleich zu FH-hTERT ist die NF- κ B-Aktivität in Klon 4 signifikant reduziert (Luziferase RLU $0,013 \pm 0,001$ vs. $0,006 \pm 0,003$; $p < 0,05$). HepG2 als Kontrolle zeigt eine Luziferaseaktivität von $0,037 \pm 0,04$ RLU.

5 Diskussion

Das HCC ist weltweit die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache mit kontinuierlich steigender Inzidenz in den westlichen Industrieländern.^{119,120} Auch wenn die klinischen Risikofaktoren gut definiert sind, sind die molekularen Mechanismen, die zur Tumorentstehung und -entwicklung beitragen, bisher nicht im Detail verstanden. Bekannt ist, dass es in der Hepatokarzinogenese in 90% der Fälle bereits früh zu einer Reaktivierung der Telomerase kommt.³³ Die alleinige Aktivierung ist jedoch nicht ausreichend, um eine maligne Transformation zu induzieren.⁶⁷ Zusätzliche genetische Alterationen in weiteren Signalwegen sind notwendig, um die Transformation in proliferierenden Hepatozyten voranzutreiben. Nach heutiger Sicht geht man davon aus, dass sich durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen aus normalen Zellen über präneoplastische Stadien ein invasiver Tumor entwickelt. In diesem Prozess muss sich neben einer unbegrenzten Proliferation ein von Wachstumsfaktoren bzw. -inhibitoren unabhängiges Wachstum entwickeln. Außerdem müssen transformierte Zellen eine Resistenz gegen die Auslösung von Apoptose entwickeln und die Angiogenese muss vorangetrieben werden, um den entstehenden Tumor zu versorgen. Schließlich müssen die Tumorzellen die Fähigkeit entwickeln, invasiv zu wachsen und zu metastasieren.⁸

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Telomerase-immortalisierte humane fetale Hepatozyten als Zellkulturmodell für proliferierende Hepatozyten mit Telomeraseaktivierung als „*First hit*“ im mehrstufigen Modell der humanen Hepatokarzinogenese eingesetzt. Um weitere Schlüsselereignisse im Übergang zur Malignität zu definieren, wurden in diesen Zellen genetische Veränderungen mittels retroviraler Insertionsmutagenese induziert. Dazu wurden FH-hTERT mit dem replikationsinkompetenten γ -retroviralen Vektor

SF11 α EGFP_{rev} mit EGFP als Marker transduziert. Durch die anschließende Kultivierung von Mischkulturen (EGFP-positive und EGFP-negative, nicht-transduzierte Zellen zu gleichen Teilen gemischt) konnten hyperproliferierende EGFP-positive Zellklone angereichert und schließlich Einzelzellklone abgeleitet werden. Um neben einer gesteigerten Proliferation weitere Phänotypveränderungen funktionell zu charakterisieren, wurden Serumabhängigkeit und Kontaktinhibition in den abgeleiteten Klonen untersucht. Außerdem wurden ein verankerungsunabhängiges Wachstum mittels Softagarassay und ein mögliches Tumorwachstum mittels Nacktmausassay ermittelt. Des Weiteren wurden LM-PCR und qRT-PCR durchgeführt, um die retroviralen Insertionsstellen zu identifizieren und Veränderungen in der Expression der angrenzenden Gene zu detektieren. Zusätzlich wurde die Expression der in unserem Modellsystem identifizierten Gene in humanen HCC-Proben untersucht, um die Relevanz in der humanen Hepatokarzinogenese zu validieren.

5.1 FH-hTERT als Zellkultursystem

Funktionelle Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der mehrstufigen Hepatokarzinogenese waren bisher durch das Fehlen geeigneter Zellkulturmodelle begrenzt. Primäre Hepatozyten können zwar isoliert werden, lassen sich jedoch nur für einen kurzen Zeitraum kultivieren. Etablierte Hepatoma-Zelllinien sind bereits maligne transformiert und damit ungeeignet für die Untersuchung des Entartungsprozesses.

In dieser Arbeit wurden FH-hTERT als Zellkulturmodell verwendet. Durch ektope Expression von TERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase, konnte in fetalen humanen Hepatozyten die Telomerase aktiviert und die Telomere stabilisiert werden.⁶⁹ In der mehrstufigen Hepatokarzinogenese wird die Reaktivierung der Telomerase in einer

Vielzahl der Fälle beschrieben.³³ In vielen humanen Tumoren konnte ebenfalls Telomeraseaktivität nachgewiesen werden.³³ Allerdings ist die Telomeraseaktivierung als alleinige Alteration nicht ausreichend für eine maligne Transformation.⁶⁷ Untersuchungen haben gezeigt, dass TERT-immortalisierte Zellen, einschließlich Fibroblasten, endotheliale Zellen, Skelettmuskelzellen und glatte Muskelzellen, einen normalen Phänotyp aufweisen und keine Wachstumseigenschaften von präneoplastischen oder neoplastischen Zellen entwickeln.^{121,122} Bezüglich der malignen Transformation in FH-hTERT wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Telomerase *per se* keine maligne Transformation induziert.⁷¹ Jedoch haben weitere Experimente eindeutig die niedrige Schwelle Telomerase-immortalisierter Hepatozyten zur malignen Transformation bestätigt.¹²³ So ist z. B. eine zusätzliche konstitutive Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ausreichend, um nach wenigen Passagen in Zellkultur in FH-hTERT einen malignen Phänotyp mit Tumorwachstum im Nacktmausmodell zu induzieren. Zusammenfassend sind die immortalisierten Hepatozyten aufgrund der unbegrenzten Proliferation und des nicht-transformierten Phänotyps mit niedriger Schwelle zur Transformation hervorragend als Modellsystem zur funktionellen Untersuchung der mehrstufigen humanen Hepatokarzinogenese geeignet.

Immortalisierte Zellen als *in vitro* Zellkultursystem zur Untersuchung der Karzinogenese werden bereits auch für andere Tumorentitäten eingesetzt. Kusakari und Kollegen haben beispielsweise Zellen des Ovaroberflächenepitheliums immortalisiert, um die Pathogenese von Ovarialkarzinomen zu analysieren.¹²⁴ Durch eine zusätzliche Aktivierung von c-erbB-2 oder einer H-ras-Mutante konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass eine maligne Transformation in den immortalisierten Zellen ausgelöst werden kann und es in einigen Fällen zum Tumorwachstum im Nacktmausmodell kommt.¹²⁴ Die Überexpression

des Wachstumsfaktor Acroganin führte in diesen Zellen zu einem 100%-igen Anwachsen von Tumoren im Nacktmausmodell.¹²⁵ Erstmals wurde damit ein Wachstumsfaktor beschrieben, der in der Entwicklung des Ovarialkarzinoms eine direkte Rolle für die maligne Transformation spielt. Die Verwendung von immortalisierten Zellen als Zellkulturmodell bietet somit die Möglichkeit, die Pathogenese von verschiedenen Tumorentitäten zu untersuchen.

Nach heutiger Sicht wird angenommen, dass eine relativ kleine Anzahl zusätzlicher genetischer Veränderungen notwendig ist, um proliferierende Zellen vollständig zu transformieren. Durch eine Studie von Hahn und Kollegen wurde deutlich, dass sich durch die Expressionsänderung von nur drei Genen normale epitheliale Vorläuferzellen in Tumorzellen umwandeln lassen.⁶⁸ Demnach kann mit dem Modellsystem FH-hTERT durch wenige, gezielte Veränderungen (z. B. retrovirale Insertionsmutagenese, Auslösung von oxidativen Stress, gezielte Manipulation von Signalwegen, wie z. B. Wnt/ β -Catenin) eine maligne Transformation ausgelöst werden.

5.2 Retrovirale Insertionsmutagenese zur Entschlüsselung relevanter Mechanismen in der Hepatokarzinogenese

Retrovirale Vektoren integrieren stabil in das Wirtsgenom. Dabei führt jede Integration zu einer Zerstörung der Organisation des Genoms und wird per Definition als Insertionsmutagenese bezeichnet. Jede Integration birgt die Gefahr, die Genexpression der betroffenen bzw. der angrenzenden Gene zu verändern. Kritisch wird es, wenn dabei Protoonkogene aktiviert bzw. Tumorsuppressorgene inaktiviert werden und es zur Tumorentstehung kommt. Für die Gentherapie wurde dieses Risiko zunächst als vertretbar betrachtet, da die kodierenden Regionen im Genom nur einen kleinen Teil ausmachen.

