

Molekulare Mechanismen der Hepatokanzerogenese

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg**



**vorgelegt von
Thomas Amann aus Amberg
November 2007**

Promotionsgesuch eingereicht: November 2007

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff.

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Herr Prof. Dr. Ralph Witzgall
1. Gutachter (1. Prüfer):	Herr Prof. Dr. Rainer Deutzmann
2. Gutachterin (2. Prüferin):	Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff
3. Prüfer:	Herr Prof. Dr. Richard Warth

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Das hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	4
2.1.1	Häufigkeit und Inzidenz.....	4
2.1.2	Ätiologie des HCC.....	4
2.1.3	Therapie und Prognose	5
2.2	Leberzellen und Risikofaktor Leberzirrhose	6
2.2.1	Leberzellen.....	6
2.2.2	Risikofaktor Leberzirrhose als Folge der Aktivierung hepatischer Sternzellen	6
2.3	Tumor: Mikromilieu und Stroma	7
2.3.1	Einfluss von Karzinomzellen auf das Tumorstroma.....	7
2.3.2	Bedeutung von Fibroblasten im Tumorstroma für die Karzinom-Entstehung und -Progression.....	8
2.3.3	Bedeutung von aktivierten HSZ für die Progression von hepatischen Metastasen.....	9
2.3.4	Bedeutung von aktivierten HSZ für HCC-Entstehung und -Progression	9
2.4	<i>Melanoma Inhibitory Activity 2 (MIA2)</i>	11
2.4.1	Die <i>Melanoma Inhibitory Activity</i> (MIA) Gen-Familie	11
2.4.2	Regulation der MIA2 Expression	12
2.5	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb</i>	13
2.5.1	<i>Fibroblast Growth Factors</i> (FGF) und Struktur sowie Isoformen der <i>Fibroblast Growth Factor Rezeptoren</i> (FGFR)	13
2.5.2	Biologische Funktion der FGFRs und ihre Bedeutung für die Kanzerogenese ..	15
2.6	„Warburg Effekt“ und GLUT1	17
2.6.1	„Warburg Effekt“	17
2.6.2	GLUT1.....	17
2.6.3	GLUT1 im Karzinom.....	18
2.6.4	GLUT1 im HCC-Gewebe	19
3	Materialien und Methoden	21
3.1	Chemikalien und Reagenzien	21
3.2	Gase.....	21
3.3	Verbrauchsmaterialien	22
3.4	Allgemeine Laborgeräte	22
3.5	Plasmide	23

3.6	Pufferlösungen	23
3.7	Arbeiten mit Bakterien.....	24
3.7.1	Bakterienstämme	24
3.7.2	Flüssigmedium und Agarplatten	24
3.7.3	Kultivierung	24
3.7.4	Herstellung kompetenter Bakterien.....	25
3.7.5	Transformation von Bakterien.....	25
3.7.6	Isolierung von Plasmid DNA (Mini- und Midipräparation).....	26
3.7.7	Expression des rekombinaten MIA2 Protein.....	27
3.8	Zellkultur.....	27
3.8.1	Humane HCC-Zell-Linien.....	27
3.8.2	Zell-Linie von humanen aktivierten hepatischen Sternzellen (HSZ).....	27
3.8.3	Zellkulturmedien.....	28
3.8.4	Kultivierung von Zell-Linien.....	28
3.8.5	Isolation von primären humanen Hepatozyten (PHH)	29
3.8.6	Isolation von humanen hepatischen Sternzellen (HSZ).....	29
3.8.7	Zellzahlbestimmung	30
3.8.8	Einfrieren von HCC-Zellen und primären aktivierten HSZ.....	31
3.8.9	Auftauen von Zellen	31
3.8.10	Generierung von konditioniertem Medium	31
3.9	Gewebeproben.....	32
3.9.1	Murine HCC-Gewebeproben	32
3.9.2	Humanes HCC-Gewebe	32
3.10	Molekularbiologische DNA- und RNA-Methoden.....	32
3.10.1	DNA-Isolierung.....	32
3.10.2	RNA-Isolierung.....	32
3.10.3	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	33
3.10.4	Reverse Transkription von RNA in cDNA	33
3.10.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.10.6	Quantitative real time (RT) PCR	34
3.10.7	Nachweis genomischer Verluste.....	36
3.10.8	Analyse der Promotormethylierung.....	36
3.10.9	Sequenzierung	37
3.10.10	Gelelektrophorese.....	37
3.10.11	Restriktionsverdau	38
3.10.12	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
3.10.13	Ligation.....	38
3.10.14	MIA2 siRNA Vektor	39
3.10.15	Transiente und stabile Transfektion.....	41

3.10.16 siRNA (small interfering RNA)	41
3.11 Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.11.1 Verwendete Antikörper	42
3.11.2 Herstellung von Gesamtproteinlysaten	43
3.11.3 Herstellung nukleärer Extrakte.....	43
3.11.4 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	44
3.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.11.6 Proteindetektion durch Westernblotanalyse	45
3.11.7 HCC-Tissue-Microarray	46
3.11.8 Histologische und immunhistochemische Analysen	48
3.11.9 Immunfluoreszenz.....	49
3.11.10 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling).....	50
3.11.11 Quantifizierung der aktiven nukleären NFκB Konzentration	50
3.12 Laktatmessung	50
3.13 Durchflusszytometrische Analyse	50
3.14 Funktionelle Untersuchungen	51
3.14.1 Apoptose	51
3.14.2 Zellzyklusanalyse	52
3.14.3 XTT-Proliferationsanalyse.....	52
3.14.4 Migrations- und Invasionsanalyse.....	52
3.14.5 Analyse des matrixunabhängigen Wachstums.....	53
3.14.6 Sphäroidmodell	54
3.14.7 Nacktmausmodell.....	54
3.14.8 Statistische Auswertung.....	55
4 Ergebnisse.....	56
4.1 Analyse der Bedeutung von aktivierten HSZ für die Tumorigenität von HCC-Zellen	56
4.1.1 Effekt von konditioniertem Medium von aktivierten HSZ auf HCC- Zellen <i>in vitro</i>	56
4.1.2 Effekt von aktivierten HSZ auf HCC-Zellen in einem dreidimensionalen <i>in vitro</i> Kokultur System	58
4.1.3 Effekt von aktivierten HSZ auf HCC-Zellen <i>in vivo</i> im Nacktmausmodell.....	59
4.1.4 Effekt von aktivierten HSZ auf die Aktivierung von ERK und NFκB in HCC-Zellen.....	61
4.2 Regulation und Funktion des Proteins MIA2 im Verlauf der Hepatokanzerogenese	63
4.2.1 Reduzierte HNF-1 Expression führt im HCC zu verminderter MIA2 Expression	63
4.2.2 Re-Expression von MIA2 in HCC-Zellen.....	65
4.2.3 Funktionelle Veränderungen in HCC-Zellen <i>in vitro</i> nach MIA2 Re-Expression	67
4.2.4 Tumorigenität der MIA2 re-exprimierenden HCC-Zellen <i>in vivo</i>	69

4.2.5	MIA2 Expression im humanen HCC	70
4.2.6	Generierung von MIA2 Knockout Mäusen bzw. transgenen Mäusen mit (konditionellem) Knockdown von MIA2.....	74
4.2.6.1	Grundlagen für die Generierung einer MIA2 Knockout Maus	74
4.2.6.2	Grundlagen für den konditionellen Knockdown von MIA2 in der Maus	78
4.3	FGFR2-IIIb im hepatozellulären Karzinom.....	82
4.3.1	FGFR2-IIIb Expression im HCC <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	82
4.3.2	FGFR2-IIIb Expression <i>in situ</i> in humanem HCC-Gewebe	83
4.3.3	Molekulare Mechanismen der verminderten FGFR2-IIIb Expression im HCC... ..	86
4.3.4	Re-Expression von FGFR2-IIIb in HCC-Zellen.....	89
4.3.5	Funktionelle Veränderungen in FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen <i>in vitro</i>	90
4.3.6	Der Effekt von KGF und einem Inhibitor der Tyrosinkinase Aktivität auf die Tumorigenität der FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen	92
4.3.7	Tumorigenität der FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen <i>in vivo</i>	93
4.4	GLUT1 im hepatozellulären Karzinom.....	95
4.4.1	GLUT1 Expression im HCC	95
4.4.2	Inhibierung der GLUT1 Expression in HCC-Zellen.....	99
4.4.3	Funktionelle Veränderungen nach GLUT1 Suppression in HCC-Zellen	101
4.4.4	Einfluss von aktivierten HSZ auf die GLUT1 Expression von HCC-Zellen.....	102
5	Diskussion.....	104
5.1	Bedeutung von aktivierten HSZ für die Tumorigenität von HCC-Zellen	105
5.2	Regulation und Funktion des Proteins MIA2 im Verlauf der Hepatokanzerogenese	109
5.3	Expression und Funktion von FGFR2-IIIb im HCC.....	112
5.4	Expression und Funktion von GLUT1 im HCC	116
5.5	Zusammenschau und gemeinsame Bewertung der erzielten Ergebnisse	119
6	Literaturverzeichnis.....	123
7	Abkürzungsverzeichnis	139
8	Anhang.....	140
8.1	Eigene Publikationen	140
8.2	Vorträge und Posterpräsentationen	141
8.3	Danksagung	144
8.4	Eidesstattliche Erklärung.....	145

1 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der häufigsten malignen Tumoren weltweit mit weiterhin steigender Inzidenz. Die Prognose des HCC ist außerordentlich schlecht, da bisher keine effektiven Therapieansätze existieren und das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon weit fortgeschritten ist, so dass auch resektive Therapieverfahren nicht mehr zum Einsatz kommen können.

Die Leberzirrhose stellt den Hauptrisikofaktor für die HCC-Entstehung dar. Diese entsteht auf dem Boden einer chronischen Leberschädigung durch progredienten fibrotischen Umbau des Lebergewebes. Hierbei spielen aktivierte hepatische Sternzellen (HSZ) eine zentrale Rolle, da sie die Quelle für die exzessive Produktion und Deposition extrazellulärer Matrixproteine bei der Leberfibrose darstellen. Zudem bilden und durchsetzen sie auch das HCC-Stroma und sezernieren verschiedene prokanzerogene Faktoren. Die Bedeutung von aktivierten HSZ für die HCC-Progression war bislang jedoch weitgehend unbekannt.

Zentrales Ziel dieser Arbeit war es daher, die Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen zu analysieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass aktivierte HSZ das Wachstum, die Apoptoseresistenz, die Migration und die Invasivität von HCC-Zellen *in vivo* und *in vitro* fördern. Als potentielle Mechanismen wurde eine durch aktivierte HSZ induzierte Aktivierung von Erk1/2 und NFκB in HCC-Zellen identifiziert. Beide Signalkaskaden spielen eine wichtige Rolle in der HCC-Entstehung und -Progression. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion von aktivierten HSZ mit HCC-Zellen und die bei dieser Interaktion relevanten Mediatoren ein innovatives Target für die HCC-Therapie darstellen könnten.

Ferner wurden in der vorliegenden Arbeit drei Moleküle bzw. (molekulare) Mechanismen analysiert, von denen wir, basierend auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, annahmen, dass sie bei der Interaktion von aktivierten HSZ und HCC-Zellen eine wichtige (pathophysiologische) Rolle spielen.

Zum einen wurde die Regulation und Wirkung des Proteins *Melanoma Inhibitory Activity 2* (MIA2) im HCC analysiert. Dieses Protein wird spezifisch von Hepatozyten exprimiert und bei chronischer Leberschädigung induzierten aktivierte HSZ eine gesteigerte MIA2 Expression. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine reduzierte MIA2 Expression im HCC durch den Verlust der HNF-1 Expression induziert wird. Zudem zeigten HCC-Zellen, die stabil mit MIA2 transfiziert wurden, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibiertes Wachstum und Invasivität, was darauf hinweist, dass MIA2 im HCC einen Tumorsuppressor darstellt. Auch durch Gabe von rekombinantem MIA2 Protein konnte die Tumorigenität von HCC-Zellen inhibiert werden, was eine potentielle therapeutische Anwendung von MIA2 anzeigt. Für weiterführende Studien der (patho-)physiologischen Wirkung von MIA2 konnten zudem Grundlagen für die Generierung einer konditionellen MIA2 Knockdown Maus durch RNA Interferenz und einer konstitutiven MIA2 Knockout Maus durch homologe Rekombination geschaffen werden.

Ferner wurde die Expression und Funktion des *Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb* (FGFR2-IIIb) im HCC analysiert. Dieser Rezeptor wird in der Leber spezifisch von Hepatozyten exprimiert und fördert die Proliferation von Hepatozyten und die Leberregeneration. Interessanterweise wird der spezifische Ligand *Keratinocyte Growth Factor* (KGF), der exklusiv am FGFR2-IIIb bindet, im Verlauf der Leberschädigung von aktivierten HSZ *de novo* exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die FGFR2-IIIb Expression im HCC vermindert oder verloren ist und dieser Verlust in humanen HCC-Proben mit einer erhöhten Tumorigenität assoziiert ist. Durch eine Re-Expression des Rezeptors in HCC-Zellen wurde die Tumorigenität von HCC-Zellen *in vitro* und *in vivo* gehemmt. Dieses Ergebnis ist von großer Bedeutung, da für KGF mehrere potentielle therapeutische Anwendungsmöglichkeiten bestehen, u.a. zur Unterstützung der Leberregeneration bei chronischen Lebererkrankungen. Da KGF ausschließlich an FGFR2-IIIb bindet, war es wichtig auszuschließen, dass KGF über FGFR2-IIIb auch prokanzerogene Wirkung zeigt.

Weiterhin wurde die Expression und Funktion des Glukosetransporters GLUT1 im HCC analysiert, der die Glukoseaufnahme in Tumorzellen beeinflusst. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass aktivierte HSZ in HCC-

Zellen die Expression von GLUT1 und mehreren Enzymen der Kaskade der anaeroben Glykolyse induzieren. Es konnte sowohl in HCC-Zellen und auch in humanem HCC-Gewebe eine vermehrte GLUT1 Expression nachgewiesen werden. Diese korrelierte in humanem HCC-Gewebe mit erhöhter Proliferation und Invasivität der HCC-Zellen. Durch Inhibierung der GLUT1 Expression in HCC-Zellen *in vitro* wurde dagegen deren Proliferation und Migration gehemmt. Ferner ging durch Inhibierung der GLUT1 Expression in HCC-Zellen auch deren Laktatproduktion zurück. Zusammenfassend wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass GLUT1 durch Steigerung der anaeroben Glykolyse in HCC-Zellen deren Tumorigenität fördert. Die Inhibierung von GLUT1 könnte somit im HCC einen innovativen therapeutischen Ansatz darstellen.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit wesentlich neue Erkenntnisse zur Bedeutung von aktivierten HSZ für die HCC-Entstehung und -Progression gewonnen werden. So gelang es, wichtige Hinweise für potentielle innovative therapeutische Ansätze zu gewinnen. Zudem könnten MIA2, FGFR2-IIIb oder GLUT1 auch als prognostische Marker für die Progression dieses hochmalignen Tumors eingesetzt werden.

2 Einleitung

2.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

2.1.1 Häufigkeit und Inzidenz

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den gravierendsten und lebensbedrohlichsten Folgen einer chronischen Lebererkrankung. Mit jährlich über eine Million Todesfällen ist es einer der häufigsten malignen Tumore weltweit (1). Neueste Studien zeigen ferner, dass die Inzidenz insbesondere in den westlichen Ländern weiter steigt (2-7). Auch in Deutschland stellt das HCC zwar nur den 7.-8. häufigsten Tumor dar, ist aber der Tumor mit dem größten Inzidenzanstieg (8).

Das HCC gehört in Mitteleuropa und Nordamerika zu den Tumoren des höheren Lebensalters mit einem Häufigkeitsgipfel im 7. Lebensjahrzehnt (9-11). Weltweit liegt das durchschnittliche Alter an einem HCC zu erkranken zwischen 45 und 60 Jahren, wobei sich auch in westlichen Industrienationen der Häufigkeitsgipfel zunehmend zu einem jüngeren Alter verschiebt (12). Die Prävalenz des HCCs ist bei Männern 3- bis 10-fach höher als bei Frauen (9; 13-16).

2.1.2 Ätiologie des HCC

Bei der Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms handelt es sich um einen Mehrstufenprozess, in dem multiple genetische Alterationen zur malignen Transformation führen. Insgesamt ist die molekulare Hepatokanzerogenese jedoch noch weitgehend ungeklärt (17).

HCCs entwickeln sich in der Mehrzahl der Fälle auf dem Boden einer zirrhotisch veränderten Leber (9; 13; 14; 17-22). Die Ätiologie der Zirrhose scheint dabei weniger von Bedeutung zu sein als der zirrhotische Umbau per se (23).

Zu den Hauptursachen einer Zirrhose zählen vor allem chronische Hepatitis B (HBV) und Hepatitis C (HCV) Virus Infektionen, sowie chronischer Alkoholabusus und die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) (24). Der Anteil weiterer Lebererkrankungen, die die Entstehung eines malignen Lebertumors induzieren, ist insgesamt gering. Als Ursachen wurden angeborene Stoffwechselerkrankungen (Hämochromatose, Morbus Wilson, Alpha-1-

Antitrypsinmangel), Autoimmun-Hepatitis und primäre biliäre Erkrankungen (Primäre biliäre Zirrhose, Primäre sklerosierende Cholangitis) identifiziert (13).

Weltweit spielen zudem Aflatoxine des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* als potente Karzinogene in tropischen Ländern mit feucht-heißem Klima eine große Rolle. Eine zusätzliche Infektion mit dem Hepatitis B Virus stellt eine multiplikative Interaktion dar, was auf unterschiedliche karzinogene Mechanismen schließen lässt (25).

2.1.3 Therapie und Prognose

Die Prognose des HCC ist außerordentlich schlecht und hat sich über die letzten Jahrzehnte kaum verbessert. Bei unbehandelten Patienten beträgt die mediane Überlebenszeit ab Symptombeginn unter 12 Monaten (26). Ursache dafür ist zum einen ein meist fortgeschrittenes Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose, das Stadium der Grunderkrankung (Leberzirrhose) und die Tatsache, dass bisher keine effektiven medikamentösen oder biologischen Therapieansätze existieren. Die einzigen effektiven Therapieverfahren sind die lokale Destruktion (Ethanol-Injektion, Radiofrequenzablation und (Chemo-)Embolisation) und die Resektion sowie die Lebertransplantation als aggressivste chirurgische Therapie des Tumors sowie der Präkanzerose (Zirrhose). Dabei ist im Einzelfall das optimale Therapieverfahren bzw. deren Sequenz bisher nicht geklärt. Zudem können jene auch bislang oft aufgrund der zu späten Diagnosestellung bzw. des (hieraus resultierenden) fortgeschrittenen Tumorstadiums nicht mehr zum Einsatz kommen (27). Ferner besteht nach Lebertransplantation – als aggressivstem potentiell kurativen Therapieansatz – durch die derzeit verwendete Immunsuppression mit Calcineurin-Inhibitoren aufgrund ihrer proangiogenetischen und tumorigenen Wirkung ein hohes Rezidivrisiko (28).

2.2 Leberzellen und Risikofaktor Leberzirrhose

2.2.1 Leberzellen

Das Parenchym der Leber setzt sich außer aus Hepatozyten (94 Vol. %) auch aus etwa Nicht-Parenchymzellen (6 Vol. %) zusammen. Dabei beinhalten letztere v.a. Kupffer-Zellen (residente Makrophagen der Leber), sinusoidale Endothelzellen, lebereigene Lymphozyten und hepatische Sternzellen (HSZ). HSZ repräsentieren etwa 10% der Nicht-Parenchymzellen und dienen als Retinoid-Speicher (40-70% der Körperreserven). HSZ sind im subendothelialen Disse-Raum (siehe Abbildung 1A) lokalisiert und umfassen mit ihren sternförmigen Ausläufern den sinusoidalen Endothelzellschlauch (29; 30).

2.2.2 Risikofaktor Leberzirrhose als Folge der Aktivierung hepatischer Sternzellen

Im Falle chronischer Leberschädigung kommt es zu einem Aktivierungsprozess der HSZ. Dabei transdifferenzieren die physiologisch ruhenden HSZ zu einem aktivierten und Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp (31; 32). Ein Marker für aktivierte HSZ/Myofibroblasten ist *α -Smooth Muscle Aktin* (33). Die Bedeutung der Aktivierung von HSZ stellt den Hauptfaktor für die Entwicklung einer Leberfibrose bis hin zu einer Leberzirrhose dar. Im Verlauf der Fibrose kommt es zu einem Verlust homöostatischer Kontrollmechanismen von extrazellulärer Matrix (EZM)-Synthese (Fibrogenese) und EZM-Degradation (Fibrolyse) mit konsekutiv exzessiver Deposition von EZM v.a. Kollagen Typ I im chronisch geschädigten Organ (34-36). Durch die zusätzliche Expression prokanzerogener und löslicher Faktoren wie z.B. PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) und MMPs (Matrix Metalloproteinasen) stellt die zirrhotische Leber (Abbildung 1B), wie bereits dargestellt, den Hauptrisikofaktor für ein HCC dar (37).

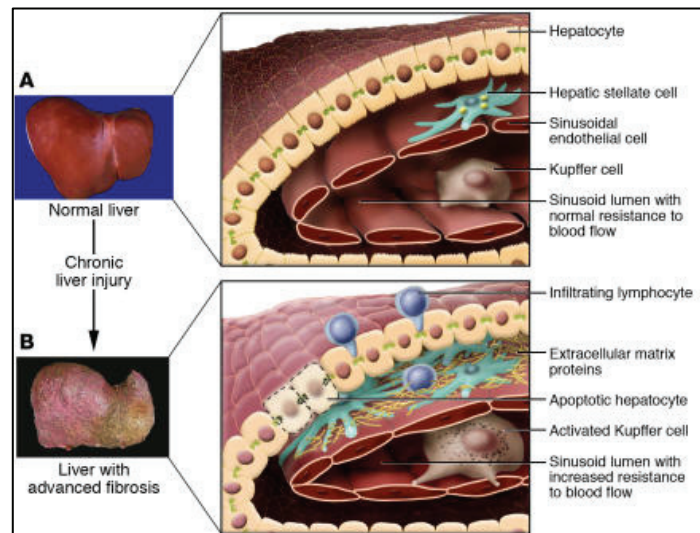


Abbildung 1. Veränderungen in der hepatischen Architektur im Verlauf chronischer Leberschädigung, A: normale Leber, B: während chronischer Leberschädigung infiltrieren Lymphozyten das hepatische Parenchym, Hepatozyten gehen in Apoptose und Kupffer-Zellen werden aktiviert; ebenso werden HSZ aktiviert, proliferieren und sezernieren große Mengen extrazellulärer Matrixproteine; sinusoidale Endothelzellen verlieren ihre Fenestration und durch die Kontraktion aktivierter HSZ wird der Blutstrom in den hepatischen Sinusoiden vermindert; Abbildung aus Bataller und Brenner, 2005.

2.3 Tumor: Mikromilieu und Stroma

Als Modell wird generell angenommen, dass sich die Karzinomentstehung aus der Anhäufung somatischer Mutationen in epithelialen Zellen ergibt. Das „Verhaltensmuster“ von Karzinomen wird aber insbesondere auch durch das komplexe Mikromilieu des Tumors beeinflusst, das aus diffusionsfähigen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, sowie aus nicht epithelialen Zellen wie Endothelzellen, Makrophagen und v.a. aktivierten (Myo-)Fibroblasten besteht (38). Die Interaktion des Tumorstromas mit den Karzinomzellen ist ein aktiver Prozess, der u.a. die Tumervaskularisierung, aber auch die Invasion und Metastasierung fördert (37).

2.3.1 Einfluss von Karzinomzellen auf das Tumorstroma

Es ist bekannt, dass Karzinome ein modifiziertes und prokanzerogenes Stroma induzieren können (39-41), indem sie Faktoren exprimieren, die zur Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese), zur Veränderung der extrazellulären Matrix und zur Proliferation von Fibroblasten im Tumorstroma beitragen. Außerdem rekrutieren sie verstärkt inflammatorische Zellen (42; 43). Die Rolle inflammatorischer Zellen

bei Tumorimmunität und die Rolle von Endothelzellen bei Neoangiogenese sind hierbei bereits gut beschrieben (44; 45).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass insbesondere auch Fibroblasten im Tumorstroma einen großen Einfluss auf die Karzinom-Entwicklung und -Progression haben (46). Diese aktivierten Fibroblasten im Tumorstroma zeichnen sich durch verstärktes proliferatives sowie migratorisches Potential aus und werden auch peritumorale Fibroblasten, reaktives Stroma oder Tumor-Assoziierte Fibroblasten (TAFs) genannt (47; 48).

Im Weiteren soll die prokanzerogene Bedeutung von Myofibroblasten bei der Tumorentstehung und -Progression dargestellt werden.

2.3.2 Bedeutung von Fibroblasten im Tumorstroma für die Karzinom-Entstehung und -Progression

Die prokanzerogene Wirkung von Fibroblasten im Tumorstroma konnte bereits in einigen Karzinommodellen gezeigt werden.

So konnte in einem *in vitro* und *in vivo* Kokulturmolell gezeigt werden, dass Tumor assoziierte Fibroblasten in der Lage sind, eine maligne Transformation in normalen Epithelzellen der Prostata zu induzieren (49). Interessanterweise konnte auch durch ionisierende Bestrahlung der Brustdrüsen von Mäusen ein Stroma erzeugt werden, das zu einem Remodeling der extrazellulären Matrix (EZM) führte, wodurch das tumorigene Potential der epithelialen Zellen gefördert wurde (50; 51). In einem murinen Xenograftmolell konnte die Überexpression von TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) und HGF durch humane Fibroblasten in normalen humanen Mammaepithelzellen maligne Läsionen induzieren (52).

Ferner konnte in einem Nacktmausmolell verstärktes Tumorwachstum nachgewiesen werden, wenn Prostatakarzinomzellen zusammen mit Fibroblasten injiziert werden. In diesem Molell werden Myofibroblasten durch TGF- β so modifiziert, dass sie vermehrt Gene für das Gewebe-Remodeling exprimieren und somit das Tumorwachstum fördern (53; 54). Auch die Ko-Implantation von kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten führte zu beschleunigtem Tumorwachstum, wobei der genaue Mechanismus hierfür nicht identifiziert werden konnte (55). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten neben der Proliferation auch die Invasivität von Kolonkarzinomzellen *in vivo* induzieren können (56).

2.3.3 Bedeutung von aktivierten HSZ für die Progression von hepatischen Metastasen

Es konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen hepatische Sternzellen induzieren können, VEGF-abhängige endotheliale Zellmigration, Apoptoseresistenz und Proliferation zu fördern. So findet man in einem Melanom-Metastasierungsmodell *in vivo* bereits Myofibroblasten während des avaskulären Wachstums einer hepatischen Melanommetastase, bevor es zur Rekrutierung endothelialer Zellen kommt. Ferner korreliert die spätere Kolokalisation von aktivierten HSZ und hepatischen sinusoidalen Endothelzellen mit der Vaskularisierung der Metastase (57).

Aktivierte HSZ exprimieren und sekretieren VEGF (58), das die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördert (59). Es wurde auch gezeigt, dass konditionierte Medien aktivierter hepatischer Sternzellen die Proliferation von Endothelzellen stimulieren können (60). Ein hoher Serumspiegel von VEGF steht zudem in Zusammenhang mit vaskulärer Invasion, Metastasierung und einer schlechten Prognose für HCC-Patienten (61).

In einem kolorektalen Metastasierungsmodell *in vivo* wurde zudem beobachtet, dass es um die Metastase zu einer Akkumulation von aktivierten HSZ kommt. Diese werden anscheinend von den Karzinomzellen aktiviert und sezernieren daraufhin verschiedene prokanzerogene Wachstumsfaktoren (62).

2.3.4 Bedeutung von aktivierten HSZ für HCC-Entstehung und -Progression

Das HCC-Stroma besteht aus Kapillaren, Ateriolen und fibrotischen Bändern und für das HCC sind auch Sinusoid-ähnliche Kapillaren charakteristisch. Mittels Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie konnten in diesen perisinusoidalen Räumen des HCC Myofibroblasten nachgewiesen werden (63-67). Der Ursprung dieser infiltrierenden Zellen sind die tumoralen Sinusoide, fibrotische Septen und Kapseln. Die Zellen sind positiv für α -Smooth Muscle Aktin und konnten als aktivierte HSZ/Myofibroblasten identifiziert werden (68-70). Zudem ist die Anzahl perisinusoidaler Myofibroblasten im HCC im Vergleich zur zirrhotischen Leber erhöht (71). Wie bereits dargestellt, kommt es besonders beim Prozess der Leberfibrose zu einer quantitativ und qualitativ stark veränderten EZM-

Komposition, die ebenfalls die HCC-Entstehung und -Progression begünstigen könnte. Denn Zell-Matrix-Interaktionen sind entscheidend für die Differenzierung und das Wachstum von Geweben, so dass durch einen Interaktionsverlust Neoplasien entstehen können (72-74).

Bislang war die Rolle von aktivierten HSZ im HCC weitgehend unbekannt.

Zentrales Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher, die Bedeutung von aktivierten HSZ/Myofibroblasten für die Entstehung und Progression des HCC zu analysieren (Abbildung 2).

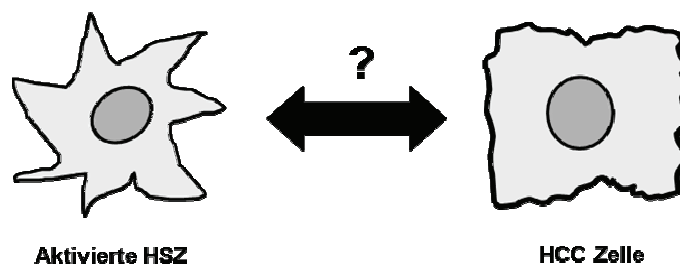


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Hypothese, dass die wechselseitige Interaktion von aktivierten HSZ und HCC-Zellen die Hepatokanzerogenese fördert.

Aufbauend auf den hierbei entwickelten Modellen und Ergebnissen, sollten dann insbesondere drei Moleküle bzw. (molekulare) Mechanismen analysiert werden, von denen wir, basierend auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, annahmen, dass sie bei der Interaktion von aktivierten HSZ und HCC-Zellen eine wichtige (pathophysiologische) Rolle spielen:

- Das leberspezifisch sekretierte Protein ***Melanoma Inhibitory Activity 2 (MIA2)***,
- der Rezeptor ***Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb (FGFR2-IIIb)*** und sein spezifischer Ligand der Wachstumsfaktor ***Keratinocyte Growth Factor (KGF)*** und
- der Glukose Transporter **GLUT1** und der so genannte „**Warburg Effekt**“ (Phänomen der anaeroben Glykolyse von Tumorzellen unter aeroben Bedingungen).

Im Folgenden sollen diese drei Moleküle bzw. Mechanismen sowie die Rationale für die Analyse Ihrer Bedeutung für die HCC-Entstehung und -Progression dargestellt werden.

2.4 *Melanoma Inhibitory Activity 2 (MIA2)*

2.4.1 Die *Melanoma Inhibitory Activity (MIA)* Gen-Familie

Das Gen *Melanoma Inhibitory Activity 2* (MIA2) wurde durch unsere Arbeitsgruppe bei einer GenBank™ Suche neu identifiziert. Der Genlokus liegt auf dem menschlichen Chromosom 14q13. MIA2 gehört zusammen mit MIA, OTOR und TANGO zu der MIA Gen-Familie. Alle vier bis heute bekannten Mitglieder der Gen-Familie haben mit einer SH3-Domäne und zwei intramolekularen Disulfidbrückenbindungen gleiche strukturelle Eigenschaften. Außerdem besitzen sie eine ähnliche genomische Organisation. Sie stimmen in 34-45% auf Protein- und in 47-59% auf cDNA-Ebene überein (75-77).

Im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern enthält MIA2 eine zusätzliche C-terminale Region aus 422 Aminosäuren ohne Homologie zu anderen bekannten Proteinen (78). Interessanterweise unterscheiden sich die vier Mitglieder der MIA Gen-Familie völlig in Hinblick auf ihr Expressionsmuster. MIA wird exklusiv im Knorpel aber nicht in anderen nicht-neoplastischen Geweben exprimiert (79). OTOR zeigt ein sehr beschränktes Expressionsmuster in der Cochlea, im Auge und im Knorpel (80). Tango hingegen zeigt ein breites Expressionsmuster, kann aber nicht im hämatopoetischen System nachgewiesen werden (81). Im Gegensatz dazu wird MIA2 ausschließlich in der Leber (Abbildung 3) und hier von Hepatozyten exprimiert (82).

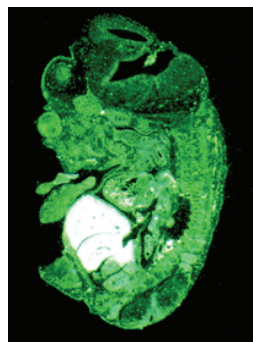


Abbildung 3. *In situ* Hybridisierung mit [³³P]-markierter antisense MIA2 RNA Sonde: spezifische MIA2 Expression in der embryonalen Mausleber (E12,5), Abbildung aus Bosserhoff et al., 2003.

2.4.2 Regulation der MIA2 Expression

Die Expression von MIA2 in Hepatozyten wird über den Transkriptionsfaktor HNF-1 reguliert. Ferner induzieren IL-6 und TGF- β 1 die Expression von MIA2. Dies ist in Übereinstimmung mit den STAT3- (IL-6 Regulation) und SMAD- (TGF- β Regulation) Konsensus-Bindungsstellen im MIA2 Promotor (83). Interessanterweise werden bei chronischen Lebererkrankungen beide Zytokine hauptsächlich von aktivierten HSZ/Myofibroblasten exprimiert und unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass aktivierte HSZ auch die MIA2 Expression in Hepatozyten induzieren (84). Hierzu passend konnte zudem gezeigt werden, dass es bei chronischen Lebererkrankungen zu einer gesteigerten MIA2 Expression kommt und diese signifikant mit dem Ausmaß der hepatischen Fibrose korreliert (85).

Während MIA2 also in der Leberzirrhose, dem Hauptrisikofaktor für die HCC-Entstehung gesteigert exprimiert wird, findet man bei den meisten HCCs eine verminderte Expression. Hinsichtlich der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von MIA2 lagen bislang keine Informationen vor.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, die Funktion und Regulation von MIA2 im HCC zu analysieren (Abbildung 4).

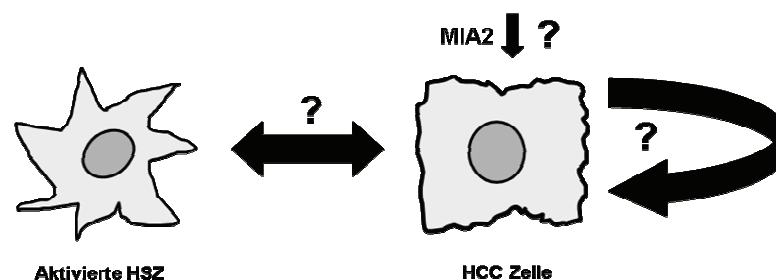


Abbildung 4. Ziel der Arbeit: Analyse der autokrinen (↷) und parakrinen (↔) Funktionen von MIA2 und Aufklärung der Regulation der verminderten (↓) MIA2 Expression im HCC.

2.5 *Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb*

2.5.1 *Fibroblast Growth Factors (FGF) und Struktur sowie Isoformen der Fibroblast Growth Factor Rezeptoren (FGFR)*

Fibroblast Growth Factor Rezeptoren (FGFRs) sind transmembrane Tyrosinkinase Rezeptoren. Abhängig von Zelltyp und Entwicklungsstadium regulieren sie Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Wundheilung und Angiogenese. Sie werden durch vier verschiedene Gene, FGFR 1-4, codiert. Die codierten Proteine sind strukturell einander sehr ähnlich und in ihrer Aminosäuresequenz hoch konserviert.

FGFRs sind hochaffine Rezeptoren für *Fibroblast Growth Factors* (FGFs). FGFs bilden eine Familie von Polypeptid-Mitogenen mit einer Größe von 17-34 kDa, deren Bezeichnung sich dadurch erklärt, dass die ersten identifizierten FGFs (FGF1 und FGF2) mitogene Wirkung auf Fibroblasten zeigten. Es wurden bisher 22 verschiedene FGF Gene (Abbildung 5) identifiziert, von denen 18 für FGFR Liganden codieren (86).

FGFR1b	FGF1, -2, -3 and -10
FGFR1c	FGF1, -2, -4, -5 and -6
FGFR2b	FGF1, -3, -7, -10 and -22
FGFR2c	FGF1, -2, -4, -6, -9, -17 and -18
FGFR3b	FGF1 and -9
FGFR3c	FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18 and -23
FGFR4	FGF1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18 and -19

Abbildung 5. Ligandenspezifität der FGFR Isoformen, Abbildung aus Eswarakumar et al., 2005.

FGFRs sind Glykoproteine mit einer extrazellulären Region, die sich aus einem Signalpeptid und drei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen Igl, IgII und IgIII zusammensetzt. Diese Domänen sind durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten stabilisiert und vermitteln die Bindung von Liganden. Zwischen der Igl- und IgII-Domäne findet sich eine Folge von sauren Aminosäuren. Diese sog. „acidic box“ kommt nur bei FGFRs vor und ist eine Bindungsstelle für Heparin. Weiterhin besitzen sie eine hydrophobe Transmembranregion und eine intrazelluläre Region, die eine Juxtamembrandomäne, eine katalytische Tyrosinkinasedomäne und eine carboxyterminale Domäne mit mehreren

kommt (92). Die aktivierten Domänen autophosphorylieren sich anschließend gegenseitig an mehreren Tyrosinresten im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptormoleküls. Über diese Phosphorylierungen können die Rezeptoren mit zahlreichen zytoplasmatischen Molekülen interagieren und eine Vielzahl von biologischen Prozessen beeinflussen.

2.5.2 Biologische Funktion der FGFRs und ihre Bedeutung für die Kanzerogenese

FGFRs sind potente Regulatoren der Proliferation (93), Differenzierung (94; 95) und Migration (96) von Zellen. Eine zentrale Rolle der FGFRs bei der frühen Embryogenese zeigen Studien an Mäusen mit gezielter Inaktivierung der FGFR Gene: Der homozygote Knockout sowie gezielte Mutagenese führen zu einer Reihe schwerster Entwicklungsstörungen und zum Teil zum Absterben des Embryos noch vor der Gastrulation (97-99). Die Bedeutung von FGF-Rezeptoren bei der Skelettentwicklung ist besonders gut dokumentiert. FGFRs sind sowohl an der Induktion der Extremitätenanlage (FGFR2), an der Regulation des Längenwachstums der Röhrenknochen in den Extremitäten (FGFR3) als auch an der Regulation des Schädelknochenwachstums in den Schädelnähten (FGFR2) beteiligt. Die zentrale Rolle der FGFRs bei der Skelettentwicklung ist auch daran zu erkennen, dass wenigstens acht beim Menschen vorkommende autosomal-dominant vererbte Formen von Skelettfehlbildungen (vier Formen disproportionierten Minderwuchses und vier Craniosynostose-Syndrome) bekannt sind, die in Zusammenhang mit Mutationen in FGFR-Genen stehen (100).

In Hinblick auf die Kanzerogenese und Tumorprogression scheint sich die Funktion und Wirkung unterschiedlicher FGFRs dagegen, auch abhängig vom jeweiligen Organsystem, zu unterscheiden.

So konnte zum einen in mehreren Tumoren gezeigt werden, dass FGFRs bzw. über FGFR vermittelte Signale die Tumorigenität fördern. Es wurde eine Translokation in der Kinase Domäne von FGFR1 bei einigen malignen hämatopoetischen Erkrankungen beobachtet und die Aktivierung von FGFR3 durch Punktmutationen stellt ein häufiges Ereignis beim Blasenkarzinom dar (101; 102). Auch bei mehreren anderen Tumoren, u.a. auch beim HCC konnte eine

gesteigerte FGFR1 Expression nachgewiesen und deren Bedeutung für eine gesteigerte Tumorigenität aufgezeigt werden (103).

FGFR2 wird dagegen bei einigen Tumoren wie dem Blasen- oder Prostatakarzinom vermindert exprimiert (104; 105) und zum Teil konnte auch gezeigt werden, dass FGFR2-IIIb als Tumorsuppressor wirkt (106). Dagegen ist die Expression von FGFR2-IIIb in Tumoren des Magens oder der Lunge mit einem weniger differenzierten Phänotyp und einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert (107).

Bisher wurde die Expression und Funktion von FGFR2-IIIb im HCC noch nicht analysiert. In einer vorangegangenen Untersuchung konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass FGFR2-IIIb in der Leber exklusiv von Hepatozyten exprimiert wird (108).

Zudem ist bekannt, dass FGFR2-IIIb eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration und Homöostase spielt (109). Außerdem konnten wir interessanterweise nachweisen, dass der spezifische FGFR2-IIIb Ligand FGF7/KGF während der hepatischen Fibrosierung gesteigert exprimiert wird, mit einem Maximum in zirrhotisch umgebauten Lebern. Die zelluläre Quelle der gesteigerten FGF7 Expression stellen dabei aktivierte HSZ dar (110).

Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Expression und Funktion von FGFR2-IIIb im HCC zu analysieren (Abbildung 7).

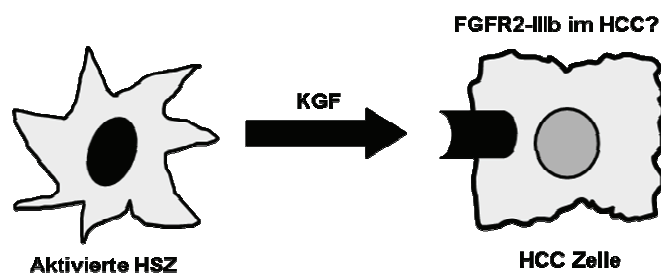


Abbildung 7. Ziel der Arbeit: Analyse der Expression und Funktion von FGFR2-IIIb im HCC und die der Einfluss von KGF, der von aktivierten HSZ sezernierte Ligand des FGFR2-IIIb.

2.6 „Warburg Effekt“ und GLUT1

2.6.1 „Warburg Effekt“

Der deutsche Biochemiker Otto Heinrich Warburg (1883-1970) beschrieb 1924 als erster, dass sich der Stoffwechsel aggressiver Tumorzellen von dem gesunder Zellen unterscheidet, indem sie trotz aeroben Bedingungen eine anaerobe Glykolyse betreiben. Die Beobachtung der gesteigerten Laktatproduktion wird als „Warburg Effekt“ bzw. aerobe Glykolyse bezeichnet (111). Für diese Entdeckung erhielt Warburg 1931 den Nobelpreis.

