

„Analyse
genomischer Imbalancen
in hepatozellulären Karzinomen
und präneoplastischen Leberläsionen“

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fataneh Niketeghad
geb. am 23.10. 60 in Boroujerd/Iran

Mainz, 2004

*Für Darja und
Ihr Lächeln*

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	4
Verzeichnis der Tabellen	6
Verzeichnis der Abkürzungen	7
1. Einleitung	9
1.1. Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	9
1.2. Ätiologie	9
1.2.1. Virale Infektionen	10
1.2.2. Aflatoxine	12
1.3. Morphologie	12
1.4. Molekulare Hepatokarzinogenese	15
1.4.1. Aktivierung von Protoonkogenen	15
1.4.2. Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen	16
1.4.3. Überexpression von Wachstumsfaktoren	17
1.5. Genomische Alterationen	18
1.5.1. Zytogenetische Analyse der HCCs	20
1.6. Problemstellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Versuchsmaterial	22
2.2. Isolierung genomischer DNA aus Frischgewebe	22
2.3. Isolierung genomischer DNA aus paraffineingebetteten Gewebe	23
2.4. Isolierung genomischer DNA aus Blut-Lymphozyten	23
2.5. Herstellung von Metaphasepräparaten	24
2.6. Giemsa-Färbung	25
2.7. Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)	26
2.8. DNA-Markierung durch Nick-Translation	26
2.9. Agarosegelelektrophorese	28
2.10. Dot-Blot	28
2.11. Denaturierung chromosomaler DNA	29
2.12. Hybridisierung	29
2.13. Nachweis der Reportermoleküle	30

2.14. Bilddokumentation	31
2.15. Bildverarbeitung	32
2.16. FISH-Analyse	33
2.17. "ATLAS" cDNA-Expressionsarrays	34
2.18. Herstellung einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde	34
2.19. Die Hybridisierung des cDNA-Expressionsarray	35
2.20. Puffer und Lösungen.....	36
2.21. Bezugsquellen	38
3. ERGEBNISSE	39
3.1. Vergleich der CGH mit einer zytogenetischen Analyse	39
3.2. Analyse genomischer Imbalancen in HCCs	41
3.2.1. CGH-Analyse	41
3.2.2. Zusammenfassung der CGH-Ergebnisse	48
3.2.3. Die Interphasen-FISH-Analyse	51
3.2.4. Atlas™ Human cDNA Expression Array	55
3.3. CGH-Analyse Cholangiozellulärer Karzinome (CCC)	57
3.3.1. Zusammenstellung der CGH-Analyse der CCCs	59
3.4. CGH-Analyse Präneoplastischer Läsionen (Dysplastische Knoten)	60
3.4.1. Zusammenstellung der CGH-Daten der Dysplastischen Knoten	62
4. Diskussion	63
4.1. Methodendiskussion	63
4.2. Genomische Imbalancen bei HCCs	64
4.2.1. Genomische Alterationen des HCC im Vergleich zu anderen Tumoren des Verdauungstraktes	65
4.3. Tumorgenese	66
4.4. Betroffene potentiell tumorrelevante Gene beim HCC	67
4.4.1. Genomische Verluste als Zeichen mögliche Tumor- Suppressor-Gene im HCC	68
4.4.2 Genomische Zugewinne als Hinweis auf potentielle Onkogene beim HCC	70

5. Zusammenfassung	74
6. Literaturverzeichnis	76
7. Anhang	103
8. Lebenslauf	111
9. Danksagung	113

Verzeichnis der Abbildung

Abb.1.1:	Schematische Darstellung eines morphologischen Konzeptes der schrittweisen humanen Hepatokarzinogenese	13
Abb.1.2:	Schematische Darstellung der funktionellen und morphologischen Korrelation der Ereignisse in der humanen Hepatokarzinogenese	14
Abb.1.3:	Schematische Darstellung der CGH-Methode	19
Abb. 3.1:	Zytogenetische Analyse der HAFL1-Zelllinie mittels Giemsa-Bandenfärbung bzw. CGH-Analyse	39 - 40
Abb. 3.2:	Überlagerungsaufnahmen von DNA aus Tumor #21- und Referenz-DNA-Hybridisierungen auf normalen Metaphasen	42
Abb. 3.3:	CGH-Durchschnittsprofile des Tumors #21	43
Abb. 3.4:	Darstellung genomischer Imbalancen bei Tumor #6 mit Hilfe der CGH-Analyse	44
Abb. 3.5:	Detektion chromosomaler Imbalancen durch CGH und digitale Bildanalyse in HCC # 10	45 - 46
Abb. 3.6:	Mittelwert der ermittelten Fluoreszenz-Ratio Profile nach der Hybridisierung mit DNA aus Tumor #10	47
Abb. 3.7:	Die Zusammenfassung der mit der CGH-Methode detektierten chromosomalen Imbalancen in 18 HCCs	48
Abb. 3.8:	Interphase FISH-Analyse von Tumor #6	52

Abb. 3.9:	CGH-Untersuchung und Interphase-FISH-Analyse von Tumor #8	54
Abb. 3.10:	cDNA-Expressionsarrays von Tumor #6	56
Abb. 3.11:	CGH-Analyse von CCC #4	58
Abb.3.12:	Chromosomale Lokalisationen genomischer Imbalancen bei CCCs	59
Abb. 3.13:	Genomische Makroimbalancen des Dysplastischen Knotens #2 detektiert durch die CGH-Analyse	61
Abb. 3.14:	Zusammenstellung der CGH-Analysen von 6 Dysplastischen Knoten	62
Abb.4.1:	Darstellung der häufig vorkommenden spezifischen Chromosomenrearrangements und potentiell betroffener tumorrelevanter Gene	67

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1:	Risikofaktoren des HCCs	10
Tab. 1.2:	Charakteristische Vertreter der Hepadnaviren	11
Tab. 3.1:	Genomische Imbalancen von HCCs und humanen Lebertumor-Zelllinien	49
Tab. 3.2:	Häufige genomische Imbalancen in humanen HCCs	50
Tab. 3.3:	Interphasen-FISH-Analyse.....	53
Tab. 3.4:	Gene mit erhöhter Expression und Lokalisation auf 1q, 8q oder X (Tumor #6)	57
Tab.3.5:	Genomische Imbalancen von präneoplastischer Läsionen	60

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
amp.	Amplifikation
BglI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus globigii</i> RUB 561
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
cDNA	complementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
chr.	Chromosom
Ci	Curie
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
del.	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Cpm	Zerfallimpulse pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	2`-desoxy-Adenosin 5`-triphosphat
dCTP	2`-desoxy-Cytidin 5`-triphosphat
dNTP	2`-desoxy-Nucleotid 5`-triphosphat
dTTP	2`-desoxy-Thymidin 5`-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Restriktionsenzym aus <i>Escherichia coli</i> B 55
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
evtl.	eventuell
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
H	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
Hind III	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenzae</i> Rd com-10
Hinf I	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenzae</i> Rf
IGF-II	Insulinlike Growth Factor II
IGF-II-R	Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II Rezeptor
Kb	Kilobasenpaare
LOH	Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)
M	Mol
Mbp	Megabasenpaare
min.	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Oligo[dT]	Oligodesoxythymidin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHA	Phythämagglutinin
Poly [A]	Polyadenosin
R	Rezeptor
RB	Retinoblastom

RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
Sat.	Satelliten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
SSC	Natriumchlorid-Natriumacetat-Lösung
SV40-T	Simian Virus 40 large T-antigen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1. Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Das HCC zählt weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren (Bosch, 1997). Es tritt beim Mann häufiger als bei der Frau (4:1) auf und verursacht weltweit schätzungsweise bis zu einer Million Todesfälle pro Jahr (Di Bisceglie et al., 1988). Das Erkrankungsalter steht im engen Zusammenhang mit dem Lebensraum und den Lebensbedingungen. In den Entwicklungsländern, in denen das HCC am häufigsten auftritt, liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter zwischen 20 und 40 Jahre. Die Gebiete mit der höchsten HCC-Häufigkeit sind Südostasien sowie große Teile des südlichen Afrikas. In diesen Gebieten kann die Erkrankungshäufigkeit bei über 120/100,000 pro Jahr liegen. Japan, die Länder Südeuropas (vor allem Italien und Spanien) und des Mittleren Ostens sind Gebiete mit intermediärer HCC-Häufigkeit. Regionen, in denen das HCC selten auftritt, sind die nördlichen Länder Europas, die USA und Südamerika, in denen die Rate unter 5/100,000 der Population liegen kann (Di Bisceglie et al., 1988). Neue Studien berichten jedoch über die wesentliche Zunahme des HCCs in den USA und in Europa (Taylor-Robinson et al., 1997; El-Serag und Mason, 1999).

1.2. Ätiologie

Das HCC ist einer der wenigen humanen Tumore, bei denen die zugrunde liegende Ätiologie in mehr als 80% der Fälle identifiziert werden kann. Es ist häufig mit chronischen Lebererkrankungen sowie der Leberzirrhose assoziiert (del Olmo et al., 1998). Die meisten ätiologischen Faktoren, wie die chronische Hepatitis (HBV und HCV), metabolische Leberkrankheiten (Hämochromatose) und chronischer Alkoholkonsum können gleichzeitig zur Leberzirrhose führen (Tiribelli et al., 1989; Schirmacher et al., 1993).

Entwicklungsländern mit einer HBV-Infektion korreliert (Wild und Hall, 2000). Das HBV ist der Hauptvertreter der Hepadnaviren, die eine eigene Familie von DNA-Viren bilden und sich von den Hepatitis-RNA-Viren unterscheiden. Hepadnaviren ähneln in vielen Details des Replikationszyklus den Retroviren und haben sich vermutlich aus den Retroviren entwickelt. Tab. 1.2. zeigt die verschiedenen bekannten Hepadnaviren. Drei sind Säugetierviren: Humanes-Hepatitis-B-Virus (HBV) (Galibert et al., 1979), Erdhörnchen Hepatitis B-Virus (GSHV) (Marion et al., 1980), Waldmurmeltier Hepatitis B-Virus (WHV) (Summers et al., 1978) und zwei sind Vogelviren: Enten-Hepatitis B-Virus (DHBV) (Mason et al., 1980), Reiher Hepatitis B-Virus (HHBV) (Sprengel et al., 1988). Genomgröße (3.0-3.3 kb), Genomorganisation, Replikationszyklus und Gen-Expressionsmuster sind ähnlich.