Allerdings wurde diese Einschätzung mit dem Auftreten von Leukämien als Folge einer Gentherapie revidiert. So erkrankten mehrere Kinder an Leukämie nachdem sie mit einem rekombinanten MLV-basierten Retrovirus behandelt wurden. Das Provirus hatte dabei in das Gen LMO-2 (*LIM domain only 2*), ein Protoonkogen, inseriert und dieses aktiviert.¹²⁶

Die Insertionsmutagenese bietet jedoch auch die Möglichkeit, im experimentellen System Gene und Signalwege, die an der Karzinogenese beteiligt sind, zu identifizieren. Durch die Verwendung von retroviralen Vektoren können Mutationen ausgelöst werden. Aufgrund der bekannten Sequenz des Provirus können dann der Insertionsort und die dort lokalisierten Gene identifiziert werden. Tumoren, die im Tiermodell durch retrovirale Vektoren induziert wurden, konnten mittels virusspezifischer Sonden auf identische Integrationsorte untersucht werden.¹²⁷ So konnte z. B. der Spi-1 Locus beschrieben werden, der in 95% der experimentell durch den SFFV induzierten Erythroleukämien betroffen ist.¹²⁸ Eine andere Studie konnte mittels retroviraler Insertionsmutagenese zeigen, dass der Bach2 Locus ein bevorzugter Integrationsort in von MLV ausgelösten B-Zell Lymphomen ist.¹²⁹ Hier wurden in NMRI-Mäusen Tumoren durch MLV induziert und auf Insertionsorte untersucht. Für Bach2 (*BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2*) konnte ein alternativer Promotor beschrieben werden, der durch das Provirus aktiviert wird und die Expression des Gens steigert. Inzwischen gibt es verschiedene Datenbanken, wie z. B. RTCGD (*Retroviral tagged cancer gene database*; <http://RTCGD.ncifcrf.gov>). Diese Datenbank fasst in der Literatur beschriebene CIS-Gene (*Common integration sites*) und einzelne retrovirale Integrationen in murinen hämatopoetischen Tumoren zusammen.¹³⁰

Das System der experimentellen Insertionsmutagenese lässt sich ebenfalls *in vitro*

einsetzen. Zellen können durch Transduktion mit retroviralen Vektoren einfach in Zellkultur mutagenisiert werden. Fehse *et al.* lösten mit replikationsinkompetenten retroviralen Vektoren in normalen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine maligne Transformation aus.¹³¹ Durch die Identifikation der viralen Insertionsstellen lassen sich dann die Gene feststellen, die für einen veränderten Phänotyp verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang konnten Hu und Kollegen mit Hilfe der *in vitro* eingesetzten retroviralen Insertionsmutagenese Smyd4 (*SET and MYND domain containing 4*) als einen potenziellen Tumorsuppressor für die Brustkrebsentstehung beschreiben.¹³² Dazu wurde die murine Mammaepithelzelllinie NOG8 mit einem retroviralen Vektor transduziert. Transformierte Zellen zeigten eine signifikant reduzierte Expression von Smyd4. Eine Re-Expression des Gens führte sowohl zu einem reduzierten Wachstum dieser Zellen als auch zur Abwesenheit von Tumoren im Nacktmausmodell. Die *in vitro* eingesetzte Insertionsmutagenese bietet den Vorteil, dass nach retroviraler Transduktion auf definierte Alterationen des Phänotyps selektiert werden kann. Dazu ist es hilfreich, wenn die zu untersuchende phänotypische Veränderung spontan mit einer niedrigen Frequenz auftritt und mit der Transduktion erhöht werden kann. Die Zellen mit solch einer Phänotypveränderung können dann selektiert und charakterisiert werden.

In Anlehnung an die oben aufgelisteten Anwendungen wurde in dieser Arbeit erstmals die experimentelle retrovirale Insertionsmutagenese zur molekularen Entschlüsselung relevanter Treibergene der humanen Hepatokarzinogenese eingesetzt.

5.3 Einzelzellklone mit verändertem Phänotyp

Bei der chronischen Leberschädigung kann es zu genetischen Veränderungen kommen, die den Zellen einen Wachstumsvorteil bieten. Die entstandenen Wachstumsvorteile können

sich in einer gesteigerten und von Wachstumsfaktoren unabhängigen Proliferation auswirken. Übersetzt auf Zellkulturbedingungen bedeutet dies eine gesteigerte Proliferation bei gleichbleibendem Spiegel an Wachstumsfaktoren im serumhaltigen Medium, so dass als Kriterium für einen im Rahmen des Transformationsprozesses interessanten Phänotyp für diese Arbeit eine gesteigerte Proliferation (Hyperproliferation) festgesetzt wurde. Wachstumsvorteile könnten ebenfalls durch Resistenz gegen die Auslösung einer Apoptose entstehen. Dies wird durch die in dieser Arbeit eingesetzten Kultur- und Selektionsbedingungen nicht simuliert, so dass vorrangig proliferationsfördernde Mutationen detektiert werden.

Um Einzelzellklone zu isolieren, wurden nach erfolgreicher Transduktion Mischkulturen mit einem Anteil von 40 bis 50% retroviral transduzierter und somit EGFP-positiver Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert. Ziel war es, hyperproliferierende Zellklone in der Mischkultur anzureichern und schließlich Einzelzellklone abzuleiten. Nach etwa 80 Tagen machten die EGFP-positiven Zellen mehr als 90% der Zellen in Kultur aus. Es besteht dabei die Möglichkeit, dass die EGFP-positiven Zellen aufgrund des Proteins EGFP einen Wachstumsvorteil erhalten haben und sich gegenüber den nicht-transduzierten und EGFP-negativen Zellen in der Mischkultur durchsetzen konnten. FACS-Analysen zeigten jedoch eine Reduktion in der Streuung der EGFP-Intensität, was auf eine oligoklonale Dominanz einiger EGFP-positiver Klone hinweist. Die Mischkultur enthielt demnach nach etwa 80 Tagen nur eine geringe Anzahl an EGFP-positiven Klonen mit Hyperproliferation. In der Literatur wird außerdem von verschiedenen Untersuchungen berichtet, die eher eine Inhibition der zellulären Proliferation durch EGFP andeuten. Dieses Ereignis konnte in mehreren Versuchsansätzen wiederholt werden, was die Validität des Modells bestätigt.

Von den dominanten Klonen konnten schließlich Einzelzellklone abgeleitet werden.

5.4 Bestimmung der Insertionsstellen von SF11 α EGFP_{rev}

Mit Hilfe des experimentellen Ansatzes konnten insgesamt 16 Einzelzellklone isoliert werden. Aus den Mischkulturen wurden jedoch auch identische Einzelzellklone abgeleitet. So zeigten Klon 2 und 4 bzw. Klon 6 und 8 übereinstimmende Insertionsorte des Provirus. Klon 9 bis 16 waren ebenfalls identisch, so dass in der weiteren Durchführung nur mit Klon 4, 6 und 9 weitergearbeitet wurde.

Für Klon 4 wurde mittels der LM-PCR eine Insertionsstelle nahe RIPK4 detektiert (Chromosom 21q22.3; TSS +150 kb). In Klon 6 ist das Gen MYCBP2 (Chromosom 13q22; TSS +118 kb; Intron 23) von dem Provirus getroffen. In Klon 9 wurden insgesamt 6 Insertionen identifiziert. Die erste Insertion befindet sich im Intron 1 (Chromosom 10p15.3; TSS +0,4 kb) des Pseudogenes IL9RP2. Direkt getroffen sind ebenfalls das Gen MYOF (Chromosom 10q24; TSS +22 kb; Intron 1) und PLAG1 (Chromosom 8q12; TSS +38 kb, Intron 2). Weitere Insertionen befinden sich in der Nähe der Gene SNX7 (Chromosom 1p21.3; TSS -336 kb), MAML3 (Chromosom 4q28; TSS -23 kb) und PEX2 (Chromosom 8q21.1; TSS -197 kb).

Mit Hilfe der EGFP-Kopienzahlanalyse wurde zusätzlich eine quantitative Messung der EGFP-Genkopien in den einzelnen Klonen durchgeführt und damit die Anzahl der Virusinsertionen bestimmt. Es wurden für alle drei Klone (K4, 6 und 9) mehr Insertionen detektiert, als in der LM-PCR identifiziert wurden. Grund hierfür sind die durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente. Sehr kurze Fragmente (<100 bp) enthalten nur eine kurze genomische DNA-Sequenz, so dass es beim Vergleich mit dem Genom zu

mehreren Übereinstimmungen kommt. Die Integration kann nicht eindeutig identifiziert werden. Sehr lange DNA-Fragmente (>800 bp) sind in der PCR-Reaktion benachteiligt. So werden durch die LM-PCR nur etwa 65% der Insertionen erfasst. Aufgrund der unterbestimmten Anzahl an Virusinsertionen, könnten eventuelle phänotypische Veränderungen der Klone möglicherweise nicht auf die identifizierten Gene zurückzuführen sein. Um weitere Insertionen in den Klonen zu identifizieren, ist es notwendig, die LM-PCR mit mehreren Restriktionsenzymen durchzuführen.¹³³ Auch eine geringere MOI wäre ein methodischer Ansatz, um die Anzahl der Virusinsertionen zu reduzieren. Genetische Veränderungen, die verantwortlich für einen veränderten Phänotyp sind, können dann schneller identifiziert werden.

5.5 Charakterisierung der Klone

Die abgeleiteten Klone zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen eine gesteigerte Proliferation. Außerdem konnte mittels Softagarassay für Klon 4, 6 und 9 ein verankerungsunabhängiges Wachstum als Marker für eine maligne Transformation festgestellt werden. Bei Erreichen einer Konfluenz von 100% kam es bei Klon 4 und 6 zum Zellzyklusarrest. Klon 9 hingegen zeigte eine vollständig aufgehobene Kontaktinhibition. Die Serumabhängigkeit blieb in allen 3 Klonen erhalten. Bei Klon 6 wirkte sich der Entzug von Serum aus dem Kulturmedium jedoch nicht so stark auf die Proliferation aus, so dass dieser Klon die Proliferation bei niedrigeren Spiegeln an Wachstumsfaktoren aufrechterhalten kann. Auch in den Proliferationsanalysen zeigte Klon 6 im Vergleich zu Klon 4 und 9 eine gesteigerte Proliferation, was auch im Softagarassay beobachtet werden konnte. Im Nacktmausmodell konnte für keinen der abgeleiteten Einzelzellklone ein Tumorwachstum bestätigt werden.