Das von normalen Zellen benötigte ATP für Proliferation und Überleben stammt aus zwei Quellen.

Die erste ist die Glykolyse, in der Glukose im Zytoplasma zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Dabei entstehen pro Glukosemolekül 2 ATP.

Die andere ist der Trikarbonsäurezyklus, in dem das in der Glykolyse gebildete Pyruvat via NADH und FADH₂ als Elektronendonator für die Atmungskette dient. Mit Sauerstoff als finalen Elektronenakzeptor wird durch den Elektronentransfer entlang der inneren mitochondrialen Membran ein Elektronengradient gebildet. Dieser wird von der ATP-Synthase zur Bildung von 36 ATP pro Glukose Molekül genutzt. Bei einer Limitation an Sauerstoff, wie es im Muskelgewebe bei Überbelastung der Fall ist, wird Pyruvat nicht im Trikarbonsäurezyklus verstoffwechselt, sondern durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert (Abbildung 8). Dieser Prozess wird anaerobe Glykolyse genannt (112).



Abbildung 8. Der Prozess der anaeroben Glykolyse: Glukose wird über die Enzymkaskade der Glykolyse zu Pyruvat und schließlich durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat verstoffwechselt.

2.6.2 GLUT1

Ein erhöhter Glukosestoffwechsel insbesondere in Verbindung mit anaerober Glykolyse ist ein weit verbreitetes Charakteristikum für maligne Zellen (113). Dieser Stoffwechsel ist hoch effizient, um sehr schnell ATP für Proliferation und Wachstum zu produzieren (114). Um den dadurch gesteigerten Bedarf an Glukose

decken zu können, bedarf es einer gesteigerten Expression von Glukosetransportern in der Zellmembran.

Die erleichterte Diffusion von Glukose in Zellen wird durch eine Familie homologer Proteine mediert. Die Glukosetransporter GLUT1-GLUT5 unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster, der Affinität zu Glukose und der physiologischen Regulation (115). Zusätzlich wurde eine humane Pseudogenesequenz für GLUT6 und GLUT7 als ein mikrosomaler Glukosetransporter in der Rattenleber beschrieben (116; 117). Das Molekulargewicht von GLUT1 beträgt je nach Glykosylierungsgrad 45-55 kDa. Der Transporter besteht aus insgesamt zwölf amphiphilen Transmembrandomänen, die sich so in der Plasmamembran anordnen, dass die hydrophoben Anteile nach außen in die Membran binden und in der Mitte eine hydrophile Pore für Glukose entsteht. Dabei liegen Amino-Terminus und Carboxyl-Terminus auf zytosolischer Seite. Die Bindung von Glukose verursacht eine Konformationsänderung, durch die das Molekül zur anderen Seite transportiert wird (115). In normalem adultem Gewebe wird GLUT1 insbesondere von Erythrozyten exprimiert, in anderen Geweben und benignen epithelialen Tumoren dagegen kaum (118-120).

2.6.3 GLUT1 im Karzinom

Es konnte bereits gezeigt werden, dass GLUT1 in vielen Karzinomen aberrierend exprimiert wird. So wurde eine erhöhte GLUT1 Expression in verschiedenen Karzinomen wie Mammakarzinom, squamöse Karzinome des Halses und Kopfes, sowie Nierenzellkarzinom nachgewiesen (121-123). Im Kolonkarzinom ist eine erhöhte GLUT1 Expression signifikant mit einer neoplastischen Progression und einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert (124). Eine andere Studie konnte ebenso im Kolonkarzinom nachweisen, dass eine verstärkte GLUT1 Expression auch mit einer vermehrten Lymphknoten-Metastasierung einhergeht (125).

Zudem stützen neueste Studien die Warburg-Hypothese. So konnte in einem *in vivo* Modell gezeigt werden, dass das Wachstum von Kolonkarzinomzellen gehemmt werden konnte, nachdem durch die Expression des Proteins Frataxin ein anaerober Stoffwechsel induziert wurde. Im Gegensatz dazu führte ein spezifischer Knockout dieses Gens in der Leber von Mäusen zur Entwicklung hepatischer Karzinome (126; 127). Frataxin ist ein mitochondriales Protein, das

aus 210 Aminosäuren besteht und eine noch nicht bis in alle Einzelheiten geklärte Funktion hat. Frataxin ist aber an der Bildung eisenhaltiger und schwefelhaltiger Proteine beteiligt und spielt beim mitochondrialen Eisentransport eine wichtige Rolle. Eine gestörte Frataxinbildung führt zu einer Störung des mitochondrialen Energiestoffwechsels (128-130).

2.6.4 GLUT1 im HCC-Gewebe

Frühere Studien konnten Unterschiede zwischen HCC-Zellen und Hepatozyten feststellen in Bezug auf die glykolytische Kapazität feststellen (131) und durch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) konnte gezeigt werden, dass die Menge an aufgenommenen [^{18}F]-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose (FDG) ein unabhängiger prognostischer Marker für das HCC ist (132). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die PET Aktivität mit einem fortgeschrittenen Tumor Stadium korreliert (133).

Das Phänomen der aeroben Glykolyse sowie die GLUT1 Expression und Funktion sind im HCC bislang nur wenig untersucht bzw. die bislang vorliegenden Studien mit jeweils nur relativ kleinen Fallzahlen zeigten unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der GLUT1 Expression im HCC (134-140). Dabei gibt es mehrere Hinweise und Hypothesen, dass gerade das Phänomen der aeroben Glykolyse beim HCC eine wichtige Rolle spielt (141; 142).

Zudem zeigt sich, dass auch hier aktivierten HSZ eine besondere Bedeutung zukommen könnte. So ist bekannt, dass Laktat, das Endprodukt der aeroben Glykolyse, in Fibroblasten eine gesteigerte Expression von Hyaluronsäure induzieren kann. Durch das Wasser der hydrierten Hyaluronsäure werden Räume für Migration und Proliferation geschaffen (143). So konnte im HCC eine erhöhte Hyaluronsäure-Konzentration nachgewiesen werden (144). Der Rezeptor für Hyaluronsäure CD44 ist in den meisten Karzinomen einschließlich HCC überexprimiert und ist mit Tumorprogression assoziiert (145; 146).

Weiter weisen Arbeiten von Koukourakis et al. darauf hin, dass insbesondere Fibroblasten im Tumorstroma des Lungen- und Kolonkarzinoms durch Aufnahme und Metabolisierung von Laktat das Mikromilieu günstig für die Tumorzellen beeinflussen (147; 148).

Ferner zeigten bislang unveröffentlichte vergleichende Arrayanalysen unserer Arbeitsgruppe, dass aktivierte HSZ in HCC-Zellen die Expression von GLUT1 und mehrerer Enzyme der Kaskade der aeroben Glykolyse induzieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst die Expression und Wirkung von GLUT1 im HCC zu analysieren, um hierdurch die Basis für nachfolgende Untersuchungen der Bedeutung der anaeroben Glykolyse im HCC und die Rolle von aktivierten HSZ in diesen Prozessen zu schaffen (Abbildung 9).

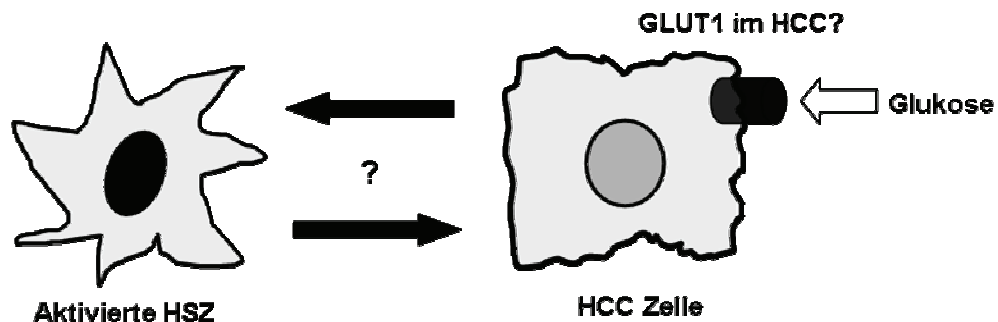


Abbildung 9. Ziel der Arbeit: Analyse der Expression und Wirkung des Glukosetransporters GLUT1 im HCC, sowie die Untersuchung der Bedeutung für die Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose SeaKem [®] LE	Biozym, Hess/Oldendorf
Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Ciprobay	Bayer, Leverkusen
Diflucan	Pfizer, Karlsruhe
DMEM Pulver	PAN-Biotech, Aidenbach
DMEM Fertigmedium	PAA Laboratories, Cölbe
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech, Aidenbach
Genitacin	Invitrogen, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumbicarbonat	Sigma, Deisenhofen
Nicht essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories, Cölbe
Nonidet [®] P40	Roche, Mannheim
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

Alle sonstigen verwendeten Chemikalien wurden von der Firma VWR, Darmstadt bezogen.

3.2 Gase

Alle Gase wurden von der Firma Linde Technische Gase, Höllriegelskreuth bezogen.

3.3 Verbrauchsmaterialien

Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalspitzen (10, 20, 100 und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tubes (50 ml)	Corning, New York, USA
Glaswaren (verschiedene)	Schott, Mainz
Multiwell Platten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipetten (5, 10, 25 und 50 ml)	Corning, New York, USA
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpell (No. 10)	Pfm, Köln
Strip Tubes (0,2 ml)	Peqlab, Erlangen
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Corning, New York, USA

3.4 Allgemeine Laborgeräte

Heiz- und Kühlblock:

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
---------------------	--------------------

PCR-Cycler:

GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
--------------------------	--------------------------------------

Pipetten:

Gilson (P2, P20, P200, P1000)	Gilson, Bad Camberg
-------------------------------	---------------------

Pipettierhelfer:

Accu-jet®	Brand, Wertheim
-----------	-----------------

Schüttelgeräte:

Kreisschüttler KS 260 basic	IKA® Werke, Staufen
Schüttelgerät 3017	GFL, Burgwedel

Spannungsgeräte:

Consort E145	Peqlab, Erlangen
Power Supply-EPS 301	Amersham Biosciences, München

Spektrophotometer:

EMax® Microplate Reader	MWG Biotech, Ebersberg
-------------------------	------------------------

Waage:

MC1 Laboratory LC 620 D	Sartorius, Göttingen
-------------------------	----------------------

Wasserbad:

Haake W13/C10

Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Zentrifugen:

Biofuge fresco

Heraeus, Hanau

Megafuge 1.0 R

Heraeus, Hanau

3.5 Plasmide

PAC 460

zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. M. Moser, MPI, Martinsried

pBluescript II SK

Stratagene, Heidelberg

pBS/U6 ploxPneo

zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. C. Deng, NIH, Bethesda, USA

pcDNA3.1

Invitrogen, Karlsruhe

pcDNA3.1 HNF1 α

zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. G. Kullak-Ublick, Universitätsspital Zürich, Schweiz

pCMX

Addgene, Cambridge, USA

pCRII-TOPO

Invitrogen, Karlsruhe

pGEM7

zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. M. Moser, MPI, Martinsried

pIC-Cre

zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. T. Hehlhans, Universität Regensburg

pIVEX2.3 MCS

Roche, Mannheim

pWH9

zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. M. Moser, MPI, Martinsried

pSV7d FGFR2-IIIb

zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. S. Werner, ETH, Zürich

3.6 Pufferlösungen

PBS-Puffer

140 mM

NaCl

10 mM

KCl

6,4 mM

Na₂HPO₄

2 mM

KH₂PO₄

pH 7,4

TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl	
	1 mM	EDTA	pH 8,0

3.7 Arbeiten mit Bakterien

3.7.1 Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF':
ultrakompetente *Escherichia coli* Stratagene, Heidelberg

294-Cre: Cre-Rekombinase
exprimierende *Escherichia coli* Gene Bridges, Heidelberg

3.7.2 Flüssigmedium und Agarplatten

LB Medium 10 g/l Pepton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
Substanzen wurden in H₂O_{dest.}
gelöst und autoklaviert.

Für Agarplatten: 15 g/l Agar

Antibiotikum:
100 µg/ml Ampicillin

3.7.3 Kultivierung

Die Bakterien wurden sowohl auf festem Nährboden als auch in Flüssigkultur kultiviert. Für die Selektion transformierter Bakterien wurde das Medium bzw. die Nährplatte mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt. Die Bakterien wurden mit einem sterilen Trigalsky Spatel auf Agarplatten ausplattiert und im Brutschrank 12-16 h bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine einzelne Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen

und in das Nährmedium überführt. Anschließend wurde die Kultur 12-16 h bei 37°C auf einem Schüttelgerät bei 250 Upm inkubiert.

3.7.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* kann durch Behandlung mit Kalziumchlorid bei niedriger Temperatur so modifiziert werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Bakterienkultur wurde in LB-Medium bei 37°C so lange kultiviert, bis die Bakterienlösung eine optische Dichte (OD_{650}) von 0,2-0,5 erreicht hatte. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (1.500 g, 10 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskalter Kalziumchlorid-Lösung (50 mM) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1.500 g, 10 min, 4°C) und anschließend in 4 ml eiskalter Kalziumchlorid-Lösung (50 mM) aufgenommen. Für die Lagerung der Bakterien bei -80°C wurden 3,4 ml der Bakteriensuspension mit 0,6 ml sterilem Glycerin vermengt und jeweils 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.7.5 Transformation von Bakterien

Kompetente *E. coli* (100 µl) wurden mit 0,1 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 45 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme in das Zellinnere zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine kurze Abkühlung der Bakterien auf Eis. Nach der Zugabe von 500 µl LB Medium, wurde die Kultur unter Schütteln 60 min bei 37°C inkubiert. Die transformierten *E. coli* wurden abzentrifugiert (1.500 g, 5 min, RT) und der Überstand dekantiert. Die pelletierten Bakterien wurden im verbliebenen Medium wieder resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert.

3.7.6 Isolierung von Plasmid DNA (Mini- und Midipräparation)

Minipräparation:

- **Lösungen für die Plasmid Minipräparation:**

Lösung I	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Lösung II	200 mM	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Lösung III	3 M	Kaliumacetat, pH 5,5

- **Durchführung**

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Plasmid Minipräparation wurden 3 ml steriles Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft und unter Schütteln (250 Upm, 12-16 h, 37°C) herangezogen. 1,5 ml der Schüttelkultur wurden abzentrifugiert (1.500 g, 5 min, RT), das Kulturmedium entfernt und das Pellet in 300 µl Lösung I resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurden anschließend 300 µl Lösung II zugegeben und die Suspension gemischt. Proteine werden durch SDS und DNA durch das alkalische Milieu denaturiert. Dieser Schritt ermöglicht die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA. Um denaturierte Proteine zu entfernen, folgte die Zugabe von 300 µl Lösung III und das Mischen der Suspension. Die Sedimentation der präzipitierten Proteine und Membranbestandteile mit der daran anhaftenden chromosomalen DNA erfolgte mittels Zentrifugation (16.000 g, 15 min, 4°C). Nach der Zentrifugation wurde 750 µl Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 600 µl Isopropanol gefällt. Danach wurde die Plasmid-DNA abzentrifugiert (16.000 g, 12 min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet mit 400 µl Ethanol (70%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (16.000 g, 12 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die pelletierte Plasmid-DNA in einer Speedvac Zentrifuge (B. Braun, Melsungen) 10 min bei RT getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

Midipräparation

Für die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine Midipräparation durchgeführt. Dafür wurden 50 ml steriles Selektionsmedium mit 50 µl Bakteriensuspension aus einer Vorkultur beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelgerät herangezogen. Die Plasmidisolierung wurde mit dem HiSpeed® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach der beiliegenden Isolationsanleitung durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 µl TE-Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

3.7.7 Expression des rekombinaten MIA2 Protein

Das rekombinante MIA2 Protein wurde in *E. coli* mit dem Vektor pIVEX2.3-MCS, in den die MIA2 cDNA kloniert wurde, exprimiert. Für die Expression wurde das Rapid Translation System, ein zellfreies Protein Transkriptions-/Translations-System (Roche, Mannheim) nach der Anleitung des Herstellers benutzt. Die korrekte Expression des rhMIA2 wurde durch Westernblot Analyse überprüft.

3.8 Zellkultur

3.8.1 Humane HCC-Zell-Linien

HepG2	ATCC HB-8065
PLC	ATCC CRL-8024
Hep3B	ATCC HB-8064
HuH-7	JCRB*0403

Die Zell-Linien sind in der *American Type Culture Collection* (ATCC) und *Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB) hinterlegt und wurden von diesen Zellbanken bezogen.

3.8.2 Zell-Linie von humanen aktivierten hepatischen Sternzellen (HSZ)

Bei dieser Zell-Linie handelt es sich um humane aktivierte hepatische Sternzellen, die durch die Infektion mit einem hTERT- (*human Telomerase reverse Transcriptase*) exprimierenden Retrovirus immortalisiert wurden. Verkürzte

Telomere kontrollieren die zelluläre Seneszenz. Die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase stabilisiert die Länge der Telomere und erhöht die Lebenserwartung von Zellen (149).

3.8.3 Zellkulturmedien

DMEM	4,5 g/l	Glukose
	300 µg/ml	L-Glutamin
	Zusätze:	
	10% (v/v)	FKS
	400 U/ml	Penicillin
HSZ-Medium	50 µg/ml	Streptomycin
	DMEM	
	Zusätze:	
	10 µg/ml	Diflucan
	4 µg/ml	Ciprobay
Einfriermedium	5 Vol.	DMEM
	3 Vol.	FKS
	2 Vol.	DMSO

3.8.4 Kultivierung von Zell-Linien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (Hera Safe, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank (Binder Serie CB, Binder, Tuttlingen) in DMEM mit 10% FKS und Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden zum Passagieren mit PBS gewaschen und mit Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%) (PAA Laboratories, Cölbe) bei 37°C von der Zellkulturschale abgelöst. Anschließend wurden sie in DMEM mit 10% FKS aufgenommen und 1:3 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden mit einem Mikroskop (Olympus CKX41 mit ALTRA20 Soft Imaging System, Olympus,

Hamburg) kontrolliert bzw. dokumentiert. Entstandener Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert (Sanoclav, Wolf, Geislingen).

3.8.5 Isolation von primären humanen Hepatozyten (PHH)

PHH wurden in Kooperation mit dem Zentrum für Leberzellforschung des Klinikums der Universität Regensburg mittels einer modifizierten Zweischnitt EGTA/Kollagenase Perfusion aus humanen Leberresektaten isoliert (150; 151). Die Resektate wurden von Patienten erhalten, die wegen Metastasen von Karzinomen in der Leber partiell hepatektomiert wurden. Hierbei wurde nur Lebergewebe zur weiterführenden Zellisolation verwendet, das bei makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung als nicht pathologisch verändert eingestuft wurde. Weitere Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer chronischen Hepatitis B oder C Infektion oder andere bekannte Lebererkrankungen.

Die Verwendung des Patientenmaterials erfolgte nach den Richtlinien der Ethik-Kommission des Klinikums der Universität Regensburg.

3.8.6 Isolation von humanen hepatischen Sternzellen (HSZ)

Auch die Isolation von HSZ erfolgte in Kooperation mit dem Zentrum für Leberzellforschung des Klinikums der Universität Regensburg. Nach Perfusion der Leber und Separation der Hepatozyten durch einen initialen Zentrifugationsschritt des Perfusats, wurde uns der verbleibende Überstand, der die Fraktion der nicht-parenchymatösen Leberzellen enthält, zur weiteren Isolation der HSZ zur Verfügung gestellt.

Hierfür wurde die gekühlte Zellsuspension auf 50 ml Falcon Tubes verteilt und zunächst einem Zentrifugationsschritt mit 50 g unterzogen (5 min, 4°C), um die verbliebenen humanen Hepatozyten mit höherer Sedimentationsdichte zu separieren. Anschließend wurden die Überstände in neue 50 ml Falcon Tubes überführt und erneut, diesmal mit 730 g zentrifugiert, wobei die nicht-parenchymatösen Leberzellen pelletierten (7 min, 4°C).

Da in den hier durchgeführten Arbeiten ausschließlich mit aktivierten HSZ gearbeitet wurde, wurde auf eine weitere Aufreinigung bzw. Separierung der HSZ von den anderen beiden großen Fraktionen nicht-parenchymatöser Zellen, den

Kupffer-Zellen und den sinusoidalen Endothelzellen (SEC) verzichtet, sondern die Pellets aus zwei Falcon Tubes wurden direkt in jeweils 8 ml HSZ-Medium resuspendiert und in einer T75 Flasche ausgesät. Das HSZ-Medium wurde dann eine Woche lang täglich erneuert, ab der zweiten Woche alle 2-3 Tage.

Unter den gewählten Zellkulturbedingungen, adhären nur HSZ und Kupffer-Zellen, nicht aber SEC, die innerhalb 24 h absterben und so beim ersten Mediumwechsel von der Zellkultur eliminiert werden. Durch die Kultivierung auf einer Plastikoberfläche kommt es binnen ca. 12-14 Tagen zu einer *in vitro* Aktivierung der HSZ. Die Zellen transformieren hierbei zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Zelltyp, analog der in der in der Einleitung (S. 6) beschriebenen *in vivo* Situation, bei der HSZ in Folge chronischer Leberschädigung aktiviert werden.

Nach ca. 2 Wochen werden die HSZ passagiert und im Verhältnis 1:3 neu ausgesät. Zum Passagieren wurde die Zellkultur mit PBS gewaschen und mit Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%) (PAA Laboratories, Cölbe) bei 37°C von der Zellkulturschale abgelöst. Unter diesen Bedingungen lösen sich nur die (aktivierten) HSZ von der Zellkulturoberfläche, während die Kupffer-Zellen weiter adhären bleiben. Somit liegt nach der ersten Passage eine reine Kultur aktivierter HSZ vor, was wir auch bereits in vorangegangenen Untersuchungen bestätigt hatten (152).

3.8.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurden bestimmt, indem die Zellsuspension mit Trypanblaulösung (Sigma, Deisenhofen) 1:2 verdünnt wurde. Tote Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt und konnten somit im Mikroskop deutlich von intakten Zellen unterschieden werden. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) wurden die lebenden Zellen innerhalb von vier Großquadraten (je 16 Kleinquadrate) ausgezählt.

$$\text{Berechnung der Zellzahl: } Z [\text{Zellen/ml}] = Z \times V \times 10^4/4$$

Z = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1 mm²)

V = Verdünnungsfaktor

3.8.8 Einfrieren von HCC-Zellen und primären aktivierten HSZ

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst, pelletiert und in 5 ml DMEM aufgenommen. Pro Cryoröhrchen wurden 900 µl kaltes Einfriermedium vorgelegt und 900 µl Zellsuspension dazupipettiert. Die Suspension wurde kurz gemischt und danach für 1 h bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen für eine Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt.

Bei primären aktivierten HSZ wurde die Zellzahl bestimmt und je 1×10^6 aktivierte HSZ auf ein Cryoröhrchen mit vorgelegtem Einfriermedium verteilt. Die Röhrchen wurden in das mit flüssigem Stickstoff befüllte manuelle Einfriergerät Nicool LM 10 (Air Liquide, Düsseldorf) überführt. Darin wurden die Zellen nach folgendem Programm eingefroren:

Stufe 4:	30 min
Stufe 8:	30 min
Stufe 10:	30 min

Danach wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt.

3.8.9 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden schnell in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und aus dem Cryoröhrchen in ein 50 ml Falcon mit 8 ml DMEM überführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (500 g, 5 min, 4°C) und in eine T25 Kulturflasche mit 5 ml DMEM Medium passagiert.

3.8.10 Generierung von konditioniertem Medium

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden 1×10^6 aktivierte HSZ in T75 Flaschen ausgesät und 24 h in 10 ml Medium ohne FKS kultiviert. Dieses Medium wurde anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für verschiedene funktionelle Versuche benutzt.

3.9 Gewebeproben

3.9.1 Murine HCC-Gewebeproben

Von Prof. Dr. Christian Trautwein (Klinikum der Universität Aachen) wurde uns HCC- bzw. nicht-neoplastisches Gewebe aus IgEGF- und c-myc-Mäusen zur Verfügung gestellt (153). Diese transgenen Mauslinien exprimieren entweder humanes IgEGF (sekretierter *Epidermal Growth Factor*) unter der Kontrolle eines leberspezifischen Albumin Promotors oder das murine c-myc-Gen (*Myelocytomatosis Viral Oncogene*) unter der Kontrolle des α_1 -Antitrypsin (AAT) Promotors und entwickeln durch diese Onkogene in einem Zeitraum von ca. einem Jahr ein HCC.

3.9.2 Humanes HCC-Gewebe

Humanes HCC- und korrespondierendes nicht-neoplastisches Lebergewebe wurde von Patienten erhalten, die partiell hepatektomiert oder Leber-transplantiert wurden. Nach makroskopischer Untersuchung durch einen Pathologen wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Die Verwendung des Patientenmaterials erfolgte nach den Richtlinien der Ethik-Kommission des Klinikums der Universität Regensburg.

3.10 Molekularbiologische DNA- und RNA-Methoden

3.10.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Adsorption von DNA an eine Silikamembran. Das chaotrope Salz Guanidiniumchlorid unterstützt diesen Vorgang. Verschiedene Puffer sorgen dafür, dass nur die DNA adsorbiert wird. Fremdstoffe wie Zellproteine und Metabolite bleiben in Lösung und werden ausgewaschen. Die eluierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.10.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Diese Methode der RNA-Isolation beruht ebenfalls auf einer spezifischen Aufreinigung der RNA über hydrophile Silizium-

Gelsäulchen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Gewebe wurde durch einen Stabhomogenisator (Xenox Motorhandstück 2.35 mit Roti®-Speed-Rührer Ø 7 mm, Carl Roth, Karlsruhe) und Zellen durch ein Schreddersäulchen (Qiagen, Hilden) in 350 µl eines Guanidiniumisothiocyanat enthaltenden Puffer homogenisiert bzw. lysiert. Dieses chaotrope Salz denaturiert sämtliche Proteine inklusive RNasen und gewährt somit die Isolation von intakter, nicht degradierter RNA. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.10.3 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 UV/VIS-Spektralphotometer (Peglab, Erlangen) gemessen.

3.10.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Das Umschreiben von RNA in komplementäre cDNA erfolgte mit dem Reverse Transcription System Kit (Promega, Mannheim). Die Ansätze wurden mit kontaminationsfreien Aerosolfilter-Pipettenspitzen nach folgendem Schema pipettiert:

0,5 µg	RNA
5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2,5 µl	10x Reverse Transcription Puffer
2,5 µl	dNTP Mix (10 mM)
1,25 µl	Random Primer
0,625 µl	RNasin Ribonuklease Inhibitor
ad 25 µl	H ₂ O _{dest.}

Die Proben wurden zum Umschreiben der RNA in cDNA in einem PCR-Cycler 30 min bei 42°C inkubiert und anschließend zur Denaturierung der reversen Transkriptase 5 min auf 99°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurde die cDNA mit 75 µl H₂O_{dest.} verdünnt und direkt zur Amplifizierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.10.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durchführung:

Spezifische DNA-Fragmente wurden durch PCR in einem PCR-Cycler amplifiziert. Die Ansätze wurden mit kontaminationsfreien Aerosolfilter-Pipettenspitzen nach folgendem Schema pipettiert:

12,5 µl	Qiagen Taq PCR Master Mix (Qiagen, Hilden)
0,5 µl	forward Primer (20 µM)
10,5 µl	reverse Primer (20 µM)
10 ng	DNA
ad 25 µl	H ₂ O _{dest.}

Folgendes PCR-Programm wurde je nach Schmelztemperatur der Primer und Amplifikatlänge modifiziert:

Initiale Denaturierung:	95°C, 10 min	
3 Stufen PCR:	95°C, 30 s	
	55-65°C, 30 s	→35 Zyklen
	72°C, 30-120 s	
Finaler Schritt:	72°C, 7 min	

5-10 µl des PCR-Produktes wurden mit Auftragspuffer (Peqlab, Erlangen) versetzt und zur Überprüfung über ein Agarosegel mit Ethidiumbromid (50 µg/100 ml Gel) aufgetrennt.

3.10.6 Quantitative real time (RT) PCR

Durchführung:

Die Expressionsstärke von mRNA wurde in einer quantitativen real time (RT) PCR Reaktion mit Hilfe des LightCycler II Systems (Roche Diagnostics, Mannheim) quantifiziert. Die Funktion der quantitativen real time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung der PCR-Produkte wird mit

Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green genutzt. Dieser Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz-Emission signifikant ansteigt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, wodurch eine Quantifizierung ermöglicht wird. Für die Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde für humane und murine Proben als Standard das Haushaltsgen β -Aktin benutzt. Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

Die quantitative PCR Reaktion wurde in einem 20 μ l Ansatz nach Anleitung des QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Master Mix Protokolls (Qiagen, Hilden) durchgeführt:

10 μ l	QuantiTect [®] SYBR [®] Green PCR Master Mix
2 μ l	cDNA
0,5 μ l	forward Primer (20 μ M)
0,5 μ l	reverse Primer (20 μ M)
7 μ l	H ₂ O _{dest.}

Folgendes Standardprogramm wurde je nach Schmelztemperatur der Primer modifiziert:

Initiale Denaturierung:	20°C/s auf 95°C, 900 s	
3 Stufen PCR:	20°C/s auf 95°C, 15 s	
	20°C/s auf 55-65°C, 20 s	→40 Zyklen
	20°C/s auf 72°C, 20 s	
Analyse der Schmelzkurve	20°C/s auf 95°C, 0 s	
	20°C/s auf 65°C, 15 s	
	0,1°C/s auf 95°C, 0 s	
	20°C/s auf 40°C, 30 s	

Folgende Primer wurden für die quantitative real time PCR:

Name	forward Primer	reverse Primer
human β -Aktin	5'-CTA CGT CGC CCT GGA CTT CGA GC	5'-GAT GGA GCC GCC GAT CCA CAC GG
human FGFR2-IIIb	5'-TGC TGG CTC TGT TCA ATG TG	5'-GGC GAT TAA GAA GAC CCC TA
human FGFR2-IIIc	5'-ACA CCA CGG ACA AAG AGA TT	5'-GGC GAT TAA GAA GAC CCC TA
human FGFR1	5'-CAG TGA CAC CAC CTA CTT C	5'-GCA CCA CAG AGT CCA TTA T
human GLUT1	5'-AAC TCT TCA GCC AGG GTC CAC	5'-CAC AGT GAA GAT GAT GAA GAC
human HNF1	5'-CCT GTC CCA ACA CCT CAA CAA	5'-TCT CTC GCT CCT CCT TGC TA
human IL8	5'-TCT GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA GTT	5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC CT
human MIA2	5'-ATG GCA AAA TTT GGC GTT C	5'-CAC CTC TTC AAT CTG GAC TGC
human MTAP	5'-GCG AAC ATC TGG GCT TTG	5'-GCA CCG GAG TCC TAG CTT C
mouse β -Aktin	5'-AGG CCA ACC GTG AAA AGA T	5'-GGC GTG AGG GAG AGC ATA
mouse FGFR2-IIIb	5'-GCC CAT CCT CCA AGC TG	5'-TGG TTG GCC TGC CCT ATA

Tabelle 1. Verwendete forward und reverse Primer für real time PCR, Spezies: mouse oder human.

Die Primer wurden von der Firma SIGMA Genosys, Hamburg synthetisiert. Es wurde eine 100 μ M Stammlösung der Primer durch Lösen in H₂O_{dest.} hergestellt und bei -20°C gelagert.

3.10.7 Nachweis genomischer Verluste

Für einen groben Nachweis einer genomischen Deletion in der chromosomalen Region 10q wurde ein 344 bp Fragment im Exon 8 des FGFR2 Genes amplifiziert. Dafür wurde ein Primerpaar (FGFR2-F: 5'-GCC GCT GTT TAG ACG TAA TG und FGFR2-R: 5'-TCT CCC AAA GCA CCA AGT CT) benutzt, das erst kürzlich publiziert wurde (154).

3.10.8 Analyse der Promotormethylierung

Azacytidin Behandlung

Durch 5-Azacytidin kann der Methylierungszustand von Promotoren charakterisiert werden. 5-Azacytidin ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Cytidin und ein Arzneistoff, welcher als Zytostatikum in der Chemotherapie verwendet wird. Werden Zellen mit 5-Azacytidin behandelt, wird es während der Replikation in die DNA und während der Transkription in die RNA eingebaut. Dieser Einbau von 5-Azacytidin in DNA und RNA hemmt DNA-Methyltransferasen bzw. RNA-

Methyltransferasen und verursacht dadurch eine Demethylierung methylierter Sequenzen. Dadurch können durch Hypermethylierung regulierte Gene wieder exprimiert werden. Nach 5-Azacytidin Behandlung wurde die mRNA Expression durch quantitative real time PCR überprüft.

Methylierungs-spezifische PCR Analyse

Um den Methylierungsstatus der 5'-Promotorregion des FGFR Gens zu untersuchen, wurde eine methylierungs-spezifische PCR Methode angewandt, wie sie z.B. auch bei Ricol et al. beschrieben ist (155). Die Methode beruht darauf, dass einige Restriktionsenzyme nicht in der Lage sind, methylierte DNA zu spalten.

Die DNA (1 µg) wurde mit je 10 Units der Restriktionsenzyme *Afl* und *MspI* (methylierungs-insensitiv), sowie *EcmI*, *SmaI* und *HpaII* (methylierungs-sensitiv) 16 h bei 37°C (25°C für *SmaI*) verdaut. Anschließend wurden die Enzyme bei 65°C hitzeinaktiviert. Die verdaute DNA (50 ng) wurde mit Primern (F-5'-AGT CAC TCA GCG AGC CGT TGG und R-5'-GGG TCA CGC CCC CAC TGA AAC) amplifiziert, die die beschriebene CpG Insel im FGFR2 Promotor flankieren (156).

3.10.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurde von der Firma Entelechon, Regensburg durchgeführt.

3.10.10 Gelelektrophorese

Verwendeter Puffer:

TAE-Puffer	40 mM	Tris/Acetat	
	1 mM	EDTA	pH 8,5

Durchführung:

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Owi Separation Systems B1 und B2, Peqlab, Erlangen). Je nach aufzutrennenden Fragmentgrößen wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8%-2% in TAE-Puffer verwendet. Die Fragmente konnten durch den fluoreszierenden und mit DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid

(50 µg/100 ml Gel) mittels UV-Transilluminator (Image Station 440, Kodak, Stuttgart) nachgewiesen und fotografisch dokumentiert werden. Die Größe der Fragmente wurde durch die Verwendung eines 50 bp, 100 bp bzw. 1 kb DNA-Größenstandards (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

3.10.11 Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme (Roche, Mannheim) erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit etwa 0,5 µg Plasmid-DNA, 5-10 Units des entsprechenden Enzyms und 2 µl des vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden 1-2 h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.10.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung auf dem UV-Transilluminator UVT-20M (Herolab, Wiesloch) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Gelextraktion erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach beiliegendem Protokoll.

3.10.13 Ligation

Die Ligation von Plasmiden und Insert-DNA wurde mit einer Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) durchgeführt. Die Ligationsreaktion wurde 16 h bei 16°C in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

2 µl	Ligase Puffer
0,1-0,3 µg	Ziel-Vektor
0,3-1,5 µg	Insert DNA
400 Units	T4 DNA Ligase
ad 20 µl	H ₂ O _{dest.}

Nach der Reaktion wurde die Ligase 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und anschließend in einen kompetenten Bakterienstamm transformiert.

Alle klonierten Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.10.14 MIA2 siRNA Vektor

Die Herstellung des shRNA-Expressionsplasmides erfolgte nach dem Protokoll: „RNAi-basierter konditioneller Gen Knockdown in Mäusen durch einen Vektor unter U6 Promotorkontrolle“ (157). Das Prinzip der RNA Interferenz (RNAi) beruht darauf, dass die Expression von Genen durch *small interfering RNAs* (siRNAs) oder *short hairpin RNA* (shRNA)-produzierende Vektoren unterdrückt werden kann. Diese Vektoren können auch stabil in Genome integriert werden. Durch spezifische Promotoren kann die Expression zudem induziert und somit kontrolliert werden. Die von Vektoren transkribierte shRNA wird in das Zytoplasma exportiert und vom *RISC loading complex* (RLC) in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut, dessen zentraler Bestandteil die Endonuklease Argonaut 2 (Ago2) ist (Abbildung 10). Bei diesem Vorgang wird der *sense*-Strang der siRNA verworfen, während der *antisense*-Strang im RISC zur Ziel-RNA geleitet wird und deren Spaltung induziert (158).

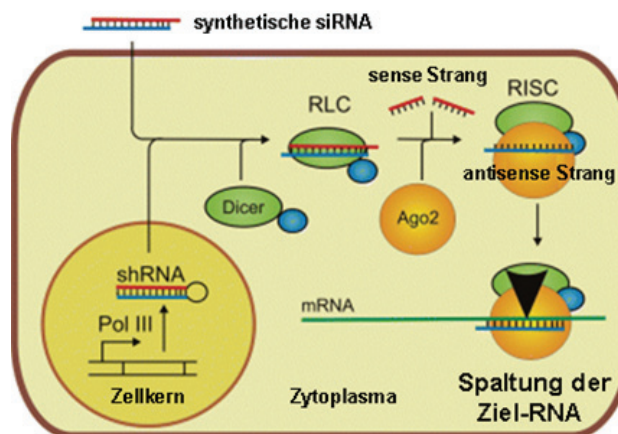


Abbildung 10. Mechanismus der RNA Interferenz: Exogen applizierte oder im Zellkern transkribierte shRNAs werden im Zytoplasma vom *RISC Loading Complex* (RLC) in den *RNA-induced silencing Complex* (RISC) eingebaut, wodurch die Spaltung der Ziel-RNA durch das Argonaut 2-Protein ermöglicht wird, Abbildung modifiziert aus Rohl und Kurreck, 2006.

Die ausgewählten siRNA Sequenzen wurden in zwei Schritten palindromisch in das Expressionsplasmid pBS/U6 ploxPneo inseriert. Der Promotor des Expressionsplasmides ist durch die Insertion einer Neomycin Kasette inaktiviert, die von sog. *loxP sites* flankiert wird (Abbildung 11). Diese kurzen DNA

Sequenzen werden von der Cre-Rekombinase erkannt. Durch dieses Enzym wird die Neomycin Kasette deletiert und der Promotor aktiviert (159).

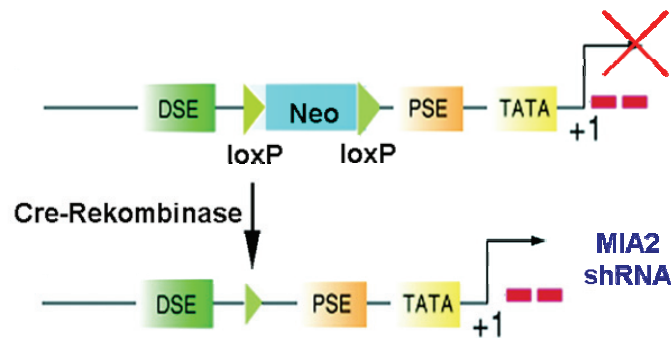


Abbildung 11. Struktur des U6-ploxPneo-MIA2 Transgens: Inaktiv durch Neomycin (Neo) Kasette im U6 Promotor und somit keine MIA2 shRNA Expression; nach Deletion des loxP Neo durch die Cre-Rekombinase Aktivierung des Promotors und Bildung der MIA2 *short hairpin RNA* (shRNA); DSE (*Distal Sequence Element*), PSE (*Proximal Sequence Element*), TATA (U6 TATA Box), Abbildung modifiziert aus Coumoul et al., 2005.

Für die erste Insertion wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *Apal* verdaut und die überhängenden Enden mit dem Klenowenzym (Roche, Mannheim) aufgefüllt. Anschließend wurde der linearisierte Vektor noch *HindIII* verdaut. Für das erste Insert wurden Oligo 1 (5'-AAG AGA TAT CTG TTT ATG TTA A) und Oligo 2 (5'-AGCTT TAA CAT AAA CAG ATA TCT CTT) miteinander annealed, so dass am 3'-Ende ein Überhang in Form einer *HindIII* Erkennungssequenz entstand. Nach der ersten Ligation wurde der Vektor *EcoRI/HindIII* verdaut und das Insert aus Oligo 3 (5'-AGCTT TAA CAT AAA CAG ATA TCT CTT C TTTT G) und Oligo 4 (5'-AATTC AAAAA G AAG AGA TAT CTG TTT ATG TTA A) mit einer *HindIII* Erkennungssequenz am 5'- und einer *EcoRI* Erkennungssequenz am 3'-Ende eingefügt. Die *HindIII* Erkennungssequenz diente als Spacersequenz zwischen den palindromischen Inserts, wodurch die Bildung einer Haarnadelstruktur ermöglicht wurde (Abbildung 12). Vor der *EcoRI* Erkennungssequenz sorgten fünf Thymidine in Reihe für die Termination der Polymerase III.

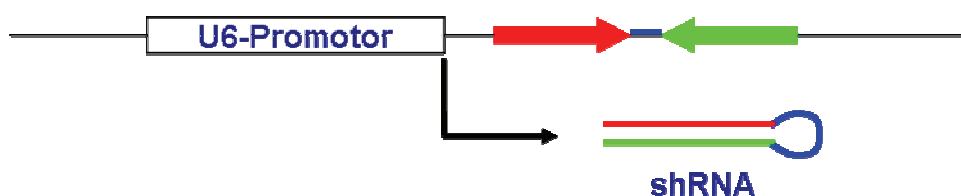


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Lage von Insert 1 (rot: sense Strang) und Insert 2 (grün: antisense Strang) hinter dem U6 Promotor; nach der Transkription resultiert daraus die shRNA (*short hairpin RNA*); der sense und antisense Strang werden durch eine Spacersequenz verknüpft (blau).

3.10.15 Transiente und stabile Transfektion

Zur Transfektion von Zellen wurde das Transfektionsreagens Lipofektamin™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Bei 50-80% Konfluenz wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und der Transfektionsansatz zupipettiert. Dies erfolgte nach Protokoll und Mengenangaben des Herstellers, wobei standardmäßig 0,5 µg Plasmid-DNA pro Versuchsansatz eingesetzt wurden. Das Transfektionsgemisch wurde nach 4 h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur RNA- bzw. Proteinisolierung weitere 24-48 h inkubiert.