Tab.1.2. Charakteristische Vertreter der Hepadnaviren

HEPADNAVIREN	BEI MENSCHEN	BEI TIEREN
Orthohepadnaviren (infizieren Säugetiere)	Hepatitis-B-Virus (HBV)	Hepatitis-B-Virus des Erdhörnchens (GSHV) Hepatitis-B-Virus des Waldmurmeltieres (WHV)
Avihepadnaviren (infizieren Vögel)		Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV) Reiher-Hepatitis-B-Virus (HHBV)

Die Avihepadnaviren unterscheiden sich von den Orthohepadnaviren dadurch, dass ein Gen (X-Gen) fehlt, das vermutlich an der Tumorbildung beteiligt ist (Okuda, 2000). Das Genom des Hepatitis-B-Virus – wie das aller anderen Mitglieder der Familie – besteht aus einer teilweise doppelsträngigen DNA. Mehrere Subtypen der humanen HBV sind bekannt; sie sind durch Unterschiede in den viralen Oberflächenantigenen definiert.

Die HCV-Infektion ist zusammen mit der HBV-Infektion der wichtigste Risikofaktor des HCC. Neue Informationen belegen, dass die chronische Hepatitis C-Infektion bei 20-30% der Patienten zur Zirrhose und bei 1-5% der Patienten zur Entstehung eines HCC führt (Zeuzem, 2000). Das HCV ist ein RNA-Virus, dessen Genom aus ca. 10.000 Nucleotiden besteht und das zur Familie der Flaviviridae gehört. Dem HCV

fehlt das Integrationsvermögen in das Wirtsgenom; HCV übt sein onkogenes Potenzial möglicherweise indirekt aus (Montella et al., 2000). Kürzlich wurde über eine Interaktion des HCV-Core Proteins mit p53 berichtet; wahrscheinlich kann diese Art von Interaktion die transkriptionelle Aktivität von p53 während der HCV-Infektion modulieren und so zur Transformation der infizierten Zellen beitragen (Otsuka et al., 2000). Aber auch Interaktionen des HCV mit zahlreiche anderen tumorrelevanten Proteinen konnten *in Vitro* dargestellt werden.

1.2.2. Aflatoxine

Aflatoxine sind eine Gruppe von vier natürlich vorkommenden Mykotoxinen; das Aflatoxin B1 wird von *Aspergillus flavus* produziert, das hauptsächlich in unsachgemäß gelagerten Vorräten an Mais, Getreide und Erdnüssen vorkommt. Zahlreiche epidemiologische Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des HCCs und der Höhe der Aflatoxinaufnahme. Experimentelle Modelle und spezifische Biomarker für die Aflatoxinaufnahme haben diese Befunde bestätigt (Jackson und Groopman, 1999; Wild und Turner, 2001). Aflatoxin B1 wurde von Bressac et al. (1991), Hsu et al. (1991) und Aguilar et al. (1993) als Ursache der G zu T-Transversion am Codon 249 des p53-Gens beim HCC benannt. Yakicier et al. (2001) zeigten den Zusammenhang von homozygoter 16q-Deletion und R249S p53-Mutation in HCC, bei hoher Aflatoxinsaufnahme der Patienten. Aufgrund dieser Befunde wird die Aufnahme hoher Aflatoxin B1-Konzentration als ein wichtiger Risikofaktor für das HCC angesehen.

1.3. Morphologie

Das Hepatozelluläres Karzinom entwickelt sich wie viele andere Tumoren stufenweise und über mehrere Jahre hinweg. Die morphologische Veränderung während der Hepatokarzinogenese wurde in verschiedenen Tierversuchen ausführlich studiert (Schirmacher et al., 1991; Pitot, 1994; Sandergen, 1995; Farber, 1996; Grisham, 1997; Bannasch und Schröder, 2002). Im Gegensatz dazu konnte eine Definition humaner prämaligener Leberläsionen lange Zeit nicht erreicht werden. Mittlerweile konnte jedoch auch bezüglich humaner prämaligener Leberläsionen ein

vorläufiger Konsens erzielt werden. Diesem Konzept folgend sind Dysplastische Foci (DFs $\leq 0,1$ cm) und Dysplastische Knoten (DN, 0,1-2 cm) prämaligne Vorläuferlasionen (Abb. 1.1), die der HCC-Entwicklung vorausgehen (International Working Party, 1995; Hirohashi et al., 2000). Darüber hinaus wurden von einigen Autoren (Kondo et al., 1997) HCCs mit einem Durchmesser kleiner als 2 cm als „frühe“ HCCs bezeichnet, um diese von den voll entwickelten HCCs zu unterscheiden. Beim „frühen“ HCC ist der Tumor normalerweise hoch differenziert, befindet sich in einer langsamen Wachstumsphase und zeigt oft keine offensichtliche Invasivität.

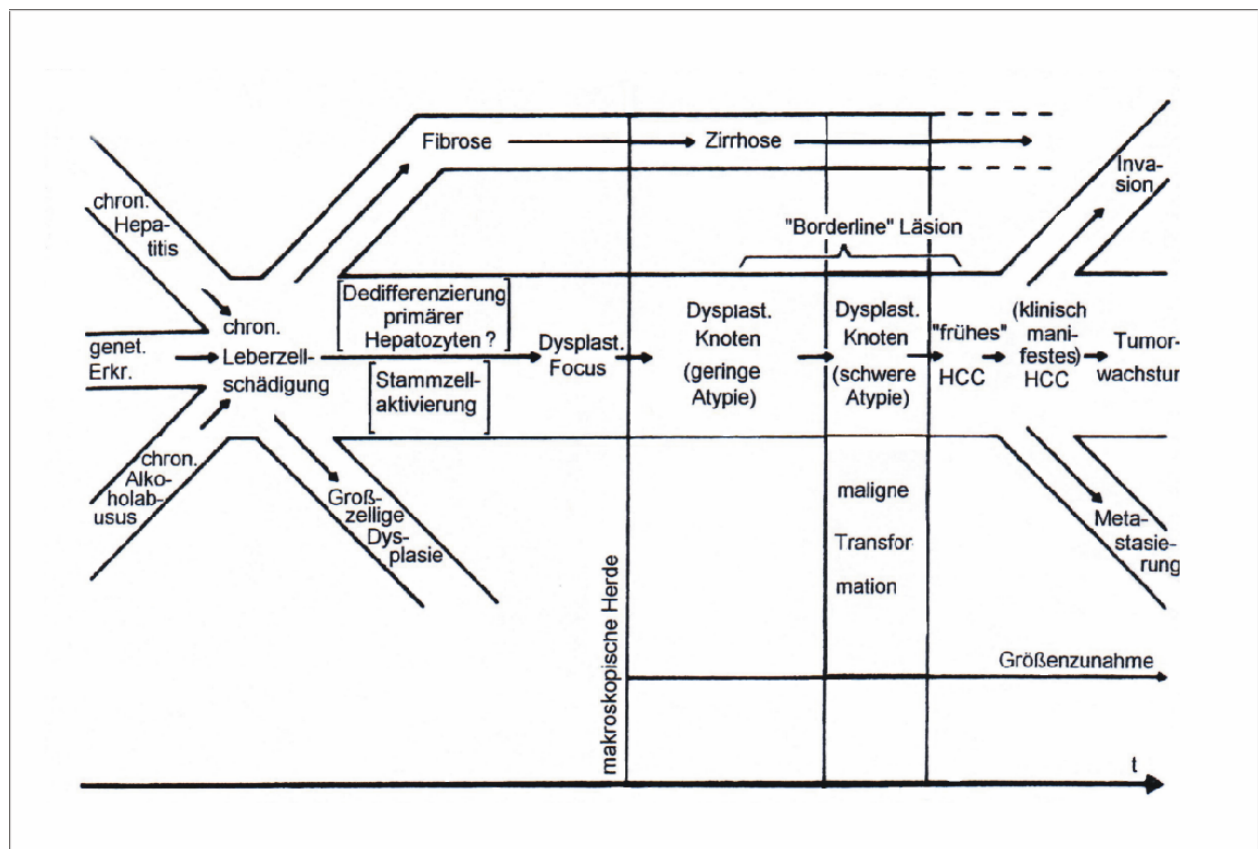


Abb.1.1: Schematische Darstellung eines morphologischen Konzeptes der schrittweisen humanen Hepatokarzinogenese (nach Schirmacher et al., 1992b).

Normalerweise entwickelt sich die humane Hepatokarzinogenese auf den histologischen Boden einer chronischen Lebererkrankungen, meist einer chronischen Hepatitis. Obwohl einige diese Ereignisse wie z.B. Mutationen von P53 (Bressac et al., 1991; Hsu et al., 1991), RB-1 (Murakami et al., 1991; Walker et al., 1991;

Nischida et al., 1992), und β -catenin (Marion, 1999), Überexpression von c-myc, cyclin D1, IGF-II, TGF- α und die Tumorsuppressor-Funktion der Insulin-like growth factor receptor IGF-II-R (Yamada et al., 1997) in den letzten Jahren geklärt wurden, gibt es noch keine genaue Kenntnis darüber, wie und in welcher Reihenfolge diese Faktoren auf der molekularen Ebene interagieren. Diese Daten zeigen jedoch, dass Alterationen mehrere Gene für den kompletten Prozess der Hepatokarzinogenese erforderlich sind.

In Abb. 1.2. werden die möglichen funktionellen und morphologischen Zusammenhänge während der mehrstufigen HCC-Entwicklung schematisch dargestellt.