Durch die Telomeraseaktivierung können FH-hTERT bereits unbegrenzt proliferieren, was eine essentielle Voraussetzung für die weitere Transformation ist. Die Immortalisierung allein reicht jedoch nicht aus, um eine vollständige Transformation auszulösen. In den abgeleiteten Klonen konnten nun verschiedene Phänotypveränderungen (als Folge der retroviralen Insertionsmutagenese) festgestellt werden, die mit der weiteren Transformation assoziiert sind. Die phänotypischen Veränderungen müssen nun mit den auslösenden genetischen Alterationen in Beziehung gesetzt werden.

5.6 Expression betroffener Gene in Klon 4, 6 und 9

Um Veränderungen in der Expression der eventuell von der Insertion des Provirus betroffenen Gene RIPK4 in Klon 4, MYCBP2 in Klon 6 und IL9RP2, MYOF, PLAG1, SNX7, MAML3 und PEX2 in Klon 9 zu detektieren, wurde eine effizienzkorrigierte qRT-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expression der verschiedenen Gene in HuH7 untersucht. Diese Tumorzelllinie wurde als zusätzliche Kontrolle für die qRT-PCR verwendet. Ein Vergleich der Expression in den untersuchten Klonen mit HuH7 war jedoch kein Kriterium für eine relevante Expressionsänderung, da das HCC ein sehr heterogener Tumor ist und HuH7 nur einen Teil der möglichen Veränderungen der Hepatokarzinogenese repräsentiert.

Klon 4. Durch die Insertion kam es in Klon 4 trotz der +150 kb Entfernung des Provirus bis zum Transkriptionsstart des Gens zu einer 10-fachen Suppression der Expression von RIPK4. Auch Integrationen in regulatorische Bereiche können einen Einfluss auf die Genexpression des betroffenen Gens haben. So führte in einer anderen Studie das stromabwärts von Pim1 (*Pim-1 oncogene*) gelegene Provirus dazu, dass das virale Polyadenylierungssignal vor dem zellulären lag. Sequenzen, die für eine instabile mRNA

verantwortlich sind, waren nun nicht mehr in dem Transkript enthalten, was zu erhöhten Pim1 Proteinmengen führte.^{134,135} Im Fall von RIPK4 könnte eine Insertion in zelluläre *Enhancer*-Bereiche dafür verantwortlich sein, dass diese Bereiche zerstört und folglich die Expression von RIPK4 supprimiert wurde.

Klon 6. In Klon 6 wurde die Expression von MYCBP2 durch die Insertion nicht verändert, obwohl sich das Provirus im 23. Intron des Gens befindet. Nach Guo und Kollegen bindet das Protein MYCBP2 in einer funktionell wichtigen Region des Proteins c-Myc.¹³⁶ Es wird angenommen, dass diese Bindung entweder eine unterstützende oder regulierende Rolle für die transkriptionelle Aktivierung der c-Myc-Targetgene spielt. Außerdem wurde für MYCBP2 eine unterstützende Funktion in der S1P- und Insulin-induzierten mTOR-Aktivierung beschrieben.¹³⁷ mTOR ist eine Proteinkinase, die in die Kontrolle des Zellwachstums involviert und in vielen Tumorentitäten aktiviert ist.¹³⁸ Es ist demnach sinnvoll, Veränderungen von MYCBP2 ebenfalls auf Proteinebene zu untersuchen.

Klon 9. Durch die Insertion des retroviralen Vektors kam es in Klon 9 bei den Genen SNX7, MYOF, MAML3 und PEX2 zu keinen wesentlichen Änderungen in der Genexpression. Eine weitere retrovirale Insertion wurde im Intron 2 von PLAG1 identifiziert. Die Expression von PLAG1 wurde dabei um das 20-fache gesteigert. Das Gen könnte damit verantwortlich für den veränderten Phänotyp sein. Die Expression des Pseudogens IL9RP2 wurde nicht überprüft, da bisher nicht bekannt ist, ob das Gen normalerweise überhaupt transkribiert wird.¹¹⁵

5.7 RIPK4 und PLAG1 und deren Bedeutung für die Karzinogenese

RIPK4. Das Protein RIPK4 ist eine Serin/Threonin-Kinase und gehört zu den RIPKinasen. Erstmals beschrieben wurde RIPK4 als Protein Kinase C β - und δ -interagierendes Protein, wobei die funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkung noch nicht geklärt ist.^{139,140} Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen weisen zudem auf eine aktivierende Wirkung von RIPK4 auf NF- κ B hin. Meylan und Kollegen konnten mittels einer RIPK4-Überexpression in 293T Zellen dosisabhängig NF- κ B aktivieren.¹¹⁷ Eine Inaktivierung der Kinasedomäne des Enzyms führte schließlich zu einem kompletten Verlust der NF- κ B-Aktivierung. Arbeiten mit verschiedenen DLBCL-Zelllinien (*Diffuse large B-cell lymphoma*) zeigten ebenfalls, dass eine Überexpression von RIPK4 eine Aktivierung von NF- κ B zur Folge hat.¹¹⁶ Eine Inaktivierung von RIPK4 mittels RNAi hingegen, führte zu einer Suppression von NF- κ B in diesen Zellen und verbesserte damit das Überleben *in vitro*. Außerdem wurde durch die Inaktivierung von RIPK4 die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika gesteigert und ein Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen verhindert.

NF- κ B ist ein Proteinkomplex und fungiert als Transkriptionsfaktor im NF- κ B-Signalweg, der von großer Bedeutung für die Regulation der Immun- und Entzündungsantwort, der Zellproliferation und der Apoptose ist. Wird der NF- κ B-Signalweg aktiviert, kommt es zur Expression pro-inflammatorischer und anti-apoptotischer Gene.¹⁴¹⁻¹⁴⁵ So wird das Überleben der Zellen sichergestellt und gleichzeitig eine Immunantwort ausgelöst, um den Organismus vor Infektionen und Verletzungen zu schützen. Wird der NF- κ B-Signalweg jedoch aberrant verändert, kann es zu verschiedenen entzündungsassoziierten Krankheiten

und zur Tumorentstehung kommen.¹⁴⁶⁻¹⁵²

PLAG1. Das Gen PLAG1 kodiert für ein Zinkfingerprotein und wurde als Onkogen erstmals in pleomorphen Adenomen der Speicheldrüse beschrieben.^{153,154} Eine große Anzahl der Adenome ist durch chromosomale Rearrangements und Translokationen charakterisiert, wobei häufig eine veränderte Genorganisation von PLAG1 detektiert wurde.¹⁵⁴ Verschiedene Gene sind bereits als Translokationspartner beschrieben. So wurde zum Beispiel die Promotorregion von LIFR (*Leukemia inhibitory factor receptor*) vor den kodierenden Sequenzen des Gens PLAG1 gefunden.¹⁵⁵ Einige Untersuchungen beschreiben außerdem die Bildung von Fusionsproteinen von PLAG1, z. B. zwischen PLAG1 und β -Catenin, SII/TCEA1 (*Transcription elongation factor A (SII), 1*) oder CHCHD7 (*Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7*).^{156,157} Alle diese Ereignisse führen zu einer Überexpression von PLAG1. Weitere Studien machen deutlich, dass PLAG1 in die Entstehung von verschiedenen Tumorentitäten involviert ist. So wurde eine aberrante PLAG1-Expression in der humanen akuten myeloischen Leukämie, in Gebärmutterleiomyomen und in Tumoren des glatten Muskelzellgewebes detektiert.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Kürzlich wurde eine PLAG1 Überexpression in Hepatoblastomen beschrieben.¹⁶⁰ Von 20 Tumoren zeigten 19 eine stark erhöhte PLAG1-Expression. Das Expressionslevel war dabei 3- bis 12-mal höher verglichen mit gesundem Gewebe.

Um zu überprüfen, ob die Gene RIPK4 und PLAG1 eine Relevanz in der humanen Hepatokarzinogenese haben, wurde die Expression der Gene zusätzlich in humanen HCC-Proben im Vergleich zu gesundem Lebergewebe mittels qRT-PCR ermittelt. In den humanen HCC-Proben wurde eine signifikante RIPK4-Suppression im Vergleich zu gesundem Lebergewebe detektiert. Klon 4 zeigte ebenfalls eine Suppression in der

RIPK4-Expression. RIPK4 könnte folglich für die Hepatokarzinogenese relevant sein. Für PLAG1 konnte in Klon 9 eine 20-fache Steigerung in der Expression festgestellt werden, wohingegen die humanen HCC-Proben keine signifikante Änderung in der PLAG1-Expression im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. PLAG1 scheint bei der Bildung eines HCC keine wesentliche Rolle zu spielen.

5.8 HCC-Datenbankanalysen

Um die Ergebnisse aus der qRT-PCR mit den HCC-Proben weiter abzusichern, wurden die Gene RIPK4 und PLAG1 zusätzlich in einer humanen HCC-Datenbank überprüft (OncoDB.HCC; *Oncogenomic Database of Hepatocellular Carcinoma*). Die Analysen bestätigten die Ergebnisse. In den untersuchten HCC-Proben konnte kein Anstieg in der PLAG1-Expression oberhalb des *Cut off* beobachtet werden (Abbildung 29). PLAG1 scheint damit keine treibende Rolle in der Bildung eines HCC zu spielen, wohingegen eine transformierende Funktion bei der Entstehung eines Hepatoblastoms beschrieben ist (siehe 5.7). Leider liegen uns keine Gewebeproben von Hepatoblastomen vor, so dass hier keine Validierung durchgeführt werden konnte. Unter Beachtung des Differenzierungsgrades der Ausgangszellen ist für FH-hTERT jedoch eine Transformation durch PLAG1 zu einer Hepatoblastomazelle ebenfalls plausibel. Da in der vorliegenden Arbeit das HCC und nicht die Genese eines Hepatoblastoms untersucht werden sollte, wurden hierzu keine zusätzlichen Experimente durchgeführt.