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zell-Linien wurde ein Expressionsvektor mit Resistenzgen in die Zellen eingebracht und durch Zugabe des Antibiotikums Geniticin ein Selektionsdruck aufgebaut. Dadurch konnten nur Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten, überleben.

3.10.16 siRNA (small interfering RNA)

Verwendete siRNAs:

Name	Target Sequenz
GLUT1 siRNA1: Hs_SLC2A1_5	CAG CTG GAT GAG ACT TCC AAA
GLUT1 siRNA2: Hs_SLC2A1_6	CTC CAC GAG CAT CTT CGA GAA
MIA2-1	AAG AGA TAT CTG TTT ATG TTA
MIA2-2	TTC CAT GTA CAG AAA TAT TAA
MIA2-3	TCG GAA GTA CCA GTG AAT CAA
MIA2-4	CAG AGA TGC AGT CGA GAT TGA
HNF1: Hs_TCF1_1	CAG GAC AAG CAT GGT CCC ACA
AllStars Negative Control siRNA	keine Sequenz verfügbar
AllStars Negative Control siRNA Alexa Fluor 488	keine Sequenz verfügbar

Tabelle 2. Verwendete siRNAs, Name und Target Sequenz.

Die siRNAs wurden von der Firma Qiagen, Hilden bezogen.

siRNA Transfektion:

Zur Transfektion von Zellen mit siRNA wurde das Transfektionsreagens HiPerFect (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Transfektion wurde nach Anleitung des

Herstellers durchgeführt: In einer 12-well Platte wurden 2×10^5 Zellen mit 75 ng siRNA und 6 μ l Transfektionsreagens transfiziert.

3.11 Proteinbiochemische Methoden

3.11.1 Verwendete Antikörper

1. Antikörper	Verdünnung WB	Verdünnung IH	Firma
β -Aktin (mouse)	1:20.000	---	Sigma, Deisenhofen
ERK (rabbit)	1:1.000	---	Cell signaling, Frankfurt a.M.
Glut1 (rabbit)	1:500	1:50	Lab Vision, Wedel
MiB1 (mouse)	---	1:10	Dako, Hamburg
MIA2 (rabbit)	1:300	1:30	Biogenes, Berlin
pERK (rabbit)	1:1.000	---	Cell signaling, Frankfurt a.M.

Tabelle 3. Angabe der verwendeten 1. Antikörper (mouse oder rabbit) gegen humanes Protein und Angabe der verwendeten Verdünnung für Westernblot (WB) Analyse und Immunhistochemie (IH) sowie Herstellerfirma.

2. Antikörper für WB	Verdünnung	Firma
anti-mouse HRP	1:3.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-rabbit HRP	1:3.000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-rabbit Alexa Fluor 488	1:200	Molecular Probes, Leipzig
2. Antikörper für IH	Verdünnung	Firma
anti-mouse/rabbit HRP	LSAB2-Kit	Dako, Hamburg

Tabelle 4. Verwendete 2. Antikörper gegen mouse oder rabbit 1. Antikörper, konjugiert mit *Horseradish Peroxidase* (HRP) oder dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 und Angabe der eingesetzten Verdünnung sowie Herstellerfirma.

FGFR2-IIIb Antikörper

Der Antikörper wurde in Kooperation mit der Firma Biogenes (Berlin) generiert, indem Hasen mit einem synthetischen Peptid immunisiert wurden. Das Oligopeptid mit der Aminosäuresequenz HSGINSSNAEVL ist korrespondierend zu den Aminosäuren 314-325 im alternativ gespleißten Teil der dritten extrazellulären Immunglobulin (IgIII) Domäne des humanen FGFR2-IIIb (87). Für Westernblot

Analysen und Immunhistochemie wurde das Antiserum in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt.

3.11.2 Herstellung von Gesamtproteinlysaten

Verwendeter Puffer:

RIPA-Puffer	50 mM	Tris/HCl; pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1% (v/v)	Nonidet® P40
	0,5%	Natriumdesoxycholat
	0,1% (w/v)	SDS

Durchführung:

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus Zell-Linien wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Zellschaber (Corning, New York, USA) abgeschabt und in 1 ml gekühlten PBS-Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation (1.500 g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 200 µl RIPA-Puffer resuspendiert und mit einem Ultraschallgerät (Sonoplus HD 70, Bandelin Elektronik, Berlin) bei einer Intensität von 40% 10 x 3 s lysiert. Anschließend wurden die gelösten Proteine durch Zentrifugation (16.000 g, 10 min, 4°C) von den nicht-löslichen Zellbestandteilen abgetrennt. Die Proteinlösung wurde bei -20°C gelagert.

3.11.3 Herstellung nukleärer Extrakte

Verwendete Puffer:

Puffer 1	10 mM	Hepes; pH 7,9
	10 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	0,1 mM	EGTA
Puffer 2	20 mM	Hepes; pH 7,9
	0,4 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA

Durchführung:

Vor Gebrauch wurden die Puffer mit 1 mM DTT versetzt und auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und durch Zentrifugation pelletiert (700 g, 5 min, 4°C). Anschließend wurde das Zellpellet in 400 µl Puffer 1 (hypotonisch) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl Nonidet P40 (10%) lysierten die Zellen und die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (10.000 g, 5 min, 4°C) von den zytoplasmatischen Bestandteilen getrennt. Das nukleäre Pellet wurde danach in 50 µl Puffer 2 resuspendiert. Um die Zellkerne aufzuschließen wurden sie 15 min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation (16.000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit den nukleären Proteinen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.11.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung des BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Bei der sog. Biuret Reaktion wird Cu^{2+} durch Proteine zu Cu^+ reduziert. Zusammen mit Bicinchromsäure (BCA) bildet sich ein lila Farbkomplex. Dieser kann durch eine photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden.

Zu 1 µl Gesamtproteinlysate wurden 200 µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung bei 562 nm in einem Spektrophotometer konnte die Absorption bestimmt werden. Durch parallele Quantifizierung eines BSA-Standards konnte die Absorption in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

3.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**Verwendete Puffer:**

Laemmli-Puffer	62,5 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	2% (w/v)	SDS
	10% (v/v)	Glycerin
	5%	β-Mercaptoethanol

Laufpuffer	25 mM	Tris/HCl, pH 8,5
	200 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
10% Trenngel	7,9 ml	H ₂ O _{dest.}
	5,0 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
	0,2 ml	10% (w/v) SDS
	6,7 ml	Acrylamid/Bis-Acrylamid (30%/0,8% w/v)
	0,2 ml	10% (w/v) APS
	0,008 ml	TEMED
5% Sammelgel	2,7 ml	H ₂ O _{dest.}
	0,5 ml	1,0 M Tris/HCl pH 6,8
	0,04 ml	10% (w/v) SDS
	0,67 ml	Acrylamid/Bis-Acrylamid (30%/0,8% w/v)
	0,04 ml	10% (w/v) APS
	0,004 ml	TEMED

Durchführung:

Das Proteinlysate wurde 5 min in Laemmli-Puffer bei 95°C erhitzt und anschließend bei 35 mA/150 V (XCell *SureLock*™ Mini-Cell, Invitrogen, Karlsruhe) auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der Full Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare, Freiburg) verwendet.

3.11.6 Proteindetektion durch Westernblotanalyse**Verwendeter Puffer:**

Transferpuffer	10% (v/v)	Methanol
	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin

Durchführung:

Um die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine durch Antikörper nachweisen zu können, wurden diese elektrophoretisch (XCell II™ Blot Module, Invitrogen, Karlsruhe) 1,5 h bei 220 mA/300 V auf eine Nitrocellulose-Membran (Invitrogen, Karlsruhe) transferiert.

Die Membranen wurden anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei RT in PBS mit 3% BSA oder 5% Milchpulver in PBS-Puffer geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Membran mit einem HRP- (*Horseradish Peroxidase*) konjugierten 2. Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS-Puffer gewaschen und 1 min mit dem Detektionssystem ECL Plus (GE Healthcare, Freiburg) vorinkubiert. Durch dieses System können Proteine durch Chemilumineszenz detektiert werden. Es besteht aus einem PS-3 Acridan Substrat, das durch die HRP in einen Acridiniumester umgewandelt wird. Der Ester reagiert unter alkalischen Bedingungen mit Peroxid und emittiert Licht. Dieses wurde mit einem Biomaxfilm (Kodak, Stuttgart) autoradiographisch dokumentiert. Der Film wurde in einem Automaten (Curix 60, Agfa, Köln) entwickelt. Alle Inkubationsschritte wurden unter Schwenken auf einem Kreisschüttler durchgeführt.

3.11.7 HCC-Tissue-Microarray

Für vergleichende immunhistochemische Untersuchungen wurde zudem ein HCC-Tissue-Microarray (TMA) verwendet, in dem 85 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete humane HCC-Gewebe sowie 81 korrespondierende nicht-neoplastische Lebergewebe zusammengefasst wurden.

Die Herstellung des TMA erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Arndt Hartmann und Herrn Dr. Peter Wild am Institut für Pathologie der Universität Regensburg wie beschrieben (160).

Das Patientenkollektiv besteht aus unselektionierten Patienten, die in den Jahren 1993 bis 2005 am Klinikum der Universität Regensburg behandelt worden waren und von denen am Institut für Pathologie ein für die Herstellung des TMA geeigneter Paraffinblock zur Verfügung stand. Es umfasst 69 (81,2%) Männer und 16 (18,8%) Frauen mit einem Durchschnittsalter von 61 Jahren

(min. 20 /max. 85 Jahre). Weitere klinische und pathologische Patientendaten sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Klinisch-pathologische Charakteristika							
Variable	Kategorie	n	%	Variable	Kategorie	n	%
Alter bei Diagnose	<60 Jahre	39	45,9	Ätiologie	HBV	9	10,6
	≥60 Jahre	46	54,1		HCV	7	8,2
					Alkohol	34	40,0
Geschlecht	weiblich	16	18,8		andere	3	3,5
	männlich	69	81,2		unbekannt	32	37,6
				Tumorgroße	≤ 5 cm	36	42,4
Tumor-Staging	T1	13	1,0		> 5 cm	30	35,3
	T2	25	29,4		unbekannt	19	22,4
	T3	41	48,2				
	T4	3	3,5				
	unbekannt	3	3,5				
Tumor-Grading	G1	29	34,1				
	G2	48	56,5				
	G3	8	9,4				

Tabelle 5. Klinisch-pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs für HCC-Tissue-Microarray.

Das Tumor-Staging wurde nach der TNM-Klassifikation durchgeführt (161). Die Stadieneinteilung von malignen Tumoren richtet sich nach Ausdehnung des Tumors, Lymphknotenmetastasen (Nodes) und Fern-Metastasen (pT1-pT4). Die Stadien werden folgendermaßen eingeteilt:

- T1 solitärer Tumor, ohne Gefäßinvasion
- T2 solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiple Tumoren, keiner mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- T3 multiple Tumoren mehr als 5 cm in größter Ausdehnung oder Tumoren mit Befall eines größeren Astes der Vena porta oder der Venae hepaticae
- T4 Tumor(en) mit direkter Invasion von Nachbarorganen ausgenommen Gallenblase oder Tumor(en) mit Perforation des viszerale Peritoneums

Das histologische Grading beschreibt den Differenzierungsgrad des Tumors: gut, mittel oder schlecht differenziert entsprechend G1-3 (162).

Die Verwendung des Patientenmaterials erfolgte nach den Richtlinien der Ethik-Kommission des Klinikums der Universität Regensburg.

3.11.8 Histologische und immunhistochemische Analysen

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden von formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben sowie von den TMA Blöcken Schnitte mit einer Stärke von 5 µm angefertigt und auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) überführt.

Für histologische Untersuchungen wurden die Schnitte Hematoxylin/Eosin (HE) gefärbt:

Hämatoxylin färbt alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (rER). Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle azidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen rot, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst. Nach der H-Färbung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Durch Erhöhung des pH-Wertes (Bläuen) mittels Spülen in Leitungswasser schlägt der Farbton in das typische Blauviolett um. Anschließend folgt die Zytoplasma-Färbung in einer alkoholischen oder wässrigen Lösung von Eosin. Durch weitere Spülschritte über Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration bis zu absolutem Alkohol wird das Wasser aus dem Gewebeschnitt verdrängt. Schließlich wird der entwässerte Schnitt in Xylol geklärt.

Im Einzelnen wurden folgende immunhistochemische Färbungen durchgeführt:

MIA2, FGFR2-IIIb, GLUT1 und MiB1/Ki67 (Antikörper siehe 3.11.1).

Die Visualisierung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit dem LSAB2-Kit (Dako, Hamburg, siehe 3.11.1) nach dem indirekten Immunoperoxidase Protokoll gemäß den Angaben des Herstellers.

Die gefärbten Schnitte wurden anschließend mit einem Eindeckmittel (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und einem Deckglas (Carl Roth, Karlsruhe) bedeckt.

Für die Fragestellung der MIA2 und FGFR2-IIIb Expression im HCC wurde die Intensität der Färbung nach einem dreistufigen Punktesystem (0-2+) semiquantitativ bewertet: 0, negativ; 1+, schwach positiv; 2+, stark positiv. In Anbetracht der kleinen Menge an Gewebe jedes individuellen Tumors auf dem TMA, wurde dabei jeweils auch bereits eine schwache Immunreaktion als positiv (1+) gewertet.

Im Falle der immunhistochemischen Analyse von GLUT1 wurden alle Fälle mit einer 100% negativen immunhistochemischen Färbung für GLUT1 als GLUT1 negativ eingestuft. Die restlichen Fälle wurden als GLUT1 positiv eingestuft.

Die Auswertung erfolgte hierbei jeweils geblindet durch Kooperationspartner im Institut für Pathologie: Frau PD Dr. Frauke Bataille und Herrn Prof. Dr. Arndt Hartmann.

3.11.9 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf sog. „Lab-Teks“ (Nalge, Naperville, USA) ausgesät. „Lap Teks“ sind Objektträger, bestehend aus acht abnehmbaren Kammern mit Deckel. In diese Kammern wurden jeweils 2×10^4 Zellen ausgesät. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen mit einer Paraformaldehydlösung (4%, 250 µl pro Kammer) 15 min fixiert. Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen anschließend 5 min mit einer Triton-X-100-Lösung (0,1%) permeabilisiert. Dem sorgfältigen Waschen mit PBS folgte das Blockieren des Präparats für 1 h mit 1% BSA in PBS. Daraufhin wurden die Zellen 1 h mit dem primären Antikörper in 1% BSA in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 10 Minuten folgte eine einstündige Inkubation mit dem fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper (siehe Tabelle). Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach dem Waschen wurden die Kammern vom Objektträger abgehoben. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt, das im Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) enthalten war. Die Fluoreszenzfärbung konnte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 (Zeiss, Göttingen) kontrolliert werden.

3.11.10 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)

Aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Nacktmaustumoren wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. In diesen wurden apoptotische Zellen durch das DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers nachgewiesen. Dabei werden freie DNA-Enden, die typisch für apoptotische Zellen sind, durch die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) mit Fluorescein-12-dUTP markiert und können so visualisiert werden. Die Kernfärbung erfolgte mit einer DAPI-Lösung (siehe 3.11.9). Die Fluoreszenzfärbung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (siehe 3.11.9) analysiert.

3.11.11 Quantifizierung der aktiven nukleären NFκB Konzentration

Die aktivierte p65 Untereinheit NFκB wurde in nukleären Extrakten mit dem TransAM™ NFκB ELISA (Active Motif, Rixensart, Belgien) nach Anleitung des Herstellers quantifiziert.

3.12 Laktatmessung

Die Bestimmung der Laktatkonzentrationen in Zellkulturüberständen wurde in Kooperation mit dem Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin am Klinikum der Universität Regensburg durchgeführt.

3.13 Durchflusszytometrische Analyse

Fluoreszenzmarkierte Zellsuspensionen wurden im Durchflusszytometer (Coulter®EPICS®XL™, Beckman Coulter, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 488 nm (Argonlaser) vermessen. Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine mehrparametrische Analyse von Zellen innerhalb kurzer Zeit (10³ Zellen/s). Durch Detektion des Streulichtverhaltens und der Fluoreszenz von Einzelzellen konnten chemische und physikalische Eigenschaften der Zellen erfasst werden. Sämtliche Messungen wurden mit der Software WinMDI (Version 2.8, <http://facs.scripps.edu>) ausgewertet.

3.14 Funktionelle Untersuchungen

3.14.1 Apoptose

Lipoapoptose Modell

Für Apoptoseanalysen verschiedener Zellen wurde mit der freien Fettsäure Palmitat über JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*) eine sog. Lipoapoptose induziert. Es wurden standardmäßig 10^5 Zellen pro Well (6-Well-Platte) 20 h mit Palmitat behandelt. Die freie Fettsäure Palmitat wurde in einer Konzentration von 10 mM in Isopropanol gelöst. Zur Induktion von Lipoapoptose wurden Konzentrationen von 100 bis 300 μ M zusammen mit 1% BSA (w/v) eingesetzt. Als Kontrolle diente 1% BSA in Isopropanol (163).

Quantifizierung der Apoptose mit AnnexinV-/Propidiumiodid-Färbung

In der frühen Apoptose verändert sich die Phospholipid Doppelschicht der Zellmembran. Dabei wird Phosphatidylserin externalisiert. AnnexinV gehört zu der Familie der kalziumabhängigen Phospholipid-bindenden Proteine und hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylresten. Durch FITC markiertes AnnexinV kann somit das Phosphatidylserin detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Apoptose geht auch die Integrität der Zellmembran verloren. Dies kann durch den fluoreszierenden und mit DNA interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) nachgewiesen werden.

Für die AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung apoptotischer Zellen wurde der ApoTarget™ AnnexinV FITC Apoptosis Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dafür wurden 2×10^5 Zellen in 100 μ l Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln 15 min mit 5 μ l AnnexinV und 10 μ l Propidiumiodid bei 20-25°C gefärbt. Die Zellsuspension wurde im Durchflusszytometer vermessen (siehe 3.13). Dabei wurde die Fluoreszenz des AnnexinV-FITC-Signals mit einem Bandpaß von 530 ± 30 nm und die des PI-Signals mit einem Bandpaß von 585 ± 42 nm erfasst. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Zweiparametermessung wurde als Dotplot dargestellt und mit der Quadrantenanalyse ausgewertet. Die Unterscheidung in vitale, apoptotische und spätaoptotische/nekrotische Zellen erfolgte anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten im AnnexinV- und PI-Signal. Zur Auswertung der AnnexinV-/PI-Messungen wurde die prozentuale

Verteilung der Zellpopulationen in Bezug auf die Gesamtzellzahl (10^4 Zellen) berechnet und der Unterschied der Apoptoseraten untersucht.

3.14.2 Zellzyklusanalyse

Der nukleäre DNA Gehalt wurde ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurden 10^6 Zellen 1 h in eiskaltem Methanol (70%) auf Eis fixiert und zweimal in PBS-Puffer gewaschen. Die fixierten Zellen wurden 30 min bei 37°C mit 0,01 mg/ml RNase (Roche, Mannheim) behandelt. Anschließend wurden sie mit dem fluoreszierenden und mit DNA interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (50 µg/ml) abgedunkelt auf Eis 30 min gefärbt. Die Fluoreszenzintensität des PI-Signals wurde im Durchflusszytometer mit einem Bandpaß von 585 ± 42 nm erfasst (siehe 3.13). Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung wurde als Histogramm dargestellt.

3.14.3 XTT-Proliferationsanalyse

Die Proliferation wurde mit dem XTT-Kit (Roche, Mannheim) quantifiziert. Die Analyse basiert auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen, das Tetrazoliumsalz XTT zu orange gefärbten Formazan zu reduzieren. Der gebildete Farbstoff ist wasserlöslich und die Intensität der Färbung kann bei einer Wellenlänge von 450-650 nm mit einem Spektrophotometer gemessen werden. Die Intensität der Färbung ist proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Die Zellen wurden für eine Proliferationsanalyse in 96-well Platten ausgesät und stimuliert. Die metabolische Aktivität wurde über mehrere Tage 1-3 h nach Zugabe des XTT-Reagens gemessen.

3.14.4 Migrations- und Invasionsanalyse

Dieser Test diente zur Bestimmung des migratorischen und invasiven Potentials von Zellen. Dazu wurden gelatinebeschichtete Polykarbonatfilter mit 8 µm Porengröße (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) verwendet. Für die Herstellung der Gelatinemembranen wurden die Polykarbonatfilter 20 min in 0,5% Essigsäure bei 50°C langsam gerührt, anschließend über einen Faltenfilter abfiltriert und zweimal mit $H_2O_{dest.}$ gespült. Danach wurden die Filter 1 h in 5 mg/l Gelatine (in Wasser)

gekocht, abfiltriert und mit einer Pinzette auf Whatman Papier verteilt. Die Filter wurden 1 h bei 100°C getrocknet.

Die untere Kammer der sog. Boydenkammer (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) wurde mit 210 µl konditioniertem Medium von aktivierten HSZ gefüllt. Darauf wurde die gelatinebeschichtete Membran luftblasenfrei gelegt. Nach dem Zuschrauben der Kammer wurden 3×10^4 Zellen/ml in die obere Kammer pipettiert.

Für die Invasionsanalyse wurden zusätzlich 50 µl Matrigel (BD Biosciences, Bedford, USA) auf dem Filter verteilt, um eine Basalmembran aus extrazellulären Matrixproteinen zu imitieren. Anschließend wurden 2×10^5 Zellen in 800 µl DMEM ohne FKS in das obere Kompartiment pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C wurden alle noch auf der oberen Seite des Filters sitzenden Zellen vorsichtig abgewischt. Die auf die Unterseite des Filters gewanderten Zellen wurden nach einer Methanolfixierung mit einer Hemacolor Schnellfärbung gefärbt und unter dem Mikroskop gezählt.

3.14.5 Analyse des matrixunabhängigen Wachstums

Verwendete Lösungen:

1 x MEM	0,25 g	DMEM Pulver
	0,88 g	Natriumbicarbonat
	ad 20 ml	H ₂ O _{dest.}
	+ 0,25 ml	nicht essentielle Aminosäuren
	ad 25 ml	H ₂ O _{dest.}
	pH 7,2; steril filtrieren	
0,5% Grundagar	5,4 ml	1 x MEM
	4,5 ml	2 x MEM
	3,6 ml	FKS
	4,5 ml	2% Agar
0,3% Topagar	0,6 ml	Grundagar
	0,4 ml	Zellsuspension (in 1 x MEM)

Durchführung

Zur Bestimmung des matrixunabhängigen Wachstumsverhaltens wurden in 6-Well-Platten $1-3 \times 10^4$ Zellen/ml in Soft-Agar eingebettet. Nach einer Inkubationszeit von zehn Tagen bei 37°C wurden die entstandenen Kolonien gezählt und fotografisch dokumentiert.

3.14.6 Sphäroidmodell

Hierbei handelt es sich um ein dreidimensionales Zellkulturmodell, in dem das *in vivo* Verhalten von Tumorzellen imitiert werden sollte.

Dazu wurden 96-well-Platten mit 50 µl Agarose (1% in PBS) pro Well beschichtet. Zur Generierung der Sphäroide wurden 200 µl einer Suspension mit $4-8 \times 10^3$ Zellen auf die ausgehärtete Agarose ausgebracht. Das Sphäroidwachstum wurde zehn Tage mikroskopisch beobachtet. Mit dem Radius (r) der Sphäroide wurde über die Formel $V=4/3\pi r^3$ das Sphäroidvolumen berechnet (Abbildung 13). Für immunhistologische Untersuchungen wurden die Sphäroide mit Formaldehyd (4%) fixiert und in Paraffin eingebettet.

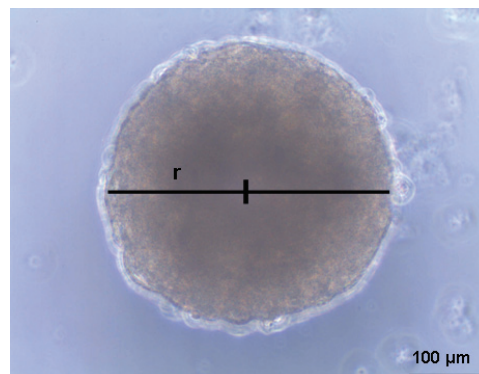


Abbildung 13. Schematische Darstellung: Bestimmung des Radius (r) eines Sphäroids.

3.14.7 Nacktmausmodell

Bei diesem Modell wurden Tumorzellen in Kooperation mit Herrn Dr. Thilo Spruss, dem Leiter der Zentralen Tierlaboratorien an der Universität Regensburg, in immundefiziente NMRI (nu/nu) Mäuse subkutan injiziert, um das Tumorstadium *in vivo* analysieren zu können. Die Mäuse wurden bei konstanten Temperaturverhältnissen von 21°C in einem 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus bei freiem Zugang zu Nahrung und Wasser in den zentralen

Tierlaboratorien der Universität Regensburg gehalten. Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet und zweimal mit serumfreien DMEM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur in DMEM mit einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ ml resuspendiert.

Jede Versuchsgruppe bestand aus zehn NMRI (nu/nu) Mäusen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 32 g. Allen Mäusen wurde eine Zellsuspension von 0,1 ml mit 1×10^6 Zellen subkutan injiziert. Für die Aufzeichnung der Wachstumskinetik des Tumors wurde der Durchmesser des Tumors mit einem elektronischen Messschieber bestimmt. Das Tumolvolumen wurde mit folgender Formel berechnet: $V = L \times B^2/2$ (L: Länge, B: Breite). Aus ethischen Gründen wurden die Tiere getötet und die Tumoren herauspräpariert, sobald der erste Tumor ulzerierte. Die Tumorproben wurden für immunhistologische Untersuchungen in Formaldehyd (4%) fixiert. Für RNA- und Proteinisolationen wurden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gelagert.

3.14.8 Statistische Auswertung

Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwerte inklusive Standardabweichungen oder in Prozentangaben dargestellt. Alle Versuche wurden jeweils in mindestens drei unabhängigen Ansätzen wiederholt. Signifikanzberechnungen zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „Student's paired t-test“ durchgeführt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für die Berechnungen wurde die GraphPad 4 Software (GraphPad software Inc, San Diego, USA) verwendet.

Die Korrelation zwischen Parametern wurde mit dem Spearman Test berechnet. Die Kontingenztabellen-Analyse und der „two-sided Fisher's exact test“ wurden verwendet, die statistische Assoziation zwischen klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Variablen zu untersuchen.

Die Auswertung des Tissue-Microarrays erfolgte mit dem SPSS Softwareprogramm Version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

4 Ergebnisse

Wie einleitend dargestellt, sollten in dieser Arbeit vier Fragestellungen bzw. Ziele verfolgt werden:

- 4.1 Analyse der Bedeutung von aktivierten HSZ für die Tumorigenität von HCC-Zellen,
- 4.2 Regulation und Funktion des Proteins MIA2 im Verlauf der Hepatokanzerogenese,
- 4.3 Expression und Funktion von FGFR2-IIIb im HCC und
- 4.4 Expression und Funktion von GLUT1 im HCC als Basis für nachfolgende Untersuchungen zur Bedeutung des „Warburg Effektes“ bei der Hepatokanzerogenese

Die hierbei erzielten Ergebnisse werden im Folgenden in dieser Reihenfolge dargestellt:

4.1 Analyse der Bedeutung von aktivierten HSZ für die Tumorigenität von HCC-Zellen

Um die Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen zu untersuchen, kamen drei unterschiedliche Modelle zum Einsatz:

- 1. konditioniertes Medium von aktivierten HSZ *in vitro*,
- 2. ein dreidimensionales *in vitro* Sphäroid Kokultur System und
- 3. das Nacktmausmodell als *in vivo* Xenograftmodell

4.1.1 Effekt von konditioniertem Medium von aktivierten HSZ auf HCC-Zellen *in vitro*

Um die Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen zu untersuchen, wurden zuerst drei verschiedene HCC-Zell-Linien mit konditioniertem Medium (KM), das von aktivierten HSZ gesammelt wurde, inkubiert.

Die Analyse der Zellproliferation zeigte, dass das KM von aktivierten HSZ die Proliferation aller drei untersuchter HCC-Zell-Linien (HepG2, Hep3B und PLC) signifikant verstärkte (Abbildung 14).

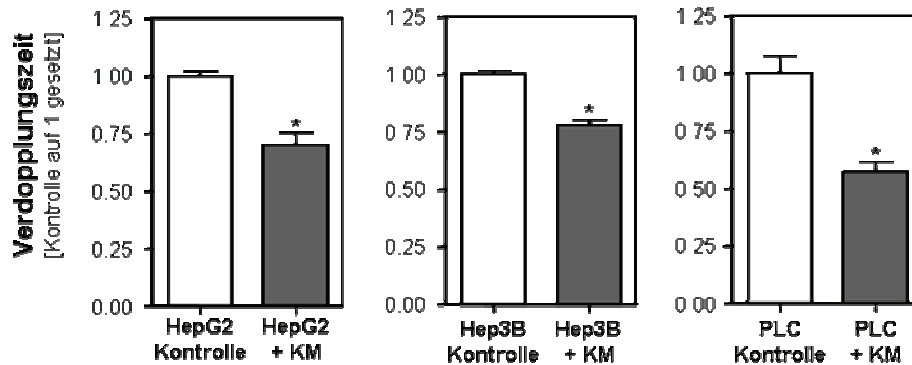


Abbildung 14. Proliferationsanalyse der HCC Zell-Linien (HepG2, Hep3B und PLC): unstimuliert (Kontrolle) und nach Stimulation mit KM (konditioniertem Medium) von aktivierten HSZ, *: $p < 0,05$.

Als nächstes wurde die migratorische Aktivität der mit KM stimulierten HCC-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen analysiert. Boydenkammer Analysen zeigten, dass KM von aktivierten HSZ das migratorische Potential von HCC-Zellen (Hep3B, HepG2 und PLC) signifikant steigerte (Abbildung 15).

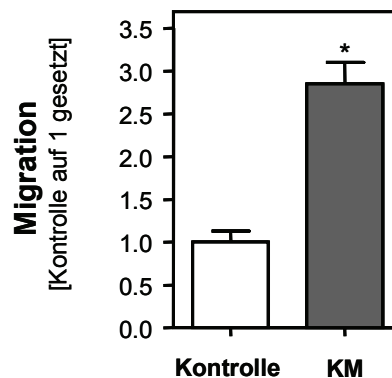


Abbildung 15. Repräsentative Analyse des migratorischen Potentials von Hep3B Zellen nach Stimulation mit KM (konditioniertem Medium) von aktivierten HSZ im Vergleich zu den unstimulierten (Kontrolle) Hep3B Zellen in einer Boydenkammer Analyse, *: $p < 0,05$.

Außerdem wurde nach dreitägiger Serumdepletion die Apoptose in KM stimulierten PLC Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Stimulation mit KM von aktivierten HSZ reduzierte signifikant die Anzahl apoptotischer Zellen (AnnexinV/PI: $4,4 \pm 0,3$ vs. $18,8 \pm 1,9$; $p = 0,009$, Abbildung 16) im Vgl. zu unstimulierten PLC Zellen.

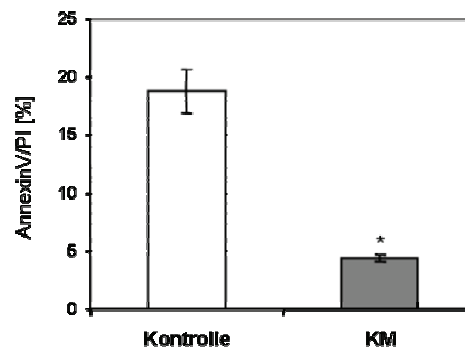


Abbildung 16. Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose von PLC Zellen: stimuliert mit KM (konditioniertem Medium) und unstimuliert (Kontrolle) nach ausgedehnter dreitägiger Serumdepletion mittels AnnexinV/PI Färbung; PI: Propidiumiodid.

4.1.2 Effekt von aktivierten HSZ auf HCC-Zellen in einem dreidimensionalen *in vitro* Kokultur System

Als nächstes wurde das Sphäroid-System verwendet, um den Effekt aktivierter HSZ auf HCC-Zellen zu untersuchen. Nachdem jeweils 4×10^3 Zellen pro Well einer 96-well Platte ausgesät wurden, bildeten sich nach zwei bis drei Tagen sowohl Sphäroide aus HCC-Zellen als auch aus aktivierten HSZ. Die simultane Aussaat beider Zelltypen in gleicher Menge (4×10^3 HSZ und 4×10^3 HCC-Zellen) resultierte ebenfalls in einer Sphäroidbildung nach zwei bis drei Tagen. Jedoch zeigten diese gemischten Sphäroide ein schnelleres Wachstum. Abbildung 17 stellt das Sphäroidvolumen nach zehn Tagen dar. Der gestrichelte Balken entspricht der Summe ($5,1 \pm 0,2 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$) aus den gemittelten Volumina der Sphäroide, die nur aus aktivierten HSZ ($0,3 \pm 0,1 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$) bzw. Hep3B Zellen ($4,7 \pm 0,2 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$) bestanden (Abbildung 17). Diese ist signifikant kleiner als das tatsächliche gemittelte Volumen der gemischten Sphäroide aus aktivierten HSZ und HCC-Zellen ($7,2 \pm 0,3 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$; $p=0,0002$).

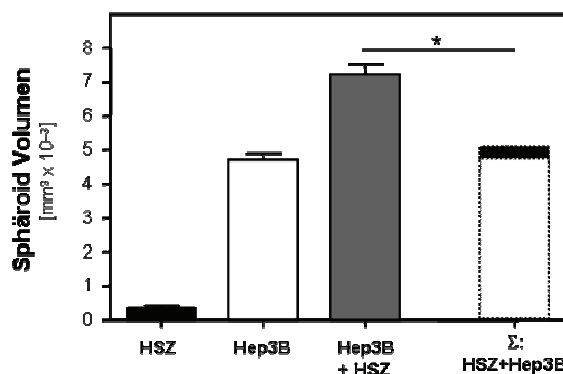


Abbildung 17. Sphäroidvolumina: der gestrichelte Balken repräsentiert die Summe aus den gemittelten Volumina der einfachen HSZ- und Hep3B-Sphäroide im Vergleich zu den gemischten Sphäroiden aus HSZ und Hep3B Zellen, *: $p<0,05$.

Interessanterweise wiesen in einer histologischen Analyse (Abbildung 18) die gemischten Sphäroide, obwohl sie größer waren, kleinere Areale (33%) mit zentraler Nekrose auf als die Sphäroide aus Hep3B Zellen alleine (50%).

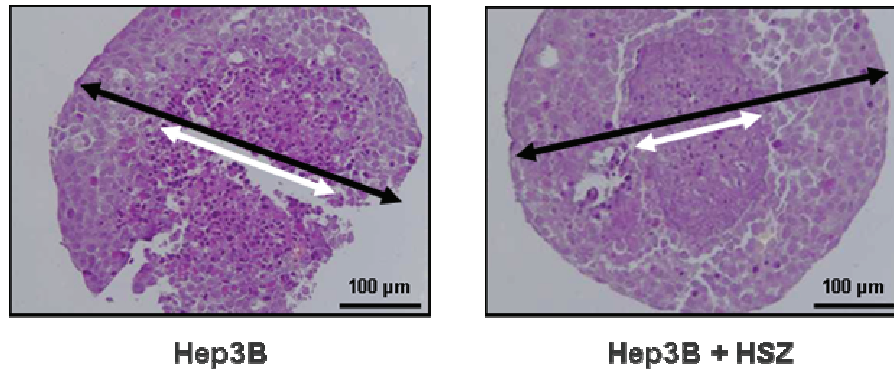


Abbildung 18. HE Färbung: Sphäroide aus Hep3B Zellen (Nekrose: 50%) und gemischte Sphäroide aus aktivierten HSZ und Hep3B Zellen (Nekrose: 33%) nach zehn Tagen; weißer Balken: Durchmesser der zentralen Nekrose; schwarzer Balken: Sphäroiddurchmesser.

4.1.3 Effekt von aktivierten HSZ auf HCC-Zellen *in vivo* im Nacktmausmodell

HCC-Zellen wurden entweder alleine ($0,5 \times 10^5$ Zellen/Maus) oder zusammen mit aktivierten HSZ ($0,5 \times 10^5$) in Nacktmäuse implantiert. Aktivierte HSZ alleine ($0,5 \times 10^5$) bildeten in einem Beobachtungszeitraum von drei Monaten keine Tumoren. Auch die Implantation von PLC bzw. Hep3B Zellen alleine resultierte unter unseren experimentellen Bedingungen in keiner Tumorbildung. Im Gegensatz dazu bildeten PLC oder Hep3B Zellen in allen Mäusen Tumoren (10/Gruppe), wenn sie zusammen mit aktivierten HSZ injiziert wurden (Abbildung 19).

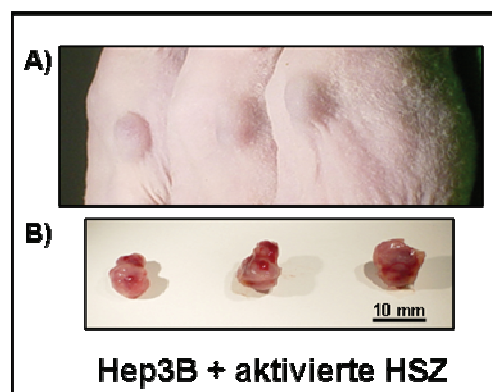


Abbildung 19. A) gemischte Tumoren aus aktivierten HSZ und Hep3B Zellen nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse B) Tumoren nach Präparation *ex vivo*.

HepG2 Zellen bildeten im Nacktmausmodell auch ohne aktivierte HSZ Tumoren. Jedoch wurde ein sehr viel schnelleres Tumorstadium beobachtet, wenn sie zusammen mit aktivierten HSZ injiziert wurden (Abbildung 20; $83,1 \pm 19,8 \text{ mm}^3$ vs. $28,7 \pm 10,6 \text{ mm}^3$ 16 Tage nach Injektion).

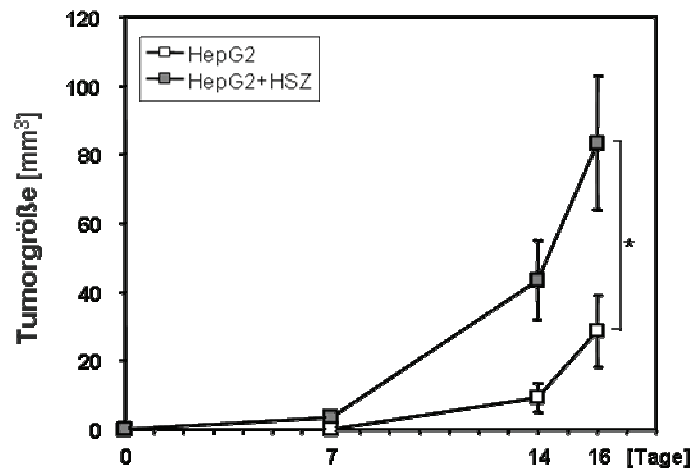


Abbildung 20. Wachstumskinetik über 16 Tage: Nacktmaustumoren nach Implantation von HepG2 Zellen alleine oder zusammen mit aktivierten HSZ, *: $p < 0,05$.

Ähnlich wie im Sphäroid-System *in vitro* zeigte eine histologische Analyse, dass gemischte Tumoren aus HepG2 Zellen und aktivierten HSZ ein kleineres zentrales Nekroseareal aufwiesen als die Tumoren aus HepG2 Zellen allein (Abbildung 21).

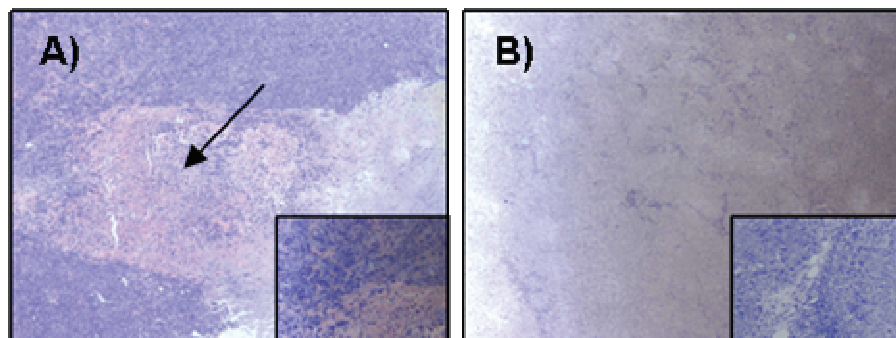


Abbildung 21. HE Färbung der Nacktmaustumoren: A) HepG2 Zellen alleine mit ausgeprägter zentraler Nekrose (Pfeil), B) gemischter Tumor aus Hep3B Zellen und aktivierten HSZ, 16 Tage nach Implantation der Zellen.

Weiterhin zeigte die histopathologische Analyse, dass die gemischten Tumoren ein diffuses Wachstum aufwiesen, während Tumoren aus HepG2 Zellen alleine ein eher noduläres Wachstumsmuster zeigten. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 22 gezeigt.

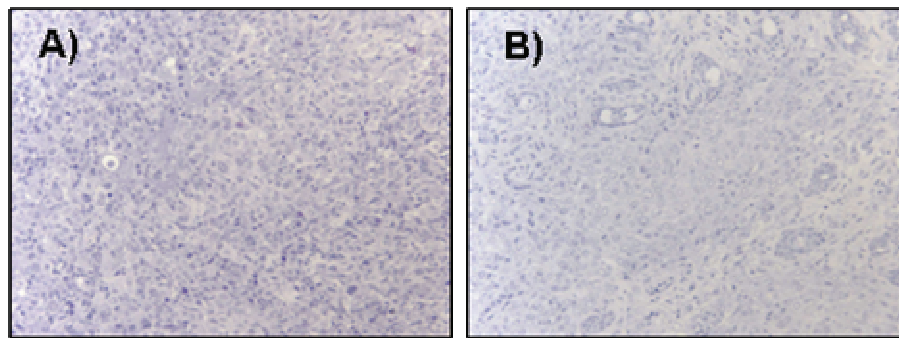


Abbildung 22. HE Färbung von Nacktmaustumoren: A) aus HepG2 Zellen alleine, B) HepG2 Zellen zusammen mit aktivierten HSZ, 16 Tage nach Implantation.

4.1.4 Effekt von aktivierten HSZ auf die Aktivierung von ERK und NFκB in HCC-Zellen

Um einen Einblick in die molekularen Mechanismen zu bekommen, durch die der tumorigene Effekt aktivierter HSZ auf HCC-Zellen vermittelt wird, wurden zwei Signalwege untersucht, die eine wichtige Rolle in der Hepatokanzerogenese spielen.