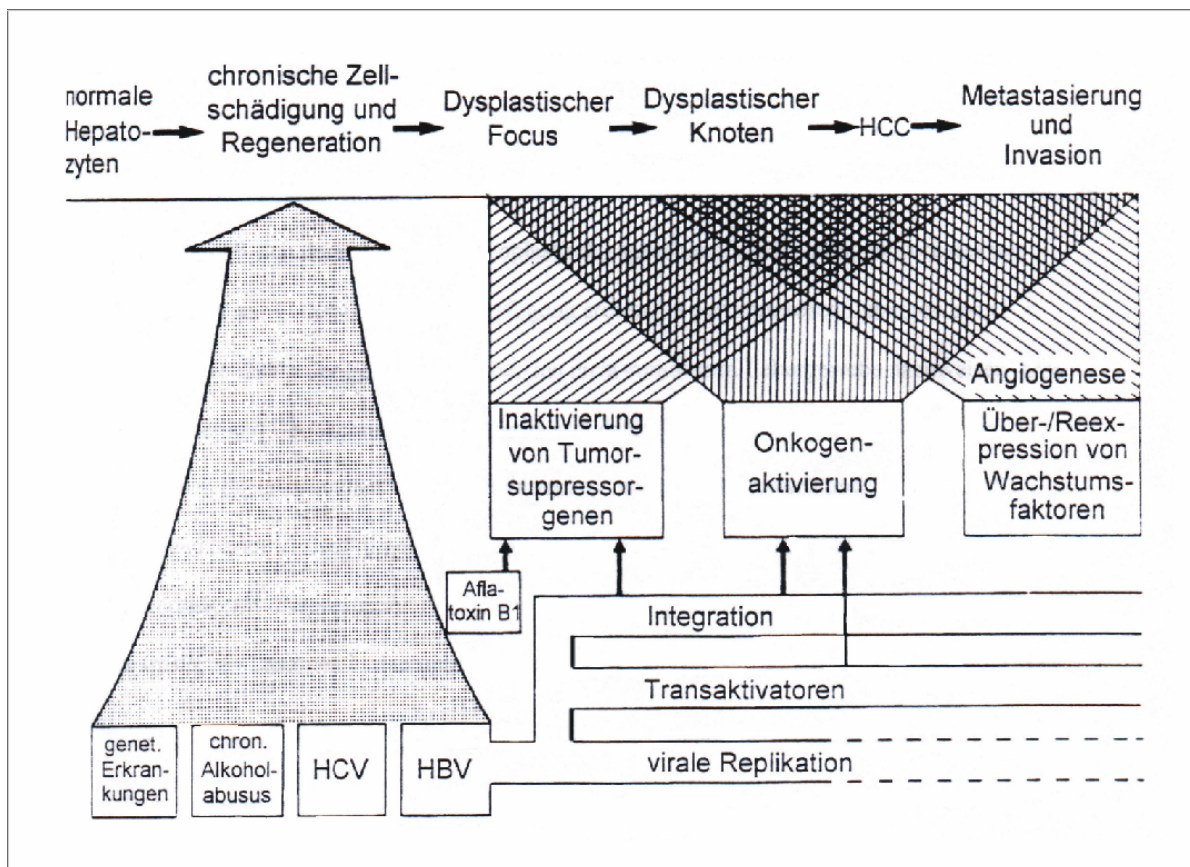


Abb.1.2: Schematische Darstellung der funktionellen und morphologischen Korrelation der Ereignisse in der humanen Hepatokarzinogenese (nach Schirmacher et al., 1992b).

1.4. Molekulare Hepatokarzinogenese

Zur vollständigen malignen Transformation ist die Anhäufung von mehreren genetischen oder epigenetischen Veränderungen von Genen notwendig, deren Produkte einen positiven oder negativen regulatorischen Effekt auf die normale Zellproliferation, Gewebedifferenzierung und Apoptose ausüben können. Diese molekularen Ereignisse, die mit der mehrstufigen HCC-Entwicklung in Korrelation stehen, betreffen verschiedene Gruppen von Faktoren (Schirmacher et al., 1993). Die Aktivierung von zellulären Protoonkogenen, Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen, Überexpression von Wachstumsfaktoren und Telomerase- Aktivierung sind bei der HCC-Entwicklung wichtige und nachgewiesene Ereignisse.

1.4.1. Aktivierung von Protoonkogenen

Protoonkogene sind zelluläre Gene mit normalen Zellfunktionen. Oft haben sie bedeutende regulatorische Funktionen und übernehmen eine wichtige Rolle bei der interzellulären Signaltransduktion. Verschiedene Alterationen wie Punktmutationen und Überexpressionen führen zur Konstitutiven Deregulation von Protoonkogenen und somit zu ihrer protumorigenen Aktivierung.

Mutationen von ras-Genen sind bei Nagern ausführlich charakterisiert worden (Reynolds et al., 1986, 1987). Bisherige Analysen zeigen eine vergleichsweise seltenes Auftreten von Ras-Gen-Mutationen beim humanen HCC (Geissler et al., 1997); im Gegensatz dazu wurden Mutationen von ras-Genen (K-Ras) in 66% der Cholangiozellulären Karzinome (CCCs) nachgewiesen (Tada et al., 1990).

Das c-myc-Protoonkogen kann durch Insertion eines Retrovirus, durch Chromosomentranslokation oder Genamplifikation aktiviert werden. Bei allen drei möglichen Mechanismen ist die Kontrolle der Expression des c-myc-Protoonkogens verloren gegangen. Die Überexpression des c-myc-Gens ist beim Waldmurmeltier bekannt (Hsu et al., 1988). Im Gegensatz dazu konnte die c-myc-Überexpression in humanen HCC bisher nur selten nachgewiesen werden (Geissler et al., 1997).

Beta-Catenin ist als Protein mit der cytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin assoziiert. Es übernimmt anscheinend zwei unterschiedliche Funktionen. Erstens spielt es eine entscheidende Rolle bei der Zell- Zell-Adhesion; zweitens ist es eine

wichtige Komponente des intrazellulären WNT-Signalübertragungsweges. Die Aktivierung dieses Signalübertragungsweges bewirkt eine interzelluläre/unklare β -Catenin-Akkumulation und die transkriptionelle Aktivierung von β -Catenin-abhängige Zielgenen. Beta-Catenin-Mutationen scheinen ein wichtiger Faktor in der Hepatokarzinogenese zu sein. Mutationsanalysen zeigten bei 26% der humanen HCCs onkogene Mutationen in der GSK-3 β -Bindungsstelle des β -Catenin-Gens, die mit einer nuklearen β -Catenin-Akkumulation einhergehen (de la Caste et al., 1998).

1.4.2. Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen

Tumor-Supressor-Gene sind an der Steuerung des Zellzyklus und an Transkriptionsvorgängen beteiligt und werden als negativ-regulatorische Zellproteine bezeichnet (Weinberg, 1991). Die meisten erblichen Tumore werden durch Störungen von Tumorsuppressor-Genen verursacht. Sie kontrollieren meist die Zellproliferation. Wenn ihre Funktion ausfällt, trägt dies zur malignen Transformation bei. Eine Reihe von Informationen deutet auf die Beteiligung von Tumorsuppressor-Genen an der Hepatokarzinogenese hin.

P53 ist das Prominenteste Tumorsuppressor-Gen. In mehr als der Hälfte der humanen Krebserkrankungen ist entweder das p53-Gen mutiert oder das P53-Protein ausgefallen. P53 ist ein nukleares Phosphoprotein. Eine DNA-Schädigung aktiviert P53, indem seine Konzentration in der Zelle beträchtlich zunimmt. Hierdurch wird die Apoptose induziert und/oder das Wachstum der Zellen gestoppt. Eine häufige Beteiligung von p53-Mutationen besonders am Codon 249, wurde bei HCCs in Zusammenhang mit einer Aflatoxin B1-Belastung nachgewiesen (Bressac et al., 1991; Hsu et al., 1991).

Das RB-Gen kodiert das nukleare Phosphoprotein pRB (Lee et al., 1987); pRB liegt während der G0/G1-Phase des Zellzyklus unterphosphoryliert vor und hemmt die Zellproliferation. Es wird vor dem Eintritt in die S-Phase (G1/S-Übergang) phosphoryliert (Weinberg, 1995), dephosphoryliert wird es dann wieder während der Mitose. Bestimmte virale Tumorantigene, wie SV40-T-Antigen und Adenovirus E1A, binden sich spezifisch an die nicht phosphorylierte Form von RB; dadurch wird seine Funktion als negativer Regulator der Zellproliferation inhibiert.

Deletionen im RB-1-Gen scheinen auch die HCC-Entwicklung zu begünstigen, und sind in einem signifikanten Prozentsatz an HCCs nachweisbar (Murakami et al.,

1991; Walker et al., 1991; Nischida et al., 1992).

Der IGF-II/mannose-6 Phosphat Rezeptor (IGF-II/M6PR) bindet sich an den IGF-II, einen Wachstumsfaktor für viele Tumoren, und induziert seine Degradation. Bei einem signifikanten Anteil verschiedener Tumore ist das IGF-II-R entweder mutiert oder völlig deletiert. Diese Tatsache deutet auf seine aktive Rolle als negativer Regulator des Zellwachstums hin. Eine Abnahme der IGF-II/M6PR-Expression in den JEG-3-Zellen verursacht einen Wachstumsvorteil und stimmt insofern mit der Hypothese überein, dass IGF-II-R als ein Inhibitor für das Tumorstadium fungiert (O’Gorman et al., 1999).

Inaktivierende Mutationen des IGF-II-R konnten in einem signifikanten Anteil des HCCs nachgewiesen werden (Yamada et al., 1997).

1.4.3. Überexpression von Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind multifunktionale Polypeptide, die den Zytokinen zugeordnet werden (Aaronson, 1991; Cross und Dexter, 1991). Sie werden von einer Zelle sezerniert, um auf sie selbst oder andere benachbarte Zelle einzuwirken. Es ist bekannt, dass die Überexpression der Wachstumsfaktoren bei der Karzinogenese häufig zu beobachten ist (Cullen et al., 1991). Der Wachstumsfaktor IGF-II und der Wachstumsfaktor TGF- α sind in etwa 30-50% der untersuchten HCCs überexprimiert und korrelieren mit einer vermehrten HCC-Entwicklung und/oder hoher Tumorstadium (Derynck et al., 1987; Schirmacher et al., 1992; Nong et al., 1997). Der Insulin like Growth Factor (IGF)-II ist ein hepatisch hochexprimierter fetaler Wachstumsfaktor, der kurz nach der Geburt herunterreguliert wird. IGF-II wird in vielen verschiedenen Tierversuchen der Hepatokarzinogenese überexprimiert (Fu et al., 1988; Ueno et al., 1988; Cariani et al., 1991; Schirmacher et al., 1991, 1992; Yang et al., 1993; Pasquinelli et al., 1994; Casola et al., 1995; Liu et al., 1997; Harris et al., 1998). Über seine Überexpression in HCC-Zelllinien, in mindestens 40% der humanen HCCs und möglicherweise auch in einzelnen prämaligen Läsionen wurde mehrfach berichtet (Cariani et al., 1988; D’Errico et al., 1994; Kulik et al., 1997; Li et al., 1997; Sohda et al., 1997; Aihara et al., 1998; Ng et al., 1998).