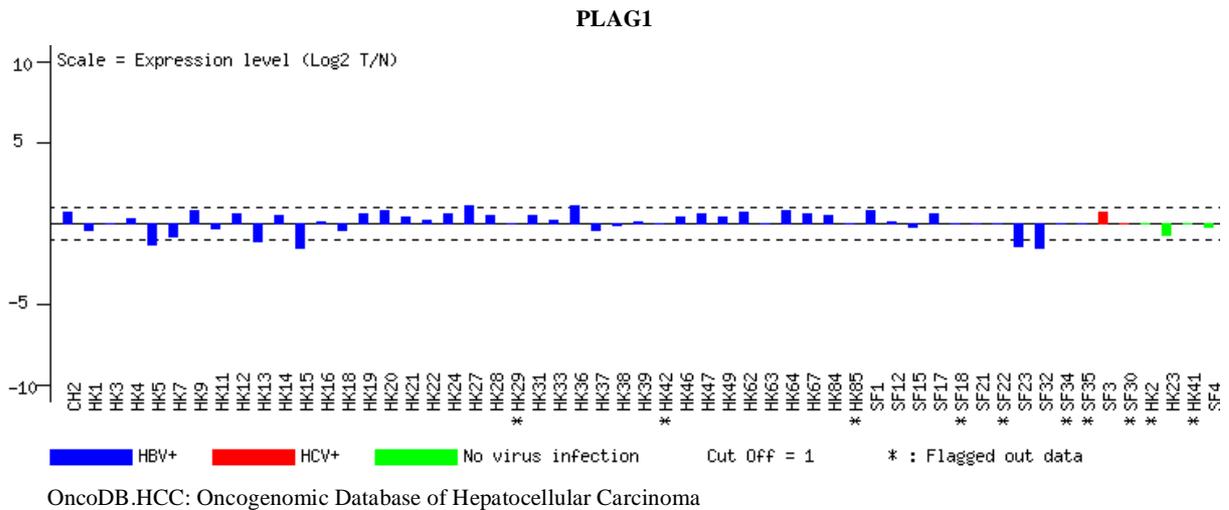


Abbildung 29: Expression von PLAG1 in HCC-Proben. Datenbankanalyse (Quelle: OncoDB.HCC). Expression von PLAG1 in HCC-Proben (T) im Vergleich zu normalem Lebergewebe (N). Blaue Balken zeigen die PLAG1-Expression in HBV-infizierten HCC-Proben. Rote Balken stehen für die Expression in HCV-infizierten Proben und grüne Balken für die Expression in Proben ohne Virusinfektion. Die gestrichelte Linie stellt den *Cut off* dar.

Da Klon 9 eine vollständig aufgehobene Kontaktinhibition zeigt und durch die EGFP-Kopienzahlanalyse 22 Insertionen detektiert wurden, ist es sinnvoll die LM-PCR mit anderen Restriktionsenzymen zu wiederholen. Außerdem können die bereits identifizierten Gene weiter auf Proteinebene untersucht werden. Des Weiteren ist bekannt, dass integrierte Proviren auch über große Entfernungen (200 kb) noch Einfluss auf die Expression von Genen haben können. Eventuell sind Gene betroffen, die räumlich weiter vom Integrationsort entfernt sind. Außerdem sollte das Pseudogen IL9RP2 noch genauer betrachtet werden. Pseudogene sind unvollständige oder veränderte Kopien des originalen, proteinkodierenden Gens. Diese Gene fungieren nicht mehr als Vorlage für ein funktionales Protein und wurden lange Zeit als „DNA-Müll“ oder falsche Genkopien, die im Laufe der Evolution entstanden sind, beschrieben.¹⁶¹ Neben nicht-transkribierten gibt es jedoch auch Pseudogene, die umgeschrieben werden.¹⁶² Die nicht-kodierende RNA scheint dabei regulierend auf ihr Genpendant zu wirken. Piehler und Kollegen konnten durch einen spezifischen *Knockdown* von ABCC6P1 (*ATP-binding cassette sub-family C member 6*

pseudogene 1) die Expression der ABCC6 mRNA (*ATP-binding cassette sub-family C (CFTR/MRP) member 6*) verringern.¹⁶³ Durch Veränderungen der physiologischen Umgebung, wie zum Beispiel im Falle einer Krankheit wie Diabetes mellitus, aber auch Krebs, kann es zu Veränderungen in der Expression der Pseudogene kommen.¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ Im Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass die Spiegel von PTEN/PTENP1 miteinander korrelieren.¹⁶⁵ PTENP1 (*Phosphatase and tensin homolog pseudogene 1*) agiert als „miRNA Köder“, indem die RNA des Pseudogens die miRNA bindet und so die zelluläre Konzentration reduziert. PTEN entkommt damit dem Abbau durch miRNA. Aufgrund der Hinweise, dass Pseudogene regulatorische Eigenschaften besitzen, müssen für IL9RP2 weitere Untersuchungen folgen. Da bisher nicht bekannt ist, ob das Pseudogen transkribiert wird und so eine qRT-PCR nicht möglich ist, könnte man die Genexpression des Genpendants IL9R auf Änderungen überprüfen.

Für RIPK4 haben die Datenbankanalysen gezeigt, dass das Gen in zahlreichen HCC-Proben, wie auch in Klon 4, herunterreguliert ist (Abbildung 30). Die RIPK4-Suppression könnte demzufolge eine relevante treibende genetische Veränderung in der humanen Hepatokarzinogenese darstellen.

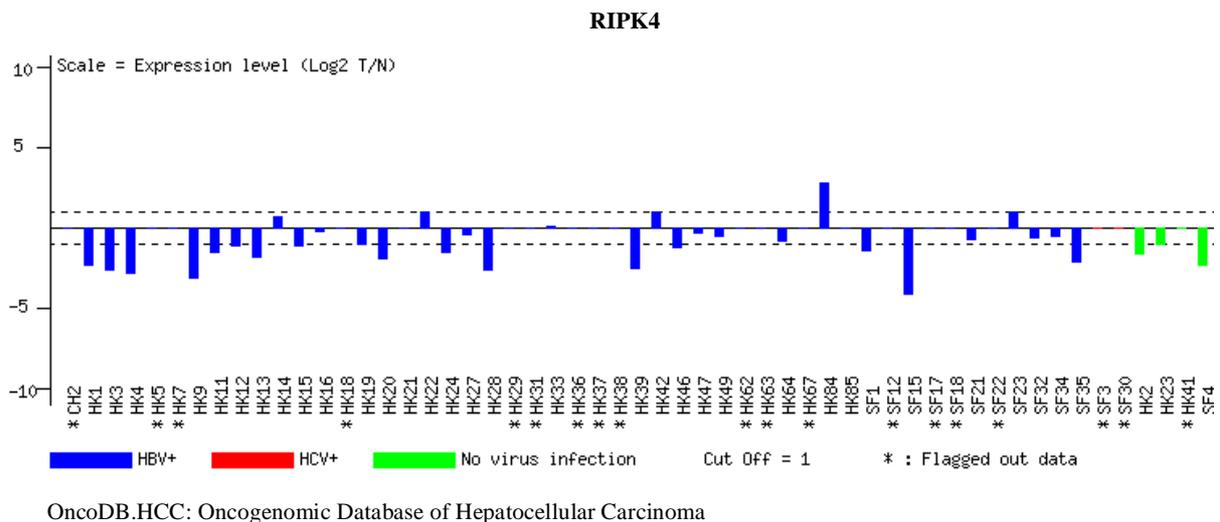


Abbildung 30: Expression von RIPK4 in HCC-Proben. Datenbankanalyse (Quelle: OncoDB.HCC). Expression von RIPK4 in HCC-Proben (T) im Vergleich zu normalem Lebergewebe (N). Blaue Balken zeigen die RIPK4-Expression in HBV-infizierten HCC-Proben. Rote Balken stehen für die Expression in HCV-infizierten Proben und grüne Balken für die Expression in Proben ohne Virusinfektion. Die gestrichelte Linie stellt den *Cut off* dar.