Nach einer Stimulation mit KM von aktivierten HSZ konnte durch eine Westernblot Analyse eine starke Phosphorylierung der p42/p44 MAPK (ERK1/2) in allen untersuchten Zell-Linien (Hep3B, HepG2 und PLC) nachgewiesen werden. Abbildung 23 zeigt exemplarisch das Ergebnis, das sich bei HepG2 Zellen zeigte.

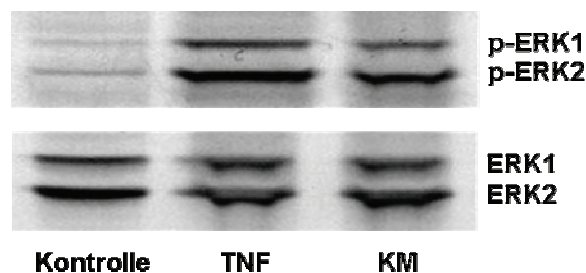


Abbildung 23. Westernblot Analyse von phosphoryliertem ERK1/2 (p-ERK1, p-Erk-2, 42/44 kDa) in HCC- Zellen, die mit KM von aktivierten HSZ stimuliert wurden und unstimulierten Kontrollzellen. Zusätzlich wurden HCC-Zellen mit TNF als positive Kontrolle stimuliert. Unphosphoryliertes ERK (ERK1/2, 42/44 kDa) diente als Ladekontrolle.

Die Induktion war ähnlich stark wie nach einer Stimulation mit TNF, das bekanntlich ein starker Induktor der ERK Aktivierung ist.

Als nächstes wurde mit einem ELISA die Konzentration von aktiviertem NFκB in nukleären Extrakten aus HCC-Zellen, die mit KM von aktivierten HSZ stimuliert wurden, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen bestimmt. Dabei konnte in HCC-

Zellen eine signifikant höhere NF κ B Aktivität gezeigt werden, nachdem sie mit KM von aktivierten HSZ stimuliert wurden. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis, das mit PLC Zellen erzielt wurde.

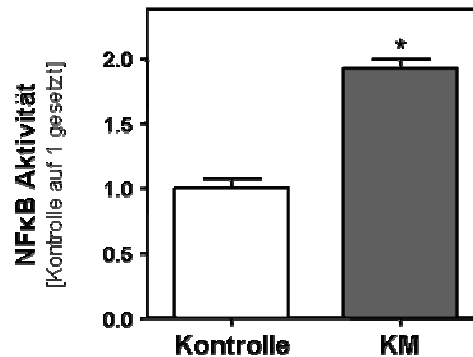


Abbildung 24. NF κ B Aktivität in PLC Zellen nach Stimulation mit KM von aktivierten HSZ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, *: $p < 0,05$.

Das proinflammatorische Chemokin Interleukin IL-8 wird durch NF κ B reguliert und von HCC-Zellen exprimiert (164).

Durch quantitative PCR Analyse konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von PLC Zellen mit KM von aktivierten HSZ die IL-8 Expression verstärkte (Abbildung 25).

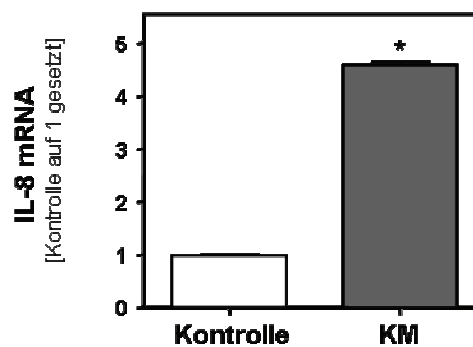


Abbildung 25 IL-8 mRNA Expression von PLC Zellen nach Stimulation mit KM von aktivierten HSZ für 24 h (KM) und unstimulierten Kontrollzellen (Kontrolle), *: $p < 0,05$.

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass aktivierte HSZ in HCC-Zellen die Proliferation und die Resistenz gegen Apoptose induzieren. Weiterhin fördern sie die Migration von HCC-Zellen *in vitro* und deren invasives Wachstum *in vivo*. Die tumorigenen Effekte werden wahrscheinlich über eine NF κ B und ERK Aktivierung vermittelt. Zwei Signalwege, die im HCC eine wichtige Rolle spielen.

4.2 Regulation und Funktion des Proteins MIA2 im Verlauf der Hepatokanzerogenese

4.2.1 Reduzierte HNF-1 Expression führt im HCC zu verminderter MIA2 Expression

Zuerst sollten die molekularen Mechanismen analysiert werden, die für die starke Reduktion oder den Verlust der MIA2 Expression in humanen HCC-Zell-Linien *in vitro* und HCC-Gewebe *in vivo* verantwortlich sind. Da bereits gezeigt wurde, dass die MIA2 Expression durch HNF-1 reguliert ist (165), wurde die Expression dieses Transkriptionsfaktors in vier verschiedenen HCC-Zell-Linien im Vergleich zu PHHs untersucht (Abbildung 26).

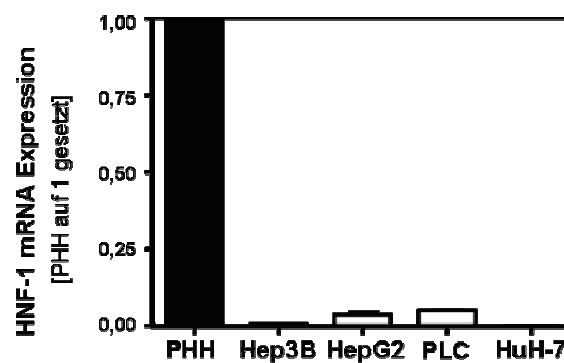


Abbildung 26. HNF-1 mRNA Expression in PHH (primäre humane Hepatozyten) und vier HCC-Zell-Linien (Hep3B, HepG2, PLC und HuH-7).

Interessanterweise wurde eine starke Reduktion der HNF-1 mRNA Expression in allen vier Zell-Linien gefunden. Ebenso zeigte sich eine verminderte HNF-1 mRNA Expression in den Tumorgeweben von zehn HCC-Patienten im Vergleich zum korrespondierenden nicht-neoplastischen Lebergewebe. Insgesamt wurde eine $6,4 \pm 2,1$ -fache Reduktion im HCC nachgewiesen (Abbildung 27).

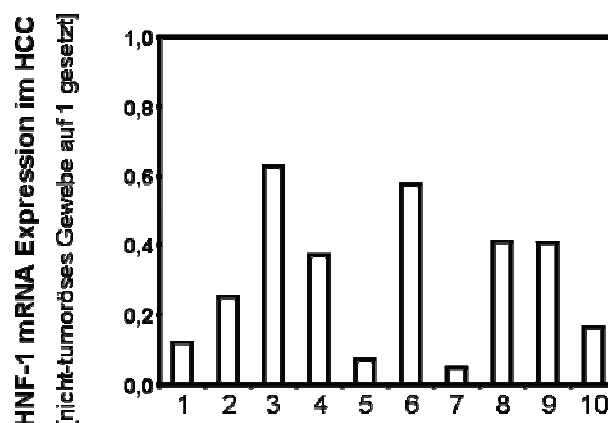


Abbildung 27. HNF-1 mRNA Expression in zehn HCC-Geweben (#1-10) im Vergleich zu den korrespondierenden nicht-tumörösen Geweben.

Wie bereits gezeigt, war MIA2 in diesen HCC-Geweben ebenfalls vermindert exprimiert ($9,9 \pm 4,5$ -fach) (166) und die Reduktion der HNF-1 Expression korrelierte signifikant mit der verminderten MIA2 Expression ($r=0,71$; $p=0,023$, Abbildung 28).

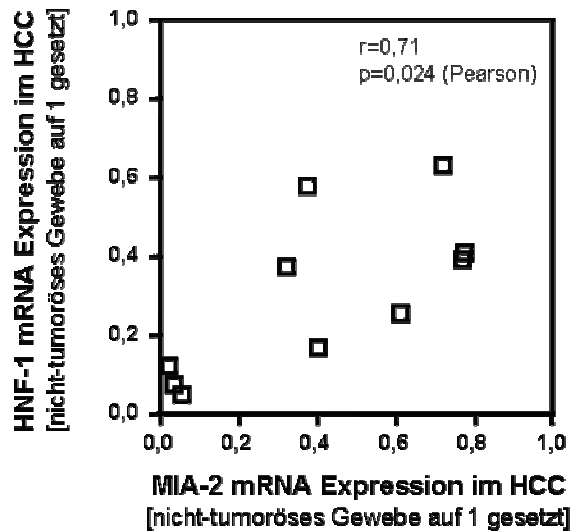


Abbildung 28. Korrelation von HNF-1 und MIA2 mRNA Expression in zehn analysierten HCC-Gewebeproben.

Um zu untersuchen, ob der verminderte HNF-1 Expressionslevel für die Reduktion der MIA2 Expression im HCC verantwortlich ist, wurden die HCC-Zell-Linien transient mit einem Expressionsplasmid für HNF-1 transfiziert. Eine anschließende Analyse der MIA2 mRNA Expression im Vergleich zu Kontroll- und nicht-transfizierten Zellen zeigte, dass die Transfektion von HNF-1 ausreichend war, die MIA2 mRNA Expression in HCC-Zellen ähnlich stark wie in humanen PHH zu re-induzieren. Die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse wurden mit HepG2 Zellen erzielt.

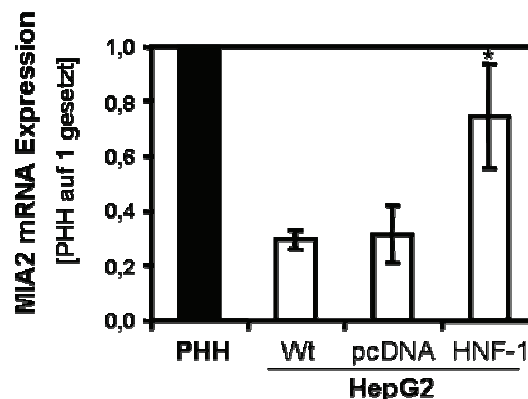


Abbildung 29. MIA2 mRNA Expression nach transienter Transfektion mit einem HNF-1 Expressionsplasmid im Vergleich zu Kontroll- (pcDNA) und nicht-transfizierten HepG2 Zellen (Wt), sowie in Relation zu PHH (primäre humane Hepatozyten), *: $p<0,05$ im Vgl. zu Kontroll- (pcDNA) und nicht-transfizierten HepG2 Zellen (Wt).

In einem komplementären Ansatz wurde die HNF-1 Expression in HepG2 Zellen durch *small interfering RNA* (siRNA) depletiert. Dies resultierte in einer signifikant verminderten MIA2 Expression im Vergleich zu der siRNA- und nicht-transfizierten Kontrolle (Abbildung 30). Analoge Ergebnisse wurden auch mit den anderen HCC-Zell-Linien erzielt.

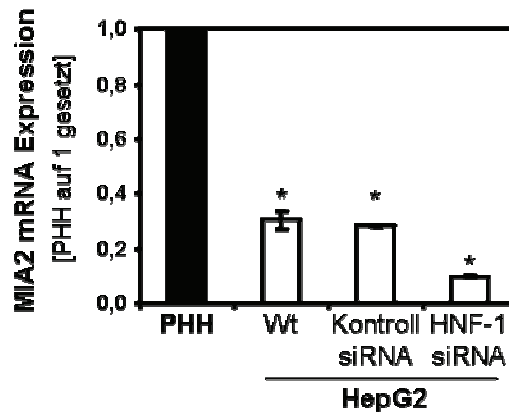


Abbildung 30 MIA2 mRNA Expression nach transients Transfektion mit HNF-1 siRNA im Vergleich zu den Kontroll- und nicht-transfizierten HepG2 Zellen (Wt), sowie in Relation zu PHH (primäre humane Hepatozyten), *: $p < 0,05$.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine reduzierte MIA2 Expression im HCC durch den Verlust der HNF-1 Expression im HCC verursacht wird.

4.2.2 Re-Expression von MIA2 in HCC-Zellen

Um einen Einblick in die funktionelle Rolle der verminderten MIA2 Expression von MIA2 im HCC zu bekommen, wurde MIA2 in der HCC-Zell-Linie Hep3B durch eine stabile Transfektion mit einem MIA2 Expressionsvektor, der die komplette MIA2 cDNA unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) Promotors enthält, re-induziert. Der Leervektor pCMX ohne Insert wurde als Kontrolle verwendet. Eine quantitative real time PCR Analyse zeigte eine starke Induktion der MIA2 mRNA Expression in den Zellklonen 1 und 2. In den Kontroll-transfizierten Zellen wurde dagegen keine Veränderung der MIA2 Expression beobachtet (Abbildung 31).

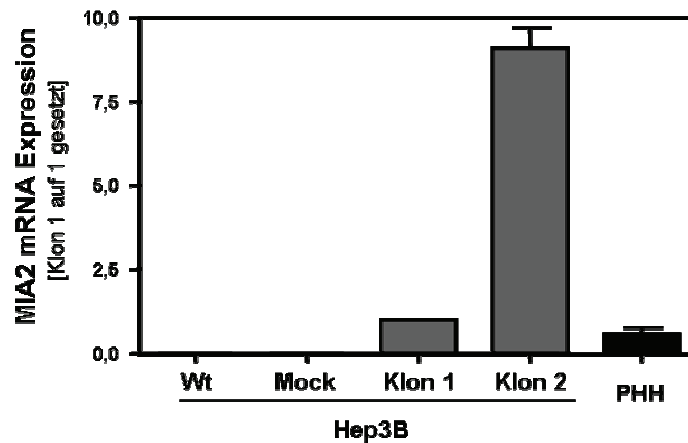


Abbildung 31. MIA2 mRNA Expression: Hep3B MIA2 Zellklone (Klon 1 und 2) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, sowie in Relation zu PHH (primäre human Hepatozyten).

Eine gesteigerte MIA2 Expression konnte in den Zellklonen ebenso auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 32).

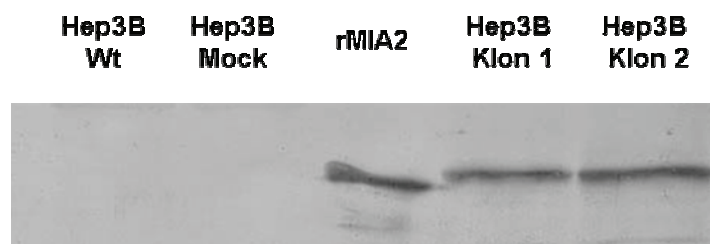


Abbildung 32 MIA2 Protein Expression (60 kDa): Hep3B MIA2 Zellklone im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, sowie im Vergleich zu rekombinanten MIA2 (rMIA2).

Die veränderte MIA2 mRNA Expression stimmte mit dem veränderten Proteinlevel überein. Immunfluoreszenz Analysen bestätigten ebenfalls die Re-Expression von MIA2 in den Zellklonen, wie in Abbildung 33 exemplarisch für Klon 1 gezeigt.

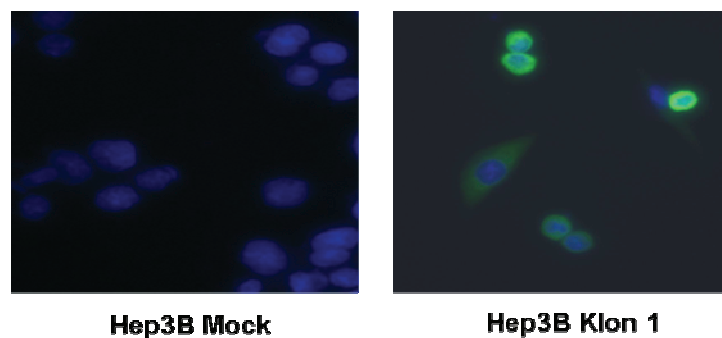


Abbildung 33. Representative MIA2 Immunfluoreszenz: Hep3B Klon 1 MIA2 positiv (grünes Signal), kein Signal bei Hep3B Mock, Zellkernfärbung mit DAPI (blaues Signal).

4.2.3 Funktionelle Veränderungen in HCC-Zellen *in vitro* nach MIA2 Re-Expression

Für eine weitere Charakterisierung der Rolle von MIA2 in HCC-Zellen, wurden mit den MIA2 exprimierenden Zellklonen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen und nicht-transfizierten HepG2 Zellen funktionelle *in vitro* Analysen durchgeführt. Die Proliferation war in MIA2 re-exprimierenden Zellen signifikant vermindert (Abbildung 34).

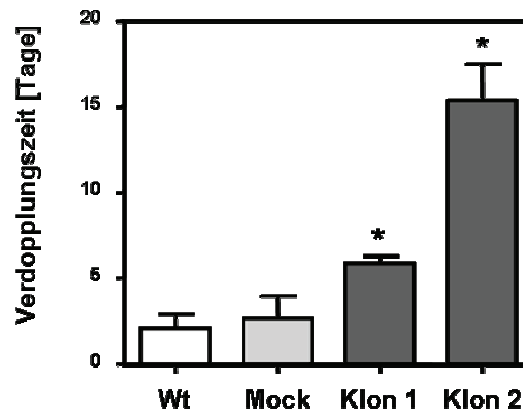


Abbildung 34. Analyse der Verdopplungszeit: Hep3B MIA2 Zellklone (Klon 1 und 2) im Vergleich zu den Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, *: $p < 0,05$.

Auf Grund dieser Erkenntnis wurde eine durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus der MIA2 Zellklone und Kontrollzellen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Fraktion der MIA2 Zellklone, die in der G0/G1 Phase verblieb (Klon 1 (K1) $35,9 \pm 1,9\%$ und Klon 2 (K2) $38,8 \pm 2,2\%$) signifikant höher war, als in Kontroll-transfizierten ($24,1 \pm 1,1\%$; $p = 0,032$ vs. K1 und $p = 0,026$ vs. K2) und nicht-transfizierten Zellen ($26,2 \pm 1,2\%$; $p = 0,048$ vs. K1 und $p = 0,036$ vs. K2). Weiterhin wurden weniger MIA2 re-exprimierende Zellen in der S-Phase (K1: $32,2 \pm 1,2\%$ und K2: $25,0 \pm 0,6\%$) im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen ($39,4 \pm 1,2\%$; $p = 0,047$ vs. K1 und $p = 0,008$ vs. K2) detektiert. Der Anteil der detektierten Zellen in der G2/M-Phase unterschied sich nicht signifikant zwischen Zellklonen und Kontrollen (Abbildung 35).

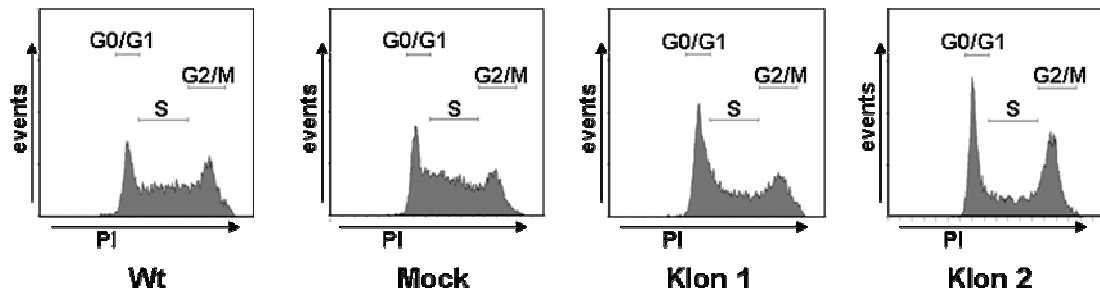


Abbildung 35. Analyse des Zellzyklus (G0/G1-, S-, und G2/M-Phase): Hep3B MIA2 Zellklone (Klon 1-3) im Vergleich zu den Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, Propidiumiodid Färbung (PI).

Zudem zeigte eine durchflusszytometrische AnnexinV/Propidiumiodid Analyse in den Zellklonen und Kontrollen nur eine marginale Apoptoserate von <3%. Dies deutet darauf hin, dass eine MIA2 Expression die Apoptose in HCC-Zellen *in vitro* nicht beeinflusst (Abbildung 36).

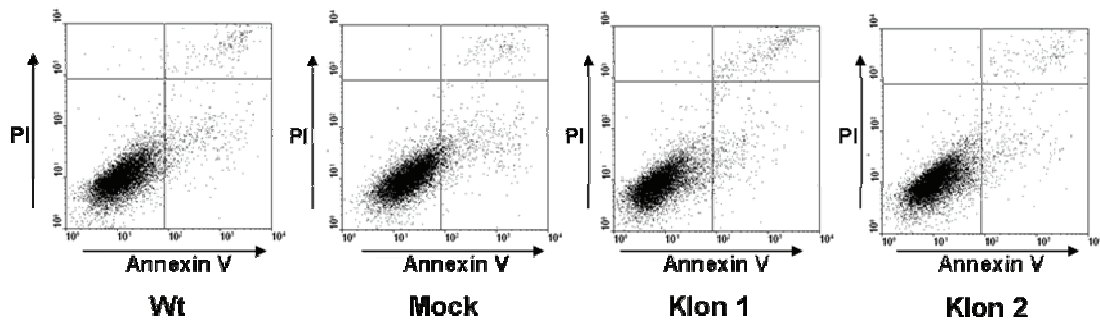


Abbildung 36. Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose: Hep3B MIA2 Zellklone (Klon1 und 2) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, AnnexinV/Propidiumiodid (PI) Färbung.

Jedoch zeigten die stabil transfizierten MIA2 Zellklone in einer Invasionsanalyse ein signifikant verringertes Invasionspotential im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 37).

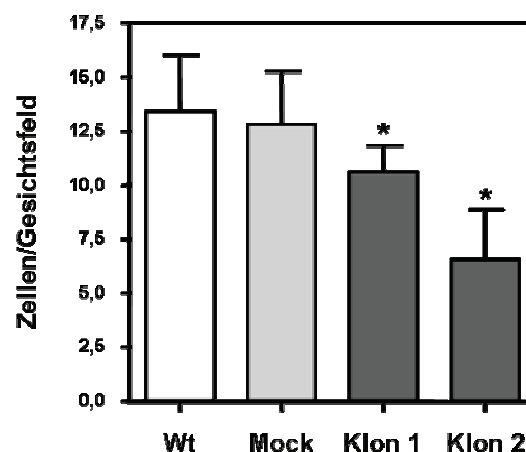


Abbildung 37 Analyse des invasiven Potentials: Hep3B MIA2 Zellklone (Klon 1 und 2) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, Matrigel Boydenkammer Analyse, *: $p < 0,05$.

Um die funktionellen Effekte von MIA2 auf HCC-Zellen zu bestätigen und um erste Erkenntnisse für einen möglichen therapeutischen Einsatz von MIA2 zu bekommen, wurden HCC-Zellen mit rekombinantem MIA2 (rMIA2) behandelt. Dadurch konnte der inhibitorische Effekt auf die Zellproliferation und die Invasion (Abbildung 38), der in den stabil MIA2 exprimierenden Zellklonen beobachtet wurde (Abbildung 34 und 37), bestätigt werden.

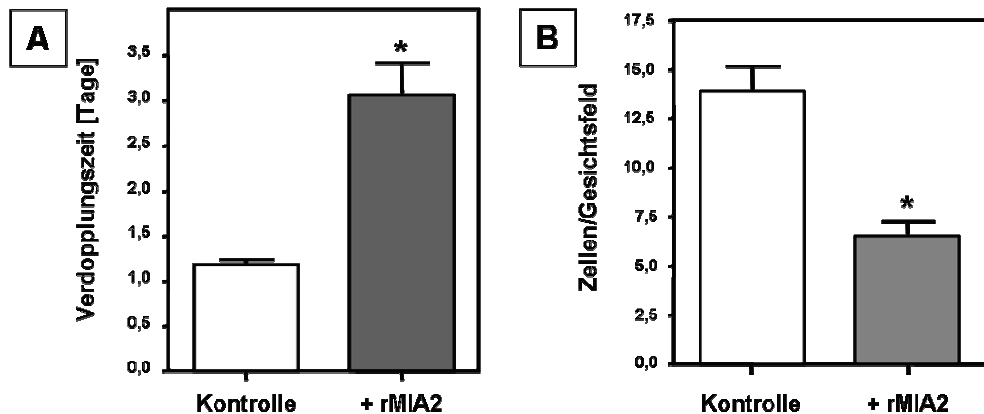


Abbildung 38. Analyse der Verdopplungszeit (A) und des invasatorischen Potentials (B) von Hep3B Zellen nach Stimulation mit rekombinantem MIA2 im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen (Kontrolle), *: $p < 0,05$.

4.2.4 Tumorigenität der MIA2 re-exprimierenden HCC-Zellen *in vivo*

Um die Effekte von MIA2 auf das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen, wurden die stabil transfizierten MIA2 Zellklone subkutan in Nacktmäuse injiziert. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Tumorbildung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 39).

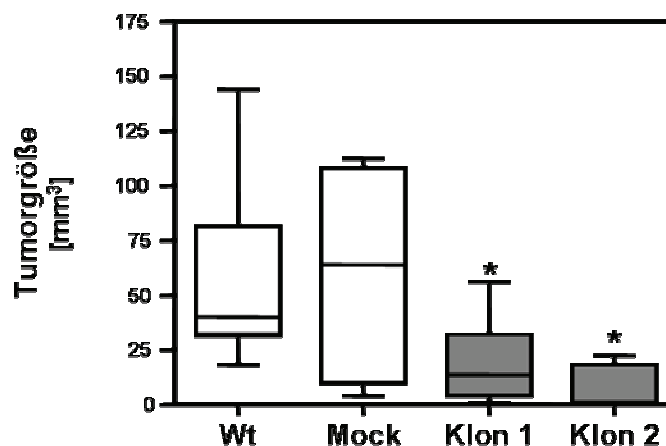


Abbildung 39. Tumorgößen 15 Tage nach subkutaner Injektion von 1×10^6 Hep3B MIA2 Zellklonen, Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierter Zellen (Wt) in Nacktmäuse ($n=10$ /Gruppe; *: $p < 0,05$ im Vergleich zu Wt und Mock).

Zehn Tage nach der Injektion entwickelten alle Tiere der Kontrollgruppen Tumoren. In den Gruppen mit den injizierten MIA2 Zellklonen bildeten nur 6 von 10 (K1) und 4 von 10 (K2) Tiere Tumoren. Nach 15 Tagen hatten auch alle Tiere der K1 Gruppe und 6 Tiere der K2 Gruppe Tumoren. Jedoch waren diese Tumoren signifikant kleiner als die der Kontrollgruppen (K1: $17,7 \pm 5,5 \text{ mm}^3$ und K2: $7,9 \pm 3,1 \text{ mm}^3$ vs. Wt: $57,5 \pm 12,1 \text{ mm}^3$ und Mock $59,8 \pm 14,9 \text{ mm}^3$; K1: $p=0,017$ und K2: $p=0,003$ im Vergleich zu Mock; K1: $p=0,008$ und K2: $p=0,0009$ im Vergleich zu Wt). Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Re-expression von MIA2 in HCC-Zellen die Proliferation *in vivo* hemmt.

Weiterhin zeigte eine histopathologische Analyse, dass Tumoren aus Kontrollzellen diffus und invasiv und Tumoren aus MIA2 re-exprimierenden Zellen eher nodulär wachsen. Representative Bilder sind in (Abbildung 40) dargestellt.

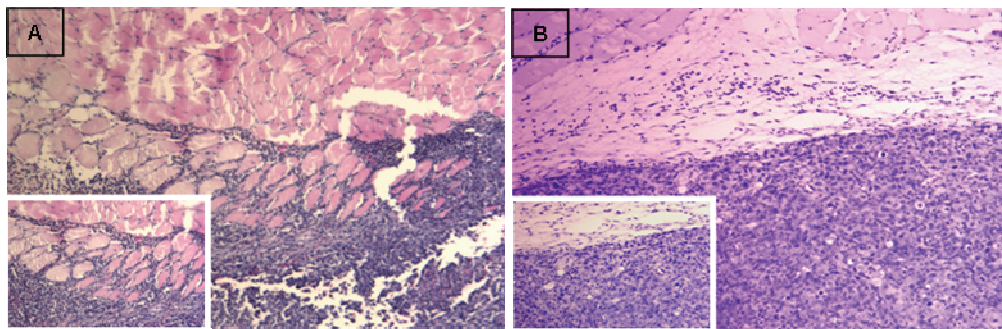


Abbildung 40. Representative HE Färbung: A) Tumoren aus Kontroll-transfizierten Zellen mit invasivem Wachstum (Mock) und B) MIA2 re-exprimierenden Hep3B Zellen (Klon 2) mit eher nodulärem Wachstum.

Zusammenfassend und in Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen, weisen die *in vivo* Daten darauf hin, dass eine verminderte MIA2 Expression in HCC-Zellen die Tumorigenität von HCC-Zellen induziert.

4.2.5 MIA2 Expression im humanen HCC

Um die MIA2 Expression im HCC in einer größeren Fallzahl untersuchen zu können, wurde ein Tissue-Microarray (TMA) mit 85 HCCs und korrespondierenden nicht-tumorösen Geweben der gleichen Patienten ($n=81$) immunhistochemisch analysiert. Die Untersuchung der MIA2 Proteinexpression war in allen 85 HCC- und in 98,8% (80/81) der nicht tumorösen Gewebeproben aussagekräftig. In 32,9% (28/85) der HCC-Gewebeproben war keine MIA2 Expression detektierbar. Im Gegensatz dazu konnte in allen nicht karzinomatösen Gewebeproben eine

MIA2 Expression (score 1+ oder 2+) nachgewiesen werden. Außerdem war die MIA2 Immunoreaktivität in 62,5% (50/80) der Fälle geringer als in den korrespondierenden nicht-tumorösen Lebergeweben. Representative immunhistologische MIA2 Färbungen sind in Abbildung 41 dargestellt.

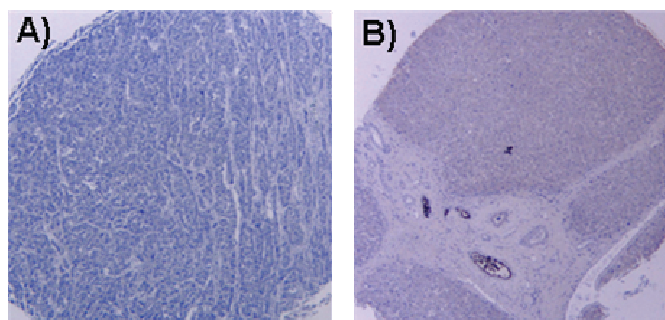
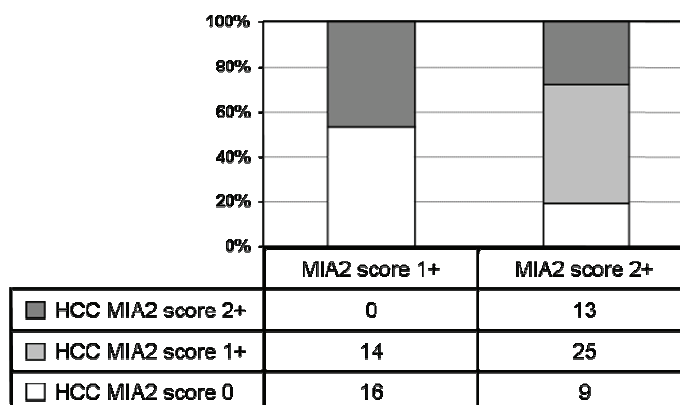


Abbildung 41. Repräsentatives Beispiel eines HCC-Gewebe mit negativer MIA2 Immunoreaktivität (A, score: 0) und korrespondierenden nicht-tumorösen Lebergewebe mit starker MIA2 Expression (B, score: 2+).

In Abbildung 42 werden die immunhistochemischen Ergebnisse für das HCC- und nicht-tumoröses Lebergewebe auf dem TMA zusammengefasst.



$p < 0,001$ exakter Test nach Fisher

Abbildung 42. Immunhistochemische MIA2 Analyse: Semiquantitative Analyse des MIA2 Immunosignals in HCC- und korrespondierenden nicht-tumorösen Lebergewebe mittels (negativ: 0, schwach: 1+ und stark: 2+).

MIA2 war im HCC signifikant ($p < 0,0001$) vermindert exprimiert. Korrespondierende Daten der mRNA- und semiquantitativen Proteinexpression auf dem TMA waren von zehn HCC-Patienten verfügbar. In allen Fällen war die mRNA Expression in den HCC-Geweben im Vergleich zu den nicht-tumorösen Geweben vermindert ($41,0 \pm 9,6$; $p = 0,0002$). Die MIA2 mRNA Expression war in fünf HCC-Fällen, in denen auch die Immunhistochemie eine verminderte MIA2 Proteinexpression zeigte, signifikant vermindert ($21,1 \pm 11,4\%$) als in fünf Fällen, in denen das immunhistologische Signal ähnlich wie in den nicht-tumorösen Geweben war

(60,9±9,0%; p=0,026). Diese Ergebnisse zeigen, dass die stark verminderte MIA2 Expression im HCC durch die Immunhistochemie korrekt nachgewiesen wurde. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass weniger ausgeprägte Unterschiede zwischen HCC- und nicht-tumorösen Gewebe nicht festgestellt werden konnten. Darum ist es wahrscheinlich, dass MIA2 noch in mehr Fällen vermindert exprimiert wurde als es durch die Immunhistochemie gezeigt werden konnte. Für eine deskriptive Datenanalyse wurden alle relevanten Variablen mit der MIA2 Immunhistochemie verglichen (Tabelle 6).

Variable	Kategorie	MIA2 Immunreaktion				p*
		n analysierbar	negativ	score 1+	score 2+	
Alter bei Diagnose	<60 Jahre	39	16	19	4	0,217
	≥60 Jahre	46	12	24	10	
Geschlecht	weiblich	16	9	6	1	0,095
	männlich	69	19	37	13	
Tumor-Staging	pT1	13	2	4	7	0,036
	pT2	25	10	12	3	
	pT3	41	13	24	4	
	pT4	3	1	2	0	
Tumor-Grading	G1	29	12	14	3	0,407
	G2	48	12	26	10	
	G3	8	4	3	1	
Ätiologie	HBV	9	5	4	0	0,131
	HCV	7	0	6	1	
	Alkohol	34	10	19	5	
	andere	3	2	0	1	
	unbekannt	32	11	14	7	
Tumorgröße	≤ 5 cm	36	10	18	8	0,448
	> 5 cm	30	9	18	3	
Immunhistochemische Daten						
Ki-67 Proliferationsrate (MiB1)						
	≤5%	40	7	23	10	0,008
	>5%	45	21	20	4	

Tabelle 6. MIA2 Immunreaktion im Verhältnis zu klinisch-pathologischen Charakteristika und Ki-67 Proliferationsrate (MiB1), hervorgehobene p-Werte entsprechen p<0,05; exakter Test nach Fisher.

Der Verlust der MIA2 Immunoreaktivität war signifikant mit einem höheren Tumor-Staging assoziiert ($p=0,036$). Weiterhin zeigten MIA2 negative HCC-Gewebe eine signifikant höhere Proliferationsrate (MiB1 Index) im Vergleich zu MIA2 positiven HCC-Gewebe ($p=0,008$; Abbildung 43).

Es konnte keine Korrelation zwischen MIA2 Expression und Alter, Geschlecht, Histologie, Entzündungsgrad, Tumorgroße sowie Ätiologie der zugrunde liegenden Krankheit festgestellt werden.

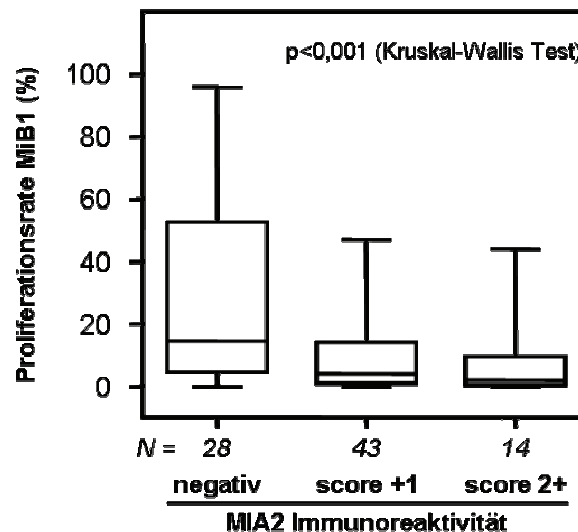


Abbildung 43. Proliferationsrate (immunohistochemischer MiB1 Index) in HCC-Geweben im Vergleich zu negativer, schwacher (score 1+) und starker (score 2+) MIA2 Immunoreaktivität.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass MIA2 das Wachstum und die Invasion des HCC *in vitro* und *in vivo* hemmt, also einen Tumorsuppressor repräsentiert. Weiterhin konnte ein neuer Mechanismus identifiziert werden, wie der Verlust der HNF-1 Expression im HCC die Tumorigenität durch die verminderte MIA2 Expression beeinflusst.

4.2.6 Generierung von MIA2 Knockout Mäusen bzw. transgenen Mäusen mit (konditionellem) Knockdown von MIA2

Ein auf der hier vorliegenden Arbeit aufbauendes und hinausgehendes wichtiges Ziel ist es, die Funktion und Wirkung von MIA2 im Verlauf der Hepatokanzerogenese, aber auch bei weiteren physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen. Aufgrund der komplexen Interaktion parenchymatöser und nicht-parenchymatöser Leberzellen sind hierbei *in vivo* Analysen erforderlich.

Um dieses Ziel zu erreichen, verfolgen wir zwei Strategien bzw. es sollen zwei Mauslinien generiert werden:

1. MIA2 defiziente **Knockout** Mäuse und
2. transgene Mäuse, in denen es durch entweder konstitutive oder Cre-LoxP induzierte RNA Interferenz zum konditionellen **Knockdown** von MIA2 kommt.

Im Folgenden werden die bereits durchgeführten und grundlegenden Versuche sowie Ergebnisse dargestellt, die die Basis für die Generierung der entsprechenden Mäuse darstellen.

4.2.6.1 Grundlagen für die Generierung einer MIA2 Knockout Maus

Um das erste Exon von MIA2 durch homologe Rekombination zu ersetzen, wurde ein Vektor nach folgender Klonierungsstrategie generiert:

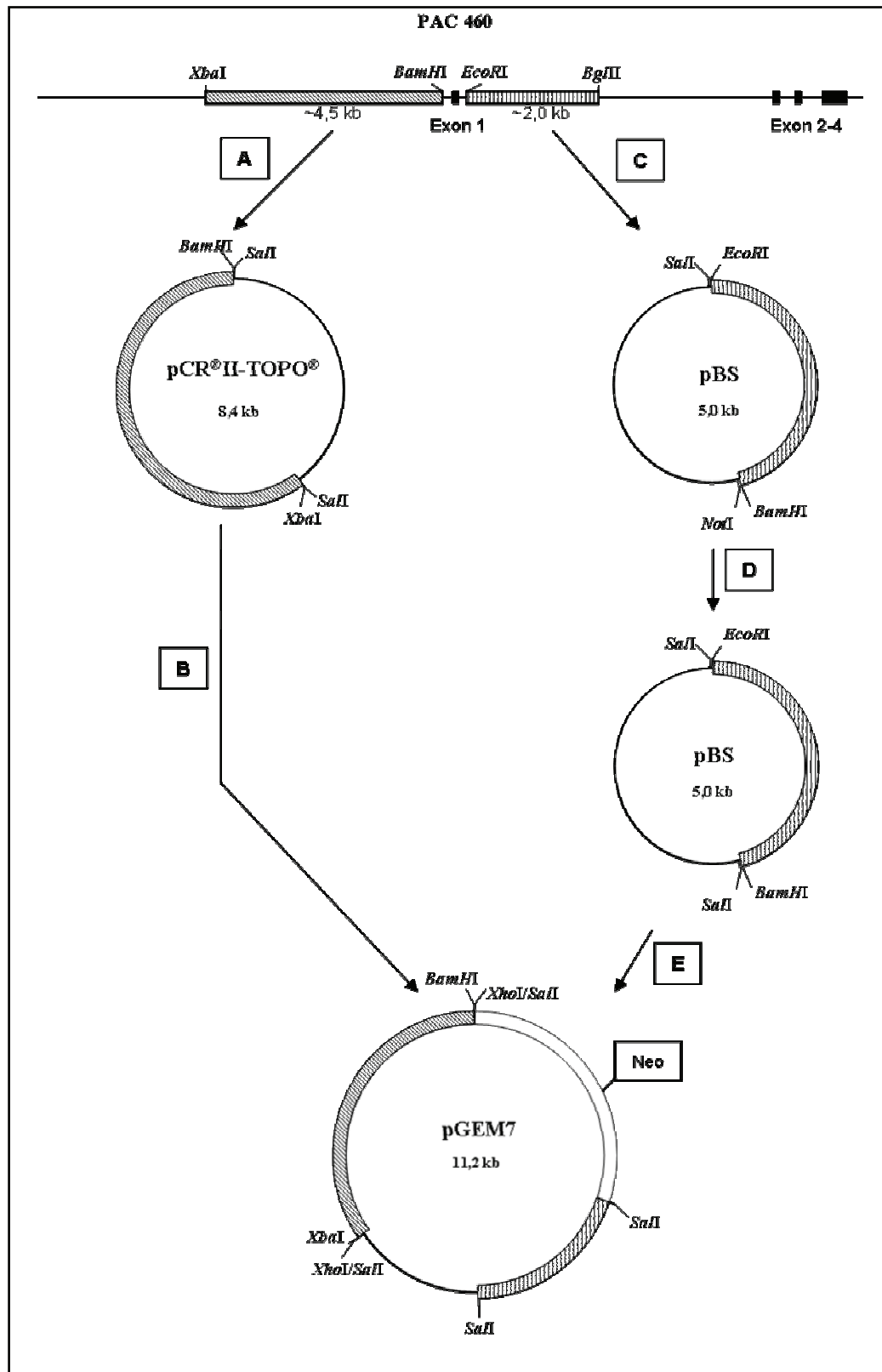


Abbildung 44. Vektor Klonierungsstrategie ausgehend vom murinen MIA2 Gen auf dem Vektor PAC 460 für homologe Rekombination, A) Subklonierung des *XbaI*/*BamHI* Fragments nach PCR in den Vektor pCRII[®]TOPO[®], B) Klonierung des *SalI* Fragmentes aus Vektor pCRII[®]TOPO[®] in den mit *XhoI* linearisierten Endvektor pGEM7, C) Subklonierung des *EcoRI*/*BglII* Fragments in den Vektor pBluescript II SK (pBS, linearisiert mit *EcoRI*/*BamHI*), D) Einfügen einer *SalI* Schnittstelle in die *NotI* Schnittstelle des Vektors pBluescript II SK (pBS), E) Klonierung des *SalI* Fragments aus dem Vektor pBluescript II SK in den Endvektor pGEM7 (linearisiert mit *SalI*).