Der Transforming Growth Factor (TGF)- α ist ein kleines Polypeptid-Wachstumshormon und gehört zur Epidermal Growth Faktor (EGF)-Familie. TGF- α ist mitogen für viele Zelltypen, unter anderem auch für Hepatozyten, und ein wichtiger

positiver Wachstumseffektor bei malignen Zellen. Eine Überexpression von TGF- α wurde in vielen humanen HCCs und HCC-Zelllinien beobachtet (Derynck et al., 1987; Yeh et al., 1987; Hsia et al., 1992; Morimitsu et al., 1995).

1.5. Genomische Alterationen

Maligne Tumoren erwerben während ihrer Transformation und Progression oft multiple chromosomale Mutationen. Die Veränderungen, die ursächlich mit der neoplastischen Transformation assoziiert sind, kommen für gewöhnlich im neoplastischen Gewebe vor. Neoplasie-assoziierte Karyotypanomalien korrelieren nicht selten mit dem histopathologischen Subtyp einer Leukämie oder eines soliden Tumors und können deshalb differentialdiagnostische und prognostische Informationen beinhalten (Mitelman et al., 1997; Grimwade et al., 1998; Ong und Le Beau 1998). Die Tumorzytogenetik beschäftigt sich mit der Analyse dieser Karyotypanomalien, die auch die Identifizierung von Genen unterstützen können, welche ursächlich am neoplastischen Transformationsprozess sowie an der Progression der Erkrankung beteiligt sind.

Mittels der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH), einem 1992 beschriebenen Verfahren der molekularen Zytogenetik (Kallioniemi et al., 1992; Lichter und Cremer, 1992; Du Manoir et al., 1995), ist es erstmals möglich geworden, ein gesamtes Testgenom ohne Einsatz der Zellkultur auf chromosomale Imbalancen hin zu untersuchen. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte Test- und Kontroll-DNA in gleicher Menge auf normale Referenz-Metaphasenchromosomen unter Suppression der repetitiven Sequenzen hybridisiert werden (Abb. 1.3). Die Fluoreszenzintensitäten entlang der Chromosomen werden dann gemessen und ein Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten errechnet. Liegen DNA-Segmente der Test-DNA in höherer oder niedrigerer Kopienzahl als in der Kontroll-DNA vor, so lässt sich eine stärkere, bzw. schwächere Fluoreszenzintensität in dem entsprechenden Chromosomenabschnitt nachweisen.

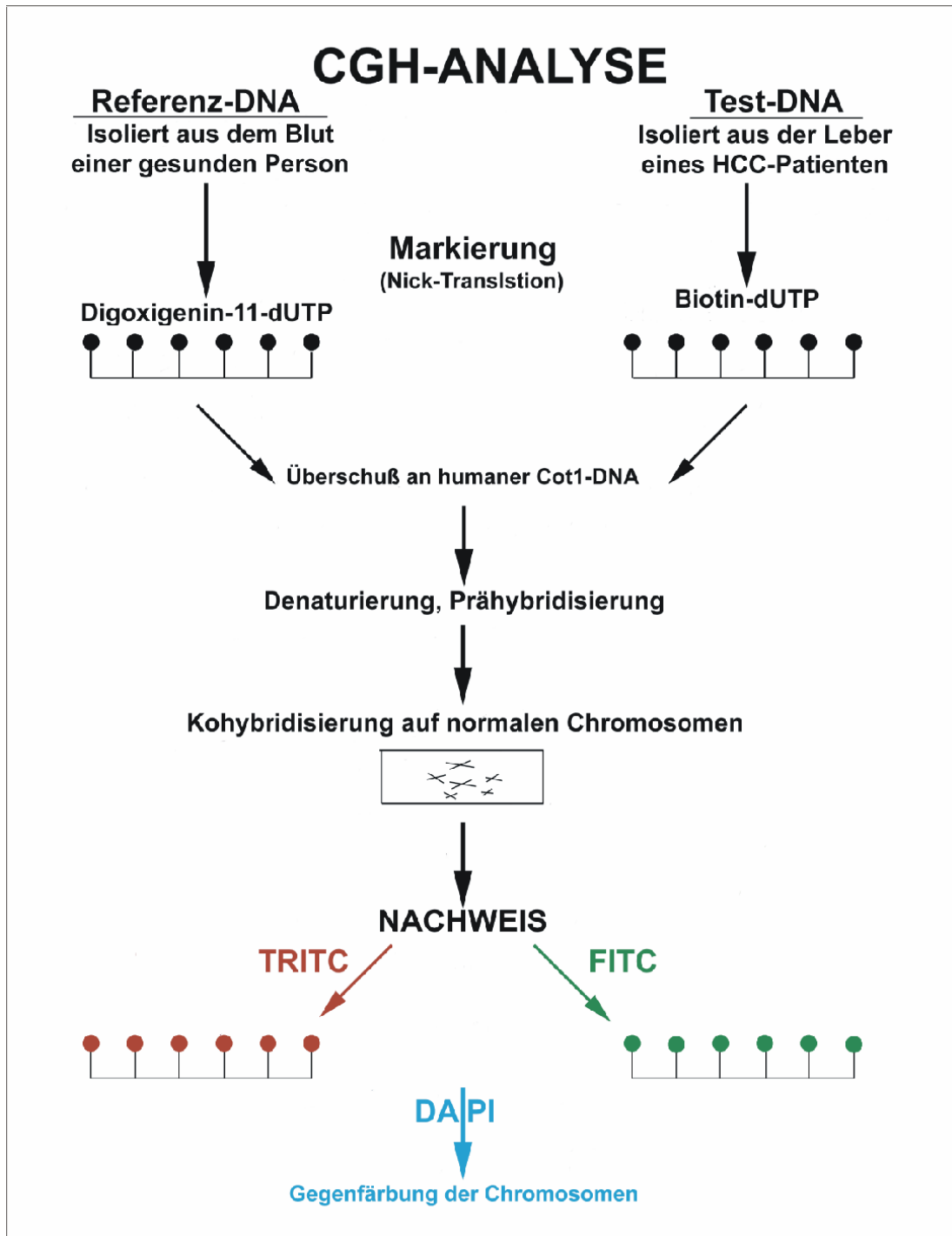


Abb.1.3: Schematische Darstellung der CGH-Methode.

Grün markierte Tumor-DNA (Test) und rot markierte Normal-DNA (Referenz) wurden Gleichzeitig auf normalen Metaphasechromosomen hybridisiert.

1.5.1. Zytogenetische Analyse der HCCs

Die Analyse der genomischen Alterationen beim HCC basiert entweder auf der CGH- oder LOH-Analysen. CGH-Analysen wurden in zahlreichen Studien durchgeführt. Dabei wurden über 600 HCCs analysiert (Kusano et al., 1999; Qin et al., 1999; Sakakura et al., 1999; Marchio et al., 1997, 2000; Wong et al., 1999, 2000; Guan et al., 2000; Tornillo et al., 2000; Balsara et al., 2001; Collonge-Rame et al., 2001; Rao et al., 2001; Shiraishi et al., 2001; Wang et al., 2001; Wilkens et al., 2001). Die unterschiedlichen Studien sind zum großen Teil übereinstimmend und vergleichbar. Sie zeigen ein ziemlich klares Bild von häufigen genomischen Alterationen in HCCs. Die häufigsten genomischen Vermehrungen wurden auf 1q (24-25; 45-80%) und 8q (21-24; 30-80%) detektiert, indem Verluste meist auf 17p (13; 35-65%), 4q (12-22; 30-50%), 16q (21-23; 30-50%) und 13q (13-14; 20-40%) beobachtet wurden. Zu den meisten dieser chromosomalen Regionen wurden speziell Tumor-relevanten-Gene wie p53 (17p), RB-1 (13q), E-cadherin (16q) und c-myc (8q) zugeordnet.

Die Loss Of Heterozygosity (LOH)-Analysen zeigen ein breites Spektrum von genomischen Alterationen beim HCC. Umfassende Allelotyp-Studien von HCCs (Nishida et al., 1992; Tsuda et al., 1990; 1992; Nagai et al., 1997; Piao et al., 1998; Okabe et al., 2000; Laurent-Puig et al., 2001) stimmen im wesentlichen auf häufige LOHs auf 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, und 17p überein. Die verschiedenen Studien sind jedoch wegen der Verschiedenheit der verwendeten LOH-Marker kaum vergleichbar. Infolgedessen sind auch die Resultate sehr variabel. Außerdem werden bei dieser Technik nur potentielle Tumorsuppressoren-Loci detektiert. Daher konnten LOH-Analysen bislang keinen signifikanten Beitrag zur Identifikation Tumor-relevanter Gene beim HCC leisten.

1.6. Problemstellung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung chromosomaler Imbalancen in HCCs. Da Lebertumorzellen nur selten und nur nach Kultivierung zytogenetischen Analysen zugänglich sind, sollten zunächst mit Hilfe der CGH HCC-spezifische chromosomale Imbalancen identifiziert werden. Ausschließend sollte die Validität der CGH-Ergebnisse anhand einer unabhängigen Methode (Interphase-FISH-Analyse) kontrolliert werden.

Ferner sollte ermittelt werden ob auch potentiell prä-maligne Leberläsione (Dysplastische Knoten) bereits Makroimbalancen aufweisen und ob sich diese von manifestierten HCCs unterscheiden.

Verglichen werden sollten die Ergebnisse beim HCC ferner mit denen der CGH-Analysen bei einem anderen Primären malignen Lebertumor, dem intrahepatischen Cholangiocarzinom (CCC). In Konsequenz sollten damit mögliche Tumortyp-spezifische oder auch Stadiums-abhängige genomische Alterationen ermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsmaterial

Bei den mit der CGH untersuchten HCC-Proben handelte es sich ausschließlich um Frischgewebe (-80°C), das zuvor einer genauen histologischen Analyse unterworfen wurden.

Histologische Einschlusskriterien waren:

- $\geq 90\%$ Tumoranteil
- definitives HCC
- $\leq 10\%$ Tumornekrose.

Im Gegensatz stammte alle mittels CGH untersuchten Proben von Dysplastischen Knoten bzw. Cholangiozellulären Karzinomen aus formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben.