5.9 Auswirkungen der Expressionsänderung von RIPK4 auf NF- κ B in Klon 4

Wie bereits zuvor beschrieben, ist RIPK4 in der Lage NF- κ B zu aktivieren. Zur NF- κ B-Familie gehören RELA (*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*), REL (*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog*), RELB (*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B*), p50 (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*) und p52 (*PC4 and SFRS1 interacting protein 1*), welche Homo- oder Heterodimere bilden. Normalerweise liegen diese Dimere durch Inhibitoren inaktiviert in der Zelle vor. Zu den Inhibitoren gehören beispielsweise I κ B α (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*),

I κ B β (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta*) und I κ B γ (*Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma*). Die Aktivierung von NF- κ B wird durch den I κ B Kinase-Komplex (IKK) kontrolliert. IKK besteht aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK α (*Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*) und IKK β (*Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*) und der regulatorischen Untereinheit NEMO (*Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma*). Durch proinflammatorische Zytokine, bakterielle und virale Produkte, γ -Strahlung, UV-Licht und oxidativen Stress wird über Rezeptoren der TNFR (*Tumor necrosis factor receptor*)- und TLR (*Toll-like receptor*)-Familie der kanonische NF- κ B-Signalweg aktiviert. IKK phosphoryliert die Inhibitoren I κ B, die dann degradiert werden. Die NF- κ B-Dimere können daraufhin in der Zelle akkumulieren und gelangen schließlich in den Nukleus. Dort wird die Transkription von anti-apoptotischen und immunregulatorischen Genen aktiviert und der Organismus kann vor Verletzungen und Infektionen geschützt werden (Abbildung 31).¹⁶⁸

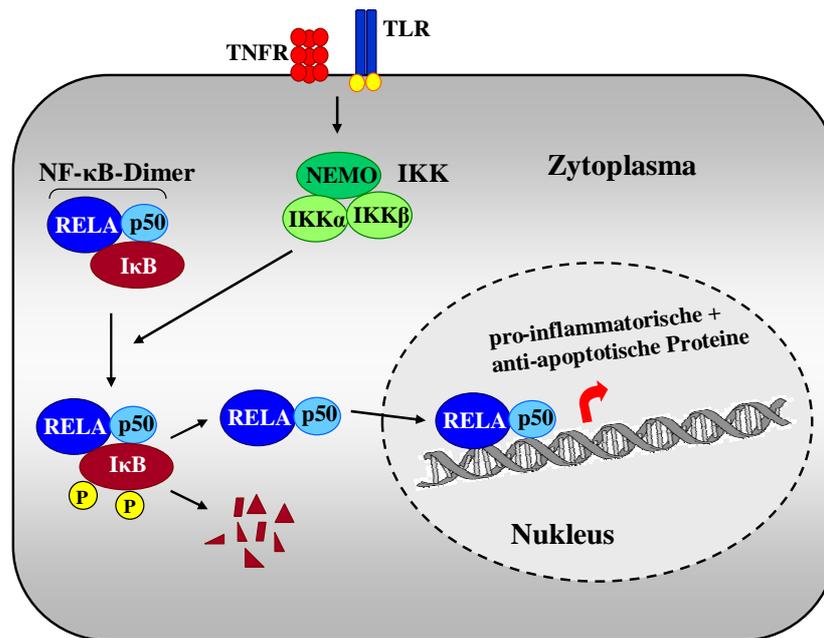


Abbildung 31: Der kanonische NF-κB-Signalweg. NF-κB-Dimere sind normalerweise mit dem Inhibitor IκB assoziiert und damit inaktiv. Durch die Stimulierung von Rezeptoren der TNFR- oder der TLR-Familie wird der IκB Kinase-Komplex (IKK) aktiviert. Dieser phosphoryliert IκB, was zum Abbau des Inhibitors führt. Freigewordene NF-κB-Dimere gelangen nun in den Nucleus und aktivieren Gene mit pro-inflammatorischen und anti-apoptischen Funktionen.

Um die Auswirkungen der Expressionsänderung von RIPK4 auf den NF-κB-Signalweg in Klon 4 zu untersuchen, wurde ein dualer Luziferase-Reporterassay durchgeführt. Im Vergleich zu FH-hTERT war die NF-κB-Aktivität in diesem Klon signifikant reduziert. Eine Suppression in der RIPK4-Expression könnte demnach die Inhibierung des NF-κB-Signalwegs in Klon 4 zur Folge gehabt haben, wie dies auch in anderen Zellsystemen bereits gezeigt wurde (siehe 5.7).

Eine aberrante Aktivierung des Signalwegs führt zu entzündungsbedingten Krankheiten und zur Krebsentstehung. In nicht-immunen, epithelialen und parenchymalen Zellen kann es jedoch auch durch eine Inhibierung des NF-κB-Signalwegs zu einer schweren Entzündung kommen. So führt eine Suppression von NF-κB in Leberparenchymzellen (LPC - Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen) zu Schäden. Mäuse mit einem

LPC-spezifischen *Knockdown* von NEMO (NEMO^{LPC-KO}) entwickeln spontan eine chronische Hepatitis mit erhöhter Apoptose von Hepatozyten, Leberentzündung, Steatose und kompensierende Proliferation von Hepatozyten.¹⁵² Durch die anhaltende Schädigung kommt es in diesen Mäusen schließlich zur HCC-Entstehung. Eine LPC-spezifische Inhibierung von FADD (*Fas (TNFRSF6)-associated via death domain*), ein für die rezeptorgesteuerte Apoptose essentielles Adaptermolekül, oder die Gabe des Antioxidans Butyl-Hydroxyl-Anisol konnte die Apoptose, die Entzündung und die Steatose in NEMO^{LPC-KO} verhindern. Damit ist die gesteigerte Apoptose der Prozess, der die chronische Schädigung in diesen Mäusen vorantreibt. Eine NF-κB-Inhibierung führt auch in Epithelzellen des Intestinums und in der Haut zur Entwicklung von verschiedenen entzündungsassoziierten Krankheiten. Da die Inhibierung von NF-κB im zentralen Nervensystem, im Pankreas und in der Skelettmuskulatur keine Auswirkung zeigt, scheint dieser Mechanismus nur auf bestimmte Gewebe beschränkt zu sein.¹⁶⁸ Ist die NF-κB-Aktivität in diesen Geweben normal, bleibt die Homöostase erhalten. Kommt es jedoch zu einer aberranten (In-)Aktivierung von NF-κB, werden entzündungsassoziierte Krankheiten gefördert.

Mittels retroviraler Insertionsmutagenese kam es in Klon 4 zu einer Suppression der RIPK4-Expression. Außerdem wurde in diesem Klon eine Verringerung der NF-κB-Aktivität nachgewiesen. Da ein gestörtes Gleichgewicht im NF-κB-Signalweg zu Tumorentstehung in der Leber führen kann, könnten die Alterationen in Klon 4 zu einem veränderten Phänotyp mit Tumormerkmalen beigetragen haben (z. B. über eine gestörte DNA-Schadensantwort durch verminderte NF-κB-Aktivität). Damit scheint ein neuer Mechanismus in der humanen Hepatokarzinogenese mit RIPK4 als möglichem

Tumorsuppressor aufgedeckt.

5.10 Zusammenfassung und Ausblick

Die molekulare Pathogenese des HCC ist bisher nicht vollständig verstanden. Eine Stabilisierung der Telomere stellt eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Voraussetzung für eine maligne Transformation humaner Hepatozyten dar. Zur Identifizierung weiterer und für die mehrstufige Hepatokarzinogenese relevanter Veränderungen wurden in FH-hTERT mittels retroviraler Insertionsmutagenese genetische Veränderungen induziert. Es konnte für alle drei abgeleiteten Klone (Klon 4, 6 und 9) ein veränderter prämaligener Phänotyp nachgewiesen werden. So entwickelten alle Klone ein verankerungsunabhängiges Wachstum. Klon 9 zeigte außerdem eine vollständig aufgehobene Kontaktinhibition. Die Serumabhängigkeit blieb allerdings bei allen abgeleiteten Einzelzellklone erhalten und auch im Nacktmausmodell konnte kein Tumorwachstum bestätigt werden. Die Virusinsertion nahe RIPK4 in Klon 4 hatte eine 10-fache Suppression der RIPK4-Expression zur Folge, wohingegen die Insertion im Intron 23 des Gens MYCBP2 bei Klon 6 zu keiner Änderung in der Expression des Gens führte. In Klon 9 wurde die Expression von PLAG1 aufgrund einer Virusinsertion im Intron 2 um das 20-fache gesteigert. Die qRT-PCR mit HCC-Proben und die HCC-Datenbankanalysen zeigten für PLAG1 keinen Anstieg in der Expression, so dass eine PLAG1-Aktivierung scheinbar keine Rolle für die Entstehung eines HCC spielt, aber als ein treibendes Gen in der Entstehung eines Hepatoblastoms beschrieben wurde. Für RIPK4 konnte, wie auch in Klon 4, eine Suppression in der Expression in HCC-Proben nachgewiesen werden. Demzufolge ist eine RIPK4-Suppression in unserem Modellsystem eine treibende genetische Veränderung („*Second hit*“) in der Transformation proliferierender Leberzellen. Da RIPK4 den NF- κ B-Signalweg aktivieren kann, wurden die Auswirkungen der Expressionsänderung von RIPK4 auf NF- κ B in Klon 4 untersucht.

Hier fand sich eine Reduktion in der NF- κ B-Aktivität. Eine Inhibierung des NF- κ B-Signalwegs in der Leber führt möglicherweise ebenso wie eine aberrante Aktivierung zu entzündungsassoziierten Veränderungen und zur Tumorentstehung. Eine verringerte NF- κ B-Aktivität, ausgelöst durch RIPK4, könnte in Klon 4 demnach zu einem veränderten Phänotyp mit Tumormerkmalen beigetragen haben. Damit scheint ein neuer Mechanismus in der frühen humanen Hepatokarzinogenese mit RIPK4 als möglichem Tumorsuppressor aufgedeckt.

Um den Mechanismus von RIPK4 als neue relevante genetische Veränderung in der humanen Hepatokarzinogenese zu bestätigen, müssen nun gezielte Manipulationen (z. B. RNAi) in FH-hTERT erfolgen. Außerdem können Mausmodelle (z. B. transiente Suppression von RIPK4 in MDR2^{-/-}-Mäusen) hilfreich sein, um die Hypothese weiter zu untersuchen. Die Identifikation einer RIPK4-Suppression als relevantes frühes Ereignis in der humanen Hepatokarzinogenese kann die Möglichkeit zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer sowie möglicherweise auch präventiver Verfahren eröffnen. So könnte die RIPK4-Suppression als Marker für ein erhöhtes Risiko für eine maligne Transformation verwendet werden. Außerdem könnte eine gezielte Genaktivierung bei Patienten mit einer RIPK4-Suppression zur Tumorthherapie eingesetzt werden.