Das ca. 4,5 kb große *XbaI/BamHI* Fragment im 5'-Bereich von Exon 1 wurde mit den Primern *Xba/Bam* for3343 *SalI* (5'-GTC GAC GCT TCC TTT TGT TCT AGA GCT TTT AG) und rev7893 *SalI* (5'-GTC GAC GAA GGA TTC TTT GAA CAC TGA CTT C) mit integrierter *SalI* Erkennungssequenz amplifiziert.

Durch diese Primer wurde am 5'- und 3'-Ende eine *SalI* Schnittstelle angehängt. Als Template diente der PAC Vektor 460 (*P1 Artificial Chromosome*), ein künstliches Chromosom, das die murine MIA2 Gensequenz enthält. Das aufgereinigte PCR Produkt wurde in den Vektor pCR[®]II-TOPO[®] subkloniert (Abbildung 44 A). Nach einem *SalI* Restriktionsverdau wurde das Insert in den Vektor pGEM7 kloniert. Dieser wurde mit *XhoI* linearisiert und durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert, um eine Re-Ligation zu vermeiden. (Abbildung 44 B).

Das ca. 2,0 kb große *EcoRI/BglII* Fragment im 3'-Bereich von Exon 1 wurde mit den Primern MIA2KO *Eco/Bgl* 7815for (5'-GCC TAA CAT TCT AAC GCT TG) und 10800rev (5'-GAT GTC TTC TGG ACC ATG ACA G) amplifiziert. Das Template war hier ebenfalls der PAC Vektor 460. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* verdaut und in den Vektor pBluescript II SK (linearisiert mit *EcoRI/BamHI*) subkloniert (Abbildung 44 C). Um das *EcoRI/BglII* Fragment über eine *SalI* Schnittstelle in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pGEM7 klonieren zu können, wurde mit einem Oligo (5'-GGC CGT CGA C) eine zusätzliche *SalI* Schnittstelle in die *NotI* Schnittstelle des pBluescript II SK subkloniert (Abbildung 44 D und E).

Für die Etablierung des Screenings embryonaler Stammzellen aus der Maus, musste ein sog. PCR positiv Vektor kloniert werden. Dieser enthält die Neomycin Kasette und einen verlängerten 3'-Bereich des *EcoRI/BglII* Fragmentes. Dies entspricht der *in vivo* Situation (Abbildung 45).

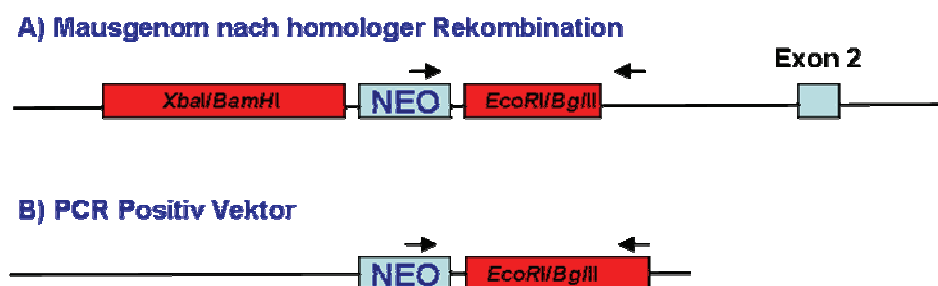


Abbildung 45. Darstellung der Primer-Positionen für das Screening embryonaler muriner Stammzellen im Mausgenom (A) und im PCR Positiv Vektor (B) (forward Primer: →, reverse Primer: ←).

Hierfür wurde ein verlängertes 3'-Fragment mit dem Primerpaar MIA2 PCR pos ctrl for2 (5'-AGT TCG CTT TTC TTA TTC TCT CTT ACA) und MIA2 PCR pos ctrl rev (5'-TTG ACA TTC CAG CAC AGA GC) mit dem PAC Vektor als Template amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den pCR®II-TOPO® Vektor zwischenkloniert und über *Nsi*I in den Vektor pGEM7 integriert.

Der erste Primer für das Screening liegt in der integrierten Neomycin Kasette und der zweite Primer im angrenzenden, unveränderten genomischen Bereich. Durch eine PCR mit dem Primerpaar Neo PolyA down (5'-CGT CTC TTT ACT GAA GGC TCT TT) und Mia2 PCR pos ctrl rev (5'-TTG ACA TTC CAG CAC AGA GC) kann eine korrekte homologe Rekombination nachgewiesen werden.

Mit diesem MIA2 PCR positiv Vektor konnte das Screening für die embryonalen Stammzellen der Maus etabliert werden und in einem Kopienstandard (<http://www.med.umich.edu/tamc/spike.html>) eine einzige Kopie des Transgens nachgewiesen werden (Abbildung 46).

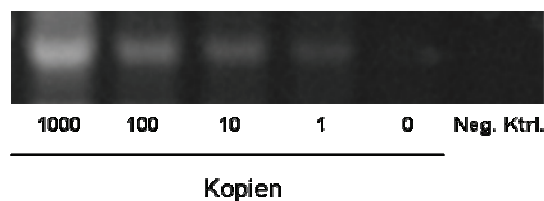


Abbildung 46. PCR Analyse: Kopienstandard (0 bis 1000 Kopien) des MIA2 PCR positiv Vektors zum Nachweis einer korrekten homologen Rekombination im Vergleich zu genomischer muriner DNA (Neg. Ktrl.: Negativ Kontrolle).

4.2.6.2 Grundlagen für den konditionellen Knockdown von MIA2 in der Maus

Als Grundlage für den konditionellen Knockdown von MIA2 in der Maus wurden zunächst von der Firma Qiagen (Hilden) siRNAs bezogen, die dort bioinformatisch gegen MIA2 generiert worden waren. Sie wurden so generiert, dass sie an homologe Sequenzen im Human- und Maussystem binden können.

Die siRNAs sollten nämlich in dem humanen MIA2 überexprimierenden HepG2 Klon 2 (siehe 4.2.2) getestet werden, da sowohl primäre humane als auch murine Hepatozyten mit den üblichen Transfektionsmethoden sehr schlecht zu transfizieren sind und die MIA2 Expression in HCC-Zell-Linien reduziert bzw. völlig verloren ist. Beim Test von vier verschiedenen MIA2 siRNAs zeigte sich, dass die siRNAs die MIA2 Expression deutlich verringern konnten. Dies konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden (Abbildung 47).

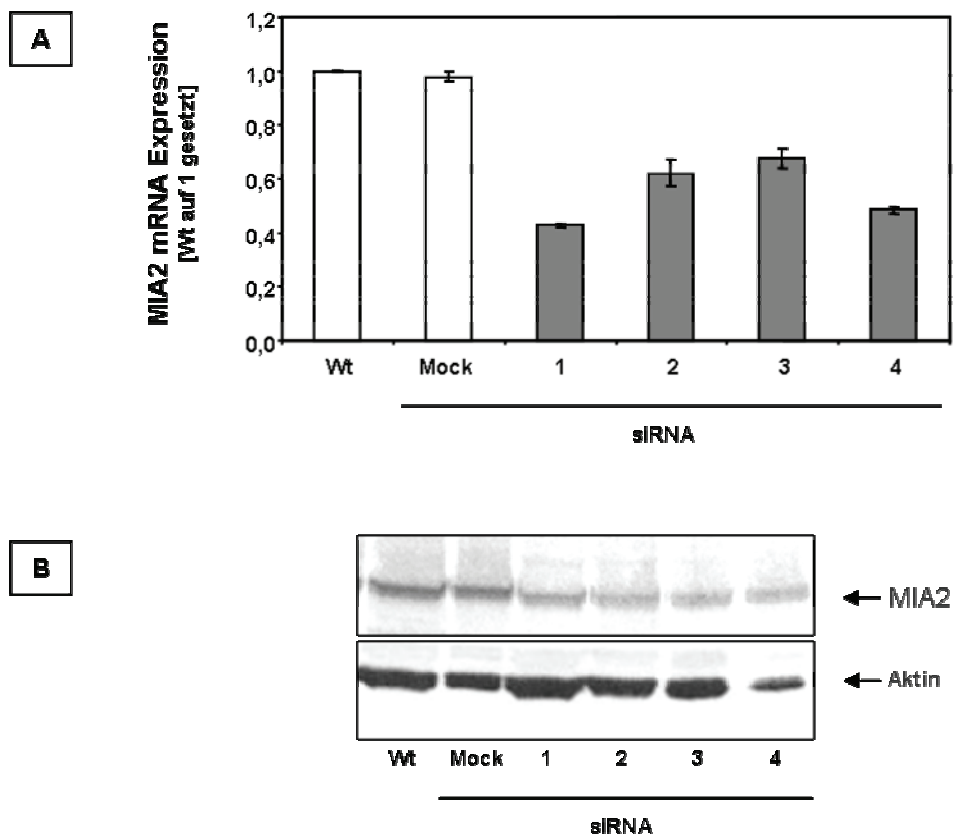


Abbildung 47. MIA2 mRNA (A) und Protein (B) Expression (60 kDa) nach MIA2 siRNA Transfektion (siRNA 1-4) im Vergleich zu Kontroll- (Mock: unspezifische siRNA) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle.

Für die nachfolgende Konstruktion eines shRNA produzierenden Vektors wurde die Sequenz der MIA2 siRNA 1 verwendet.

Funktionalität des inaktiven shRNA produzierenden Vektors pBS/U6-ploxPneo MIA2 si1

Die Generierung des shRNA produzierender Vektors pBS/U6-ploxPneo MIA2 si1 ist ausführlich in Materialien und Methoden (siehe 3.10.14) beschrieben. Die Funktionalität des späteren Transgens wurde durch Kotransfektionsexperimente im Zellkultursystem nachgewiesen. Hierzu wurde der Vektor pBS/U6-ploxPneo MIA2 si1 zusammen mit dem Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmid pIC-Cre transfiziert.

Die Transfektion des MIA2 überexprimierenden HepG2 Klon 3 ergab eine signifikant verringerte MIA2 Expression auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 48).

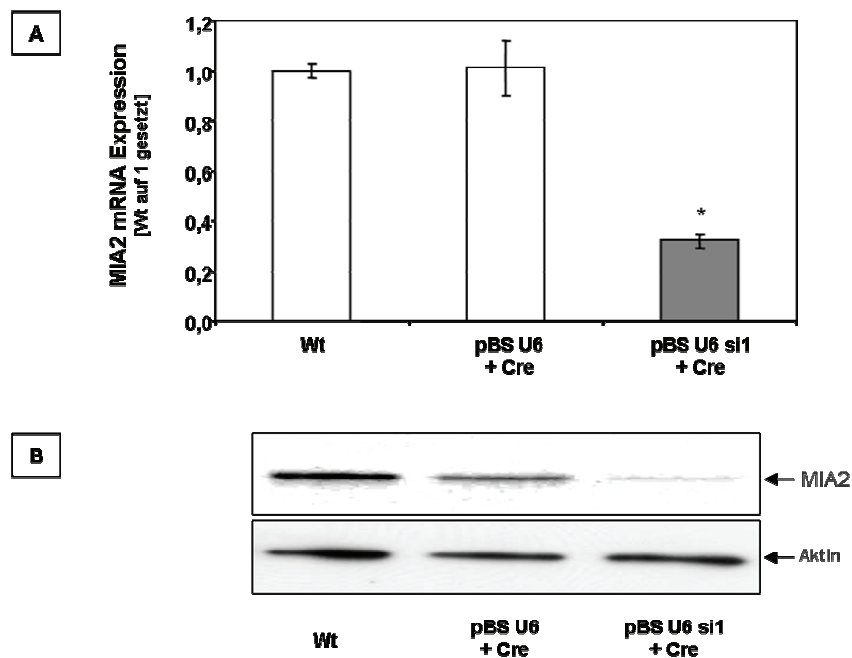


Abbildung 48. MIA2 mRNA (A) und Protein (B) Expression (60 kDa) nach Transfektion mit den Vektoren pBS/U6-ploxPneo MIA2 si1 und pIC-Cre im Vergleich zu Kontroll- (Mock: Leervektor und pIC-Cre) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle, *: $p < 0,05$.

Funktionalität des aktiven shRNA produzierenden Vektors pBS/U6-plox MIA2 si1

Da es sich bei MIA2 um ein leberspezifisches Gen handelt und derzeit kein Anhalt dafür besteht, dass MIA2 in der Embryogenese eine Rolle spielt, wurde auch ein Vektor mit konstitutiv aktiven Promotor generiert. Hierfür wurde der Vektor

pBS/U6-ploxPneo MIA2 si1 in den Cre-Rekombinase exprimierenden *E. coli* Stamm Cre-293 transformiert. Durch die Deletion der Neomycin Kasette konnte nicht nur der konstitutiv aktive Vektor pBS/U6 Δ Neo MIA2 si1 erzeugt werden, sondern auch durch eine zweite Methode die Funktionalität der *loxP sites* gezeigt werden (Abbildung 49).

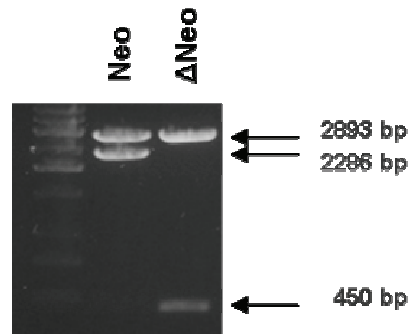


Abbildung 49. Nachweis einer erfolgreichen Cre-medierten Rekombination: Exzision der Transgene mit (Neo, 2286 bp) und ohne (Δ neo, 450 bp) Neomycin Kasette aus pBS/U6 (2893 bp) Vektor durch die Restriktionsenzyme *SacI/KpnI*. Größenstandard: 1 kb Leiter.

Durch Transfektionsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass mit dem konstitutiv aktiven Expressionsplasmid pBS/U6 Δ Neo MIA2 si1 die MIA2 Expression in dem MIA2 exprimierenden HepG2 Klon 3 auf mRNA- und Proteinebene signifikant verringert werden konnte (Abbildung 50).

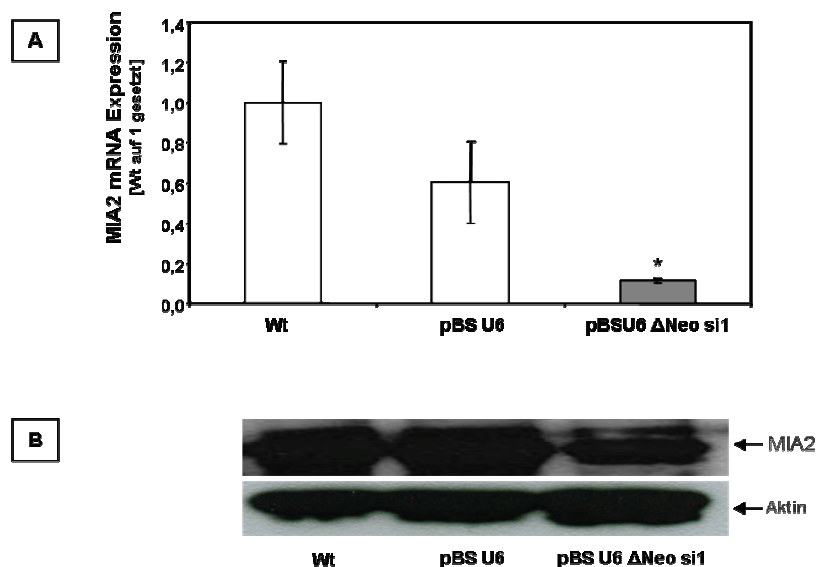


Abbildung 50 MIA2 mRNA (A) und Protein (B) Expression (60 kDa) nach Transfektion mit dem Vektor pBS/U6 Δ neo MIA2 si1 im Vergleich zu Kontroll- (Mock: Leervektor) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle, *: $p < 0,05$.

Für die Generierung der transgenen Mäuse soll die pronukleäre Injektion dieser transgenen Konstrukte in Kooperation mit Herrn Dr. Thilo Spruss (Leiter der Zentralen Tierlaboratorien, Universität Regensburg) durchgeführt werden.

Als wichtige Voraussetzung, um eine Integration der Transgene zu überprüfen, wurde neben dem bereits publizierten Primerpaar für die Detektion des Neomycin Gens (167) auch ein Screening-Test für das Transgen ohne Neomycin Kassette (Δ Neo MIA2 si1) etabliert. Mit dem Primerpaar Del1 (5'-CGC ACA GAC TTG TGG GAG AA) und Del2 (5'-CAC AAT TAC TTT ACA GTT AG) kann in einem Kopienstandard (<http://www.med.umich.edu/tamc/spike.html>) eine einzige Kopie des Transgen nachgewiesen werden (Abbildung 51).

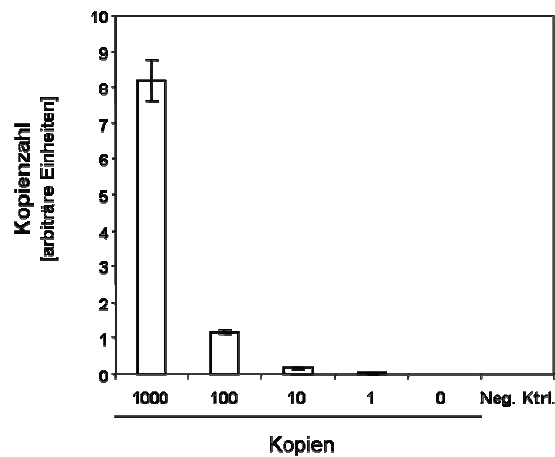


Abbildung 51. Quantitative real time PCR: Kopienstandard des Transgens Δ Neo MIA2 si1 im Vergleich zu genomischer muriner DNA (Negativ Kontrolle: Neg. Ktrl.).

4.3 FGFR2-IIIb im hepatozellulären Karzinom

4.3.1 FGFR2-IIIb Expression im HCC *in vitro* und *in vivo*

Zuerst wurde die FGFR2-IIIb Expression von vier verschiedenen HCC-Zell-Linien im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten (PHH) von drei verschiedenen Spendern mittels quantitativer PCR untersucht. Interessanterweise war die FGFR2-IIIb Expression im Gegensatz zu den PHH drei Zell-Linien komplett verloren bzw. stark vermindert. Nur Hep3B Zellen zeigten eine ähnlich starke FGFR2-IIIb Expression wie PHH (Abbildung 52).

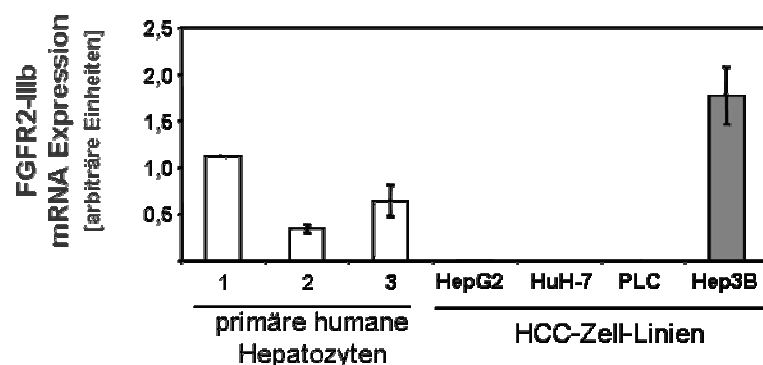


Abbildung 52. FGFR2-IIIb mRNA Expression in PHH (primäre humane Hepatozyten) und vier HCC-Zell-Linien (HepG2, HuH-7, PLC, Hep3B).

Die FGFR2-IIIb Expression *in vivo* wurde zunächst in gepaarten Gewebeproben aus zwei murinen HCC-Modellen (168) analysiert. HCC-Gewebe, die aus c-myc- und IgEGF-transgenen Tieren isoliert wurden, zeigten entweder einen kompletten Verlust oder eine signifikant verringerte FGFR2-IIIb mRNA Expression im Vergleich zum umgebenden nicht-neoplastischen hepatischen Gewebe (Abbildung 53).

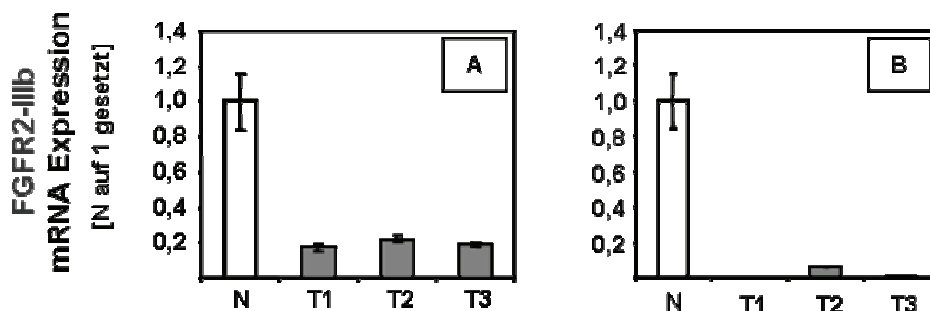


Abbildung 53. FGFR2-IIIb mRNA Expression in murinen c-myc- (A) und IgEGF- (B) HCC-Modellen, nicht-tumoröses Gewebe (N) im Vergleich zu Tumorgewebe (T1-3).

Als nächstes wurden 15 gepaarte humane Proben von HCC-Patienten untersucht. Von jedem Patienten wurde RNA sowohl aus dem karzinomatösen als auch aus dem umgebenden nicht-tumorösen Gewebe isoliert und die FGFR2-IIIb mRNA Expression durch quantitative RT-PCR gemessen (Abbildung 54). In zwölf HCC-Proben war die FGFR2-IIIb Expression im Vergleich zum entsprechenden nicht-tumorösen Gewebe signifikant verringert (gesunde Leber auf 1,0 gesetzt vs. HCC: durchschnittliche Abweichung $0,65\% \pm 0,13\%$; $p < 0,0001$) und in sechs Proben überhaupt nicht mehr zu detektieren. In zwei Patienten (#10 und #11) war die FGFR2-IIIb Expression im Vergleich zum nicht-tumorösen Gewebe nicht signifikant verändert. Nur in zwei HCC-Proben (#2 und #6) konnten erhöhte FGFR2-IIIb Expressionslevel im Vergleich zum entsprechenden nicht-tumorösen Gewebe nachgewiesen werden.

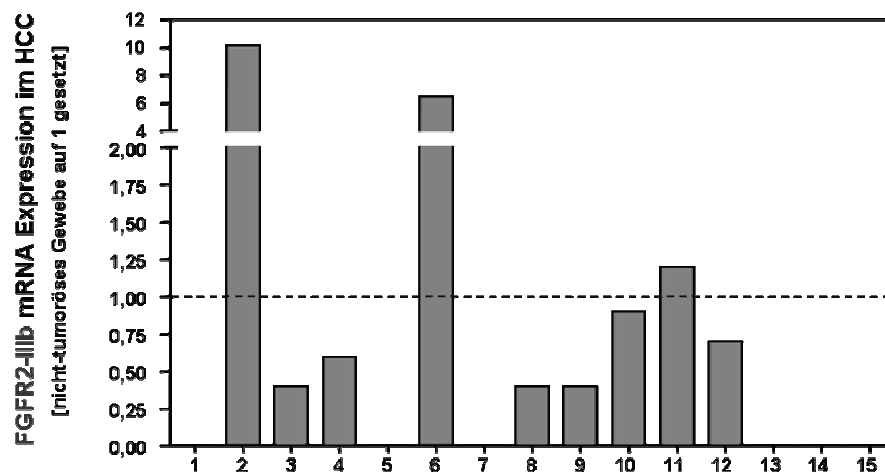


Abbildung 54. FGFR2-IIIb mRNA Expression in 15 humanen HCC-Geweben in Korrelation zu korrespondierendem nicht-tumorösem Lebergewebe, Patientencodes: #1-15. Gestrichelte Linie bei 1 entspricht keinem Unterschied.

4.3.2 FGFR2-IIIb Expression *in situ* in humanem HCC-Gewebe

Um im HCC die FGFR2-IIIb Expression *in situ* bestimmen zu können, wurden die HCC-Gewebe von fünf Patienten immunhistochemisch untersucht. Hierfür wurde ein neu generierter polyklonaler Antikörper benutzt, der spezifisch die IIIb-Spleißvariante des FGFR2 Rezeptors erkennt.

Eine representative immunhistochemische Färbung ist in (Abbildung 55) gezeigt. Die Immunhistochemie zeigt eine starke Färbung der Hepatozyten im nicht-tumorösen hepatischen Gewebe. Im Gegensatz dazu war das FGFR2-IIIb Signal im HCC stark vermindert oder nicht detektierbar.

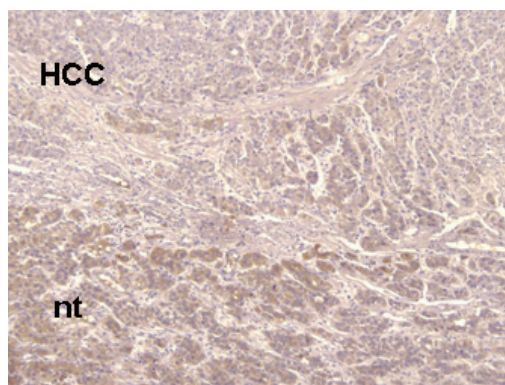


Abbildung 55. Representative immunhistochemische Färbung: FGFR2-IIIb im HCC- und benachbarten nicht-tumorösen (nt) Gewebe.

Um die FGFR2-IIIb Expression im HCC in einer größeren Fallzahl untersuchen zu können, wurde ein Tissue-Microarray (TMA) mit 85 HCC- und korrespondierenden nicht-tumorösen Geweben der gleichen Patienten (n=81) immunhistochemisch analysiert.

Die Untersuchung der FGFR2-IIIb Proteinexpression war in allen HCC und nicht tumorösen Geweben aussagekräftig. In 35,3% (30/85) der HCC-Gewebe war kein FGFR2-IIIb Immunsignal zu detektieren. Im Gegensatz dazu konnte eine FGFR2-IIIb Proteinexpression (1+ oder 2+) in allen nicht-tumorösen Geweben gefunden werden. In 59,3% (48/81) der Fälle war das FGFR2-IIIb Signal im HCC geringer als im korrespondierenden nicht-tumorösen Lebergewebe. Abbildung 56 fasst die immunhistochemischen Ergebnisse des TMA für die HCC- und die umgebenden nicht-karzinomatösen Lebergewebe zusammen.

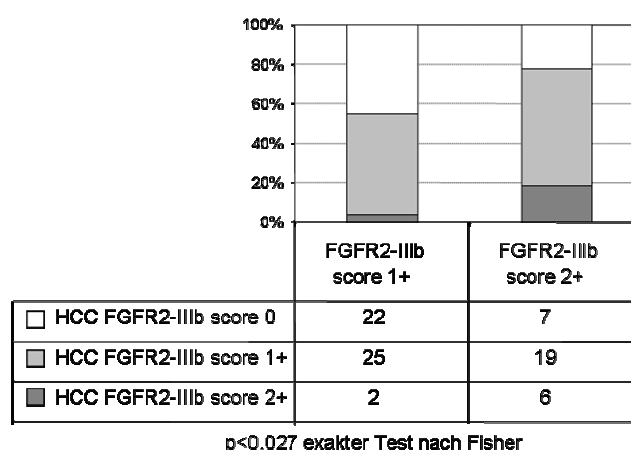


Abbildung 56. Immunhistochemische FGFR2-IIIb Analyse: HCC- und korrespondierendes nicht-tumoröses Lebergewebe mittels eines semiquantitativen Dreipunkte-System (negativ: 0, schwach: 1+ und stark: 2+).

Im HCC war die FGFR2-IIIb Expression im Vergleich zum nicht-neoplastischen Gewebe signifikant vermindert.

Für eine deskriptive Datenanalyse wurden alle relevanten Variablen der klinisch-pathologischen Charakteristika in Bezug auf die FGFR2-IIIb Immunhistochemie verglichen (Tabelle 7).

				FGFR2-IIIb Immunreaktivität			
Variable	Kategorie	n	%	negativ	score 1+	score 2+	p*
Alter bei Diagnose							
	<60 Jahre	39	45,9	17	19	3	0,337
	≥60 Jahre	46	54,1	13	28	5	
Geschlecht							
	weiblich	16	18,8	8	8	0	0,244
	männlich	69	81,2	22	39	8	
Tumor-Staging							
	pT1	13	15,3	1	10	2	0,009
	pT2	25	29,4	5	16	4	
	pT3	41	48,2	19	20	2	
	pT4	3	3,5	3	0	0	
	unbekannt	3	3,5	2	1	0	
Tumor-Grading							
	G1	29	34,1	12	14	3	0,487
	G2	48	56,5	17	26	5	
	G3	8	9,4	1	7	0	
Ätiologie							
	HBV	9	10,6	5	3	1	0,744
	HCV	7	8,2	2	4	1	
	Alkohol	34	40,0	13	17	4	
	andere	3	3,5	1	2	0	
	unbekannt	32	37,6	9	21	2	
Tumorgroße							
	≤ 5 cm	36	42,4	14	19	3	0,570
	> 5 cm	30	35,3	9	16	5	
	unbekannt	19	22,4	7	12	0	
Ki-67 Proliferationsrate (MiB1-Index)							
	≤ 5%	40	47,1	5	29	6	<0,0001
	> 5%	45	52,9	25	18	2	

Tabelle 7. FGFR2-IIIb Immunreaktion im Verhältnis zu klinisch-pathologischen Charakteristika und Ki-67 Proliferationsrate (MiB1), hervorgehobene p-Werte entsprechen $p < 0,05$; exakter Test nach Fisher.

Der Verlust der FGFR2-IIIb Expression war signifikant mit einem höheren Tumor-Staging ($p=0,009$) assoziiert. Außerdem zeigten FGFR2-IIIb negative HCC-Gewebe im Vergleich zu FGFR2-IIIb positiven Tumoren eine signifikant höhere Proliferationsrate (MiB1 Index: $p<0,0004$, Abbildung 57). Es wurde keine Korrelation zwischen FGFR2-IIIb Expression und Alter, Geschlecht, histologischen Grad, Tumorgroße sowie Ätiologie gefunden.

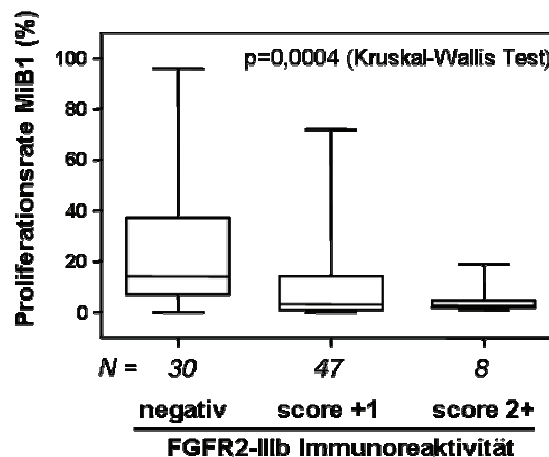


Abbildung 57. Proliferationsrate (immunhistochemischer MiB1 Index) in HCC-Geweben mit negativer, schwacher (score 1+) und starker (score 2+) FGFR2-IIIb Immunoreaktivität.

4.3.3 Molekulare Mechanismen der verminderten FGFR2-IIIb Expression im HCC

Es wurde gezeigt, dass eine verminderte FGFR2-IIIb Expression oftmals mit einer erhöhten BEK (FGFR2-IIIc) Expression assoziiert ist (169; 170). Um zu analysieren, ob eine Verminderung der FGFR2-IIIb mRNA im HCC mit einer Erhöhung der FGFR2-IIIc mRNA einhergeht, wurde die Expression dieser Spleißvariante in den HCC-Zell-Linien mittels PCR untersucht. Es zeigte sich das gleiche Expressionsmuster wie bei der IIIb-Variante. Weder in den PHH noch in den HCC-Zell-Linien konnte FGFR2-IIIc nachgewiesen werden (Abbildung 58). Dies verdeutlicht, dass die verminderte FGFR2-IIIb mRNA Expression nicht mit einer Erhöhung der FGFR2-IIIc mRNA assoziiert ist.

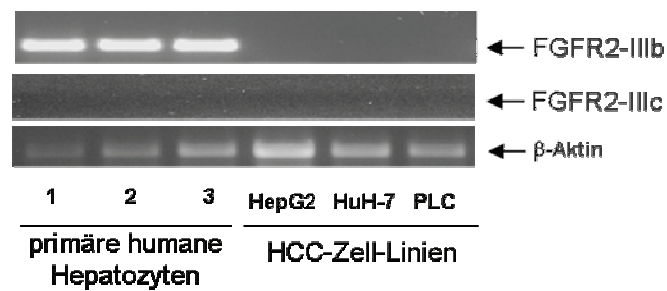


Abbildung 58. RT-PCR Analyse: FGFR2-IIIb (210 bp) und -IIIc in PHH (primäre humane Hepatozyten) und HCC-Zell-Linien (HepG2, HuH-7 und PLC), β-Aktin (380 bp) diente als Kontrolle.

Bei der Charakterisierung der 5'-Region des FGFR2 Genes wurde eine CpG Insel im Promotorbereich gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hypermethylierung dieser normal unmethylierten CpG Insel mit einem Verlust der Transkription bei einigen Blasenkarzinom-Zell-Linien und -Geweben korreliert (171). Darum wurde kontrolliert, ob Promotormethylierung auch die Ursache für die verminderte FGFR2-IIIb Expression im HCC darstellt. Die HCC-Zellen wurden mit dem Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) behandelt. Die FGFR2-IIIb mRNA Expression konnte durch 5-Aza-dC nicht beeinflusst werden (Abbildung 59 zeigt exemplarisch das Ergebnis bei HepG2 Zellen). Die Behandlung konnte aber deutlich die Expression der Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP) in HCC-Zellen reaktivieren (Abbildung 59 zeigt exemplarisch das Ergebnis bei PLC Zellen). Dieses Gen wird negativ durch Promotormethylierung reguliert, wie vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (172).

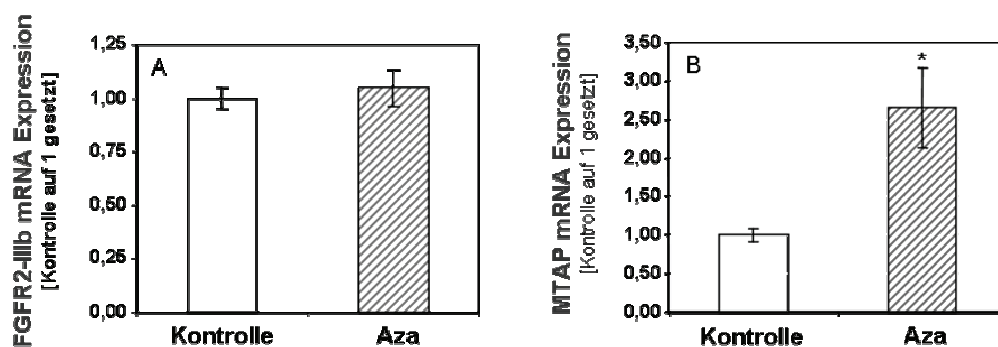


Abbildung 59. FGFR2-IIIb (A) und MTAP (B) mRNA Expression in PLC Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung (Aza) und unbehandelt (Kontrolle), *: $p < 0,05$.

Zusätzlich wurde eine methylierungs-spezifische PCR durchgeführt, um den Methylierungsstatus der CpG Insel in der 5'-Promotorregion des FGFR2 Genes zu bestimmen (173). Einem Doppelverdau mit dem CpG Insel flankierenden Restriktionsenzym *Afl*III und den methylierungs-sensitiven Enzymen *Sma*I, *Hpa*II sowie *Eag*I folgte eine Amplifikation der Promotorregion inklusive CpG Insel mittels PCR. PHH und PLC Zellen waren unmethyliert in dieser Promotorregion. In HepG2 und HuH-7 Zellen konnte jedoch kein PCR Produkt amplifiziert werden (Abbildung 60).

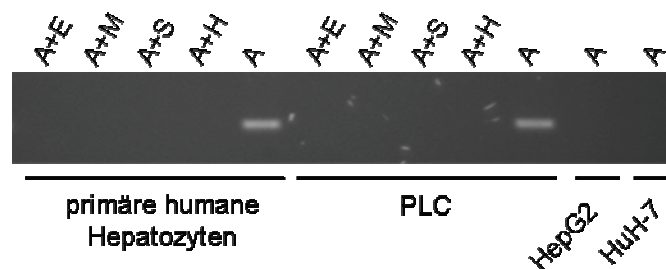


Abbildung 60. Methylierungs-sensitive PCR Analyse (Fragment: 280 bp) der CpG Insel in der 5'-Region des FGFR2-Genes von primären humanen Hepatozyten und den HCC-Zell-Linien PLC, HepG2 und HuH7: *Afl*III (A) verdaute DNA als Kontrolle (Schnittstelle außerhalb der CpG Insel), *Afl*III und *Msp*I (A+M) als negativ Kontrolle (Schnittstelle innerhalb der CpG Insel, methylierungs-insensitiv) und *Afl*III in Kombination *Sma*I (A+S), *Hpa*II (A+H) oder *Eco*VI (A+E) (methylierungs-sensitiv).

Methylierungs-unabhängig konnte in diesen Zellen auch ein Fragment im Exon 8 des FGFR2 Genes nicht amplifiziert werden, während eine PCR Analyse in PHH und PLC Zellen ein Fragment der erwarteten Größe zeigte (Abbildung 61).



Abbildung 61. PCR-Analyse: FGFR2 Exon 8 (Fragment: 344 bp) in primären humanen Hepatozyten von drei unterschiedlichen Spendern und HCC-Zell-Linien (HepG2, HuH-7 und PLC).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass häufig beschriebene genomische Veränderungen in der chromosomalen Region des FGFR2 Genes (10q) für den Verlust der FGFR2 Expression in einer Teilmenge von HCC-Geweben verantwortlich sind (174; 175). Im Gegensatz dazu weisen die Daten nicht auf eine negative Regulation der FGFR2-IIIb Expression durch alternatives Splicing oder Promotormethylierung hin.

4.3.4 Re-Expression von FGFR2-IIIb in HCC-Zellen

Um die funktionelle Rolle der verminderten FGFR2-IIIb Expression im HCC untersuchen zu können, wurde der Rezeptor in der HCC-Zell-Linie HepG2 durch stabile Transfektion mit dem Expressionsvektor pSV7d FGFR2-IIIb re-induziert (Klone 1, 2 und 3). Dieser Vektor enthält die komplette FGFR2-IIIb cDNA Sequenz unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV)-Promotors. Der Vektor ohne Insert wurde als Kontrolle benutzt (Mock). Durch eine quantitative RT-PCR konnte eine starke Induktion der FGFR2-IIIb mRNA Expression in den Zellklonen nachgewiesen werden. In den Kontroll-transfizierten Zellen konnte dagegen keine Veränderung der FGFR2-IIIb Expression beobachtet werden (Abbildung 62).

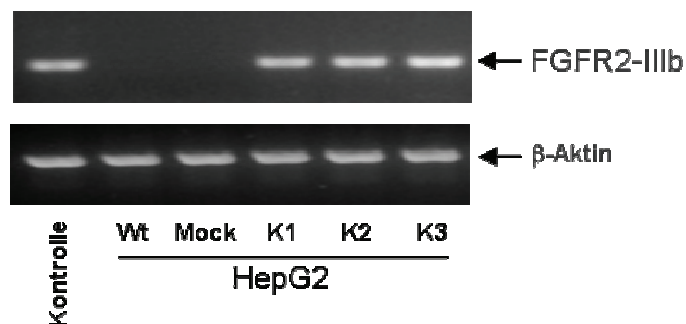


Abbildung 62. FGFR2-IIIb mRNA Expression (210 bp): Zellklone (K1-3) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, PHH (primäre humane Hepatozyten) dienten als Positivkontrolle (Kontrolle). β-Aktin diente als Ladekontrolle (380 bp).

Die Re-Expression in den Zellklonen konnte durch eine Westernblot Analyse auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 63).

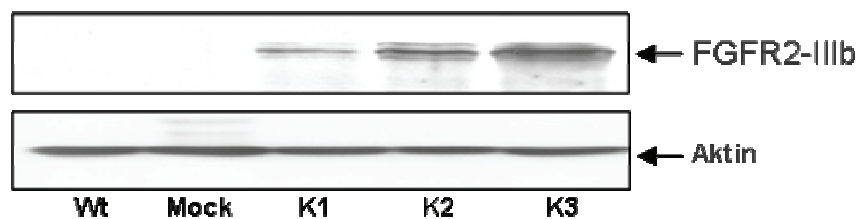


Abbildung 63. FGFR2-IIIb Protein Expression (110 kDa): Zellklone (K1-3) im Vergleich zu den Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle.

Die stabil FGFR2-IIIb exprimierenden Zellen waren in ihrer Morphologie den Kontroll- und nicht-transfizierten Zellen ähnlich.

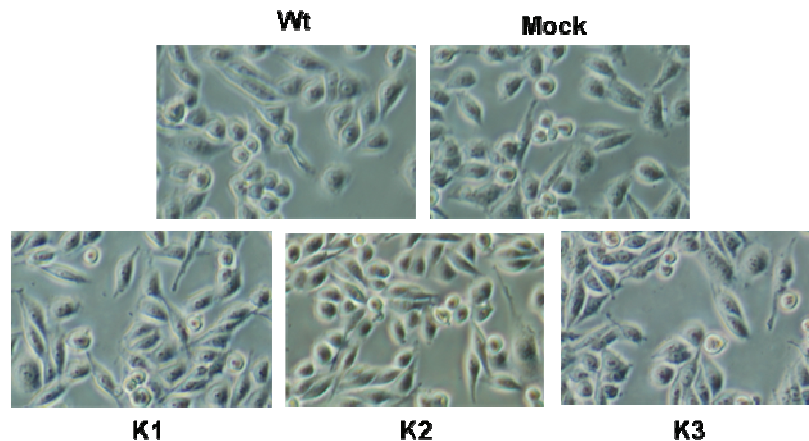


Abbildung 64. Morphologie der FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen im Vergleich zu den Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten Zellen (Vergrößerung: 400x).

4.3.5 Funktionelle Veränderungen in FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen *in vitro*

Um die Rolle des FGFR2-IIIb im HCC näher charakterisieren zu können, wurden funktionelle *in vitro* Untersuchungen mit den FGFR2-IIIb exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen und der parentalen Zelllinie durchgeführt.