2.2. Isolierung genomischer DNA aus Frischgewebe

Ein $0,5 \times 1 \times 1$ cm großes Gewebestück wurde bei -80°C in einem vorgekühlten Falcon-Röhrchen mit 5 ml DNA-Isolationspuffer mittels Ultra Turrax (Fabrikat IKA, Typ 18/19, Stufen) homogenisiert. Nach Zugabe von 5-8 ml (je nach Viskosität) DNA-Lysepuffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K wurde das Homogenisat 1-3 h lang bei 37°C inkubiert.

Die DNA-Aufreinigung erfolgte durch mehrfache Extraktionen (5x) mit Phenol (gesättigt in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) und Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 (Sambrook et al., 1989). Die gereinigte DNA-Lösung wurde mit 0,3 Vol. 4 M LiCl und 2,5 Vol. Ethanol (abs.) mindestens 15 min. lang, evtl. auch über Nacht, bei -20°C gefällt und bei 4°C und 13000 Upm (SK 15-Zentrifuge, 12145-Rotor, Sigma, St. Louis, MO., USA), 15 min. lang zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol bei RT gewaschen und bei 13000 Upm, in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator

SVC 100 H, Savant, Farmingdale, NY, USA) getrocknet und schließlich in 100-1000 µl TE-Puffer, pH 8.0 gelöst.

2.3. Isolierung genomischer DNA aus paraffineingebetteten Gewebe

Zur Extraktion von DNA aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe wurden aufgrund der Analyse der entsprechenden Schnittpräparate definierte Gewebeareale von insgesamt 30-60 jeweils 6 µm dicken Schnitten mit 1-2 ml Xylol 10 min. lang bei 37° C deparaffiniert. Nach zweimaliger Wiederholung des Entparaffinierungsvorganges folgten drei Waschschrte mit Methanol mit einer Dauer von jeweils 5 min. Anschließend wurde das Gewebe in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator SVC 100 H) lyophilisiert. Zur Dissoziation der DNA-Nukleohiston-Komplexe wurde Lyophilisat mit 1 ml 1M NaSCN über Nacht bei 37° C inkubiert (Speicher et al., 1993). Im Anschluß wurden die angedauten Proben zweimal mit 1 ml DNA-Isolation-Puffer bei RT gewaschen. Die nachfolgende enzymatische Verdauung erfolgte in 1,5 ml DNA-Isolutionspuffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K für 24 h in einem Schüttelwasserbad bei 55° C. Die Inkubation wurde nach Zugabe von weiteren 0,5 mg/ml Proteinase K für weitere 24 h fortgesetzt. Gegebenenfalls wurde die Inkubation durch weitere Zugabe von 0,5 mg/ml Proteinase K bis zur Gewebsauflösung fortgesetzt (bis zu 72 h). Die DNA wurde durch mehrfache Phenol-Chloroform-Extraktionen (5x) aufgereinigt und schließlich mit 2 Vol. Isopropanol und 1/20 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.2) gefällt. Die DNA wurde, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, gewaschen, getrocknet und anschließend in 100-1000 µl TE-Puffer gelöst.

2.4. Isolierung genomischer DNA aus Blut-Lymphozyten

Für die CGH-Experimente wird normale menschliche DNA als Kontroll-DNA benötigt. Zu diesem Zweck wurde männliches EDTA-Blut (10 ml) mit 30 ml kaltem Lysepuffer in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gemischt und zwischen 30 min. und 2 h auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde dann 10 min. lang mit 13000 Upm bei 4° C

zentrifugiert und das Sediment in 10 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert und mit 13000 Upm bei 4° C 10 min. lang zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorganges mit dem Lysepuffer wurde das Sediment in 5 ml SE-Puffer vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 3-5 µl Proteinase K (50 mg/ml) und 250 µl einer 20% SDS-Lösung wurde die Suspension 3 h lang (evtl. über Nacht) bei 55° C inkubiert. Dann wurden der Suspension 1,5 ml einer gesättigten NaCl-Lösung zugegeben und das ganze gemischt (15 sec, Vortex Genie 2, Bender u. Hobein, Zürich, Schweiz), 20 min. mit 4000 Upm bei RT abzentrifugiert und anschließend die DNA durch Zugabe von 2,5 Vol. absoluten Ethanol ausgefällt. Die DNA wurde, wie in Kapitel 2.2. beschrieben, gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl 10x TE-Puffer gelöst.

2.5. Herstellung von Metaphasepräparaten

Metaphasepräparate werden aus den Blut-Lymphozyten eines normalen männlichen Individuums gewonnen. Zu diesem Zweck wurden zu 5 ml einer Lymphozytenkultur-Lösung 300 µl PHA (Phytohämagglutinin, Gibco BRL, Eggenstein), 200 µl PWM (Pokeweed Mitogen, Gibco BRL) und 5-10 Tropfen Blut zugegeben und für 72 h bei 37° C im CO₂ Brutschrank inkubiert.

<u>Lymphozytenkultur-Ansatz</u>	<u>Volumen</u>
McCoy´s 5a Medium (Gibco)	500 ml
FKS (Gibco)	100 ml
Antibiotikum (Gibco)	5 ml
Bicarbonat (Gibco)	6 ml

Nach Zugabe von 140 µl Colcemid (10 µg/ml) und Inkubation für 30 min. bei 37° C wurde der Ansatz bei 1500 Upm zentrifugiert und das Pellet in 4 ml warmer (37° C), hypotoner, 0,56%iger KCl-Lösung resuspendiert. Die ersten Milliliter der KCl-Lösung wurden tropfenweise zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37° C wurden die Zellen erneut bei 1200 Upm für 10 min. zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden im verbliebenen Rest des Mediums resuspendiert. Zur

Fixation der Zellen wurde im Anschluss in die Kulturröhrchen bis zu 6 ml eines eiskalten Fixans (Methanol/Eisessig 3:1), dabei die ersten Milliliter tropfenweise, hinzugegeben und 10 min. bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation mit 1200 Upm bei 4° C für 10 min. wurde der Überstand verworfen und dieser Fixierungsschritt fünfmal wiederholt. Die Zellsuspension konnte für mehrere Monate bei -20° C gelagert werden.

Zur Herstellung der Metaphasenpräparate wurde die Zellsuspension 10 min. bei RT und 1200 Upm zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in ca. 10-15 Tropfen Fixans aufgenommen. Die Objektträger wurden über Nacht in 100% Ethanol inkubiert, luftgetrocknet und in Fixans getaucht. Auf feuchte Objektträger wurde ein Tropfen Zellsuspension aufgetropft und mit zwei Tropfen Fixans fixiert. Die Objektträger wurden anschließend über einem offenem 50° C warmen Wasserbad langsam getrocknet und über Nacht bei 60° C inkubiert. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgt in 100% Ethanol bei -20° C.

2.6. Giemsa-Färbung

Für die Giemsa-Färbung wurde das gemäß 2.5. hergestellte Chromosomenpräparat in Trypsin-Lösung (1 ml Trypsin in 99 ml 1 N NaCl-Lösung) 1-1,5 min. inkubiert und nachfolgend in 1 N NaCl-Lösung abgespült. Danach wurde der Objektträger einige Sekunden in der Luft geschwenkt und 10 min. in 6% Giemsa-Lösung gefärbt. Anschließend wurde das Präparat in destilliertem Wasser gespült, getrocknet und mit Eukitt (Amersham, Freiburg) eingedeckt. Falls die Chromosomen nur homogen gefärbt waren, wurde die Trypsinbehandlung verlängert. Bei blasig aufgequollenen Chromosomen wurde die Behandlung mit Trypsin verkürzt. Bei zu blasser Färbung wurde die Färbezeit verlängert (Vogel und Speit, 1985)

2.7. Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH erlaubt die Untersuchung der DNA von spezieskonformer oder –naher Herkunft auf chromosomale Zugewinne und/oder Verluste in Bezug zu normaler DNA. Es wurden Metaphase-Chromosomen aus Blutlymphozyten eines gesunden Probanden als Hybridisierungsgrundlage verwendet. Nach Hybridisierung gleicher Mengen der unterschiedlich markierten Test- und Kontroll-DNAs (1 µg) auf diesen Chromosomen folgten stringente Waschschriffe und die Detektion (Lichter et al., 1994).

2.8. DNA-Markierung durch Nick-Translation

Zur Markierung der Test- (HCC-) und Kontroll-DNA wurde die Nick-Translations-Methode (Rigby et al., 1977; Langer et al., 1981) verwendet. Die dUTP gebundene Haptene (Biotin-11-dUTP, bzw. Digoxigenin-11-dUTP) wurden als Reportermoleküle in die Test- bzw. Kontroll-DNA eingebaut. Hierzu wurde ein Nick-Translation-Kit (Vysis, Downers Grove, IL USA) verwendet. Zu einem Reaktionsansatz von 50 µl wurde 1 µg der Test- bzw. Kontroll-DNA hinzugegeben und 2 h lang bei 15° C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde der Ansatz 10 min. bei 70° C im Wasserbad inkubiert. Die Nick-Translation für indirekt markierte Sonden wurden wie folgt angesetzt:

Ansatz für Biotin-11-dUTP

<u>Volumen</u>	<u>Konzentration in Reaktion</u>
X µl DNA	1 µg
X µl dH ₂ O	Reaktionsgesamtvolumen: 50 µl
5 µl 10x Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.2, 10 mM MgSO ₄ , 1 mM DTT
10 µl dNTP-Mix je 0,1 mM ohne dTTP	jeweils 0,02 mM
6,66 µl 0,1 mM dTTP	0,013 mM

1,11 µl 0,3 mM Biotin-11-dUTP	0,0067 mM
10 µl Enzymmix	DNA Polymerase I und DNase I in unbekannter Zusammensetzung, 10% Glycerol, 10 mM Tris HCl pH7.2, 2 mM MgSO ₄ , 0,02 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA

Ansatz für Digoxigenin-11-dUTP

<u>Volumen</u>	<u>Konzentration in Reaktion</u>
X µl DNA	1 µg
X µl dH ₂ O	Reaktionsgesamtvolumen: 50 µl
5 µl 10x Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.2, 10 mM MgSO ₄ , 1 mM DTT
10 µl dNTP-Mix je 0,1 mM ohne dTTP	jeweils 0,02 mM
6,66 µl 0,1 mM dTTP	0,013 mM
3,33 µl 1:10 mit TE verdünntes Digoxigenin-11-dUTP	0,0067 mM
10 µl Enzymmix	DNA Polymerase I und DNase I in unbekannter Zusammensetzung, 10% Glycerol, 10 mM Tris HCl pH7.2, 2 mM MgSO ₄ , 0,02 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA

Die Kontrolle der Nick-Translations-Reaktion erfolgte in 1%igen TBE-Agarosegelen. Für den Einsatz in der CGH hat sich eine Fragmentlänge der markierten DNA zwischen 200-1000 bp als optimal erwiesen (Kallioniemi et al., 1994). Bei geeigneter Fragmentlänge der markierten DNA wurde die Nick-Translations-Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beendet.