6 Literatur

1. Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M (2005). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Clin Liver Dis** 9: 191-211.
2. El-Serag HB, Rudolph KL (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology** 132: 2557-2576.
3. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. **Gastroenterology** 127: S35-S50.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** 55: 74-108.
5. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R (2004). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. **Gastroenterology** 127: S5-S16.
6. Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, Bernardi M (2008). Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis** 29: 1299-1305.
7. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **N Engl J Med** 359: 378-390.
8. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. **Cell** 100: 57-70.
9. Semela D, Dufour JF (2004). Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 41: 864-880.
10. Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, Yanek KC, Fisher RA (2007). Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation. **Transplantation** 84: 1262-1271.
11. Roberts LR, Gores GJ (2005). Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. **Semin Liver Dis** 25: 212-225.
12. Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M (1998). Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 28: 68-77.
13. Chao Y, Li CP, Chau GY, Chen CP, King KL, Lui WY, Yen SH, Chang FY, Chan WK, Lee SD (2003). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin in patients with resectable hepatocellular carcinoma after surgery. **Ann Surg Oncol** 10: 355-362.
14. Li XM, Tang ZY, Zhou G, Lui YK, Ye SL (1998). Significance of vascular endothelial growth factor mRNA expression in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res** 17: 13-17.
15. Poon RT, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J (2004). High serum levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a prospective study. **Oncol Rep** 11: 1077-1084.
16. Zhou J, Tang ZY, Fan J, Wu ZQ, Li XM, Liu YK, Liu F, Sun HC, Ye SL (2000). Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus. **J Cancer Res Clin Oncol** 126: 57-61.

17. Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Ullrich A, Brechot C (1988). Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. **Cancer Res** 48: 6844-6849.
18. Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A (2004). An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. **Biochem Pharmacol** 68: 1003-1015.
19. Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Bertrand F, Cherqui G, Perret C, Capeau J (2001). Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. **Oncogene** 20: 252-259.
20. Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, Changchien CS, Lee CM, Tai MH (2003). Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. **Cancer** 97: 1929-1940.
21. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M (2004). mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. **Clin Cancer Res** 10: 8421-8425.
22. Boix L, Rosa JL, Ventura F, Castells A, Bruix J, Rodes J, Bartrons R (1994). c-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 19: 88-91.
23. Kiss A, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS (1997). Analysis of transforming growth factor (TGF)-alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth factor/c-met, TGF-beta receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinomas. **Clin Cancer Res** 3: 1059-1066.
24. Suzuki K, Hayashi N, Yamada Y, Yoshihara H, Miyamoto Y, Ito Y, Ito T, Katayama K, Sasaki Y, Ito A (1994). Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 20: 1231-1236.
25. Tavian D, De PG, Benetti A, Portolani N, Giulini SM, Barlati S (2000). u-PA and c-MET mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer** 87: 644-649.
26. Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E (1997). Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 25: 619-623.
27. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS (2006). Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. **J Clin Invest** 116: 1582-1595.
28. Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, Kelley SL (2006). Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. **Semin Oncol** 33: 392-406.
29. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G (2007). Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. **Biochim Biophys Acta** 1773: 1196-1212.
30. Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. **Biochim Biophys Acta** 1653: 1-24.
31. Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J (2006). New therapies for hepatocellular carcinoma. **Oncogene** 25: 3866-3884.
32. Wong CM, Fan ST, Ng IO (2001). beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. **Cancer** 92: 136-145.
33. Shay JW, Bacchetti S (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. **Eur J Cancer** 33: 787-

- 791.
34. Greider CW, Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. **Cell** 43: 405-413.
 35. Blackburn EH (1991). Structure and function of telomeres. **Nature** 350: 569-573.
 36. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 85: 6622-6626.
 37. Zakian VA (1995). Telomeres: beginning to understand the end. **Science** 270: 1601-1607.
 38. Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM (1998). Short telomeres on human chromosome 17p. **Nat Genet** 18: 76-80.
 39. Baumann P, Cech TR (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. **Science** 292: 1171-1175.
 40. Cerni C (2000). Telomeres, telomerase, and myc. An update. **Mutat Res** 462: 31-47.
 41. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de LT (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. **Cell** 97: 503-514.
 42. Blackburn EH (2000). Telomere states and cell fates. **Nature** 408: 53-56.
 43. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. **Curr Biol** 13: 1549-1556.
 44. Wege H, Brümmendorf TH. Telomerase-Inhibitoren. In: Dempke W, ed. Molekulare Therapie in der Hämatologie/Onkologie. Bremen: UNI-MED, 2009:145-153.
 45. Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. **Exp Cell Res** 220: 194-200.
 46. Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res** 25: 585-621.
 47. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. **J Mol Biol** 225: 951-960.
 48. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature** 345: 458-460.
 49. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, . (1995). The RNA component of human telomerase. **Science** 269: 1236-1241.
 50. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. **Science** 277: 955-959.
 51. Greider CW (1996). Telomere length regulation. **Annu Rev Biochem** 65: 337-365.
 52. Ulaner GA, Giudice LC (1997). Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. **Mol Hum Reprod** 3: 769-773.
 53. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. **Dev Genet** 18: 173-179.

54. Wege H, Muller A, Muller L, Petri S, Petersen J, Hillert C (2007). Regeneration in pig livers by compensatory hyperplasia induces high levels of telomerase activity. **Comp Hepatol** 6: 6.
55. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science** 266: 2011-2015.
56. Kim NW, Wu F (1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). **Nucleic Acids Res** 25: 2595-2597.
57. Hackett JA, Greider CW (2002). Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. **Oncogene** 21: 619-626.
58. Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL (2004). Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. **Hepatology** 40: 276-283.
59. Blasco MA, Lee HW, Rizen M, Hanahan D, DePinho R, Greider CW (1997). Mouse models for the study of telomerase. **Ciba Found Symp** 211: 160-170.
60. Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, DePinho RA (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. **Cell** 96: 701-712.
61. Stewart SA (2005). Telomere maintenance and tumorigenesis: an "ALT"ernative road. **Curr Mol Med** 5: 253-257.
62. Rogan EM, Bryan TM, Hukku B, Maclean K, Chang AC, Moy EL, Englezou A, Warneford SG, la-Pozza L, Reddel RR (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. **Mol Cell Biol** 15: 4745-4753.
63. Kojima H, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Omata M (1997). Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. **Gastroenterology** 112: 493-500.
64. Oh BK, Jo CK, Park C, Kim K, Jung LW, Han KH, Nyun PY (2003). Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. **J Hepatol** 39: 786-792.
65. Takaishi H, Kitamoto M, Takahashi S, Aikata H, Kawakami Y, Nakanishi T, Nakamura Y, Shimamoto F, Kajiyama G, Ide T (2000). Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay. **Cancer** 88: 312-317.
66. Oh BK, Kim YJ, Park C, Park YN (2005). Up-regulation of telomere-binding proteins, TRF1, TRF2, and TIN2 is related to telomere shortening during human multistep hepatocarcinogenesis. **Am J Pathol** 166: 73-80.
67. Harley CB (2002). Telomerase is not an oncogene. **Oncogene** 21: 494-502.
68. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. **Nature** 400: 464-468.
69. Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA (2003). Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. **Gastroenterology** 124: 432-444.
70. Wege H, Chui MS, Le HT, Strom SC, Zern MA (2003). In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging. **Cell Transplant** 12: 897-906.
71. Haker B, Fuchs S, Dierlamm J, Brummendorf TH, Wege H (2007). Absence of oncogenic transformation despite acquisition of cytogenetic aberrations in long-term cultured telomerase-immortalized human fetal hepatocytes. **Cancer Lett** 256: 120-127.

72. Ahn SH, Park YN, Park JY, Chang HY, Lee JM, Shin JE, Han KH, Park C, Moon YM, Chon CY (2005). Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. **J Hepatol** 42: 188-194.
73. Evans AA, O'Connell AP, Pugh JC, Mason WS, Shen FM, Chen GC, Lin WY, Dia A, M'Boup S, Drame B, London WT (1998). Geographic variation in viral load among hepatitis B carriers with differing risks of hepatocellular carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 7: 559-565.
74. Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA (2002). Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. **Ann N Y Acad Sci** 963: 13-20.
75. Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxi A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Villa E, Raimondo G (2004). Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. **Gastroenterology** 126: 102-110.
76. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer** 37 Suppl 8: S4-66.
77. Feitelson MA, Lee J (2007). Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. **Cancer Lett** 252: 157-170.
78. Feitelson MA, Reis HM, Tufan NL, Sun B, Pan J, Lian Z (2009). Putative roles of hepatitis B x antigen in the pathogenesis of chronic liver disease. **Cancer Lett** 286: 69-79.
79. Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. **Nature** 286: 533-535.
80. Shafritz DA, Shouval D, Sherman HI, Hadziyannis SJ, Kew MC (1981). Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens. **N Engl J Med** 305: 1067-1073.
81. Dandri M, Burda MR, Burkle A, Zuckerman DM, Will H, Rogler CE, Greten H, Petersen J (2002). Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. **Hepatology** 35: 217-223.
82. Bonilla GR, Roberts LR (2005). The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 42: 760-777.
83. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot C, Paterlini-Brechot P (2005). Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. **Gut** 54: 1162-1168.
84. Rous P (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. **J Exp Med** 13: 397-411.
85. Modrow S, Falke D, Truyen U. Molekulare Virologie. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
86. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. **Cell** 110: 521-529.
87. Derse D, Crise B, Li Y, Princler G, Lum N, Stewart C, McGrath CF, Hughes SH, Munroe DJ, Wu X (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. **J Virol** 81: 6731-6741.
88. Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD (2006). Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. **PLoS Pathog** 2: e60.

89. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, Barr S, Leipzig J, Hannenhalli S, Hoffmann C (2005). Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. **Nat Rev Microbiol** 3: 848-858.
90. Felice B, Cattoglio C, Cittaro D, Testa A, Miccio A, Ferrari G, Luzi L, Recchia A, Mavilio F (2009). Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome. **PLoS One** 4: e4571.
91. Westaway D, Payne G, Varmus HE (1984). Proviral deletions and oncogene base-substitutions in insertionally mutagenized c-myc alleles may contribute to the progression of avian bursal tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 81: 843-847.
92. Mukhopadhyaya R, Wolff L (1992). New sites of proviral integration associated with murine promonocytic leukemias and evidence for alternate modes of c-myc activation. **J Virol** 66: 6035-6044.
93. Baum C, Itoh K, Meyer J, Laker C, Ito Y, Ostertag W (1997). The potent enhancer activity of the polycythemic strain of spleen focus-forming virus in hematopoietic cells is governed by a binding site for Sp1 in the upstream control region and by a unique enhancer core motif, creating an exclusive target for PEBP/CBF. **J Virol** 71: 6323-6331.
94. Baum C, Dullmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von KC (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. **Blood** 101: 2099-2114.
95. Lazo PA, Lee JS, Tschlis PN (1990). Long-distance activation of the Myc protooncogene by provirus insertion in Mlvi-1 or Mlvi-4 in rat T-cell lymphomas. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87: 170-173.
96. Ben-David Y, Lavigueur A, Cheong GY, Bernstein A (1990). Insertional inactivation of the p53 gene during friend leukemia: a new strategy for identifying tumor suppressor genes. **New Biol** 2: 1015-1023.
97. Ben DY, Prideaux VR, Chow V, Benchimol S, Bernstein A (1988). Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. **Oncogene** 3: 179-185.
98. Makris A, Patriotis C, Bear SE, Tschlis PN (1993). Genomic organization and expression of Tpl-2 in normal cells and Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: activation by provirus insertion. **J Virol** 67: 4283-4289.
99. Patriotis C, Makris A, Bear SE, Tschlis PN (1993). Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90: 2251-2255.
100. Nair V (2008). Retrovirus-induced oncogenesis and safety of retroviral vectors. **Curr Opin Mol Ther** 10: 431-438.
101. Hayward WS, Neel BG, Astrin SM (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. **Nature** 290: 475-480.
102. Kustikova OS, Baum C, Fehse B (2008). Retroviral integration site analysis in hematopoietic stem cells. **Methods Mol Biol** 430: 255-267.
103. Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, Rudolph C, Meyer J, Li Z, Kamino K, von NN, Schlegelberger B, Kuehlcke K, Bunting KD, Schmidt S, Deichmann A, von KC, Fehse B, Baum C (2005). Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. **Blood** 105: 4235-4246.
104. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von KC, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuehlcke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. **Science** 296: 497.

105. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer Res** 42: 3858-3863.
106. Furuta M, Nozawa K, Takemura M, Izuta S, Murate T, Tsuchiya M, Yoshida K, Taka N, Nimura Y, Yoshida S (2003). A novel platinum compound inhibits telomerase activity in vitro and reduces telomere length in a human hepatoma cell line. **Int J Cancer** 104: 709-715.
107. Fehse B, Kustikova OS, Bubenheim M, Baum C (2004). Pois(s)on-it's a question of dose. **Gene Ther** 11: 879-881.
108. Clark GJ, Cox AD, Graham SM, Der CJ (1995). Biological assays for Ras transformation. **Methods Enzymol** 255: 395-412.
109. Ostrowska A, Karrer FM, Bilir BM (1999). Histological identification of purified and cryopreserved allogeneic hepatocytes following transplantation in a murine model without host immunosuppression. **Transpl Int** 12: 188-194.
110. Sambrook S, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY: 1989.
111. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 51 Pt 1: 263-273.
112. Paruzynski A, Arens A, Gabriel R, Bartholomae CC, Scholz S, Wang W, Wolf S, Glimm H, Schmidt M, von KC (2010). Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing. **Nat Protoc** 5: 1379-1395.
113. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. **Mol Ther** 16: 698-706.
114. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006). Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnol Lett** 28: 1601-1613.
115. Kermouni A, Van RE, Arden KC, Vermeesch JR, Weiss S, Godelaine D, Flint J, Lurquin C, Szikora JP, Higgs DR (1995). The IL-9 receptor gene (IL9R): genomic structure, chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter, and 18pter. **Genomics** 29: 371-382.
116. Kim SW, Oleksyn DW, Rossi RM, Jordan CT, Sanz I, Chen L, Zhao J (2008). Protein kinase C-associated kinase is required for NF-kappaB signaling and survival in diffuse large B-cell lymphoma cells. **Blood** 111: 1644-1653.
117. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002). RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. **EMBO Rep** 3: 1201-1208.
118. Moran ST, Haider K, Ow Y, Milton P, Chen L, Pillai S (2003). Protein kinase C-associated kinase can activate NFkappaB in both a kinase-dependent and a kinase-independent manner. **J Biol Chem** 278: 21526-21533.
119. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME (2009). Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. **J Clin Oncol** 27: 1485-1491.
120. Hussain K, El-Serag HB (2009). Epidemiology, screening, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Minerva Gastroenterol Dietol** 55: 123-138.
121. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty

- TD, Chiu CP (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. **Nat Genet** 21: 111-114.
122. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. **Nat Genet** 21: 115-118.
123. Wege H, Heim D, Lütgehetmann M, Dierlamm J, Lohse AW, Brümmendorf TH (2011). Forced activation of Beta-catenin signaling supports the transformation of hTERT-immortalized human fetal hepatocytes. **Mol Cancer Res** 10.1158/1541-7786.MCR-10-0474.
124. Kusakari T, Kariya M, Mandai M, Tsuruta Y, Hamid AA, Fukuhara K, Nanbu K, Takakura K, Fujii S (2003). C-erbB-2 or mutant Ha-ras induced malignant transformation of immortalized human ovarian surface epithelial cells in vitro. **Br J Cancer** 89: 2293-2298.
125. Miyanishi M, Mandai M, Matsumura N, Yamaguchi K, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S (2007). Immortalized ovarian surface epithelial cells acquire tumorigenicity by Acrogranin gene overexpression. **Oncol Rep** 17: 329-333.
126. Hacein-Bey-Abina S, von KC, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint BG, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le DF, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. **Science** 302: 415-419.
127. van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, Wientjens E, van der GH, Berns A (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. **Cell** 65: 737-752.
128. Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. **Nature** 331: 277-280.
129. Liu J, Sorensen AB, Wang B, Wabl M, Nielsen AL, Pedersen FS (2009). Identification of novel Bach2 transcripts and protein isoforms through tagging analysis of retroviral integrations in B-cell lymphomas. **BMC Mol Biol** 10: 2.
130. Akagi K, Suzuki T, Stephens RM, Jenkins NA, Copeland NG (2004). RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. **Nucleic Acids Res** 32: D523-D527.
131. Kustikova O, Fehse B, Modlich U, Yang M, Dullmann J, Kamino K, von NN, Schlegelberger B, Li Z, Baum C (2005). Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. **Science** 308: 1171-1174.
132. Hu L, Zhu YT, Qi C, Zhu YJ (2009). Identification of Smyd4 as a potential tumor suppressor gene involved in breast cancer development. **Cancer Res** 69: 4067-4072.
133. Gabriel R, Eckenberg R, Paruzynski A, Bartholomae CC, Nowrouzi A, Arens A, Howe SJ, Recchia A, Cattoglio C, Wang W, Faber K, Schwarzwaelder K, Kirsten R, Deichmann A, Ball CR, Balaggan KS, Yanez-Munoz RJ, Ali RR, Gaspar HB, Biasco L, Aiuti A, Cesana D, Montini E, Naldini L, Cohen-Haguenauer O, Mavilio F, Thrasher AJ, Glimm H, von KC, Saurin W, Schmidt M (2009). Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. **Nat Med** 15: 1431-1436.
134. Selten G, Cuypers HT, Berns A (1985). Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. **EMBO J** 4: 1793-1798.
135. Selten G, Cuypers HT, Boelens W, Robanus-Maandag E, Verbeek J, Domen J, Van BC, Berns A (1986). The primary structure of the putative oncogene pim-1 shows extensive homology with protein kinases. **Cell** 46: 603-611.