Die Proliferation war in FGFR2-IIIb re-exprimierenden Zellklonen signifikant vermindert (Abbildung 65).

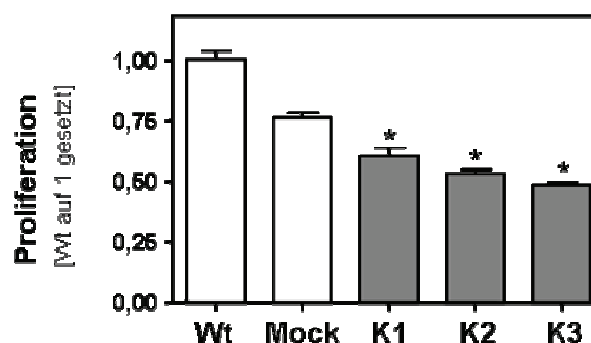


Abbildung 65. Analyse der Proliferation: FGFR2-IIIb Zellklone (K1-3) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen, *: $p < 0,05$.

Um festzustellen, ob FGFR2-IIIb das Adhäsions-unabhängige Wachstum von HCC-Zellen moduliert, wurde die Kolonie Bildung der Zellen in einem Soft Agar

analysiert. Die FGFR2-IIIb Zellklone zeigten eine im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant verringerte Koloniebildung (Abbildung 67).

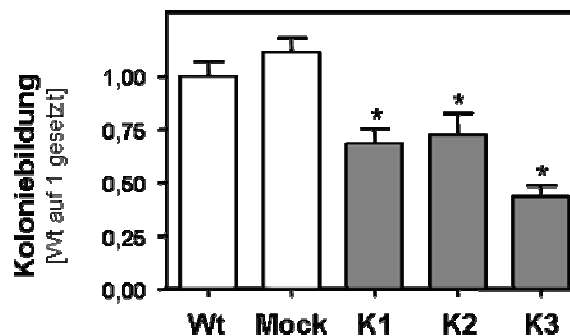


Abbildung 66. Analyse des Adhäsions-unabhängigen Wachstums: Anzahl der Kolonien die FGFR2-IIIb Zellklone (K1-3) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen in Soft Agar ausbildeten, *: $p < 0,05$.

Zusätzlich zur Proliferation wird das Tumorwachstum durch Apoptose bestimmt. Um zu eruieren, ob die FGFR2-IIIb Expression auch die Apoptose beeinflusst, wurde ein *in vitro* Modell für Lipoapoptose angewendet (176).

Die Behandlung mit der freien Fettsäure Palmitat (0,1 mM; 24 h) induzierte im gleichen Ausmaß in den nicht-transfizierten ($25,0 \pm 4,2\%$) und Kontroll-transfizierten HCC-Zellen ($21,9 \pm 2,4\%$) Apoptose. Im Gegensatz dazu wiesen die FGFR2-IIIb exprimierenden Klone eine signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen auf (Klon 1: $35,4 \pm 1,5\%$, Klon 2: $41,2 \pm 1,1\%$ und Klon 3 $51,2 \pm 0,4\%$; $p < 0,05$ im Vergleich zu nicht-transfizierten und Kontroll-transfizierten Kontrollen, Abbildung 67).

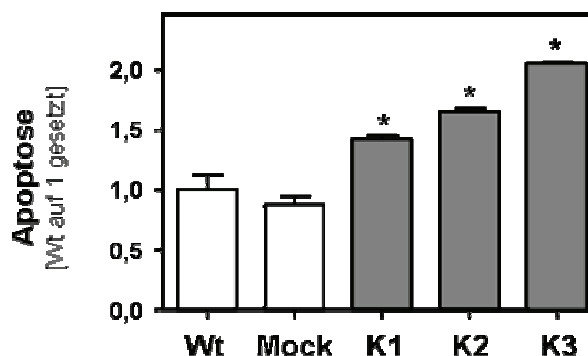


Abbildung 67. Funktionelle Analyse der Apoptose: FGFR2-IIIb Zellklone (K1-3) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen in einem Lipoapoptosemodell (siehe S. 63), *: $p < 0,05$.

Als nächstes wurde das migratorische Potential der HCC-Zellen *in vitro* untersucht. Boydenkammer-Analysen zeigten bei den FGFR2-IIIb Klonen ein signifikant vermindertes migratorisches Potential im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 68).

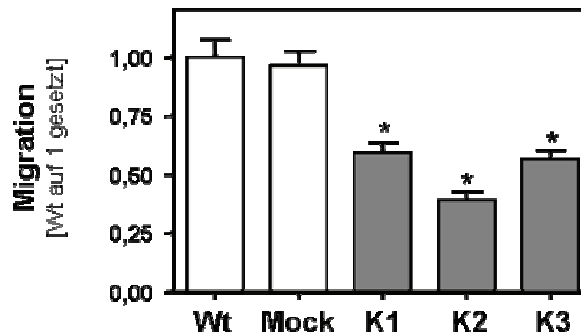


Abbildung 68. Analyse des migratorischen Potentials: FGFR2-IIIb Zellklone (K1-3) im Vergleich zu Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierten (Wt) Zellen in einer Boydenkammer-Analyse, *: $p < 0,05$.

Diese Daten verdeutlichen, dass eine erneute FGFR2-IIIb Expression in HCC-Zellen die Tumorigenität *in vitro* inhibiert.

4.3.6 Der Effekt von KGF und einem Inhibitor der Tyrosinkinase Aktivität auf die Tumorigenität der FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen

KGF (FGF7) bindet spezifisch an den FGFR2-IIIb Rezeptor. Vor kurzem konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass KGF *de novo* bei chronischen Lebererkrankungen exprimiert wird (177). Daher wurde der Effekt von KGF auf die FGFR2-IIIb re-exprimierenden sowie Kontroll- und nicht-transfizierten HCC-Zellen getestet. Wie erwartet, blieb ein Effekt auf die Proliferation der Kontroll-transfizierten und nicht-transfizierten HCC-Zellen aus, da diese Zellen keinen FGFR2-IIIb Rezeptor exprimieren. Allerdings konnte auch in den FGFR2-IIIb re-exprimierenden Zellklonen die Verdopplungszeit nicht beeinflusst werden (Abbildung 69).

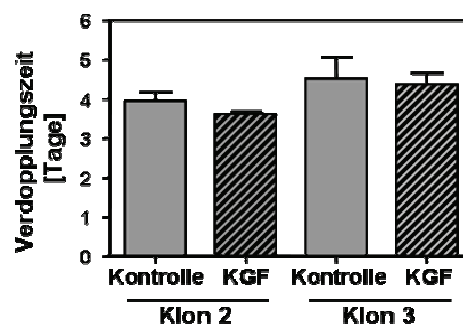


Abbildung 69. Analyse der Proliferation: Stimulation der FGFR2-IIIb Zellklone (K2 und K3) mit KGF (20 ng/ml) und unstimuliert (Kontrolle).

Auch in anderen Tumoren konnte bereits gezeigt werden, dass eine Tyrosin-Phosphorylierung des FGFR2-IIIb für die Wachstumsinhibition von Tumorzellen nicht notwendig ist (178). Um zu analysieren, ob dies im HCC auch der Fall ist, wurde die wachstumsinhibitorische Aktivität der FGFR2-IIIb exprimierenden Zellklone zusammen mit einem Inhibitor der Tyrosinkinase Aktivität evaluiert. SU5402 (Calbiochem, Darmstadt) ist ein ATP Analogon, das die Phosphorylierung von FGFR1 und FGFR2 durch Blockierung der ATP-Bindestelle inhibiert. Wie basierend auf der deutlichen Sequenz- und Strukturähnlichkeit der katalytischen Domäne der FGFRs zu vermuten und durch eine Arbeit von Bernard-Pierrot et al. auch bestätigt (179), inhibiert SU5402 auch die FGFR2-IIIb Phosphorylierung. Allerdings konnte die durch FGFR2-IIIb Expression induzierte Inhibition der Proliferation im HCC durch SU5402 nicht aufgehoben werden (Abbildung 70).

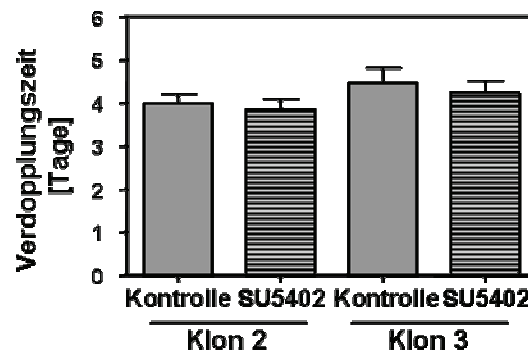


Abbildung 70. Analyse der Proliferation: Stimulation der FGFR2-IIIb Zellklone (Klon 2 und 3) mit SU5402 (30 μ M) und unstimuliert (Kontrolle).

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die wachstumsinhibitorischen Eigenschaften von FGFR2-IIIb im HCC unabhängig von der Kinase Aktivität dieses Rezeptors sind.

4.3.7 Tumorigenität der FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen *in vivo*

Um den Effekt von FGFR2-IIIb auf das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen, wurden die Zellklone subkutan in Nacktmäuse injiziert. Zwischen dem Tag 7 und Tag 21 entwickelten alle Tiere (10/Gruppe) Tumoren. Die Tumoren aus FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen waren aber signifikant kleiner als die Tumoren der Mock und Wildtyp Gruppe. Abbildung 71 zeigt vergleichend die Tumorgrößen 21 Tage nach Implantation der Zellen.

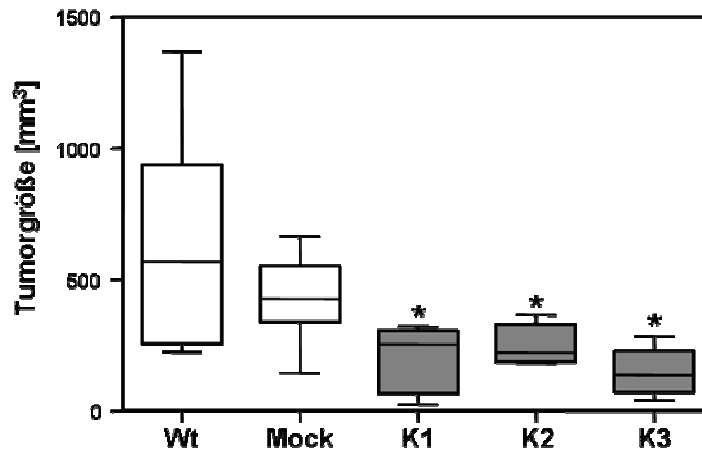


Abbildung 71. Tumorgröße 21 Tage nach subkutaner Injektion von 1×10^6 FGFR2-IIIb Zellklonen (K1-3), Kontroll- (Mock) und nicht-transfizierter Zellen (Wt) in Nacktmäuse ($n=10$ /Gruppe; *: $p<0,05$ im Vergleich zu Wt und Mock).

Eine Analyse der Apoptose mittels TUNEL-Färbung zeigte kaum apoptotische Zellen in den Tumoren der Kontrollgruppen, aber große Areale apoptotischer Zellen in den Tumoren aus FGFR2-IIIb re-exprimierenden HCC-Zellen (Abbildung 72).

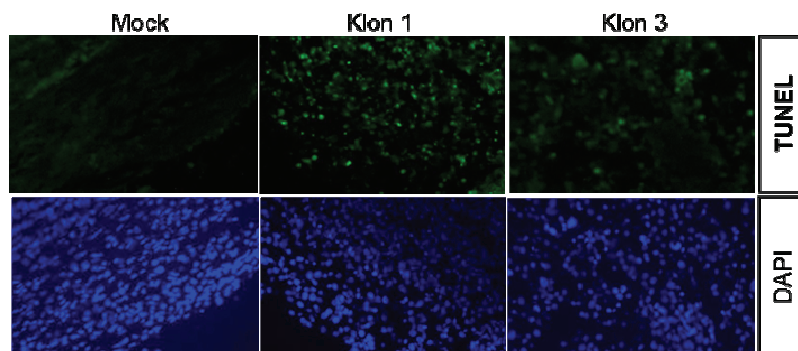


Abbildung 72. Representative Bilder: Analyse der apoptotischen Zellen (TUNEL: grün) in Nacktmaustumoren (Mock, Klon 1 und 3) und Zellkernfärbung im gleichen Schnitt (DAPI: blau).

Zusammenfassend und in Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten weisen die *in vivo* Daten aus dem Nacktmausexperiment darauf hin, dass eine Reduktion der FGFR2-IIIb Expression in HCC-Zellen die Tumorigenität von HCC-Zellen induziert.

4.4 GLUT1 im hepatozellulären Karzinom

4.4.1 GLUT1 Expression im HCC

Zuerst wurde die GLUT1 Expression in drei verschiedenen HCC-Zell-Linien (Hep3B, HepG2 und PLC) und in primären humanen Hepatozyten von drei verschiedenen Spendern mittels quantitativer real time PCR analysiert. In allen drei HCC-Zell-Linien konnte eine signifikant erhöhte GLUT1 mRNA Expression im Vergleich zu den PHH beobachtet werden (Abbildung 73).

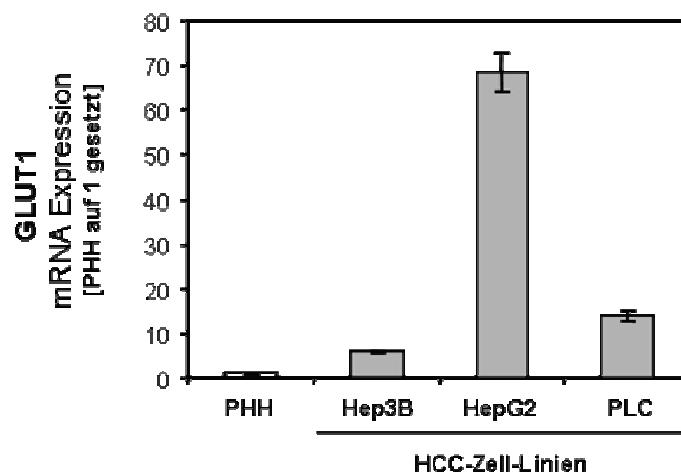


Abbildung 73 GLUT1 mRNA Expression in PHH (primäre humane Hepatozyten) und drei HCC-Zell-Linien (Hep3B, HepG2 und PLC).

Durch eine Westernblot Analyse konnte auf Proteinebene bestätigt werden, dass GLUT1 nur in HCC-Zell-Linien exprimiert wird (Abbildung 74).

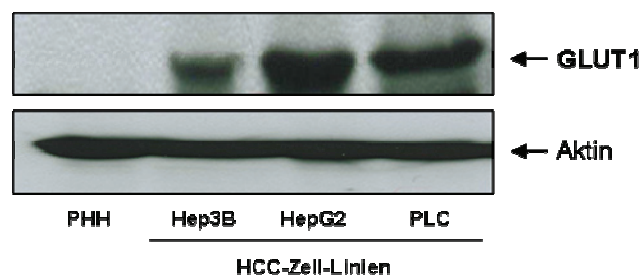


Abbildung 74. GLUT1 Protein Expression (50 kDa): PHH (primäre humane Hepatozyten) im Vergleich zu drei HCC-Zell-Linien (Hep3B, HepG2 und PLC), Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle.

Als nächstes wurden 22 humane Proben von HCC-Patienten untersucht. Von jedem Patienten wurde RNA sowohl aus dem karzinomatösen als auch aus dem

umgebenden nicht-tumorösen Gewebe isoliert und die GLUT1 mRNA Expression durch quantitative real time PCR gemessen (Abbildung 75).

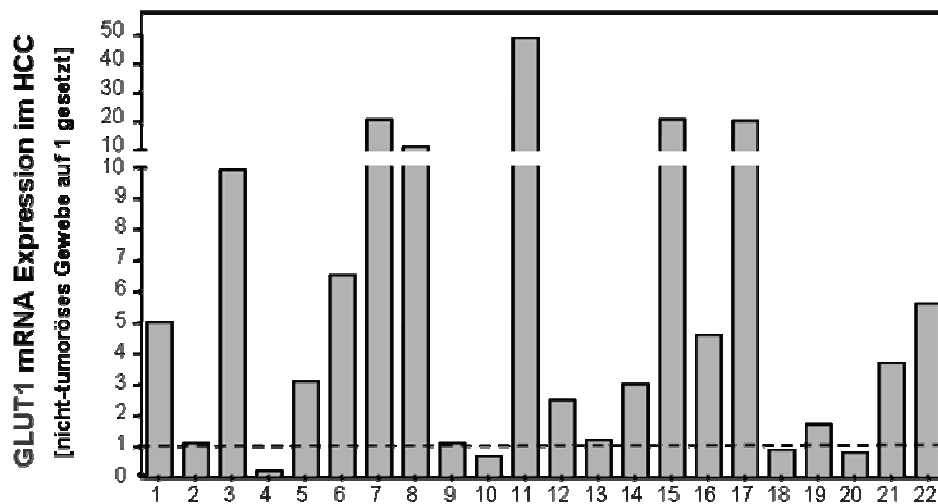


Abbildung 75. GLUT1 mRNA Expression in 22 humanen HCC-Geweben in Korrelation zu korrespondierendem nicht-tumorösem Lebergewebe, Patientencodes: #1-22. Gestrichelte Linie bei 1 entspricht keinem Unterschied.

In 14 HCC-Proben war die GLUT1 Expression im Vergleich zum entsprechenden nicht-tumorösen Gewebe signifikant erhöht. Bei sechs Patienten (#2, #9, #13, und #18-20) gab es keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die GLUT1 Expression zwischen HCC- und nicht-tumorösen Gewebe und in nur zwei Patienten (#4 und #10) war die GLUT1 Expression im Vergleich zum nicht-tumorösen Gewebe vermindert.

Um die GLUT1 Expression im HCC *in situ* in einer größeren Fallzahl untersuchen zu können, wurde ein Tissue-Microarray (TMA) mit 85 HCC- und korrespondierenden nicht-tumorösen Geweben der gleichen Patienten (n=81) immunhistochemisch analysiert. Die Untersuchung der GLUT1 Proteinexpression war in allen HCC- und nicht-tumorösen Geweben aussagekräftig. Eine repräsentative immunhistologische Färbung einer GLUT1 positiven und GLUT1 negativen HCC-Gewebeprobe ist in Abbildung 76 gezeigt.

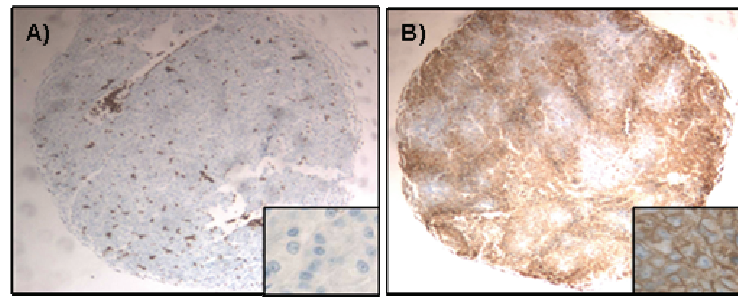


Abbildung 76 Repräsentatives Beispiel eines nicht-tumorösen Lebergewebe mit negativer GLUT1 Immunoreaktivität (A) und korrespondierendem HCC-Gewebe mit starker GLUT1 Expression (B).

In 14,1% (12/85) der HCC-Gewebe war GLUT1 immunhistochemisch nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde keine GLUT1 Proteinexpression im nicht-tumorösen Gewebeproben nachgewiesen, was einen signifikanten Unterschied ($p=0,0003$) in Bezug auf die GLUT1 Expression im HCC- und nicht-tumorösen Lebergewebe aufzeigt.

Korrespondierende Daten der mRNA- und semiquantitativen Proteinexpression auf dem TMA waren von 20 HCC-Patienten verfügbar. Die GLUT1 mRNA Expression war auch in den HCC-Fällen, in denen auch ein GLUT1 Immunsignal sichtbar war, signifikant erhöht im Vergleich zu den Fällen, in denen kein GLUT1 Immunsignal detektiert werden konnte ($5,0 \pm 0,9$ arbiträre Einheiten vs. $1,2 \pm 0,4$ arbiträre Einheiten; $p=0,0006$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte GLUT1 Expression im HCC durch die Immunhistochemie korrekt nachgewiesen wurde. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass geringere GLUT1 Proteinlevel auf Grund der Detektionsgrenze der Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden konnten. Darum ist es wahrscheinlich, dass GLUT1 in deutlich mehr Fällen verstärkt exprimiert wurde, als es durch die Immunhistochemie gezeigt werden konnte.

Für eine deskriptive Datenanalyse wurden relevante klinisch-pathologische Variablen in Tabelle 8 in Bezug auf das Ergebnis der GLUT1 Immunhistochemie verglichen.

Variable	Kategorie	n	%	GLUT1 negativ	GLUT1 positiv	p*
Alter bei Diagnose						
	<60 Jahre	39	45,9	34	5	0,753
	≥60 Jahre	46	54,1	39	7	
Geschlecht						
	weiblich	16	18,8	13	3	0,557
	männlich	69	81,2	60	9	
Tumor-Staging						
	pT1	13	15,3	12	1	0,005
	pT2	25	29,4	21	4	
	pT3	41	48,2	37	4	
	pT4	3	3,5	0	3	
	unbekannt	3	3,5	3		
Tumor-Grading						
	G1	29	34,1	27	1	0,017
	G2	48	56,5	42	6	
	G3	8	9,4	4	4	
Tumorgröße						
	≤ 5 cm	36	42,4	30	6	0,409
	> 5 cm	30	35,3	27	3	
	unbekannt	19	22,4	18	1	
Ki-67 Proliferationsrate (MiB1-Index)						
	≤ 5%	40	47,1	38	2	0,024
	> 5%	45	52,9	35	10	

Tabelle 8. GLUT1 Immunreaktion im Verhältnis zu klinisch-pathologischen Charakteristika und Ki-67 Proliferationsrate (MiB1), hervorgehobene p-Werte entsprechen $p < 0,05$; exakter Test nach Fisher.

Die Proteinexpression war signifikant mit einem höheren Tumor-Staging ($p=0,005$) und einem geringeren Tumor-Grading ($p=0,017$) assoziiert.

Außerdem zeigten GLUT1 positive HCC-Gewebe im Vergleich zu GLUT1 negativen Tumoren eine signifikant höhere Proliferationsrate (MIB-1 Index: $p < 0,0001$, Abbildung 77).

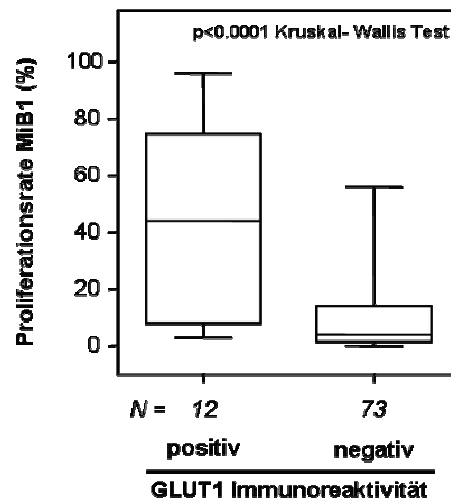


Abbildung 77. Proliferationsrate (immunohistochemischer MIB1 Index) in HCC-Geweben mit positiver und negativer GLUT1 Immunreaktion.

Es wurde dagegen keine Korrelation zwischen GLUT1 Expression und Alter, Geschlecht, Tumorgroße oder Ätiologie der zugrunde liegenden Lebererkrankung gefunden.

4.4.2 Inhibierung der GLUT1 Expression in HCC-Zellen

Um die funktionelle Bedeutung von GLUT1 im HCC weiter zu analysieren, wurde die GLUT1 Expression in HCC-Zellen durch transiente Transfektion mit GLUT1 siRNA inhibiert. Dafür wurde zuerst der Effekt von zwei verschiedenen GLUT1 siRNAs auf die GLUT1 mRNA- und Proteinexpression in HCC-Zellen untersucht. Eine quantitative real time PCR Analyse zeigte eine stark verminderte GLUT1 mRNA Expression in Hep3B Zellen, die mit GLUT1 siRNA transfiziert wurden (siRNA 1 und 2) im Vergleich zu Kontroll- (unspezifische siRNA) und nicht-transfizierten Hep3B Zellen (Abbildung 78).

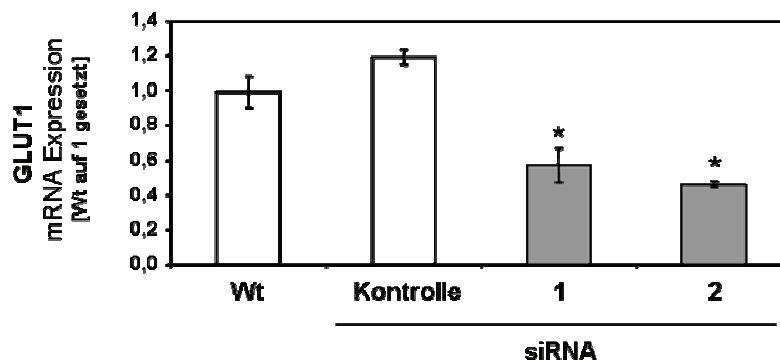


Abbildung 78. GLUT1 mRNA Expression in Hep3B Zellen, die mit GLUT1 siRNA transfiziert wurden (siRNA 1 und 2) im Vergleich zu Kontroll- (unspezifische siRNA) und nicht-transfizierten (Wt) Hep3B Zellen, *: $p < 0,05$.

Die GLUT1 Suppression in den mit GLUT1 siRNA transfizierten Hep3B Zellen konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 79).

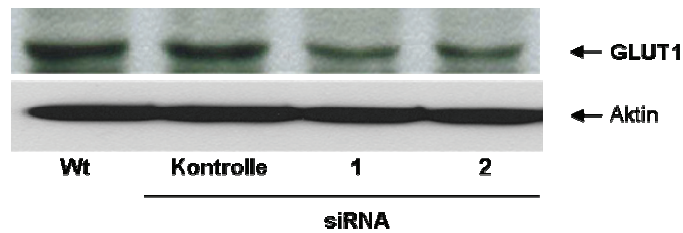


Abbildung 79. GLUT1 mRNA Expression (50 kDa) in Hep3B Zellen, die mit GLUT1 siRNA transfiziert wurden (siRNA1 und siRNA2) im Vergleich zu Kontroll- (unspezifische siRNA) und nicht-transfizierten (Wt) Hep3B Zellen, Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle.

Eine durchflusszytometrische Analyse nach Transfektion der Hep3B Zellen mit einer fluoreszenzmarkierten (Alexa Fluor 499) siRNA zeigte eine Transfektionseffizienz von annähernd $90,6\% \pm 0,8\%$ (Abbildung 80).

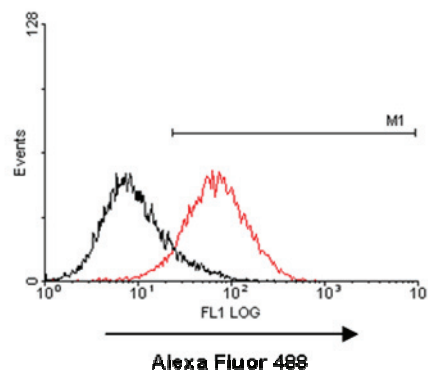


Abbildung 80. Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Transfektionseffizienz: Kontroll-transfizierte Hep3B Zellen (schwarz) und mit fluoreszenzmarkierter (Alexa Fluor 488) siRNA-transfizierte Hep3B Zellen (rot), Marker M1 entspricht der Anzahl Alexa Fluor 488 positiver Zellen.

Ferner wurde die Dauer einer effizienten GLUT1 Suppression in den Hep3B Zellen untersucht und gefunden, dass die GLUT1 mRNA Expression für bis zu vier Tage nach Transfektion anhielt. Abbildung 81 zeigt repräsentativ die Suppressionsstabilität in Hep3B Zellen nach Transfektion mit GLUT1 siRNA1.

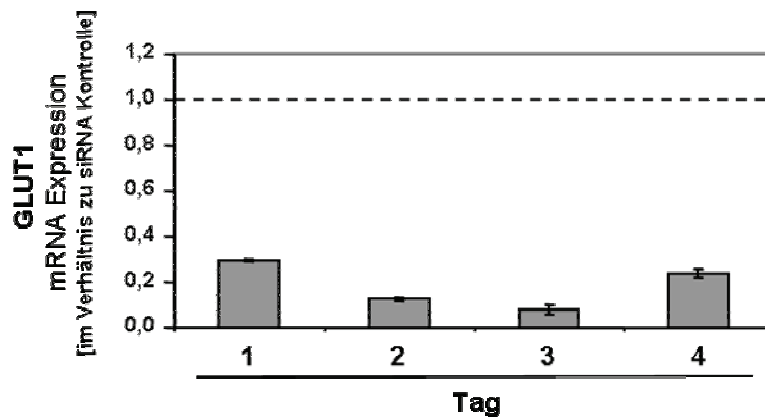


Abbildung 81. GLUT1 mRNA Expression: Stabilität der GLUT1 Suppression nach GLUT1 siRNA1 Transfektion über vier Tage im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Hep3B Zellen (gestrichelte Linie).

4.4.3 Funktionelle Veränderungen nach GLUT1 Suppression in HCC-Zellen

Um die Rolle von GLUT1 in HCC-Zellen weiter zu charakterisieren, wurden funktionelle *in vitro* Untersuchungen mit GLUT1 supprimierten HCC-Zellen (GLUT1 siRNA 1 und 2) im Vergleich zu Kontroll-siRNA- und nicht-transfizierten HCC-Zellen durchgeführt.

Die Inhibierung der GLUT1 Expression resultierte in einer signifikant verminderten Proliferation (Abbildung 82).

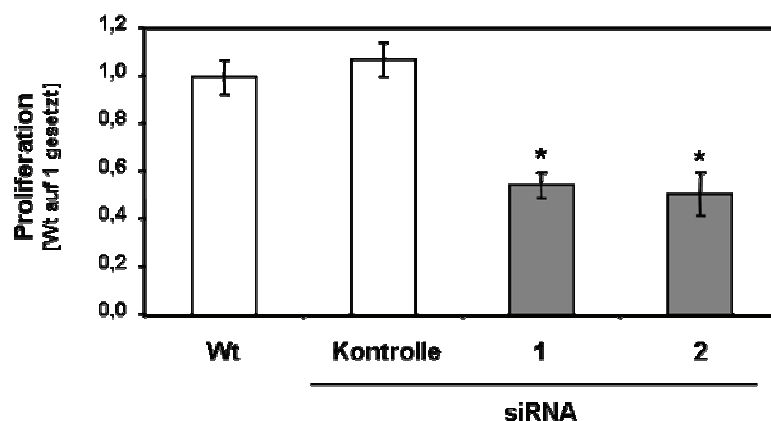


Abbildung 82. Analyse der Proliferation: Hep3B Zellen, die mit GLUT1 siRNA transfiziert wurden (siRNA 1 und 2) im Vergleich zu Kontroll- (unspezifische siRNA) und nicht-transfizierten (Wt) Hep3B Zellen, *: $p < 0,05$.

Als nächstes wurde analysiert, ob die GLUT1 Expression das migratorische Potential von HCC-Zellen *in vitro* beeinflusst. In einem Boydenkammer Assay zeigten HCC-Zellen mit einer supprimierten GLUT1 Expression eine signifikant verminderte Migration im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 83).

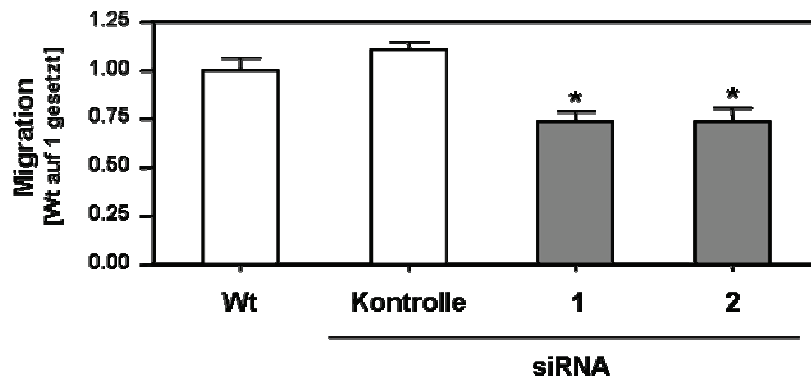


Abbildung 83. Analyse der Migration: Hep3B Zellen, die mit GLUT1 siRNA transfiziert wurden (siRNA 1 und 2) im Vergleich zu Kontroll- (unspezifische siRNA) und nicht-transfizierten (Wt) Hep3B Zellen, *: $p < 0,05$.

Da über GLUT1 die Glukoseaufnahme in Tumorzellen reguliert wird und bereits von Otto Warburg 1924 beschrieben wurde, dass Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen in gesteigertem Maße anaerobe Glykolyse betreiben, analysierten wir vergleichend die im Gegensatz zu primären Hepatozyten stark erhöhte Laktatsekretion von Hep3B Zellen, die mit siRNA gegen GLUT1 transfiziert wurden und Hep3B Zellen die mit Kontroll siRNA oder gar nicht transfiziert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Suppression von GLUT1 in Hep3B Zellen zu einer signifikant verminderten Laktatsekretion führte (Abbildung 84).

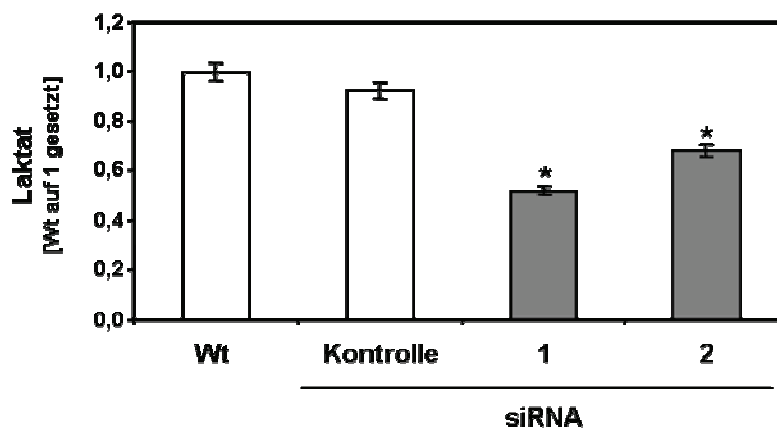


Abbildung 84. Quantifizierung der Laktatsekretion in den Zellkulturüberständen von Hep3B Zellen, die mit GLUT1 siRNA transfiziert wurden (siRNA 1 und 2) im Vergleich zu den Zellkulturüberständen von Kontroll- (unspezifische siRNA) und nicht-transfizierten (Wt) Hep3B Zellen, *: $p < 0,05$.

4.4.4 Einfluss von aktivierten HSZ auf die GLUT1 Expression von HCC-Zellen

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wiesen vergleichende cDNA-Array-Analysen bereits darauf hin, dass konditioniertes Medium von aktivierten

HSZ in HCC-Zellen die GLUT1 Expression induziert. Dieses Ergebnis konnten wir nun auch durch quantitative PCR Analysen betätigen, die zeigten, dass KM von aktivierten HSZ in Hep3B und PLC Zellen signifikant die GLUT1 Expression induziert (Abbildung 85).

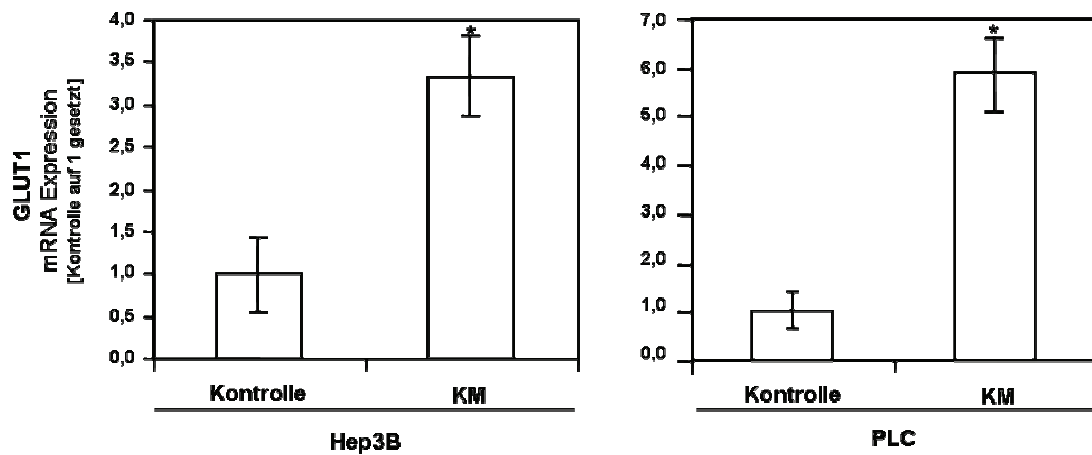


Abbildung 85. GLUT1 mRNA Expression in Hep3B und PLC Zellen: unstimuliert (Kontrolle) und nach Stimulation mit konditioniertem Medium (KM) von aktivierten HSZ, *: $p < 0,05$.

Diese Daten zeigen, dass eine Inhibition der GLUT1 Expression die Tumorigenität von HCC-Zellen inhibiert und aktivierte HSZ die GLUT1 Expression induzieren können.

5 Diskussion

Das zentrale Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von aktivierten HSZ und HCC-Zellen bezüglich der Progression des HCC zu analysieren, denn aktivierte HSZ repräsentieren die (Myo-)fibroblasten des HCC-Stromas. Zunehmend wird die wechselseitige Interaktion zwischen Tumorzellen und zellulären Komponenten des Tumorstromas als wichtiger Faktor, der die Tumorigenität beeinflusst, erkannt. Aktivierten HSZ kommt bei der HCC-Entstehung und -Progression auch des Weiteren eine wichtige Bedeutung zu, da sie beim Prozess der Leberfibrose bzw. -zirrhose die zelluläre Quelle der exzessiven Produktion und Deposition von extrazellulärer Matrix darstellen. Somit verursachen sie zum einen mit der Leberzirrhose auch den Hauptriskofaktor für die HCC-Entstehung und zum anderen sind sie bereits vor Beginn der Hepatokanzerogenese in der geschädigten Leber präsent und „begleiten“ gleichsam in enger Nachbarschaft die Hepatozyten im Verlauf der malignen Transformation.

Bezüglich der Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen war zudem die Analyse von drei Molekülen bzw. (molekularen) Mechanismen für die Hepatokanzerogenese von Bedeutung, da wir - basierend auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe - bereits wussten, dass jene die Leberregeneration und -fibrose beeinflussen bzw. annahmen, dass sie auch bei der Interaktion von aktivierten HSZ und HCC-Zellen eine wichtige (pathophysiologische) Rolle spielen.

Die Diskussion der Ergebnisse soll hier zunächst entsprechend der Reihenfolge im Ergebnisteil fokussiert auf die jeweilige Fragestellung bzw. die Ziele erfolgen:

- 5.1 Bedeutung von aktivierten HSZ** für die Tumorigenität von HCC-Zellen,
- 5.2** Regulation und Funktion des Proteins **MIA2** im Verlauf der Hepatokanzerogenese,
- 5.3** Expression und Funktion von **FGFR2-IIIb** im HCC und
- 5.4** Expression und Funktion von **GLUT1** im HCC.

Basierend auf den Ergebnissen aus der GLUT1 Analyse im HCC wird dann auch die **Bedeutung des „Warburg Effektes“** bei der Hepatokanzerogenese diskutiert.

In allen vier Projektteilen wurden wichtige Ergebnisse erzielt, die unser Verständnis für die Entstehung und Progression des HCC erweitern und auch eine potentielle Grundlage für innovative therapeutische Ansätze oder prognostische Marker für den Verlauf dieses hochmalignen Tumors darstellen könnten.

Am Ende der jeweiligen Diskussions- bzw. Projektteile wird daher auch jeweils ein Ausblick gegeben, wie - basierend auf den erzielten Daten und Erkenntnissen - die Untersuchungen auch über die hier vorgestellte Arbeit hinaus fortgesetzt werden sollen und für diese weiteren Arbeiten zum Teil auch bereits wichtige Erkenntnisse gewonnen werden konnten.

Abschließend werden die Ergebnisse dann in der Zusammenschau (5.5) diskutiert und bewertet.

5.1 Bedeutung von aktivierten HSZ für die Tumorigenität von HCC-Zellen

In diesem Teil der Arbeit sollten die Effekte aktivierter HSZ auf die Tumorigenität von HCC-Zellen *in vitro* und *in vivo* analysiert werden. Unsere Experimente zeigen, dass aktivierte humane HSZ die Proliferation, Migration und Apoptose von drei unterschiedlichen humanen HCC-Zell-Linien *in vitro* modulieren konnten. Weiterhin fördern aktivierte HSZ das Wachstum und die Invasivität von HCC-Zellen in Nacktmäusen. Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass aktivierte HSZ die Tumorigenität des HCC fördern.

Als potentiellen molekularen Mechanismus, der den tumorigenen Effekt von aktivierten HSZ auf HCC-Zellen vermittelt, konnten eine erhöhte NFκB und ERK Aktivität in HCC-Zellen identifiziert werden, nachdem diese mit konditioniertem Medium von aktivierten HSZ stimuliert wurden.

Eine aberrierende Aktivität des *MAP Kinase/Extracellular Regulated Kinase* (ERK) Signalweges ist bekanntermaßen an der Progression des humanen HCC beteiligt. Eine erhöhte ERK Aktivität induziert die Proliferation von HCC-Zellen und schützt diese vor Apoptose (180). Weiterhin beeinflusst eine erhöhte ERK Aktivierung die migratorische Aktivität und Invasivität von HCC-Zellen, was darauf hinweist, dass dieser molekulare Signalweg an der intrahepatischen Metastasierung des HCC beteiligt ist (181).