Für die Markierung der DNA aus Dysplastischen Knoten und Cholangiozellulären Karzinomen wurde die direkte Markierungsmethode verwendet, indem Spectrum

Red-dUTP bzw. Spectrum Green-dUTP (Vysis; Zusammenstellung nicht publiziert) als Reporter-moleküle in die Kontroll- bzw. Test-DNA eingebaut wurden. Dabei sind die dUTP-Moleküle direkt an Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt.

2.9. Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen vertikalen Agarosegelen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE und als Molekulargewichtsstandard dienten die Molekulargewichtsmarker II, III und VI (Boehringer Mannheim, Mannheim). Die DNA-Längenstandards II und III entsprechen der DNA des Phagen Lambda nach Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym *HindIII* bzw. den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoR1*. Der DNA-Längenstandard VI entspricht dem Produkt des Plasmids pBR328 nach Hydrolyse mit den Restriktionsenzymen *BglI* und *HinfI*. Die Agarosegele wurden in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml in 1 x E-Puffer) gefärbt. Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe des „Gel Imaging Systems“ der Firma Cybertech (Berlin).

2.10. Dot-Blot

Von der biotinylierten Test-DNA und von der Dioxigenin-markierten Referenz-DNA wurden Verdünnungsreihen im DNA-Verdünnungspuffer hergestellt (1:100, 1:1000, 1:10000), entsprechend den Konzentrationen (2 ng/µl, 0,2 ng/µl, 20 pg/µl und 2 pg/µl) wird ein Mikroliter der entsprechenden Verdünnung auf einen Nitrozellulose-Filter aufgetragen und 1 h im Trockenschrank bei 80° C inkubiert. Danach erfolgt das Äquilibrieren des Filters für 1 min. im AP1-Puffer bei RT. Der Filter wurde nach 10-minütiger Blockierung mit dem AP2-Puffer bei RT für weitere 10 min. mit Konjugaten der alkalischen Phosphatase inkubiert. Der Filter wurde erst zweimal je 3 min. in AP1-Puffer und dann dreimal je 3 min. in dem AP3-Puffer auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden 10 ml NBT/BCIP-Lösung (NBT/BCIP-Färbelösung Stable Mix, Gibco BRL) auf den Filter gegeben und bis zu 1 h lang entwickelt. Zum Beenden der enzymatischen Reaktion wurde der Filter mit TE-Puffer gewaschen. Für eine in der CGH auswertbare Markierung sollten die Indigo-Farbstoffniederschläge

bei der Test-DNA bei einer DNA-Menge von 2 pg und bei der Referenz-DNA bei einer DNA-Menge von 20 pg erkennbar sein.

2.11. Denaturierung chromosomaler DNA

Die Denaturierung der DNA der Metaphasenchromosomen erfolgte für 1 min. in 0.07 M NaOH (Hankeln und Schmidt, 1987; Schmidt, 1992).

2.12. Hybridisierung

20 µl Digoxigenin-11-dUTP markierte Kontroll-DNA (400 ng), 20 µl Biotin-11-dUTP markierte Test-DNA (400 ng) und 30 µl unmarkierter *cot1*-DNA (30 µg) wurden mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (5,5 µl) und 2,545 Vol. Ethanol (154 µl) durchgemischt und mindestens 30 min. (evtl. über Nacht) bei -20° C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13000 Upm und 4° C wurde das DNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol bei 13000 Upm 20 min. gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge bei 4° C 15 min. lang getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 12 µl 100%igem deionisiertem Formamid 30 min. bei 37° C inkubiert. Nach Durchmischung der Probe mit 12 µl Mastermix (4x SSC, 20% Dextransulfat) und weiterer 15-minütiger Inkubation bei 37° C wurde die DNA-Lösung durch 10 minütige Inkubation bei 73° C denaturiert. Anschließend wurde der Hybridisierungsmix zum „Preannealing“ für zwei bis vier Stunden in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert. Im Anschluss daran wurde 12 µl Hybridisierungsmix auf vorbehandelte Chromosomen-Präparate aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Die CGH-Hybridisierung erfolgte durch eine 72-stündige Inkubation der Chromosomenpräparate bei 37° C in einer feuchten Kammer.

2.13. Nachweis der Reportermoleküle

Der dreimaligen Inkubation für je 5 min. mit einer 45° C warmen Lösung aus 50% Formamid, 2x SSC schloss sich noch ein Waschschrift für je dreimal 5 min. mit 0,1 x SSC bei 60° C an. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vor dem

Nachweis wurden die Präparate mit 200 µl Blockierungslösung (3% BSA in 4x SSC und 0,1% Tween-20) bedeckt, mit einem 22 x 60 mm großen Deckglas versehen und bei 37° C 30 min. lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Für den Nachweis der biotinylierten Test-DNA und der digoxigeninmarkierten Kontroll-DNA wurde auf jedes Präparat 125 µl Detektionslösung, die Fluoreszein- Avidin-dcs (FITC) 1mg/ml (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)) und anti-Dig-Rhodamin (TRITC) 200µg/ml (Boehringer Mannheim) enthielt, aufgebracht und 30 min. bei 37° C inkubiert. Danach schlossen sich drei fünfminutige Waschschriffe mit 4x SSC / 0,1% Tween 20 bei 45° C an.

Um eine spätere Identifizierung der Metaphasenchromosomen zu ermöglichen, erfolgte eine Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI (2,4 Diamino-Phenylindol)/Antifade (Oncor, Gaithersburg, USA, Zusammenstellung vom Hersteller nicht publiziert).

Die Bildaufnahme der hybridisierten Metaphasen erfolgte nacheinander bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen.

FLUOROCHROM	ANREGUNGSWELLENLÄNGE [NM]	EMISSIONSWELLENLÄNGE [NM]
TRITC	570	610
FITC	495	530
DAPI	400	460

2.14. Bilddokumentation

Die Präparate wurden unter einem Forschungsmikroskop (Leica DM RBE mit 63 x Plan APO und 100 x Fluoreszenz-Objektiven, 100 W Quecksilberdampf-UV-Lampe OSRAM HBO 100/W) beurteilt. Um die einzelnen Fluoreszenzfärbungen sichtbar zu machen, wurde ein spezielles Set mit drei Filtern (DAPI, FITC und TRITC) verwendet. Von jeder ausgewählten Metaphase wurden über spezifische Filter mit einer gekühlten hochauflösenden KOHU, 265-Graustufen CCD- (Charge Coupled Dreie) Videokamera mit der Fähigkeit zur Langzeit-Integration Grauwertbilder für jedes Fluorochrom einzeln aufgenommen und auf den angeschlossenen Computer übertragen. Mit Hilfe der Bildauswertungssoftware (Cytovision, Applied Imaging, Santa Clara, Calif., USA) wurden die drei zu einer Metaphase gehörenden Einzelbilder im TIFF-Format abgespeichert. Pro ausgewertetem Präparat wurden zwischen 10 bis 15 Metaphasen auf die oben beschriebene Weise aufgenommen. Bei der Auswahl der Metaphasen wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Auswahl von Metaphasen mit definiertem Kondensationsgrad
- gleichmäßige Hybridisierung aller Fluorochrome über die gesamte Metaphase
- wenig bzw. keine Hintergrundfärbung
- wenig bzw. keine Überlagerung der einzelnen Chromosomen einer Metaphase

Die Expositionszeiten für die einzelnen Fluorochrome wurden zu Anfang der Bildakquisition für jedes Präparat neu ermittelt, um optimale Werte für die weitere quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitäten zu erreichen. Dabei wurden die Expositionszeiten im DAPI-, FITC- und TRITC-Bild so gewählt, dass die Fluoreszenzintensitäten der Chromosomen in den linearen Bereich der Kameraempfindlichkeit fielen und eine Sättigung vermieden wurde. Die gewählten Zeiten und die optischen Einstellungen des Mikroskops wurden während der gesamten Aufnahmezeit des Präparates möglichst konstant gehalten. Die Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten auf den verschiedenen Chromosomen waren zum Teil optisch sichtbar, zur Quantifizierung und Identifikation von „low copy number changes“ war jedoch eine Quantifizierung mittels digitaler Bildanalyse erforderlich.

2.15. Bildverarbeitung

Die Weiterverarbeitung der aufgenommenen Metaphasen erfolgte mit Hilfe eines Programms (Dell Power Edge SP 590-2), das von du Manoir auf der Basis eines kommerziell erhältlichen Bildanalyseprogramms (TCL-image, TNO Institut für Angewandte Physik, Delft, Niederlande) entwickelt wurde. Die teils interaktive Programmführung gliederte diesen Auswertungsprozess in folgende Schritte:

- Korrektur der mechanischen Verschiebung der DAPI-, FITC- und TRITC-Bilder
- Segmentierung der Chromosomen und Bestimmung der Achse
- Identifizierung der einzelnen Chromosomen
- Berechnung der Fluoreszenzintensitäten für DAPI, FITC und TRITC senkrecht zur Chromosomenachse
- Kalkulation der Fluoreszenzverhältnisprofile von FITC/TRITC für jedes Chromosom

Im ersten Schritt wurde ein einzeln liegendes Chromosom in jedem der drei Bilder einer Metaphase ausgewählt. Dieses diente zur Korrektur der optischen Verschiebung der drei Einzelbilder gegeneinander, die durch das Weiterschieben des Filtersets bei der Aufnahme entstanden waren. Im nächsten Schritt erfolgte die Segmentierung der einzelnen Chromosomen anhand des DAPI-Bildes. Diese Segmentationsmaske diente im Folgenden zur Bestimmung der Chromosomenachse und der Berechnung des Pixel-zu-Pixel-Verhältnisse der FITC- zu den TRITC-Bildern. Die Identifizierung der einzelnen Chromosomen wurde an den DAPI-Bildern einer jeden Metaphase vorgenommen. Dazu wurden die Bilder invertiert, so dass die Bandenmuster Giemsa-gefärbten Chromosomen ähnelten. Im vierten Schritt erfolgte nach rechnerischer Elimination des Hintergrundes die Berechnung der Intensitäten der FITC- und TRITC-Fluoreszenzen senkrecht zur Achse jedes Chromosoms. Nachdem für jedes Chromosom ein Fluoreszenzverhältnisprofil errechnet und auf eine definierte Länge gestreckt oder gestaucht worden war, wurden im letzten Schritt die Profile für die einzelnen Chromosomen über alle Metaphasen berechnet. Das Ergebnis wurde als Durchschnitts-Verhältnisprofil auf der rechten Seite des zugehörigen Chromosomenideogramms aufgetragen.