136. Guo Q, Xie J, Dang CV, Liu ET, Bishop JM (1998). Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95: 9172-9177.
137. Maeurer C, Holland S, Pierre S, Potstada W, Scholich K (2009). Sphingosine-1-phosphate induced mTOR-activation is mediated by the E3-ubiquitin ligase PAM. **Cell Signal** 21: 293-300.
138. Easton JB, Houghton PJ (2006). mTOR and cancer therapy. **Oncogene** 25: 6436-6446.
139. Bhr C, Rohwer A, Stempka L, Rincke G, Marks F, Gschwendt M (2000). DIK, a novel protein kinase that interacts with protein kinase Cdelta. Cloning, characterization, and gene analysis. **J Biol Chem** 275: 36350-36357.
140. Chen L, Haider K, Ponda M, Cariappa A, Rowitch D, Pillai S (2001). Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane-associated, ankyrin repeat-containing protein kinase. **J Biol Chem** 276: 21737-21744.
141. Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol** 16: 225-260.
142. Lenardo MJ, Baltimore D (1989). NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. **Cell** 58: 227-229.
143. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. **Cell** 87: 565-576.
144. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. **Science** 274: 787-789.
145. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. **Science** 274: 784-787.
146. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D (1995). Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. **Genes Dev** 9: 2736-2746.
147. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell** 119: 285-298.
148. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. **Science** 289: 2350-2354.
149. Rebholz B, Haase I, Eckelt B, Paxian S, Flaig MJ, Ghoreschi K, Nedospasov SA, Mailhammer R, bey-Pascher S, Schultze JL, Weindl G, Forster I, Huss R, Stratis A, Ruzicka T, Rocken M, Pfeffer K, Schmid RM, Rupec RA (2007). Crosstalk between keratinocytes and adaptive immune cells in an IkappaBalpha protein-mediated inflammatory disease of the skin. **Immunity** 27: 296-307.
150. Garg A, Aggarwal BB (2002). Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. **Leukemia** 16: 1053-1068.
151. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB (2008). Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. **Exp Biol Med (Maywood)** 233: 21-31.
152. Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van LG, Nenci A, De VR, Roskams T, Trautwein C, Pasparakis M (2007). Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell** 11: 119-132.
153. Declercq J, Van DF, Braem CV, Van V, I, Voz M, Wassef M, Schoonjans L, Van DB, Fiette L, Van d, V (2005). Salivary gland tumors in transgenic mice with targeted PLAG1 proto-oncogene

- overexpression. **Cancer Res** 65: 4544-4553.
154. Kas K, Voz ML, Roijer E, Astrom AK, Meyen E, Stenman G, Van d, V (1997). Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. **Nat Genet** 15: 170-174.
155. Voz ML, Astrom AK, Kas K, Mark J, Stenman G, Van d, V (1998). The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LIFR promoter. **Oncogene** 16: 1409-1416.
156. Asp J, Persson F, Kost-Alimova M, Stenman G (2006). CHCHD7-PLAG1 and TCEA1-PLAG1 gene fusions resulting from cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. **Genes Chromosomes Cancer** 45: 820-828.
157. Astrom AK, Voz ML, Kas K, Roijer E, Wedell B, Mandahl N, Van d, V, Mark J, Stenman G (1999). Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. **Cancer Res** 59: 918-923.
158. Hibbard MK, Kozakewich HP, Dal CP, Sciort R, Tan X, Xiao S, Fletcher JA (2000). PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. **Cancer Res** 60: 4869-4872.
159. Landrette SF, Kuo YH, Hensen K, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Perrat PN, Van d, V, Delwel R, Castilla LH (2005). Plag1 and Plag2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11. **Blood** 105: 2900-2907.
160. Zatkova A, Rouillard JM, Hartmann W, Lamb BJ, Kuick R, Eckart M, von SD, Koch A, Fonatsch C, Pietsch T, Hanash SM, Wimmer K (2004). Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** 39: 126-137.
161. Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF (2000). Vertebrate pseudogenes. **FEBS Lett** 468: 109-114.
162. Balakirev ES, Ayala FJ (2003). Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? **Annu Rev Genet** 37: 123-151.
163. Piehler AP, Hellum M, Wenzel JJ, Kaminski E, Haug KB, Kierulf P, Kaminski WE (2008). The human ABC transporter pseudogene family: Evidence for transcription and gene-pseudogene interference. **BMC Genomics** 9: 165.
164. Chiefari E, Iiritano S, Paonessa F, Le P, I, Arcidiacono B, Filocamo M, Foti D, Liebhaber SA, Brunetti A (2010). Pseudogene-mediated posttranscriptional silencing of HMGA1 can result in insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Commun** 1: 40.
165. Poliseño L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. **Nature** 465: 1033-1038.
166. Suo G, Han J, Wang X, Zhang J, Zhao Y, Zhao Y, Dai J (2005). Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. **Biochem Biophys Res Commun** 337: 1047-1051.
167. Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, Al-Mohanna F, Farid NR, Meyer B, Shi Y (2009). Oncogenic activation of MAP kinase by BRAF pseudogene in thyroid tumors. **Neoplasia** 11: 57-65.
168. Pasparakis M (2009). Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. **Nat Rev Immunol** 9: 778-788.

7 Abkürzungen

A. bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ALT	ALT-Mechanismus; Alternativer Weg der Telomerverlängerung
bp	Basenpaar
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
Chr	Chromosom
c-Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
Ct	Ct-Wert; Schwellenwert-Zyklus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
<i>env</i>	das Gen <i>env</i> codiert für die viralen Hüllproteine
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FH	fetale Hepatozyten
FH-hTERT	Telomerase-immortalisierte humane fetale Hepatozyten
<i>gag</i>	das Gen <i>gag</i> codiert für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HepG2	Leberkarzinomzelllinie
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
H-ras	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HuH7	Leberkarzinomzelllinie
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
IKK	I κ B Kinase-Komplex
IL9RP2	<i>Interleukin 9 receptor pseudogene 2</i>
INPP4B	<i>Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II</i>
kb	Kilobasen
LM-PCR	<i>Ligation-mediated polymerase chain reaction</i>
LPC	Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen
LTR	<i>Long terminal repeats</i>

MAML3	<i>Mastermind-like 3</i>
MLV	Maus-Leukämie-Virus
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
miRNA	microRNA
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MYCBP2	<i>MYC binding protein 2</i>
MYOF	<i>Myoferlin</i>
NEMO	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase γ</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene in B-cells 1</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD	Populationsverdopplung
PEX2	<i>Peroxisomal biogenesis factor 2</i>
PI	Propidiumiodid
PLAG1	<i>Pleiomorphic adenoma gene 1</i>
<i>pol</i>	<i>pol</i> kodiert für virale Protease, reverse Transkriptase und Integrase
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RIPK4	<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 4</i>
RLU	<i>Relative light unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
SNX7	<i>Sorting nexin 7</i>
TERC	Telomerase RNA Komponente
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
Tpl-2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8</i>
TRF1	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>
TRF2	<i>Telomeric repeat binding factor 2</i>
TSS	Transkriptionsstart

8 Kongressbeiträge

The International Liver Congress by the European Association for the Study of the Liver (EASL), Mailand 2008

Illegitimate activation of β -catenin signaling promotes proliferation in telomerase-immortalized human hepatocytes without induction of malignant transformation

Denise Heim, Ansgar W. Lohse, Jörg Petersen, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL), Heidelberg 2009

Transformation von Telomerase-immortalisierten humanen Leberzellen nach aberranter Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs

Denise Heim, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

The International Liver Congress by the EASL, Kopenhagen 2009

Transformation of telomerase-immortalized human hepatocytes after an aberrant activation of β -catenin signaling

Denise Heim, Ann Christin Parplys, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

27. Jahrestagung der GASL, Bonn 2010

Die Aktivierung von β -Catenin verbessert die antioxidative Abwehr in immortalisierten Hepatozyten ohne vor ROS-induzierten DNA-Schäden zu schützen

Denise Heim, Ann Christin Parplys, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden 2010

Charakterisierung der mehrstufigen Hepatokarzinogenese in Telomerase-immortalisierten humanen fetalen Hepatozyten mit zusätzlicher Aktivierung von β -Catenin

Denise Heim, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

The International Liver Congress by the EASL, Wien 2010

Retroviral insertional mutagenesis identified the serine-threonine kinase RIPK4 as a putative novel tumor suppressor in human hepatocarcinogenesis

Denise Heim, Kerstin Cornils, Boris Fehse, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

28. Jahrestagung der GASL, Regensburg 2011

Applikation der retroviralen Insertionsmutagenese zur Identifikation relevanter molekularer Mechanismen in der humanen Hepatokarzinogenese

Denise Heim, Kerstin Cornils, Boris Fehse, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

The 62nd annual meeting of the American association for the study of liver diseases (AASLD), San Francisco 2011

Retroviral insertional mutagenesis as a tool to identify molecular drivers in human hepatocarcinogenesis

Denise Heim, Kerstin Cornils, Boris Fehse, Ansgar W. Lohse, Tim H. Brümmendorf, Henning Wege

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lohse für die Möglichkeit, in seiner Klinik meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dobner und Herrn Prof. Dr. Brümmendorf für die Begutachtung meiner Arbeit.

Dr. Henning Wege danke ich besonders für die gute Betreuung, Unterstützung und Förderung meiner Arbeit. Für den Freiraum bei der Gestaltung des Projekts und dafür, dass er immer ein „offenes Ohr“ für mich hatte, vor allem nach dem N₂-Super-GAU!

Herrn Prof. Dr. Fehse danke ich für die Kooperation zur Anwendung der retroviralen Insertionsmutagenese und Frau PD Dr. Sass für die Bereitstellung des NF-κB-Reporterplasmids. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Kerstin Cornils bedanken, die in kürzester Zeit ganz viel lesen musste. „Zytoplamsa!“

Weiterhin möchte ich mich bei Petra Zemke-Trautmann für die praktische Hilfe und Unterstützung im Labor und anschließende Auswertung auf der „Parkbank“ bedanken.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Labors der I. Medizinischen Klinik, die für eine nette Atmosphäre gesorgt und immer für ein Bierchen zu haben waren, wenn der Versuch mal wieder länger dauerte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Freund Kay, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die immer an mich glauben und auch in „schwierigen“ Situationen Geduld mit mir haben. Ich bin froh, dass es Euch gibt!

Ein abschließender Dank gilt meinen Freunden Antonella Carambia, Dorothee Schwinge und Tanja Trautmann, die während meiner Doktorarbeit an meiner Seite waren und mich immer verstanden haben. „We are outstanding!“