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB ist eines der frühesten Schlüsselereignisse in der neoplastischen Progression der Leber und spielt eine kritische Rolle beim Übergang von der Entzündung zur hepatischen Onkogenese (182; 183). Konstitutive sowie induzierte NFκB Aktivität kann das Überleben von HCC-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induzieren und Zellkulturstudien bewiesen die kritische Rolle von NFκB bei der Proliferation von Karzinomzellen (184; 185). Ebenso ist NFκB ein bekannter Transkriptionsfaktor des Chemokins Interleukin IL-8, das konstitutiv in HCC-Zellen exprimiert wird (186). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass aktivierte HSZ die IL-8 Expression in HCC-Zellen stimulieren. In vorausgegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass IL-8 direkt oder indirekt in die Progression des HCC involviert ist (187; 188). IL-8 kann die Karzinomprogression sowohl durch Induktion der Proliferation und Migration von Tumorzellen als auch durch Induktion der Angiogenese, d.h. durch eine bessere Gefäßversorgung des Tumorgewebes, fördern. Von Interesse ist hierbei eine kürzlich erschienene Studie von Kubo et al., die zeigt, dass IL-8 im humanen HCC mit Invasion der Karzinomzellen aber nicht mit Tumorangiogenese korreliert (189). In Übereinstimmung dazu konnte in dieser Arbeit keine gesteigerte Angiogenese in Tumoren, die sich nach Injektion von aktivierten HSZ und HCC-Zellen in Nacktmäusen bildeten, im Vergleich zu den Tumoren aus HCC-Zellen alleine beobachtet werden. Außerdem wiesen Tumoren aus aktivierten HSZ und HCC-Zellen trotz eines größeren Volumens kleinere Areale einer zentralen Nekrose auf als Tumoren, die sich nur aus HCC-Zellen bildeten. In Einklang damit zeigten sich auch kleinere zentrale Nekrosen in Sphäroiden aus aktivierten HSZ und HCC-Zellen im Vergleich zu Sphäroiden, die nur aus HCC-Zellen bestanden. Dieses dreidimensionale Zellkultursystem, in dem Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung stehen, ist unabhängig von Angiogenese und rein durch Diffusion limitiert. Zusammenfassend weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass aktivierte HSZ nicht Angiogenese anregen, sondern das HCC-Wachstum fördern, indem sie das Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod verstärken, was ein protumorigenes Prinzip in der Hepatokanzerogenese darstellt.

Es wurden verschiedene Modelle angewandt, um die Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen zu untersuchen. In den ersten experimentellen Untersuchungen wurde eine verstärkte NFκB und ERK Aktivität, eine Induktion von Proliferation und Migration, die Resistenz gegenüber Apoptose und die

Expression von IL-8 in HCC-Zellen beobachtet, die mit konditioniertem Medium, das von aktivierten HSZ gesammelt wurde, stimuliert wurden. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass lösliche Faktoren, die von aktivierten HSZ sezerniert werden, für die beobachteten tumorigenen Effekte verantwortlich sind. In dieser Arbeit lag der Fokus nicht auf der Identifizierung dieser Faktoren. Potentielle Kandidaten sind jedoch verschiedene Wachstumsfaktoren, Matrix Metalloproteinasen (MMPs), Chemokine und Zytokine. Bisherige Studien konnten zeigen, dass HGF von aktivierten HSZ sekretiert wird und die Invasivität von HCC-Zellen *in vitro* fördert (190). Weiterhin wurde gezeigt, dass aktivierte HSZ die Progression des HCC durch TGF- β verstärken können (191). Einige weitere Wachstumsfaktoren wie FGF1 und 2, PDGF oder *Insulin Like Growth Factor (IGF)* sind bekannt, die von aktivierten HSZ exprimiert werden und die Hepatokanzerogenese beeinflussen (192). Es ist mehr als wahrscheinlich, dass einige dieser Faktoren sowie bisher noch nicht identifizierte Faktoren, die von aktivierten HSZ sekretiert werden, alleine oder in Kombination die in dieser Arbeit beobachteten tumorigenen Effekte verursachen. Ebenso kann spekuliert werden, dass diese Faktoren unterschiedliche Pathomechanismen beeinflussen und derselbe Faktor wie im Fall von HGF unterschiedliche Effekte in verschiedenen HCC-Zell-Linien hervorrufen kann (193).

Die anschließende Analyse der Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen in einem dreidimensionalen Zell Kokultur System und in einem *in vivo* Modell bestätigten die tumorigenen Effekte von aktivierten HSZ auf das HCC. In diesen Modellen können neben den von aktivierten HSZ sekretierten löslichen Faktoren weitere Mechanismen die beobachteten kanzerogenen Effekte verursachen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass HSZ die Progression von hepatischen Tumoren oder Metastasen durch das Remodeling der extrazellulären Matrix oder durch die Expression chemotaktischer Faktoren vermitteln (194; 195). Diese und weitere Studien in anderen Tumoren zeigen, dass Tumorzellen die Expression tumorigener Faktoren durch aktivierte HSZ induzieren, was auf eine gegenseitige Interaktion zwischen Karzinomzellen und stromalen (Myo-) Fibroblasten bei der Karzinomprogression hindeutet.

Zusammenfassend untermauert diese Arbeit die Bedeutung von aktivierten stromalen HSZ/Myofibroblasten bei der HCC-Progression *in vitro* und *in vivo* (Abbildung 86).

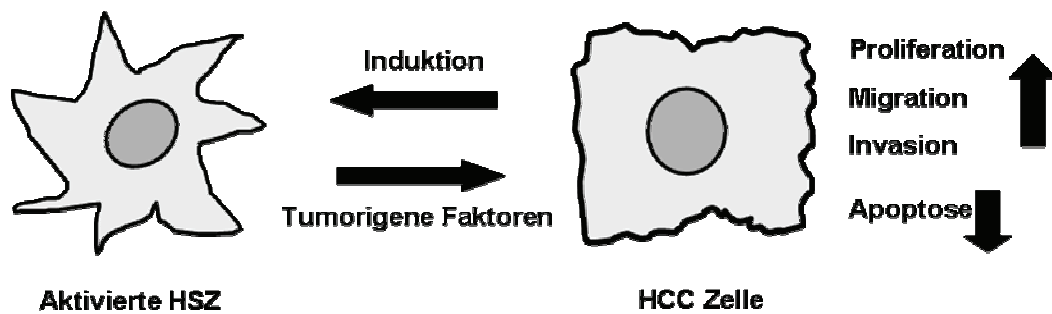


Abbildung 86. Wechselseitige Interaktion (\leftrightarrow): Bedeutung aktivierter HSZ bei der HCC-Progression durch sezernierte tumorigene Faktoren und induzierte Verstärkung dieses Effektes durch HCC-Zellen. Aktivierte HSZ induzieren (\uparrow) in HCC-Zellen Proliferation, Migration sowie Invasion und schützen (\downarrow) vor Apoptose.

Nachfolgende Fragestellungen und Ziele, die sich aus den Untersuchungen zur Bedeutung aktivierter HSZ für die HCC-Progression ergeben

Unsere Daten zeigen, dass aktivierte HSZ (zumindest auch) über sezernierte Faktoren die Tumorigenität von HCC-Zellen fördern. Eine gezielte Inhibition dieser Faktoren stellt ein interessantes von der Tumorzelldifferenzierung unabhängiges therapeutisches Target dar. Durch proteomische Analysen sollen diese Faktoren daher zunächst in den konditionierten Medien der aktivierten HSZ identifiziert werden, da sich dieses Modell hierfür methodisch sehr gut eignet. In den beiden anderen Modellen (3D Sphäroid- und Nacktmausmodell) soll dann nachfolgend die biologische Wirksamkeit einer gezielten Inhibition dieser Faktoren analysiert werden.

Weiterhin ist geplant zu untersuchen, ob eine Quantifizierung von aktivierten HSZ im HCC als prognostischer Marker genutzt werden kann. Hierfür würde sich in hervorragender Weise der Tissue-Microarray (TMA) eignen, der in den anderen Projektteilen bereits genutzt wurde.

5.2 Regulation und Funktion des Proteins MIA2 im Verlauf der Hepatokanzerogenese

Vor kurzem wurde in unserer Arbeitsgruppe mit MIA2 ein neues Mitglied der MIA Genfamilie identifiziert und eine gewebespezifische Expression in Hepatozyten beschrieben (196). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass MIA2 im HCC vermindert exprimiert wird oder komplett verloren ist (166). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Verlust des Transkriptionsfaktors HNF-1 zumindest teilweise für die transkriptionelle Reduktion der MIA2 Expression verantwortlich ist. Zudem führte eine Re-Induktion der MIA2 Expression in HCC-Zellen zu einer deutlichen Inhibierung des Wachstums und der Invasion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Außerdem war der Verlust der MIA2 Expression mit einem höheren Tumor-Staging und einer vermehrten Proliferation der Tumorzellen assoziiert. Diese Arbeit liefert also einen direkten Beweis, dass MIA2 im HCC als ein Tumorsuppressor betrachtet werden kann. Weiterhin handelt es sich bei MIA2 um einen potentiellen Marker für eine HCC Prognose und ein attraktives therapeutisches Target.

Im Moment kann über die molekularen Mechanismen der anti-tumorigenen Effekte von MIA2 nur spekuliert werden. MIA2 wird ausschließlich von Hepatozyten exprimiert und die Analyse der Aminosäuresequenz von MIA2 sowie vorläufige Experimente, bei denen der Überstand von Hepatozyten analysiert wurde, weisen darauf hin, dass es sich bei MIA2 um ein sezerniertes Protein handelt. Interessanterweise zeigte die Behandlung der HCC-Zellen mit rekombinantem MIA2 ähnliche Effekte auf Proliferation und Invasion wie die Re-expression von MIA2 durch stabile Transfektion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MIA2 wohl in einer autokrinen Weise agiert. In weiteren Studien sollen mögliche Rezeptoren und Signalwege identifiziert werden. Ebenso soll das therapeutische Potential von MIA2 weiter untersucht werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die hepatische MIA2 Expression in Patienten mit Leberfibrose oder Zirrhose erhöht ist (197). Außerdem wurde gezeigt, dass TGF- β die MIA2 Expression in Hepatozyten *in vitro* induzieren kann (198). Es ist sehr wohl bekannt, dass die TGF- β Signaltransduktion im HCC gestört ist. Daher kann spekuliert werden, ob eine gestörte TGF- β

Signaltransduktion zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität von MIA2 im tumorösen Lebergewebe beiträgt. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Hepatozyten spezifische Expression von MIA2 durch HNF-1 Bindungsstellen im MIA2 Promotor kontrolliert wird. HNF-1 gehört zur Familie der *Liver Enriched Transcription Factors*. LETFs binden an Promotor oder Enhancer Regionen verschiedener hepatischer, funktioneller Gene. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass HNF-1 an der Kontrolle der Zelldifferenzierung beteiligt ist. Transkriptionelle Veränderungen dieses Faktors wurden zwischen normalen und karzinomatösen Geweben beobachtet (199; 200). Die hier nachgewiesene Reduktion der HNF-1 Expression in HCC-Zell-Linien und Geweben ist in Übereinstimmung mit diesen vorausgegangenen Studien. Allerdings wurde einmal berichtet, dass die HNF-1 Expression in vier von sechs HCC-Proben erhöht war (201). Die Diskrepanz zwischen den hier gezeigten Ergebnissen und dieser Studie kann durch die relativ kleine Anzahl an analysierten Tumorproben erklärt werden. Eine Funktion als Tumorsuppressor wird durch den Phänotyp von zwei HNF-1 defizienten Mauslinien unterstützt. Diese Mäuse haben entweder durch eine verstärkte Proliferation der Hepatozyten eine ausgeprägte Vergrößerung der Leber (202) bzw. eine Lebervergrößerung mit einer zentralen lobulären Hypertrophie und Degeneration der individuellen Hepatozyten (203). Außerdem wurden Keimbahnmutationen des Transkriptionsfaktor 1 (TCF1) Gens, das HNF-1 kodiert, in hepatischen Adenomen gefunden (204). Allerdings wurde bisher kein direkter Effekt von HNF-1 auf die Tumorigenität von Zellen vermutet. Die hier gezeigten Daten deuten auf einen neuen Mechanismus hin, wie der Verlust der HNF-1 Expression im HCC die Tumorigenität mittels einer negativen Regulation von MIA2 beeinflusst (Abbildung 87).

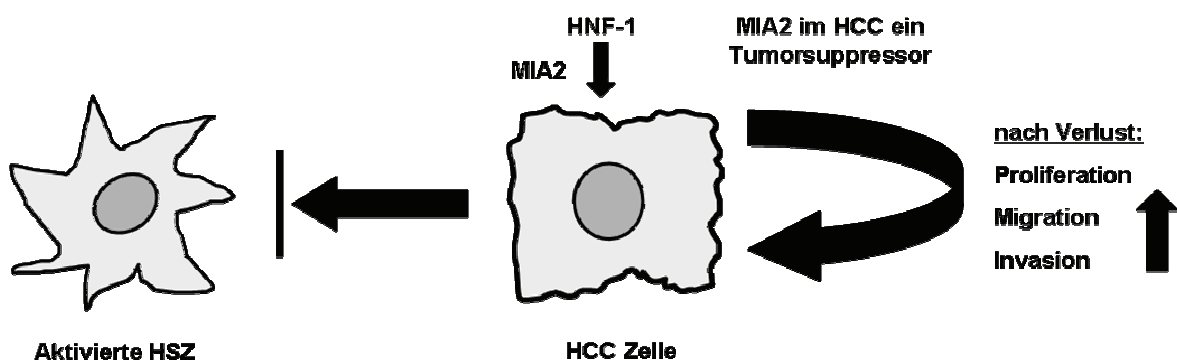


Abbildung 87. Der Verlust (↓) der HNF-1 Expression im HCC fördert die Tumorigenität der HCC-Zellen durch eine negative Regulation von MIA2. Ein Verlust des Tumorsuppressors MIA2 korreliert mit vermehrter (↑) Proliferation, Migration und Invasion. Durch den Verlust von MIA2 geht auch die proliferationshemmende Wirkung auf aktivierter HSZ verloren (1).

Nachfolgende Fragestellungen und Ziele, die sich aus der Funktion von MIA2 als Tumorsuppressor im HCC ergeben

Die Funktion von MIA2 war bislang unbekannt. Die hier vorgestellten Daten zeigen erstmals, dass MIA2 im HCC als Tumorsuppressor wirkt. Ferner führen sie zu der Hypothese, dass MIA2 ein potentiell Therapeutikum für das HCC darstellen könnte. Um dies weiter zu analysieren, ist es wichtig, die Funktion von MIA2 auch im Verlauf der HCC-Entstehung zu untersuchen. Zudem sollen die Funktion und die molekularen Wirkmechanismen von MIA2 auch bei weiteren pathophysiologischen Prozessen, wie akuter und chronischer Leberschädigung, bzw. unter physiologischen Bedingungen (in Hinblick auf die embryonale Leberentwicklung oder die Leberregeneration) analysiert werden. Aufgrund der Komplexität der zellulären Interaktion bei diesen Mechanismen sind hierfür *in vivo* Versuche in entsprechenden experimentellen Modellen erforderlich.

Hierfür soll zum einen eine MIA2 Knockout Maus mit einer kompletten MIA2 Defizienz (durch homologe Rekombination) und zum anderen eine transgene Knockdown Maus, die Mia2 shRNA konditionell exprimiert, erzeugt werden. Die Motivation, zwei Strategien für die Generierung einer MIA2 defizienten Maus zu verfolgen, ergab sich daraus, dass sich die Klonierung des Vektors für die homologe Rekombination als sehr problematisch erwies und die Klonierungsstrategie mehrfach geändert werden musste. Es kann nur spekuliert werden, dass die repetitiven und palindromischen Sequenzen der zu klonierenden Intronsequenzen dafür verantwortlich und nicht kompatibel mit dem anfangs verwendeten Vektor für die homologe Rekombination waren. Durch die zwei unterschiedlichen Mausmodelle eröffnet sich die Möglichkeit, den Einfluss einer verminderten und verlorenen MIA2 Expression *in vivo* untersuchen zu können.

So konnten in der hier vorliegenden Arbeit für die Generierung dieser Mäuse bereits wichtige Erkenntnisse gewonnen bzw. wichtige methodische Voraussetzungen geschaffen werden, so dass die transgenen Konstrukte demnächst in den Pronukleus muriner Eizellen injiziert bzw. durch Elektroporation in murine Stammzellen eingeschleust werden können.

5.3 Expression und Funktion von FGFR2-IIIb im HCC

Es konnte gezeigt werden, dass die FGFR2-IIIb-Expression in HCC-Zellen im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten vermindert oder ganz verloren ist. Dies konnte auch in murinen und humanen HCC-Gewebe verglichen mit nicht-neoplastischen Gewebe bestätigt werden. Um zu analysieren, ob FGFR2-IIIb ein Marker für Differenzierung ist, der in den meisten aggressiven Tumoren verloren ist, oder eine aktive Rolle bei der Aufrechterhaltung eines wenig aggressiven Phänotyps in epithelialen Zellen spielt, wurde FGFR2-IIIb in einer HCC-Zell-Linie re-exprimiert, die endogen kein FGFR2-IIIb exprimiert. Die Re-expression von FGFR2-IIIb inhibierte deutlich die Migration und das Wachstum *in vitro* und *in vivo*, wodurch die Tumorigenität der HCC-Zellen reduziert wurde. In Übereinstimmung mit der Suppression des Wachstums und der Tumorigenität kam es zu einer erhöhten Apoptoseinduktion durch die FGFR2-IIIb Re-expression. Außerdem wurde nachgewiesen, dass ein Verlust von FGFR2-IIIb mit einem höheren Tumor-Staging und vermehrter Zellproliferation in Patienten mit HCC assoziiert ist. Diese Arbeit bringt somit den direkten Nachweis, dass es sich bei FGFR2-IIIb im HCC um einen Tumorsuppressor handelt.

Der FGFR2-IIIb Signalweg kann Mitose induzieren, wie es z.B. bei basalen Zellen der Haut oder bei der Wundheilung der Blase der Fall ist (205; 206). Ebenso kann dieser Signalweg die Progression von wenig differenzierten Tumoren unterstützen (207; 208). Alternativ spielt derselbe Rezeptor bei der Kontrolle der Zelldifferenzierung in suprabasalen Zellen der Haut (209), sowie bei der Erhaltung einer weniger aggressiven Form gewisser Karzinome eine Rolle, wie in dieser und in anderen Studien gezeigt (210). Dies zeigt, dass das reduzierte Wachstum FGFR2-IIIb re-exprimierender HCC-Zellen wahrscheinlich durch die Aufrechterhaltung der Homöostase oder durch die Balance zwischen Proliferation, Apoptose und Differenzierung verursacht wird.

Die inhibitorischen Eigenschaften von FGFR2-IIIb und der häufige Verlust bzw. die verminderte Expression in HCC-Geweben und den meisten Zell-Linien lässt vermuten, dass die Inaktivierung von FGFR2-IIIb einen kritischen Schritt in der Entwicklung und Progression des HCC darstellt. Hierfür könnten unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein.

Aus dem FGFR2 Gen können zwei verschiedene Splicevarianten hervorgehen: FGFR2-IIIb mit einer hohen Affinität für FGF7/KGF und FGFR2-IIIc mit keiner Affinität zu FGF7/KGF. Es wurde berichtet, dass eine verminderte Expression von FGFR2-IIIb mit einer erhöhten Expression von BEK (FGFR2-IIIc) assoziiert ist (211; 212). Ungeachtet der Exon IIIb Expression war jedoch auch die Exon IIIc enthaltende Form im HCC nur schwach bzw. nicht zu detektieren.

In der vorliegenden Untersuchung konnte alternatives Splicing somit als Ursache für die verminderte FGFR2-IIIb Expression im HCC ausgeschlossen werden.

Vielmehr deuten unsere Untersuchungen darauf hin, dass die FGFR2 Genexpression im HCC reprimiert ist.

Die 5'-Region des FGFR2 Gens enthält eine CpG Insel und es wurde bereits gezeigt, dass die FGFR2-IIIb Expression in einigen Tumoren wie z.B. Blasen- und Magenkarzinom durch epigenetische Veränderungen ausgeschaltet ist (213-215). Allerdings führte eine Behandlung mit dem DNA Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2'-deoxyzytidin nicht zu einer erneuten FGFR2-IIIb Expression. Eine methylierungs-spezifische PCR zeigte ebenfalls, dass eine Promotormethylierung nicht der Grund für die verminderte FGFR2-IIIb Expression im HCC ist.

Interessanterweise konnten jedoch definierte genomische Regionen des FGFR2 Genes in zwei der untersuchten HCC-Zell-Linien nicht amplifiziert werden. Das FGFR2 Gen ist in der Chromosomenregion 10q25.3-10q26 kartiert (216) und im HCC sind in der Region 10q große genomische Veränderungen einschließlich chromosomaler Instabilität (CIN) zu finden (217).

Obwohl es in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch untersucht wurde, kann daher trotzdem vermutet werden, dass genomische Veränderungen - zumindest in einer Subpopulation von HCC-Zellen - verantwortlich für den Verlust der FGFR2-IIIb Expression im HCC sind. Allerdings müssen auch noch weitere Mechanismen wie eine veränderte Chromatinstruktur in der FGFR2 Region oder der Verlust von Transaktivatoren des FGFR2 Gens in Betracht gezogen werden. Daher sind noch weitere Studien notwendig, um die molekularen Mechanismen der verminderten FGFR2-IIIb Expression im HCC aufzuklären.

Weiterhin kann bislang über die molekularen Mechanismen der anti-tumorigenen Wirkung des FGFR2-IIIb im HCC nur spekuliert werden.

Interessanterweise ist eine Tyrosinphosphorylierung des FGFR2-IIIb wahrscheinlich nicht für die Tumorsuppression im HCC verantwortlich. Dies wurde

auch *in vitro* für Blasenkarzinomzellen gezeigt (218). Ebenso wurde in einem murinen Prostatakarzinommodell eine Inhibition des Tumorwachstums ohne Aktivierung des Rezeptors beobachtet (219). Der spezifische FGFR2-IIIb Ligand FGF7/KGF hatte in Übereinstimmung mit dieser Hypothese keinen Effekt auf die FGFR2-IIIb exprimierenden HCC-Zellklone.

Im Hinblick auf eine therapeutische Fragestellung ist es von besonderem Interesse, dass KGF das Wachstum von FGFR2-IIIb exprimierenden Zellen nicht beeinflusst. Palifermin (Kepivance™), eine rekombinante Form des humanen KGF, ist in den USA, Europa und Australien als Medikament zugelassen. Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, die während einer Stammzellbehandlung eine myelotoxische Therapie erhalten, wird KGF verabreicht, um die Inzidenz und Dauer einer oralen Mukositis zu vermindern (220). Zudem wird momentan in klinischen Studien der positive Nutzen von KGF bei Patienten mit soliden Tumoren untersucht bzw. ob dadurch gesundes Gewebe vor den nachteiligen Effekten einer Chemoradiotherapie geschützt werden kann.

Bei einer KGF Behandlung von Patienten mit Tumoren epithelialen Ursprungs stellt sich jedoch die Frage, ob KGF einen zytoprotektiven Effekt auf die Tumorzellen selbst hat, indem ihre Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Agentien zunimmt.

Ein solches Risiko war insbesondere für das HCC zu befürchten, da KGF die Apoptose von Hepatozyten *in vitro* und *in vivo* hemmt (221). Weiter induziert KGF *in vitro* und *in vivo* die Proliferation von Hepatozyten (222) und es konnte gezeigt werden, dass FGFR2-IIIb eine entscheidende Rolle bei der Leberregeneration spielt (223). Die Wirkung auf HCC-Zellen war bislang nicht untersucht.

Außerdem zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass FGFR2-IIIb Expression als Marker für die HCC-Progression genutzt werden könnte. Weiterhin könnte die Identifizierung der molekularen Mechanismen, die für die anti-tumoralen Effekte von FGFR2-IIIb verantwortlich sind, einen therapeutischen Ansatz liefern, die Progression dieses extrem aggressiven Tumors zu inhibieren.

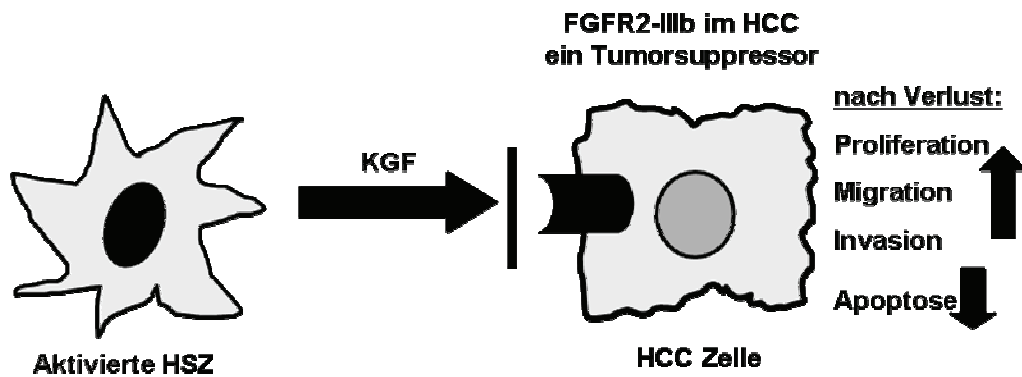


Abbildung 88. FGFR2-IIIb als Tumorsuppressor: der Verlust induziert die HCC-Progression durch vermehrte (↑) Proliferation, Migration und Invasion sowie verminderte (↓) Apoptose. Die antitumorigene Wirkung von FGFR2-IIIb wird nicht durch den von aktivierten HSZ sekretierten Liganden KGF (→) mediert.

Nachfolgende Fragestellungen und Ziele, die sich aus der Identifizierung von FGFR2-IIIb als Tumorsuppressor im HCC ergeben

Bislang ist der molekulare Mechanismus, durch den FGFR2-IIIb die anti-kanzerogene Wirkung vermittelt, unklar. Durch gezielte Analyse der Signaltransduktion und durch definierte Mutationen im FGFR2-IIIb Rezeptor soll versucht werden, diese zu identifizieren, da sich hieraus neue therapeutische Targets ergeben könnten.

Des Weiteren soll in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Sabine Werner (ETH, Zürich) in FGFR2-IIIb defizienten Mäusen (Hepatozyten-spezifisch deletiert) die prokanzerogene Wirkung des FGFR2-IIIb Verlustes nach chemischer HCC-Induktion (224) überprüft werden. Zudem wird derzeit ein FGFR2-IIIb exprimierender Adenovirus entwickelt. Durch eine Injektion des FGFR2-IIIb Adenovirus kann dann in den FGFR2-IIIb defizienten Mäusen nach HCC-Induktion die Wirkung des re-exprimierten FGFR2-IIIb als Tumorsuppressor *in vivo* bestätigt werden.

5.4 Expression und Funktion von GLUT1 im HCC

Das Ziel dieser Studie war, die Expression und Funktion des Glukosetransporters GLUT1 im HCC zu analysieren.

Bisherige Studien, in denen die GLUT1 Expression in humanen und murinen HCC-Gewebe untersucht wurde, zeigten diskrepante und unschlüssige Ergebnisse. In einigen Studien wurde im HCC in mehr als 80% der Fälle eine starke und erhöhte GLUT1 mRNA Expression im Vergleich zum korrespondierenden nicht-tumorösen Gewebe gefunden (225-227). Im Gegensatz dazu konnte in immunhistochemischen Untersuchungen anderer Studien im HCC-Gewebe kein GLUT1 Protein detektiert werden bzw. nur in einer Minderheit der Fälle (228-231). Alle diese bisherigen Studien haben gemeinsam, dass nur wenige HCC-Gewebe untersucht wurden und dass die GLUT1 Expression entweder nur auf mRNA Ebene oder auf Proteinebene analysiert wurde.

In unserer Studie wurde die GLUT1 Expression im HCC sowohl durch quantitative PCR als auch auf Proteinebene in HCC-Zellen und Geweben analysiert. Ferner wurde in 85 HCC-Fällen die GLUT1 Expression immunhistochemisch mit einem Tissue-Microarray analysiert.

Es wurde eine erhöhte GLUT1 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in allen HCC-Zell-Linien im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten gefunden. Weiterhin zeigten humane HCC-Gewebe in 64% der Fälle einen höheren GLUT1 mRNA Level als das korrespondierende nicht-tumoröse Lebergewebe. Durch eine immunhistochemische Analyse konnte in 12% aller untersuchten HCC-Gewebe GLUT1 detektiert werden, aber in keinem nicht-tumorösen Gewebe. Es kann daher spekuliert werden, ob die in nur einem kleineren Teil der HCC-Patienten immunhistochemisch nachgewiesene GLUT1 Proteinexpression die tatsächliche Expression in HCC-Geweben reflektiert. Es gibt jedoch mehrere Argumente, die gegen diese Hypothese sprechen. Diese weisen eher darauf hin, dass die Antikörper und/oder die Methoden der Detektion der immunhistochemischen Färbung hier und in früheren Studien nicht sensitiv genug sind, GLUT1 im HCC-Gewebe zu detektieren. Eventuell wird GLUT1 im HCC nur in relativ geringer Menge exprimiert. So war eine enge Korrelation zwischen GLUT1 mRNA- und Proteinexpression festzustellen, wobei nur HCC-Gewebe mit den höchsten GLUT1 mRNA Levels auch eine sichtbare immunhistochemische Färbung zeigten, was vermuten lässt, dass es einen Schwellenwert für den

immunhistochemischen Nachweis des GLUT1 Protein gibt. Zudem wurde in zwei HCC-Zell-Linien durch die Behandlung mit GLUT1 siRNA die GLUT1 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene supprimiert, was darauf hinweist, dass die GLUT1 Expression im HCC auf transkriptioneller Ebene reguliert wird.

Die Expression von GLUT1 in einer signifikanten Anzahl an HCC-Geweben und die geringe bzw. undetektierbare Expression in den korrespondierenden normalen und benignen hepatischen Geweben zeigen, dass dieser Transporter in HCC-Zellen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme spielt.

Glukose ist die Hauptenergiequelle und eine verstärkte GLUT1 Expression weist auf einen erhöhten Energiebedarf hin, der wiederum mit einem aggressiveren Tumor-Verhalten korreliert. In der Tat konnte in mehreren soliden Tumoren eine GLUT1 Überexpression mit einer aggressiveren Tumorform in Übereinstimmung gebracht werden (232; 233). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal für das HCC gezeigt werden, dass die GLUT1 Expression signifikant mit Wachstum und Invasivität assoziiert ist.

Es ist bekannt, dass die Proliferation transformierter Zellen mit einer Beschleunigung der Glukoseaufnahme und des Stoffwechsels einhergeht (234; 235). So konnte auch gezeigt werden, dass GLUT1 in fötalen Hepatozyten in größeren Mengen vorhanden ist als in adulten (236; 237).

Dadurch könnte spekuliert werden, dass eine GLUT1 Überexpression in tumorösen Geweben aus dem schnellen Wachstum der Tumorzellen resultiert.

In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Inhibition der GLUT1 Expression in HCC-Zellen eine Reduktion der Proliferationsrate und des migratorischen Potentials induziert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass GLUT1 direkt die Tumorigenität der HCC-Zellen induziert und nicht (nur) in einem späteren Verlauf der HCC-Progression in Folge eines erhöhten Energiebedarfs reaktiv exprimiert wird.

Die pharmakologische Inhibition des Glukosestoffwechsels von Tumorzellen, alleine oder in Kombination mit anderen therapeutischen Heilverfahren, hat sich als viel versprechende Therapie *in vitro* und *in vivo* erwiesen (238). Eine Inhibition der Expression oder der Funktionalität von GLUT1 wäre ein spezifischeres Target als die Inhibierung des Glukosestoffwechsels in seiner Gesamtheit, da die Zellen

im Tumor insbesondere von einer vermehrten Glukoseaufnahme für die anaerobe Glykolyse abhängig sind, so wie dies für nicht-tumoröse Zellen meistens unter hypoxischen Bedingungen der Fall ist. Da die Charakterisierung von GLUT1 signifikant vorangeschritten ist, ist zu hoffen, dass bald GLUT1 inhibierende Agentien generiert werden könnten (239; 240). Die Erfahrungen, die aus der Behandlung von Patienten mit (genetisch determinierter) GLUT1 Defizienz gewonnenen wurden, könnten dabei eingesetzt werden, die potentiellen Nebenwirkungen einer anti-GLUT1 Therapie bei Patienten zu überwinden (241). Studien zum Gebrauch von Glukose-Analoga oder -Konjugaten, die leicht in Zielzellen durch GLUT1 aufgenommen werden, zeigen zudem, dass ein ausreichend großer Unterschied der GLUT-1 Expression zwischen gesunden Geweben und Tumoren die Anwendung von GLUT1 als therapeutisches Target erlaubt. Zum Beispiel wurde der in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eingesetzte Tracer [^{18}F]-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose (FDG) kürzlich in murinen Mammakarzinom-Modellen als radiomolekulare Therapieoption getestet und es konnte gezeigt werden, dass eine Dosierung bis zu 5 mCi nicht radiotoxisch für normale Organe war (242).

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine erhöhte GLUT1 Expression im HCC die Proliferation und Invasivität beeinflusst. Hiermit stellt GLUT1 ein potentielles innovatives Target dar und die GLUT1 Expression könnte ferner als diagnostischer Marker dienen, die Progression dieses hochmalignen Tumors vorherzusagen.

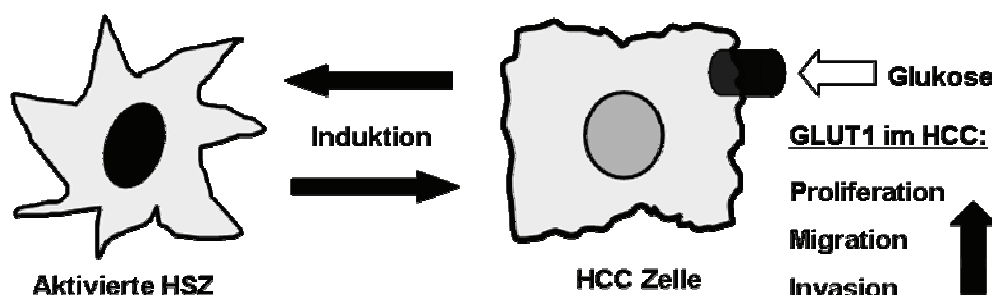


Abbildung 89. Eine verstärkte Expression des Glukosetransporters GLUT1 korreliert im HCC mit vermehrter Proliferation, Migration und Invasion (↑). Durch die Interaktion (↔) von aktivierten HSZ und HCC-Zellen kann eine verstärkte GLUT1 Expression im HCC induziert werden.

Nachfolgende Fragestellungen und Ziele, die sich aus der Identifizierung von GLUT1 als protumorigener Faktor ergeben

Wie bereits für andere Tumoren gezeigt, spielt der „Warburg Effekt“ eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, indem trotz aerober Bedingungen große Energiemengen durch die anaerobe Glykolyse bereitgestellt werden (243).

Durch die verminderte Laktatproduktion nach GLUT1 Suppression in HCC-Zellen konnte gezeigt werden, dass die aerobe Glykolyse von HCC-Zellen in Bezug auf die Glukoseversorgung auch von GLUT1 abhängig ist.

Um die supprimierende Wirkung der GLUT1 siRNAs und somit den anti-tumorigenen Effekt auch über einen längeren Zeitraum *in vivo* testen zu können, sollen GLUT1 siRNA Expressionsplasmide generiert werden. Mit diesen Expressionsplasmiden sollen HCC-Zellen stabil transfiziert und in Nacktmäuse injiziert werden.

Ebenso sollen GLUT1 siRNA exprimierende Adenoviren generiert werden. Durch eine Injektion der GLUT1 siRNA Adenoviren kann dann in Mäusen nach chemischer HCC-Induktion (244) der Einfluss von GLUT1 bei der Hepatokanzerogenese untersucht werden.

5.5 Zusammenschau und gemeinsame Bewertung der erzielten Ergebnisse

Die hepatische Fibrose ist durch die exzessive Produktion und Deposition extrazellulärer Matrix Komponenten charakterisiert. Die Aktivierung hepatischer Sternzellen (HSZ) spielt die entscheidende Rolle bei der Leberfibrogenese. Eine permanente Schädigung der Leber induziert die Aktivierung der HSZ bzw. hält diese aufrecht, wodurch die Fibrose letztendlich zu einer Zirrhose führt. Vereinfacht kann dieser Prozess als eine gestörte Wundheilung betrachtet werden und infolgedessen ist die Leberzirrhose der Hauptriskofaktor für das hepatozelluläre Karzinom anzusehen (*"Cancers are wounds that do not heal"*).

Das HCC ist sowohl infiltriert als auch eingekapselt durch aktivierte HSZ/Myofibroblasten. Das impliziert, dass aktivierte HSZ mit Karzinomzellen in allen Abschnitten der HCC-Entstehung und -Progression in enger Nachbarschaft assoziiert sind.

Unsere Arbeit zeigt die Bedeutung von aktivierten HSZ für die Tumorigenität von HCC-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Es sind jedoch weitere detaillierte Untersuchungen erforderlich, um den strukturellen und funktionellen Beitrag aktivierter HSZ zu diesem Prozess weiter aufzuklären.

Aktivierte HSZ stellen aufgrund ihrer zentralen Bedeutung sowohl bei der Leberfibrosierung als auch bei der Hepatokanzerogenese ein sehr attraktives therapeutisches Target dar.

Wichtig ist es dabei jedoch im Auge zu behalten, dass die Prozesse Leberfibrose und -Kancerogenese bzw. auch Leberregeneration und -entzündung zwar grundsätzlich etwas zeitlich versetzt, aber nicht streng sequentiell, sondern in der Folge zeitlich parallel stattfinden. Deswegen ist es immens wichtig bzw. eine notwendige Voraussetzung, dass präventive oder therapeutische Strategien diese Mechanismen gleichsinnig - im Sinne des Patienten positiv - beeinflussen bzw. zumindest, wenn sie nur einen Mechanismus beeinflussen, die anderen nicht tangieren oder gar verschlimmern. Es gibt mehrere Beispiele, dass dies nicht der Fall ist und entsprechend potentielle therapeutische Ansätze bislang nicht zum klinischen Einsatz kommen konnten. Eines der prominentesten ist TGF- β . Dies ist einer der potentesten bekannten profibrogenen Faktoren, auch in Bezug auf die Leberfibrose. Trotz zahlreicher *in vitro* oder in Tiermodellen etablierter Therapieansätze TGF- β und damit auch die Leberfibrosierung zu hemmen, verbietet sich daher ein Einsatz bei Menschen, da auch gezeigt werden konnte, dass genetisch manipulierte Mäuse, denen ein Rezeptor für TGF- β fehlt (*TGF- β Receptor Type II* defiziente Mäuse) bei hepatischer Schädigung vermehrt und beschleunigt Lebertumoren bilden (245).

Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass KGF/FGF7 ein potentielles Therapeutikum darstellen könnte, die Leberregeneration zu fördern oder die Lipidakkumulation bei der nicht-alkoholischen Lebererkrankung (NAFLD) zu hemmen. Die hier dargestellten Ergebnisse, die zeigen, dass der einzige bislang identifizierte KGF Rezeptor FGFR2-IIIb im HCC als Tumorsuppressor wirkt, sind eine wichtige und zentrale Voraussetzung, um diesen therapeutischen Ansatz weiterzuverfolgen. Basierend auf dem Wissen, dass (i) KGF im Verlauf der Leberfibrosierung *de novo* und progredient gesteigert exprimiert wird und (ii) KGF im Modell der partiellen

Hepatektomie und *in vitro* die Proliferation von Hepatozyten fördert, hätte man eher spekulieren können, dass KGF via FGFR2-IIIb das HCC-Wachstum fördert, wodurch sich ein potentieller therapeutischer Einsatz verboten hätte.

Hinsichtlich der Funktion des durch unsere Arbeitsgruppe identifizierten und charakterisierten Proteins MIA2 lagen bislang keinerlei Informationen vor. Hier konnten wir nun zeigen, dass MIA2 das HCC-Wachstum *in vivo* und *in vitro* fördert. Interessanterweise induzieren aktivierte HSZ in geschädigtem Lebergewebe jedoch die MIA2 Expression und in ersten, bislang unveröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, konnten wir einen inhibitorischen Effekt von MIA2 auf die Proliferation von aktivierten HSZ zeigen. Basierend auf diesen Daten kann man spekulieren, dass über MIA2 ein negativer Feedback Mechanismus auf (die Proliferation von) aktivierte(n) HSZ ausgeübt wird und sich das sekretierte Protein MIA2 in rekombinanter Form auch als potentielles Therapeutikum für Leberfibrosierung eignen könnte, was zudem auch noch die HCC-Entstehung und -Progression hemmen würde.

Bislang wurden v.a. Mechanismen diskutiert, wie aktivierte HSZ HCC-Zellen beeinflussen bzw. ausgeschlossen werden konnte, dass sie dies direkt oder indirekt via sekretierte Faktoren tun. Ein weiteres Beispiel im Zusammenhang mit dem „Warburg Effekt“ sind hierbei auch unsere Ergebnisse, die zeigen, dass aktivierte HSZ *in vitro* die Expression von mehreren Enzymen der Kaskade der anaeroben Glykolyse induzieren. Dass GLUT1 im HCC *in vitro* die Tumorigenität von HCC-Zellen fördert und *in vivo* mit Proliferation und Invasivität der HCC-Zellen korreliert, unterstreicht die Bedeutung dieser HSZ-Wirkung auf HCC-Zellen.

Die Ergebnisse dieses Projektteils weisen jedoch auch auf die wechselseitige Interaktion von aktivierten HSZ und HCC-Zellen hin, d.h. dass HCC-Zellen in aktivierten HSZ die Expression prokanzerogener Faktoren fördern. So fanden wir in HCC-Zellen im Vergleich zu primären Hepatozyten eine via anaerobe Glykolyse medierte deutlich gesteigerte Laktatproduktion. Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe in bislang unveröffentlichten Untersuchungen zeigen, dass Laktat in aktivierten HSZ die MMP-1 und Hyaluronsäure Expression induziert.

MMP-1 spielt bei zahlreichen Tumoren eine wichtige Rolle bei der Metastasierung (246-248). Im HCC wird MMP-1 quantitativ vorwiegend von aktivierten HSZ

exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass erhöhte MMP-1 Spiegel mit einem schlechteren Überleben der HCC-Patienten korrelieren (249).

Wir konnten zudem zeigen, dass konditioniertes Medium von HCC-Zellen *in vitro* die Proliferation und die Apoptoseresistenz von aktivierten HSZ fördert (250). Basierend auf der Annahme, dass aktivierte HSZ protumorigene Faktoren sezernieren, sind HCC-Zellen somit auch durch die Steigerung der Anzahl aktivierter HSZ in der Lage ihre Tumorigenität (indirekt) zu steigern.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit wesentlich neue Erkenntnisse zur Bedeutung von aktivierten HSZ für die HCC-Entstehung und -Progression gewonnen werden. Ferner gelang es sowohl das spezifisch in der Leber exprimierte Protein MIA2, als auch den FGF-Rezeptor FGFR2-IIIb als Tumorsuppressoren im HCC zu identifizieren, wodurch sich wichtige Konsequenzen hinsichtlich der therapeutischen Anwendung von MIA2 bzw. KGF, das FGFR2-IIIb als exklusiven Rezeptor benutzt, ergeben. Der Transporter GLUT1 wurde dagegen als Promotor für das HCC-Wachstum und Invasivität identifiziert. Dies und weitere Ergebnisse konnten zudem erste Hinweise auf die Bedeutung des „Warburg Effektes“ beim HCC liefern und weitere Mechanismen der wechselseitigen Interaktion zwischen aktivierten HSZ und HCC-Zellen aufzeigen. Insgesamt ergeben sich hieraus wertvolle Hinweise auf innovative therapeutische und diagnostische Ansätze für diesen hochmalignen Tumor.