Die vertikale Linie in der Mitte des CGH-Profiles steht für einen balancierten Zustand von genomischer DNA. Die linke und die rechte Linie bezeichnen den unteren und den oberen Schwellenwert. Im Falle eines Gewinns oder Verlust werden diese Schwellenwerte, unter der Aufnahme eines diploiden Chromosomensatzes im

Ausgangsmaterial, über- bzw. unterschritten, wenn die Veränderungen in mehr als 50% der Testzellen vorhanden sind (der Wert 1,25 wird im Fall einer Trisomie, der Wert 0,75 im Fall einer Monosomie erreicht). Da keine Angaben über die Ploidie des Genoms im Probenmaterial vorlagen, wurden diese theoretischen Grenzwerte gewählt. Diese Grenzwerte basieren auf die Untersuchungen von du Manoir et al. (1995) und Benz et al. (1995) an Material von akuten, myeloischen Leukämien mit bekanntem Karyotyp. Jedoch ist die Sensitivität auf Kosten einer höheren Spezifität im Erkennen von unbalancierten Veränderungen, die in weniger als 50% der analysierten Zellen auftreten, eingeschränkt.

Als Gewinne chromosomaler Regionen wurden alle Abweichungen des Fluoreszenzverhältnisprofils gewertet, die den oberen Schwellenwert erreichten oder überschritten; analog wurden als Verluste alle Abweichungen gewertet, die den unteren Schwellenwert erreichten oder unterschritten. Als Entscheidungshilfe, ob es sich bei den beobachteten Schwankungen um signifikante Veränderungen handelt, stellt das Bildanalyseprogramm optional das Konfidenzintervall des Ratioverlaufes grafisch dar. In dieser Arbeit wurde ein Konfidenzintervall von 95% in den Fluoreszenz-Ratiodarstellungen eingefügt.

2.16. FISH-Analyse

Es wurde ein 50 µm dicker Schnitt aus einem eingefrorenen Gewebeblock in 500 µl 1 x PBS eingeführt und vorsichtig mit einer 20G-Kanüle und einer Spritze durch mehrmaliges Aufziehen homogenisiert. Nach 10 min. Zentrifugation bei 13000 Upm wurde das Sediment in 200 µl Verdauungslösung (2 µl Pepsin 10 mg/ml in 200 µl 0,01 M HCl) resuspendiert und 10 min. bei 37° C inkubiert. Die Pepsin-Verdauung wurde durch Zugabe von 2 µl 50 x TAE, pH 8.0 gestoppt. Die Zellkerne wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Präparate aufgetropft und durch 5-minütige Inkubation in 1% Paraformaldehyd (PFA) bei RT fixiert. Anschließend wurden die Präparate fünfmal in 1 x PBS sowie fünfmal in destilliertem Wasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100% Ethanol) je 2 min. dehydriert. Die Aufbewahrung erfolgt in 100% Ethanol bei -70° C. Für die Interphase FISH-Analyse wurden die Präparate erst luftgetrocknet und mit CEP DNA-FISH-Proben (Chromosome Enumeration DNA) oder LSI (locus specific identifier DNA probes) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37° C entsprechend den Angaben der Hersteller-Firma (Vysis).

2.17. "ATLAS" cDNA-Expressionsarrays

Zur Analyse der Expressionsmuster der HCCs mit Zugewinnen an genomischer DNA wurde die Hybridisierung eines "ATLAS" cDNA-Expressionsarrays mit markierter RNA aus Tumor #6 bzw. seinem korrespondierendem nichttumörösen Gewebe durchgeführt. Hierzu erfolgte die Extraktion der RNA unter Verwendung des RNeasy-Kits (Qiagen). Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurde der RNeasy-Midi-Kit verwendet. Anschließend wurde mRNA mit Hilfe des RNA Oligotex TM-Kits (Qiagen, Hilden) aus der Gesamt-RNA-Lösung isoliert.

2.18. Herstellung einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde

Zur Herstellung der radioaktiv markierten cDNA-Sonde für die Expressionsarray-Analyse wurde eine reverse Transkription der zu untersuchenden RNA durchgeführt. Für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde 1 µl Poly[A]⁺-RNA in 2 µl DEPC-H₂O mit 1 µl CDS-Primermix (10 x) versetzt und zwei min. bei 70° C denaturiert. Nach einer weiteren zweiminütigen Inkubation bei 50° C wurde die Suspension mit Transkriptionsmix vermischt und 20 min. bei 50° C inkubiert.

<u>Transkriptionsmix</u>	<u>Volumen</u>
5 x Reaktionspuffer	2 µl
10 x dNTP-Mix ohne ATP	1 µl
[α ³² P] dATP [3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml]	3,5 µl
DTT [100 mM]	0,5 µl
MMLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	8 µl

Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Terminierungsmix beendet. Die Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde erfolgte durch Übertragung der Suspension auf einer Chroma Spin-200 DEPC-H₂O-Säule und nachfolgendem Auftrag von 40 µl bzw. 250 µl H₂O. Die Elution der Sonde erfolgte in

vier Schritten mit jeweils 100 μl H_2O . Für ein auswertbares Hybridisierungsergebnis sollte die eingebaute Radioaktivität im Bereich von $2\text{-}5 \times 10^6$ cpm liegen.

2.19. Die Hybridisierung des cDNA-Expressionsarrays

Der Expressionsarray besteht aus zwei identischen Filtern mit cDNAs von 588 verschiedenen Genen und einer Reihe sogenannter Haushaltsgene. Zur Hybridisierung wurden erst die mit deionisiertem H_2O befeuchteten Filter in einer Hybridisierungsröhre mit 10 ml Hybridisierungspuffer (ExpressHyb, Clontech) bei 68°C für 30 min. prähybridisiert. Der radioaktiv markierten cDNA-Sonde wurde 1/10 Volumen an Denaturierungslösung (1 M NaOH, 10 mM EDTA) zugesetzt und 20 min. bei 68°C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 μl *cot*-1 DNA und 2 x Neutralisierungslösung (1 M NaH_2PO_4 ; pH 7.0) im gleichen Volumen der Markierungslösung wurde die Suspension für weitere 10 min. bei 68°C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml Hybridisierungsmix erfolgte die Hybridisierung des prähybridisierten Filters über Nacht bei 68°C . Nach der Hybridisierung wurden je drei Waschschriffe mit Lösung 1 (2 x SSC; 1% SDS) bzw. Lösung 2 (0,1 x SSC; 0,5% SDS) je 30 min. lang bei 68°C durchgeführt. Zum Nachweis wurden die so behandelten Filter in Klarsichtfolie verpackt und mit einem Röntgenfilm (Kodak XAR oder Fuji RX) und Verstärkerfolie bei -80°C in Abhängigkeit von der Signalintensität zwischen 30 min. und 14 Tagen exponiert.

Eine semiquantitative Auswertung der Signalintensität erfolgte am Phosphoimager StormTM 840 (Molecular Dynamics, Krefeld) unter Verwendung des Datenverarbeitungsprogramms ImageQuaNTTM, wobei die Hybridisierungsintensitäten beider Filter mit Hilfe von Haushaltsgenen aufeinander abgestimmt wurden.

2.20. Puffer und Lösungen

AP1-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7.5 0,1 M NaCl 2 mM MgCl ₂ 0,05% Triton X-100
AP2-Puffer	AP1-Puffer BSA (0,3 g auf 10 ml)
AP3-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 9.5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
Detektionslösung	10 µl anti-Dig-Rhodamin, 200 µg/ml 5 µl Fluorescein-Avidin, 1 mg/ml in 1000 µl 3% BSA/4xSSC/0,1% Tween
DNA-Verdünnungspuffer	6x SSC 0,1 mg/ml gescherte Lachssperma- DNA
Elektrophoresepuffer (10 x E-Puffer)	0,36 M Tris 0,3 M NaH ₂ PO ₄ 0,1 M Na ₂ EDTA
Ethidiumbromid- Färbelösung	5 µg Ethidiumbromid/ml in 1 x E-Puffer
gesättigte NaCl-Lösung	6 mM NaCl

Giemsa-Lösung	6 ml Giemsa-Stammlösung 5 ml Phosphatpuffer A 5 ml Phosphatpuffer B <i>aqua dest.</i> ad 100 ml
Lyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA
Phosphatpufferstammlösung A	45,36 g/l KH ₂ PO ₄
Phosphatpufferstammlösung B	59,34 g/l Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O
SE-Puffer	75 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8.0
Standard-Saline-Citrat-Puffer (20x SSC)	3 M NaCl 0,1 M Natriumcitrat
Stopplösung	20 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,5% Dextran
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM Na ₂ EDTA
Tris-Borat-EDTA-Puffer (20x TBE)	1,8 M Tris 1,8 mM Borsäure 25 mM Na ₂ EDTA 0,1% v/v Triton X-100

2.21. Bezugsquellen

Nicht aufgeführte Chemikalien der Qualitätsstufen "p.A." bzw. "reinst" wurden von den folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Schleicher & Schüll (Dassel), Difco (Missouri, USA), Dupont (Bad Homburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (USA).