6 Literaturverzeichnis

1. Bosch FX, Munoz N. Epidemiology of hepatocellular cancer. In: Bansch P, Keppler D, and Weber G, eds. Liver cell cancer. Kluwer Academics, 1989:3-12.
2. Deuffic S, Poynard T, Buffat L, Valleron AJ. Trends in primary liver cancer. *Lancet* 1998;351:214-215.
3. El Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-750.
4. El Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2462-2467.
5. Kubicka S, Rudolph KL, Hanke M, Tietze MK, Tillmann HL, Trautwein C, Manns M. Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver* 2000;20:312-318.
6. Taylor-Robinson SD, Foster GR, Arora S, Hargreaves S, Thomas HC. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94. *Lancet* 1997;350:1142-1143.
7. Tommaso S, Pietro A, Angelo A, Antonio A, Antonio C, Maria C, Domenico G, Onofrio GM, Roberto M, Cinzia M, Giampaolo P, Gian LR, Rosa GS, Gloria T, Maria ET, Erica V, Giovanni G. Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol* 1998;29:944-952.
8. Kubicka S, Rudolph KL, Hanke M, Tietze MK, Tillmann HL, Trautwein C, Manns M. Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver* 2000;20:312-318.
9. Hellerbrand C, Hartmann A, Richter G, Knöll A, Wiest R, Schölmerich J, Lock G. Hepatocellular Carcinoma in Southern Germany: Epidemiological and Clinicopathological Characteristics and Risk Factors. *Digestive Diseases* 2001;19:345-351.
10. Kaiser A, Wohlfarth M, Schönekeas H, Gebhardt C, Wunsch PH. Klinische Pathologie der primären Leberkarzinome. Eine Studie über 352 Erkrankungen. *Chir Praxis* 2001;59:579-590.
11. Kubicka S, Rudolph KL, Hanke M, Tietze MK, Tillmann HL, Trautwein C, Manns M. Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver* 2000;20:312-318.
12. El Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-750.
13. Allgaier HP. Das hepatozelluläre Karzinom. Bremen: Uni-Med Science, 2002.
14. Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press, 2000.
15. Kaiser A, Wohlfarth M, Schönekeas H, Gebhardt C, Wunsch PH. Klinische Pathologie der primären Leberkarzinome. Eine Studie über 352 Erkrankungen. *Chir Praxis* 2001;59:579-590.

16. Kubicka S, Rudolph KL, Hanke M, Tietze MK, Tillmann HL, Trautwein C, Manns M. Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver* 2000;20:312-318.
17. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:225-237.
18. El Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2462-2467.
19. Schoniger-Hekele M, Muller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenci P, Gangl A. Hepatocellular carcinoma in Austria: aetiological and clinical characteristics at presentation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:941-948.
20. Tommaso S, Pietro A, Angelo A, Antonio A, Antonio C, Maria C, Domenico G, Onofrio GM, Roberto M, Cinzia M, Giampaolo P, Gian LR, Rosa GS, Gloria T, Maria ET, Erica V, Giovanni G. Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol* 1998;29:944-952.
21. Vogel A, Kneip S, Barut A, Ehmer U, Tukey RH, Manns MP, Strassburg CP. Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene. *Gastroenterology* 2001;121:1136-1144.
22. Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology* 1999;29:697-702.
23. Kaiser A, Wohlfarth M, Schönekäs H, Gebhardt C, Wünsch PH. Klinische Pathologie der primären Leberkarzinome. Eine Studie über 352 Erkrankungen. *Chir Praxis* 2001;59:579-590.
24. Villanueva A, Newell P, Chiang D, Friedman S, Llovet J. Genomics and Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007;055-076.
25. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet Oncology* 2001;2:533-543.
26. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwigs-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. MANUAL - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Gastrointestinaler Tumoren: Primäre Lebermalignome. 7. Auflage ed. 2006.
27. Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:424-432.
28. Buell JF, Gross TG, Woodle ES. Malignancy after transplantation. *Transplantation* 2005;80:S254-S264.
29. Pinzani M. Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 1995;66:387-412.
30. Geerts A, Lazou JM, De Bleser P, Wisse E. Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology* 1991;13:1193-1202.
31. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38 Suppl 1:S38-S53.
32. Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 1999;31:1120-1130.

33. Hautekeete ML, Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch* 1997;430:195-207.
34. Pinzani M. Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 1995;66:387-412.
35. Geerts A, Lazou JM, De Bleser P, Wisse E. Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology* 1991;13:1193-1202.
36. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372.
37. Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004;48:509-517.
38. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392-401.
39. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 1996;76:69-125.
40. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Current Opinion in Genetics & Development* 2001;11:54-59.
41. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332-337.
42. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 1996;76:69-125.
43. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Current Opinion in Genetics & Development* 2001;11:54-59.
44. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867.
45. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.
46. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332-337.
47. Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol* 2002;17:623-637.
48. Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 2002;17:599-621.
49. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium. *Cancer Res* 1999;59:5002-5011.
50. Barcellos-Hoff MH, Ravani SA. Irradiated Mammary Gland Stroma Promotes the Expression of Tumorigenic Potential by Unirradiated Epithelial Cells. *Cancer Res* 2000;60:1254-1260.
51. Barcellos-Hoff MH. Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland. *Cancer Res* 1993;53:3880-3886.

52. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4966-4971.
53. Gleave ME, Hsieh JT, von Eschenbach AC, Chung LW. Prostate and bone fibroblasts induce human prostate cancer growth in vivo: implications for bidirectional tumor-stromal cell interaction in prostate carcinoma growth and metastasis. *J Urol* 1992;147:1151-1159.
54. Verona EV, Elkahoul AG, Yang J, Bandyopadhyay A, Yeh IT, Sun LZ. Transforming growth factor-beta signaling in prostate stromal cells supports prostate carcinoma growth by up-regulating stromal genes related to tissue remodeling. *Cancer Res* 2007;67:5737-5746.
55. Loizidou MC, Carpenter R, Laurie H, Cooper AJ, Alexander P, Taylor I. Growth enhancement of implanted human colorectal cancer cells by the addition of fibroblasts in vivo. *Br J Surg* 1996;83:24-28.
56. Dimanche-Boitrel MT, Vakaet L, Jr., Pujuguet P, Chauffert B, Martin MS, Hammann A, Van Roy F, Mareel M, Martin F. In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *Int J Cancer* 1994;56:512-521.
57. Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 2003;37:674-685.
58. Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:141-148.
59. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1015-1026.
60. Jung JO, Gwak GY, Lim YS, Kim CY, Lee HS. [Role of hepatic stellate cells in the angiogenesis of hepatoma]. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:142-148.
61. Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1835-1845.
62. Shimizu S, Yamada N, Sawada T, Ikeda K, Kawada N, Seki S, Kaneda K, Hirakawa K. In vivo and in vitro interactions between human colon carcinoma cells and hepatic stellate cells. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:1285-1295.
63. Haratake J, Scheuer PJ. An immunohistochemical and ultrastructural study of the sinusoids of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1990;65:1985-1993.
64. Haratake J, Hisaoka M, Yamamoto O, Horie A. An ultrastructural comparison of sinusoids in hepatocellular carcinoma, adenomatous hyperplasia, and fetal liver. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:67-70.
65. Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol* 1991;138:1233-1242.
66. Chau KY, Lily MA, Wu PC, Yau WL. Myofibroblasts in hepatitis B related cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 1992;45:446-448.

67. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Onishi S, Saibara T, Yamamoto Y, Hara H. Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;19:895-903.
68. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Onishi S, Saibara T, Yamamoto Y, Hara H. Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;19:895-903.
69. Faouzi S, Lepreux S, Bedin C, Dubuisson L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A, Rosenbaum J. Activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes. *Lab Invest* 1999;79:485-493.
70. Terada T, Makimoto K, Terayama N, Suzuki Y, Nakanuma Y. Alpha-smooth muscle actin-positive stromal cells in cholangiocarcinomas, hepatocellular carcinomas and metastatic liver carcinomas. *J Hepatol* 1996;24:706-712.
71. Nhieu JT, Brocheriou I, Preaux AM, Mallat A, Cherqui D, Zafrani ES, Mavrier P. Myofibroblasts and hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *J Hepatol* 1998;29:120-128.
72. Barcellos-Hoff MH, Aggeler J, Ram TG, Bissell MJ. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 1989;105:223-235.
73. Barcellos-Hoff MH. The Potential Influence of Radiation-Induced Microenvironments in Neoplastic Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1998;3:165-175.
74. Schmeichel KL, Weaver VM, Bissell MJ. Structural Cues from the Tissue Microenvironment Are Essential Determinants of the Human Mammary Epithelial Cell Phenotype. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1998;3:201-213.
75. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
76. Bosserhoff AK, Moser M, Buettner R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr Patterns* 2004;4:473-479.
77. Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Bruggert M, Ambrosius D, Palme S, Engh RA, Golob M, Breibach I, Buettner R, Voelter W, Holak TA, Bosserhoff AK. The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J* 2001;20:340-349.
78. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
79. Bosserhoff AK. Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. *Pigment Cell Research* 2005;18:411-416.
80. Bosserhoff AK, Buettner R. Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). *Histol Histopathol* 2002;17:289-300.
81. Bosserhoff AK, Moser M, Buettner R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr Patterns* 2004;4:473-479.
82. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.

83. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
84. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
85. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
86. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2:REVIEWS3005.
87. Ingersoll RG, Paznekas WA, Tran AK, Scott AF, Jiang G, Jabs EW. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations. *Cytogenet Cell Genet* 2001;94:121-126.
88. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization. *Molecular Cell* 2000;6:743-750.
89. Kostrzewa M, Muller U. Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mamm Genome* 1998;9:131-135.
90. McKeehan WL, Wang F, Kan M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;59:135-176.
91. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:139-149.
92. Keating MT, Escobedo JA, Williams LT. Ligand activation causes a phosphorylation-dependent change in platelet-derived growth factor receptor conformation. *J Biol Chem* 1988;263:12805-12808.
93. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989;58:575-606.
94. Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci* 1999;4:D165-D177.
95. Lin HY, Xu J, Ischenko I, Ornitz DM, Halegoua S, Hayman MJ. Identification of the cytoplasmic regions of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 which play important roles in induction of neurite outgrowth in PC12 cells by FGF-1. *Mol Cell Biol* 1998;18:3762-3770.
96. Osterhout DJ, Ebner S, Xu J, Ornitz DM, Zazanis GA, McKinnon RD. Transplanted oligodendrocyte progenitor cells expressing a dominant-negative FGF receptor transgene fail to migrate in vivo. *J Neurosci* 1997;17:9122-9132.
97. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:139-149.
98. Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen MM, Daugherty C, Ornitz DM, Leder P. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* 1994;8:3045-3057.
99. Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5082-5087.

100. Naski MC, Ornitz DM. FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci* 1998;3:d781-d794.
101. Xiao S, Nalabolu SR, Aster JC, Ma J, Abruzzo L, Jaffe ES, Stone R, Weissman SM, Hudson TJ, Fletcher JA. FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nat Genet* 1998;18:84-87.
102. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez dM, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der KT, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1955-1959.
103. Huang X, Yu C, Jin C, Kobayashi M, Bowles C, Wang F, McKeegan WL. Ectopic Activity of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 in Hepatocytes Accelerates Hepatocarcinogenesis by Driving Proliferation and Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis. *Cancer Res* 2006;66:1481-1490.
104. Savagner P, Valles AM, Jouanneau J, Yamada KM, Thiery JP. Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 1994;5:851-862.
105. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropoulos S, McKeegan WL. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* 1993;13:4513-4522.
106. Bernard-Pierrot I, Ricol D, Cassidy A, Graham A, Elvin P, Caillault A, Lair S, Broet P, Thiery JP, Radvanyi F. Inhibition of human bladder tumour cell growth by fibroblast growth factor receptor 2b is independent of its kinase activity. Involvement of the carboxy-terminal region of the receptor. *Oncogene* 2004;23:9201-9211.
107. Finch PW, Rubin JS. Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:812-824.
108. Steiling H, Muhlbauer M, Bataille F, Scholmerich J, Werner S, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol* 2004;165:1233-1241.
109. Steiling H, Wustefeld T, Bugnon P, Brauchle M, Fassler R, Teupser D, Thiery J, Gordon JL, Trautwein C, Werner S. Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration. *Oncogene* 2003;22:4380-4388.
110. Steiling H, Muhlbauer M, Bataille F, Scholmerich J, Werner S, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol* 2004;165:1233-1241.
111. Warburg O. *The Metabolism of Tumors*. London: Constable and Co., 1930.
112. Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006;66:8927-8930.
113. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-314.
114. Garber K. Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1805-1806.
115. Pessin JE, Bell GI. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol* 1992;54:911-930.
116. Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, Seino S, Bell GI. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional

- characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* 1990;265:13276-13282.
117. Waddell ID, Zomerschoe AG, Voice MW, Burchell A. Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT 2. *Biochem J* 1992;286 (Pt 1):173-177.
 118. Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 1994;219:713-725.
 119. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007;53:233-256.
 120. Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* 2002;35:9-26.
 121. Brown RS, Wahl RL. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer* 1993;72:2979-2985.
 122. Mellanen P, Minn H, Grenman R, Harkonen P. Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int J Cancer* 1994;56:622-629.
 123. Nagase Y, Takata K, Moriyama N, Aso Y, Murakami T, Hirano H. Immunohistochemical localization of glucose transporters in human renal cell carcinoma. *J Urol* 1995;153:798-801.
 124. Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, Slater G, Weiss A, Burstein DE. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer* 1998;83:34-40.
 125. Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 1996;56:1164-1167.
 126. Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M. Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 2005;14:3857-3864.
 127. Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 2006;281:977-981.
 128. Napier I, Ponka P, Richardson DR. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood* 2005;105:1867-1874.
 129. Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 1997;276:1709-1712.
 130. Wilson RB, Roof DM. Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet* 1997;16:352-357.
 131. Hugo-Wissemann D, Anundi I, Lauchart W, Viebahn R, de Groot H. Differences in glycolytic capacity and hypoxia tolerance between hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology* 1991;13:297-303.
 132. Kong YH, Han CJ, Lee SD, Sohn WS, Kim MJ, Ki SS, Kim J, Jeong SH, Kim YC, Lee JO, Cheon GJ, Choi CW, Lim SM. [Positron emission tomography with fluorine-18-

- fluorodeoxyglucose is useful for predicting the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma]. *Korean J Hepatol* 2004;10:279-287.
133. Khan MA, Combs CS, Brunt EM, Lowe VJ, Wolverson MK, Solomon H, Collins BT, Di Bisceglie AM. Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:792-797.
 134. Grobholz R, Hacker HJ, Thorens B, Bannasch P. Reduction in the expression of glucose transporter protein GLUT 2 in preneoplastic and neoplastic hepatic lesions and reexpression of GLUT 1 in late stages of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1993;53:4204-4211.
 135. Roh MS, Jeong JS, Kim YH, Kim MC, Hong SH. Diagnostic utility of GLUT1 in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1315-1318.
 136. Su TS, Tsai TF, Chi CW, Han SH, Chou CK. Elevation of facilitated glucose-transporter messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1990;11:118-122.
 137. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:223-230.
 138. Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 1996;56:1164-1167.
 139. Zimmerman RL, Fogt F, Burke M, Murakata LA. Assessment of Glut-1 expression in cholangiocarcinoma, benign biliary lesions and hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2002;9:689-692.
 140. Zimmerman RL, Burke M, Young NA, Solomides CC, Bibbo M. Diagnostic utility of Glut-1 and CA 15-3 in discriminating adenocarcinoma from hepatocellular carcinoma in liver tumors biopsied by fine-needle aspiration. *Cancer* 2002;96:53-57.
 141. Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 2002;62:6674-6681.
 142. Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:3735-3739.
 143. Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 2002;276:24-31.
 144. Kojima J, Nakamura N, Kanatani M, Omori K. The glycosaminoglycans in human hepatic cancer. *Cancer Res* 1975;35:542-547.
 145. Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zoller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993;177:443-455.
 146. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24.
 147. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* 2006;66:632-637.

148. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Sivridis E. Lung Cancer: A Comparative Study of Metabolism Related Protein Expression in Cancer Cells and Tumor Associated Stroma. *Cancer Biol Ther* 2007;6.
149. Schnabl B, Choi YH, Olsen JC, Hagedorn CH, Brenner DA. Immortal activated human hepatic stellate cells generated by ectopic telomerase expression. *Lab Invest* 2002;82:323-333.
150. Ryan CM, Carter EA, Jenkins RL, Sterling LM, Yarmush ML, Malt RA, Tompkins RG. Isolation and long-term culture of human hepatocytes. *Surgery* 1993;113:48-54.
151. Pahernik SA, Thasler WE, Mueller-Hoecker J, Schildberg FW, Koebe HG. Hypothermic storage of pig hepatocytes: influence of different storage solutions and cell density. *Cryobiology* 1996;33:552-566.
152. Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Scholmerich J, Hellerbrand C. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006;45:520-528.
153. Liedtke C, Zschemisch NH, Cohrs A, Roskams T, Borlak J, Manns MP, Trautwein C. Silencing of caspase-8 in murine hepatocellular carcinomas is mediated via methylation of an essential promoter element. *Gastroenterology* 2005;129:1602-1615.
154. Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, Ferry G, Tucker G, Poupon MF, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:7234-7243.
155. Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, Ferry G, Tucker G, Poupon MF, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:7234-7243.
156. Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, Ferry G, Tucker G, Poupon MF, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:7234-7243.
157. Shukla V, Coumoul X, Deng CX. RNAi-based conditional gene knockdown in mice using a U6 promoter driven vector. *Int J Biol Sci* 2007;3:91-99.
158. Rohl T, Kurreck J. RNA interference in pain research. *J Neurochem* 2006;99:371-380.
159. Coumoul X, Shukla V, Li C, Wang RH, Deng CX. Conditional knockdown of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e102.
160. Hellerbrand C, Amann T, Schlegel J, Wild P, Bataille F, Spruss T, Hartmann A, Bosserhoff AK. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2007.
161. Sobin LH, Wittekin C. UICC: TNM Classification of Malignant Tumors. 6 ed. New York: Willey-Liss, 2002.
162. Kulesza P, Torbenson M, Sheth S, Erozan YS, Ali SZ. Cytopathologic grading of hepatocellular carcinoma on fine-needle aspiration. *Cancer* 2004;102:247-258.
163. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:12093-12101.

164. Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 2007;46:823-830.
165. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
166. Hellerbrand C, Bataille F, Schlegel J, Hartmann A, Muhlbauer M, Scholmerich J, Buttner R, Hofstadter F, Bosserhoff AK. In situ expression patterns of melanoma inhibitory activity 2 in healthy and diseased livers. *Liver International* 2005;25:357-366.
167. Coumoul X, Li W, Wang RH, Deng C. Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e85.
168. Liedtke C, Zschemisch NH, Cohrs A, Roskams T, Borlak J, Manns MP, Trautwein C. Silencing of caspase-8 in murine hepatocellular carcinomas is mediated via methylation of an essential promoter element. *Gastroenterology* 2005;129:1602-1615.
169. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, McKeenhan WL. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* 1993;13:4513-4522.
170. Savagner P, Valles AM, Jouanneau J, Yamada KM, Thiery JP. Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 1994;5:851-862.
171. Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, Ferry G, Tucker G, Poupon MF, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:7234-7243.
172. Hellerbrand C, Muhlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F, Weiss T, Scholmerich J, Bosserhoff AK. Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2006;27:64-72.
173. Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, Ferry G, Tucker G, Poupon MF, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:7234-7243.
174. Mattei MG, Moreau A, Gesnel MC, Houssaint E, Breathnach R. Assignment by in situ hybridization of a fibroblast growth factor receptor gene to human chromosome band 10q26. *Hum Genet* 1991;87:84-86.
175. Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:15-21.
176. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:12093-12101.
177. Steiling H, Muhlbauer M, Bataille F, Scholmerich J, Werner S, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol* 2004;165:1233-1241.
178. Bernard-Pierrot I, Ricol D, Cassidy A, Graham A, Elvin P, Caillault A, Lair S, Broet P, Thiery JP, Radvanyi F. Inhibition of human bladder tumour cell growth by fibroblast growth

- factor receptor 2b is independent of its kinase activity. Involvement of the carboxy-terminal region of the receptor. *Oncogene* 2004;23:9201-9211.
179. Bernard-Pierrot I, Ricol D, Cassidy A, Graham A, Elvin P, Caillault A, Lair S, Broet P, Thierry JP, Radvanyi F. Inhibition of human bladder tumour cell growth by fibroblast growth factor receptor 2b is independent of its kinase activity. Involvement of the carboxy-terminal region of the receptor. *Oncogene* 2004;23:9201-9211.
180. Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 2007;27:155-162.
181. Honma N, Genda T, Matsuda Y, Yamagiwa S, Takamura M, Ichida T, Aoyagi Y. MEK/ERK signaling is a critical mediator for integrin-induced cell scattering in highly metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* 2006;86:687-696.
182. Arsur M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2005;229:157-169.
183. Luedde T, Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver. *Liver Int* 2006;26:1163-1174.
184. Luedde T, Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver. *Liver Int* 2006;26:1163-1174.
185. Qiao L, Zhang H, Yu J, Francisco R, Dent P, Ebert MP, Rocken C, Farrell G. Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role. *Hum Gene Ther* 2006;17:280-290.
186. Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, Sakoda M, Kawaida K, Nuruki K, Aikou T. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol* 2005;12:800-807.
187. Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, Sakoda M, Kawaida K, Nuruki K, Aikou T. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol* 2005;12:800-807.
188. Ren Y, Poon RT, Tsui HT, Chen WH, Li Z, Lau C, Yu WC, Fan ST. Interleukin-8 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:5996-6001.
189. Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, Sakoda M, Kawaida K, Nuruki K, Aikou T. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol* 2005;12:800-807.
190. Neaud V, Faouzi S, Guirouilh J, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Human hepatic myofibroblasts increase invasiveness of hepatocellular carcinoma cells: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1997;26:1458-1466.
191. Mikula M, Proell V, Fischer AN, Mikulits W. Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF-beta dependent fashion. *J Cell Physiol* 2006;209:560-567.
192. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-218.
193. Neaud V, Faouzi S, Guirouilh J, Monvoisin A, Rosenbaum J. Hepatocyte growth factor secreted by human liver myofibroblasts increases invasiveness of hepatocellular carcinoma cells. *Curr Top Pathol* 1999;93:195-203.
194. Olaso E, Santisteban A, Bidaurrezaga J, Gressner AM, Rosenbaum J, Vidal-Vanaclocha F. Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 1997;26:634-642.

195. Theret N, Musso O, Turlin B, Lotrian D, Bioulac-Sage P, Campion JP, Boudjema K, Clement B. Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001;34:82-88.
196. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
197. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
198. Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:15225-15231.
199. Kalkuhl A, Kaestner K, Buchmann A, Schwarz M. Expression of hepatocyte-enriched nuclear transcription factors in mouse liver tumours. *Carcinogenesis* 1996;17:609-612.
200. Ishiyama T, Kano J, Minami Y, Iijima T, Morishita Y, Noguchi M. Expression of HNFs and C/EBP alpha is correlated with immunocytochemical differentiation of cell lines derived from human hepatocellular carcinomas, hepatoblastomas and immortalized hepatocytes. *Cancer Sci* 2003;94:757-763.
201. Xu L, Hui L, Wang S, Gong J, Jin Y, Wang Y, Ji Y, Wu X, Han Z, Hu G. Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3176-3181.
202. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 1996;84:575-585.
203. Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* 1998;18:3059-3068.
204. Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marques JM, Blanc JF, Bui H, Beaudoin JC, Franco D, Balabaud C, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet* 2002;32:312-315.
205. Werner S, Breeden M, Hubner G, Greenhalgh DG, Longaker MT. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol* 1994;103:469-473.
206. Baskin LS, Sutherland RS, Thomson AA, Nguyen HT, Morgan DM, Hayward SW, Hom YK, DiSandro M, Cunha GR. Growth factors in bladder wound healing. *J Urol* 1997;157:2388-2395.
207. Ishii H, Hattori Y, Itoh H, Kishi T, Yoshida T, Sakamoto H, Oh H, Yoshida S, Sugimura T, Terada M. Preferential expression of the third immunoglobulin-like domain of K-sam product provides keratinocyte growth factor-dependent growth in carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1994;54:518-522.
208. Itoh H, Hattori Y, Sakamoto H, Ishii H, Kishi T, Sasaki H, Yoshida T, Kono M, Sugimura T, Terada M. Preferential alternative splicing in cancer generates a K-sam messenger RNA with higher transforming activity. *Cancer Res* 1994;54:3237-3241.
209. Werner S, Weinberg W, Liao X, Peters KG, Blessing M, Yuspa SH, Weiner RL, Williams LT. Targeted expression of a dominant-negative FGF receptor mutant in the epidermis of transgenic mice reveals a role of FGF in keratinocyte organization and differentiation. *EMBO J* 1993;12:2635-2643.

210. Finch PW, Rubin JS. Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:812-824.
211. Savagner P, Valles AM, Jouanneau J, Yamada KM, Thiery JP. Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 1994;5:851-862.
212. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, McKeenan WL. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* 1993;13:4513-4522.
213. Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, Ferry G, Tucker G, Poupon MF, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:7234-7243.
214. Park S, Kim JH, Jang JH. Aberrant hypermethylation of the FGFR2 gene in human gastric cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:1011-1015.
215. Zhu X, Lee K, Asa SL, Ezzat S. Epigenetic silencing through DNA and histone methylation of fibroblast growth factor receptor 2 in neoplastic pituitary cells. *Am J Pathol* 2007;170:1618-1628.
216. Mattei MG, Moreau A, Gesnel MC, Houssaint E, Breathnach R. Assignment by in situ hybridization of a fibroblast growth factor receptor gene to human chromosome band 10q26. *Hum Genet* 1991;87:84-86.
217. Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:15-21.
218. Bernard-Pierrot I, Ricol D, Cassidy A, Graham A, Elvin P, Caillault A, Lair S, Broet P, Thiery JP, Radvanyi F. Inhibition of human bladder tumour cell growth by fibroblast growth factor receptor 2b is independent of its kinase activity. Involvement of the carboxy-terminal region of the receptor. *Oncogene* 2004;23:9201-9211.
219. Freeman KW, Gangula RD, Welm BE, Ozen M, Foster BA, Rosen JM, Ittmann M, Greenberg NM, Spencer DM. Conditional activation of fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1, but not FGFR2, in prostate cancer cells leads to increased osteopontin induction, extracellular signal-regulated kinase activation, and in vivo proliferation. *Cancer Res* 2003;63:6237-6243.
220. Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, Gentile T, Weisdorf D, Kewalramani T, Shea T, Yanovich S, Hansen K, Noga S, McCarty J, LeMaistre CF, Sung EC, Blazar BR, Elhardt D, Chen MG, Emmanouilides C. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med* 2004;351:2590-2598.
221. Senaldi G, Shaklee CL, Simon B, Rowan CG, Lacey DL, Hartung T. Keratinocyte growth factor protects murine hepatocytes from tumor necrosis factor-induced apoptosis in vivo and in vitro. *Hepatology* 1998;27:1584-1591.
222. Housley RM, Morris CF, Boyle W, Ring B, Biltz R, Tarpley JE, Aukerman SL, Devine PL, Whitehead RH, Pierce GF. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 1994;94:1764-1777.
223. Steiling H, Wustefeld T, Bugnon P, Brauchle M, Fassler R, Teupser D, Thiery J, Gordon JL, Trautwein C, Werner S. Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration. *Oncogene* 2003;22:4380-4388.

224. Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Nishimura D, Ichikawa T, Hamasaki K, Eguchi K. Bone marrow engraftment in a rodent model of chemical carcinogenesis but no role in the histogenesis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004;53:884-889.
225. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:223-230.
226. Grobholz R, Hacker HJ, Thorens B, Bannasch P. Reduction in the expression of glucose transporter protein GLUT 2 in preneoplastic and neoplastic hepatic lesions and reexpression of GLUT 1 in late stages of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1993;53:4204-4211.
227. Su TS, Tsai TF, Chi CW, Han SH, Chou CK. Elevation of facilitated glucose-transporter messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1990;11:118-122.
228. Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 1996;56:1164-1167.
229. Zimmerman RL, Fogt F, Burke M, Murakata LA. Assessment of Glut-1 expression in cholangiocarcinoma, benign biliary lesions and hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2002;9:689-692.
230. Zimmerman RL, Burke M, Young NA, Solomides CC, Bibbo M. Diagnostic utility of Glut-1 and CA 15-3 in discriminating adenocarcinoma from hepatocellular carcinoma in liver tumors biopsied by fine-needle aspiration. *Cancer* 2002;96:53-57.
231. Roh MS, Jeong JS, Kim YH, Kim MC, Hong SH. Diagnostic utility of GLUT1 in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1315-1318.
232. Cooper R, Sarioglu S, Sokmen S, Fuzun M, Kupelioglu A, Valentine H, Gorken IB, Airley R, West C. Glucose transporter-1 (GLUT-1): a potential marker of prognosis in rectal carcinoma? *Br J Cancer* 2003;89:870-876.
233. Oliver RJ, Woodward RT, Sloan P, Thakker NS, Stratford IJ, Airley RE. Prognostic value of facilitative glucose transporter Glut-1 in oral squamous cell carcinomas treated by surgical resection; results of EORTC Translational Research Fund studies. *Eur J Cancer* 2004;40:503-507.
234. Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006;66:8927-8930.
235. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:223-229.
236. Levitsky LL, Zheng Q, Mink K, Rhoads DB. GLUT-1 and GLUT-2 mRNA, protein, and glucose transporter activity in cultured fetal and adult hepatocytes. *Am J Physiol* 1994;267:E88-E94.
237. Zheng Q, Levitsky LL, Mink K, Rhoads DB. Glucose regulation of glucose transporters in cultured adult and fetal hepatocytes. *Metabolism* 1995;44:1553-1558.
238. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006;25:4633-4646.
239. Salas-Burgos A, Iserovich P, Zuniga F, Vera JC, Fischbarg J. Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys J* 2004;87:2990-2999.

240. Evans A, Bates V, Troy H, Hewitt S, Holbeck S, Chung YL, Phillips R, Stubbs M, Griffiths J, Airley R. Glut-1 as a therapeutic target: increased chemoresistance and HIF-1-independent link with cell turnover is revealed through COMPARE analysis and metabolomic studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007.
241. Evans A, Bates V, Troy H, Hewitt S, Holbeck S, Chung YL, Phillips R, Stubbs M, Griffiths J, Airley R. Glut-1 as a therapeutic target: increased chemoresistance and HIF-1-independent link with cell turnover is revealed through COMPARE analysis and metabolomic studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007.
242. Evans A, Bates V, Troy H, Hewitt S, Holbeck S, Chung YL, Phillips R, Stubbs M, Griffiths J, Airley R. Glut-1 as a therapeutic target: increased chemoresistance and HIF-1-independent link with cell turnover is revealed through COMPARE analysis and metabolomic studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007.
243. Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M. Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 2005;14:3857-3864.
244. Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Nishimura D, Ichikawa T, Hamasaki K, Eguchi K. Bone marrow engraftment in a rodent model of chemical carcinogenesis but no role in the histogenesis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004;53:884-889.
245. Kanzler S, Meyer E, Lohse AW, Schirmacher P, Henninger J, Galle PR, Blessing M. Hepatocellular expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor accelerates chemically induced hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2001;20:5015-5024.
246. Iida J, McCarthy JB. Expression of collagenase-1 (MMP-1) promotes melanoma growth through the generation of active transforming growth factor-beta. *Melanoma Res* 2007;17:205-213.
247. Bendardaf R, Buhmeida A, Ristamaki R, Syrjanen K, Pyrhonen S. MMP-1 (collagenase-1) expression in primary colorectal cancer and its metastases. *Scand J Gastroenterol* 2007;1-6.
248. Sato H, Takino T, Miyamori H. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* 2005;96:212-217.
249. Okazaki I, Wada N, Nakano M, Saito A, Takasaki K, Doi M, Kameyama K, Otani Y, Kubochi K, Niioka M, Watanabe T, Maruyama K. Difference in gene expression for matrix metalloproteinase-1 between early and advanced hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1997;25:580-584.
250. Wobser H, Dorn C, Weiss T, Amann T, Bollheimer C, Büttner R, Schölmerich J, Hellerbrand C. Lipid accumulation in hepatocytes induces activation and pro-fibrotic gene expression in hepatic stellate cells - A new in vitro model to study fibrogenesis in hepatic steatosis. 2007.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	mm	Millimeter
ad	zu	MMP	Matrixmetalloproteinase
al.	alii	min	Minuten
a.M.	am Main	MPI	Max-Planck-Institute
APS	Ammoniumperoxodisulfat	NIH	National Institutes of Health
arb.	arbiträr	neg.	negativ
BCA	Bicincholinsäure	OD	Optische Dichte
bp	Basenpaare	π	Kreiszahl (= 3,14159...)
BSA	Rinderserumalbumin	PBS	Phosphate buffered saline
bzw.	beziehungsweise	PCR	Polymerase chain reaction
°C	Grad Celsius	PDGF	Platelet Derived Growth Factor
ca.	circa	pH	pondus hydrogenii
cDNA	komplementärer DNA-Strang	r	Radius
Da	Dalton (= $1,66018 \times 10^{-24}$ g)	RNA	Ribonukleinsäure
d.h.	das heißt	RT	Raumtemperatur
DAPI	4,6 Diamidino-2-Phenylindol	s	Sekunde
dest.	destilliert	S.	Seite
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid	sog.	so genannt
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Tab.	Tabelle
DTT	Dithiothreitol	TAE	Tris Acetat EDTA
Ed.	Editoren	TE	Tris EDTA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure	TGF	Transforming Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	u.a.	unter anderem
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule	ÜN	über Nacht
evtl.	eventuell	Upm	Umdrehungen pro Minute
EZM	Extrazelluläre Matrix	UV	Ultraviolett(-Strahlung)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat	V	Volt
FGF	Fibroblast Growth Factor	v.a.	vor allem
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
FKS	Fötales Kälberserum	Vgl.	Vergleich
g	Gramm	Vol.	Volumen
h	Stunde	vs.	versus
HGF	Hepatocyte Growth Factor	v/v	Volumen pro Volumen
Hz	Hertz	w/v	Gewicht pro Volumen
IGF	Insulin Like Growth Factor	z.B.	zum Beispiel
kDa	Kilo-Dalton		
Ktrl.	Kontrolle		
l	Liter		
LB	Luria-Bertani		
M	Molar		
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase		
mA	Miliampere		
mCi	mili Curie		
mM	Milimolar		
μm	Mikrometer		

8 Anhang

8.1 Eigene Publikationen

■ Hellerbrand C, Amann T, Schlegel J, Wild P, Spruss T, Hartmann A, Bosserhoff AK:
The novel gene MIA2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma.
Gut. 2007 Sep 19; [Epub ahead of print]

Eingereichte Manuskripte:

■ Amann T, Bataille F, Spruss T, Wild P, Liedtke C, Mühlbauer M, Kiefer P, Trautwein C, Bosserhoff AK, Hellerbrand C:
Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb (FGFR2-IIIb) as tumor suppressor in hepatocellular carcinoma

■ Amann T, Spruss T, Bataille F, Mühlbauer M, Schölmerich J, Bosserhoff AK, Hellerbrand C:
Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma

■ Amann T, Maegdefrau U, Kreuz M, Hartmann A, Schölmerich J, Bosserhoff AK, and Hellerbrand C
GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis

■ Gäbele E, Mühlbauer M, Amann T, Paulo H, Johann M, Meltzer C, Wiest R, Wodarz N, Schölmerich J, Hellerbrand C:
Analysis of a functional promoter polymorphism of the MCP-1 gene in patients with spontaneous bacterial peritonitis

■ Wobser H, Dorn C, Weiss TS, Amann T, Bollheimer C, Büttner R, Schölmerich J, Hellerbrand C:
Lipid accumulation in hepatocytes induces activation and pro-fibrotic gene expression in hepatic stellate cells - A new in vitro model to study fibrogenesis in hepatic steatosis

8.2 Vorträge und Posterpräsentationen

2005:

■ Vortrag in der "General Session"

40th Annual Meeting Of The European Association For The Study Of The Liver

Paris, 13.-17. April 2005

T. Amann, T. Spruss, F. Bataille, M. Mühlbauer, J. Schölmerich and C. Hellerbrand:

Activated hepatic stellate cells promote growth of hepatocellular carcinoma

■ Posterpräsentation

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten

Köln, 14.-17. September 2005

T. Amann, T. Spruss, F. Bataille, M. Mühlbauer, J. Schölmerich, A. Bosserhoff, C. Hellerbrand:

Activated hepatic stellate cells promote growth and inhibit apoptosis of hepatocellular carcinoma

M. Mühlbauer, T. Amann, J. Schölmerich, A. Bosserhoff, C. Hellerbrand:

Keratinocyte Growth Factor (KGF) beeinflusst das Wachstum von Hepatom-Zellen *in vitro*

■ Vortrag

Forschungswochenende der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin I, Universität Regensburg

Neunburg v. Wald, 14.-15. Oktober, 2005

T. Amann, T. Spruss, F. Bataille, M. Mühlbauer, J. Schölmerich, A. Bosserhoff, C. Hellerbrand:

Aktivierte hepatische Sternzellen induzieren die Proliferation von HCC-Zellen *in vitro* und *in vivo*

2006:

■ Posterpräsentation

22. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber

Leipzig, 20.-21. Januar 2006

Posterpreis

T. Amann, T. Spruss, F. Bataille, M. Mühlbauer, J. Schölmerich, A. Bosserhoff, C. Hellerbrand:

Activated hepatic stellate cells promote growth and inhibit apoptosis of hepatocellular carcinoma

C. Hellerbrand, T. Amann, J. Schlegel, T. Spruss, F. Bataille, A. Hartmann, M. Mühlbauer, J. Schölmerich, A. Bosserhoff:

The novel gene MIA2 promotes progression of hepatocellular carcinoma

■ Vortrag

Forschungswochenende der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin I, Universität Regensburg
Wernberg, 13.-14. Oktober, 2006

T. Amann, T. Spruss, F. Bataille, C. Liedtke, M. Mühlbauer, C. Trautwein, A. Bosserhoff and C. Hellerbrand:

Regulation and Function of Function of Fibroblast Growth Factor Receptor 2IIIb (FGFR2-IIIb) in Hepatocancerogenesis

2007:

■ Posterpräsentation

23. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber
Göttingen, 26.-27. Januar 2007

T. Amann, T. Spruss, F. Bataille, C. Liedtke, M. Mühlbauer, C. Trautwein, A. Bosserhoff, C. Hellerbrand:

Regulation and function of Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb (FGFR2-IIIb) in hepatocancerogenesis

C. Hellerbrand, J. Schlegel, T. Amann, T. Spruss, U. Dierssen, A. Hartmann, F. Bataille, C. Trautwein, A. Bosserhoff:

HGF mediated downregulation of the novel gene MIA2 promotes progression of hepatocellular carcinoma

■ Vortrag

42th Annual Meeting Of The European Association For The Study Of The Liver
Barcelona, 11.-15. April 2007

T. Amann, T. Spruss, F. Bataille, C. Liedtke, M. Mühlbauer, C. Trautwein, A. Bosserhoff and C. Hellerbrand:

Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb (FGFR2-IIIb) as Tumor Suppressor in Hepatocancerogenesis

■ Posterpräsentation

Forschungswochenende der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin I, Universität Regensburg
Kreuth bei Rieden, 2.-3. November, 2006

T. Amann, A. Hartmann, A.-K. Bosserhoff, and C. Hellerbrand

GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis

8.3 Danksagung

Viele haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

... **Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff** und **Herrn PD Dr. Claus Hellerbrand** für die Möglichkeit dieser interessanten und spannenden Arbeit, für die anregenden Diskussionen, für ihre Geduld und das Vertrauen, für die Kongressbesuche und Fortbildungsveranstaltungen, für die dazu gewonnene naturwissenschaftliche und vor allem persönliche Erfahrung sowie für ihre freundschaftliche und offene Art.

... **Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann** für die angenehme Betreuung dieser Arbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät III und sein großes Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

... **Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter** und **Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich** für das Interesse an dieser Arbeit und die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Pathologie und in der Abteilung für Innere Medizin I am Klinikum der Universität Regensburg durchzuführen.

... **Frau PD. Dr. Frauke Bataille** und **Herrn Prof. Dr. Arndt Hartmann** für die pathologische Beantwortung der histologischen und immunhistologischen Fragestellungen.

... **Herrn Dr. Thilo Spruss** und seinen Mitarbeitern für das Management der Nacktmausversuche.

... **PD Dr. Marcus Mühlbauer** für die anregenden Diskussionen, für die gemeinsamen Kongressbesuche, für spannende Autofahrten und v. a. für seine „Weisheiten“.

... **Gertrud Lallinger** und **Jaqueline Schlegel** für all die wertvollen Tipps und Tricks im Alltag eines neuen Labors.

... der „**Lebergruppe**“: **Birgitta Ott-Rötzer**, **Christoph Dorn**, **Dr. Erwin Gäbele**, **Gabi Flossmann**, **Dr. Hella Wobser**, **Kornelia Elser**, **Marina Fink**, **Dr. Matthias Froh**, **Monika Artinger**, **Ruth Schewior**, **Dr. Peter Walbrun** und **Yvonne Egle** für die tatkräftige Unterstützung, die netten Gespräche, die Versorgung mit Energie in Form von Keksen, Kuchen,... und das tollste Arbeitsklima, das man sich nur vorstellen kann.

... der gesamten **Arbeitsgruppe Bosserhoff** und **allen Kollegen im H1** für die selbstverständliche Hilfe bei den verschiedensten Fragen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

... **meinen Eltern** für alles, was sie mir bisher ermöglicht haben.

... **meiner lieben Familie Andrea** und **Bastian** für die ständige Unterstützung und für die Entbehrungen. Schön, dass ich euch habe!

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)