Agarose No. A-687	Sigma
BSA	SigmaColcemid
Karyomax	Gibco BRL
DNase I	Sigma
Mineralöl	Sigma
3 MM-Papier	Schleicher & Schüll
Nitrozellulosefilter (BA85)	Schleicher & Schüll
Proteinase K	Merck
RNase A	Serva
Triton X-100	Boehringer Mannheim
Verstärkerfolie (Cronex Hi-Plus)	Dupont

3. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden HCCs in Hinsicht auf die genomischen Imbalancen mit Hilfe der CGH-Methode analysiert und es wurden genetische Aberrationen in Form von chromosomalen Zugewinnen und/oder Verlusten identifiziert. Ergänzend dazu führte die Analyse von prämaligen Leberläsionen zur Identifikation chromosomaler Regionen, die besonders früh im Karzinogeneseprozess alteriert sind.

3.1. Vergleich der CGH mit einer zytogenetischen Analyse

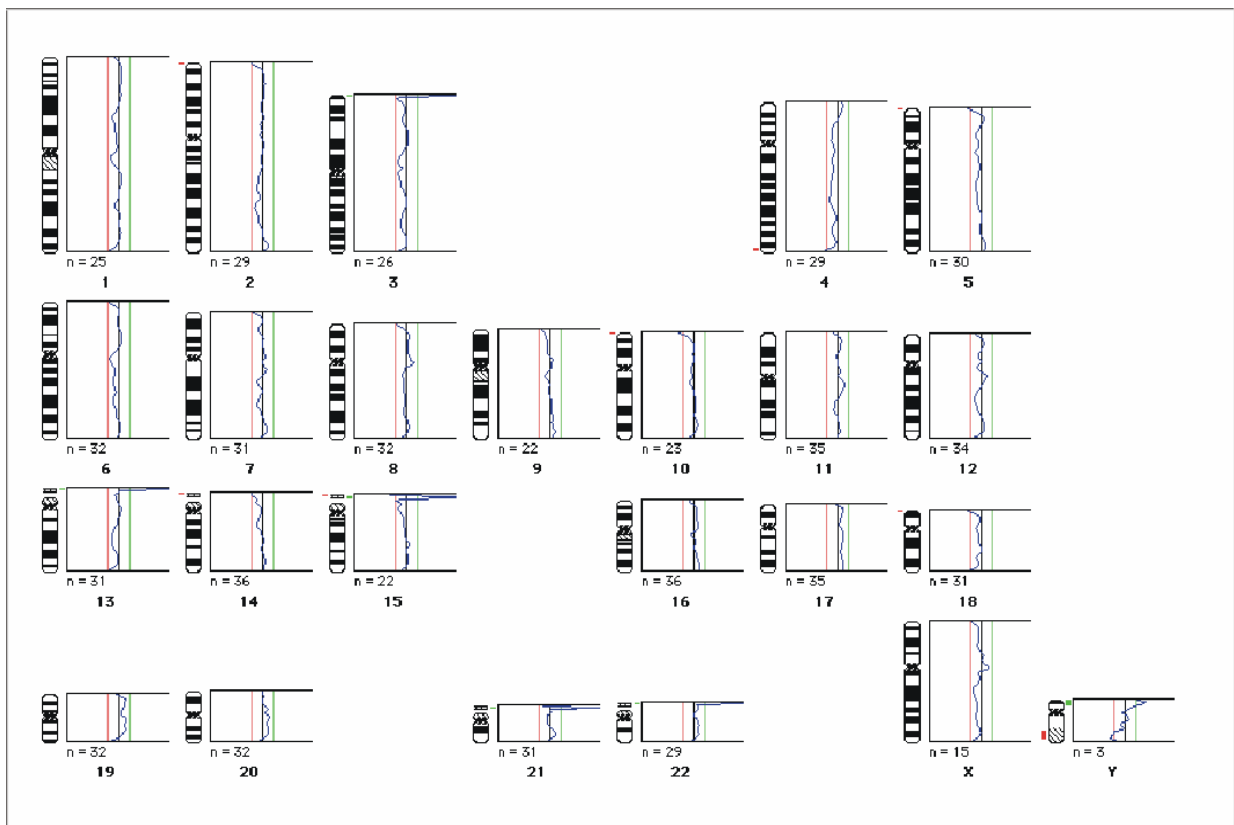
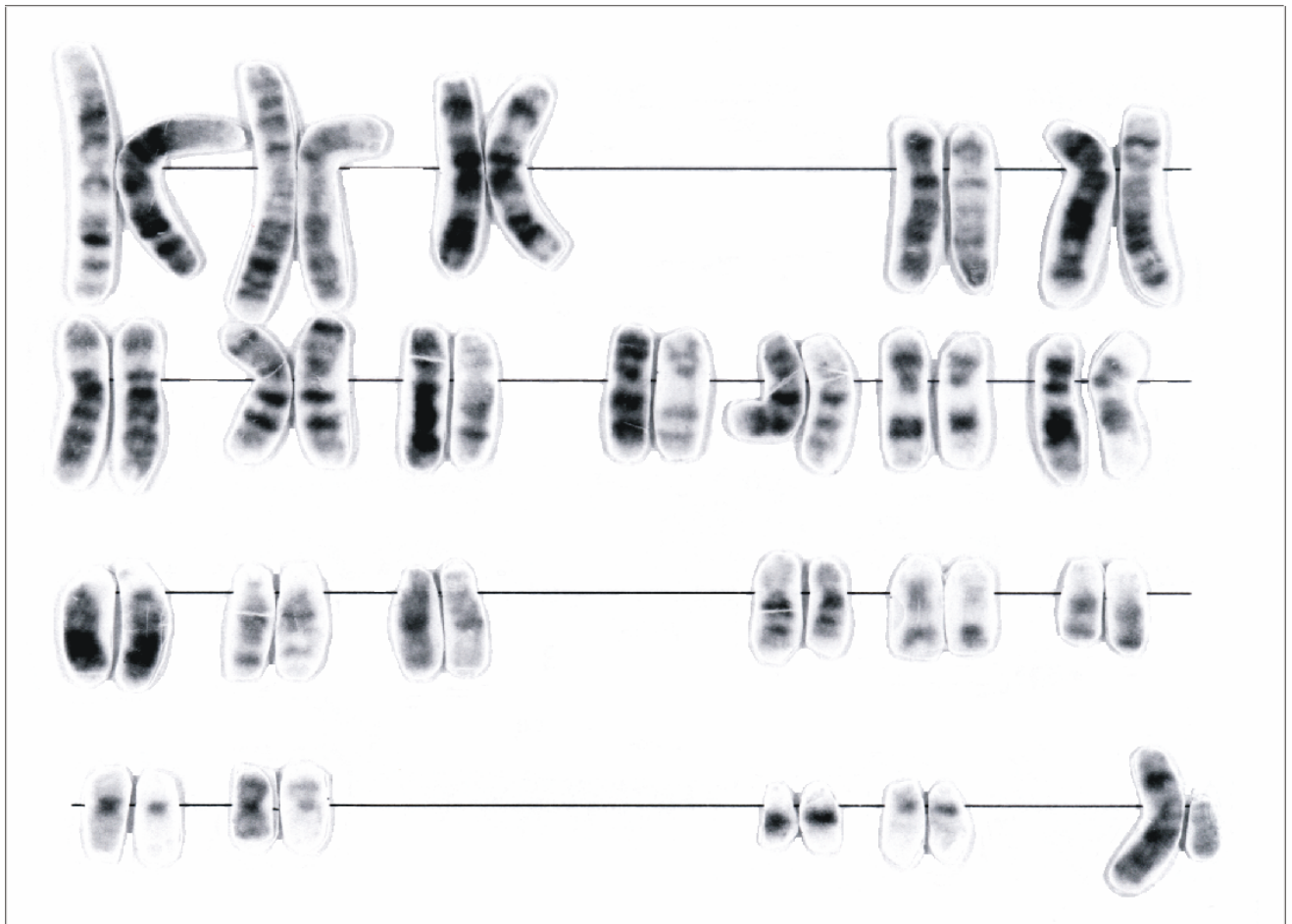
Zur Überprüfung der CGH-Methode wurde die HACL1- Zelllinie (Schleger et al., 1997), die aus einem humanen Leberzelladenom gewonnen worden war (Passage 12) mit Hilfe der Giemsa-Bandenfärbung zytogenetisch analysiert. Bei der Giemsa-Bandenfärbungsanalyse der HACL1-Zelllinie wurden nach Auswertung von 100 Metaphasen keine chromosomalen Zugewinne oder Verluste identifiziert (Abb. 3.1a). Alle Zellen hatten den normalen Status eines männlichen Karyotyps (46, XY).

Die CGH-Analyse der HACL1-Zelllinie wurde mit DNA aus dem HACL1-Zellen derselben Passage durchgeführt. Es wurden 18 Metaphasen analysiert. Die CGH-Durchschnittsprofile zeigten einen diploiden männlichen Karyotyp (46, XY) ohne chromosomale Imbalancen (Abb. 3.1b).

Abb. 3.1: Zytogenetische Analyse der HACL1-Zelllinie mittels Giemsa-Bandenfärbung bzw. CGH-Analyse.

a: Giemsa-Banden-Karyotyp der HACL1-Zelllinie der Passage 12. Das Giemsabandenmuster zeigt einen normalen männlichen Karyotyp (46,XY).

b: CGH-Durchschnittsprofile der HACL1-Zelllinie. Die Profile wurden mit Hilfe der CGH-Analyse nach Auswertung von 18 Metaphasen kalkuliert. Alle Profile liegen im normalen Bereich des diploiden Karyotyps (46,XY).



3.2. Analyse genomischer Imbalancen in HCCs

Vor der Analyse genomischer Imbalancen bei HCCs wurde das HCC-Gewebe zuerst morphologisch charakterisiert. Isolierte DNAs aus den ausgewählten HCC-Geweben wurden als Test-DNAs zur Untersuchung der genomischen Imbalancen in der CGH-Analyse eingesetzt. Die selektive Überprüfung der genomischen Imbalancen, die mittels CGH-Analyse nachgewiesen wurden, erfolgte anhand von Interphase-FISH-Analysen.

3.2.1. CGH-Analyse

Es wurden 21 morphologisch charakterisierte HCCs und 3 humane Leberzelllinien (HEP-3B: Humanes Hepatozelluläres Karzinom, SK-HEP-1: Humanes Leberadenokarzinom und HEP-G2: Humanes Hepatoblastom) mit Hilfe der CGH-Analyse auf genomische Imbalancen untersucht. Die CGH-Daten zeigten bei 13 HCC-Patienten genomische Aberrationen in Form von Zugewinnen und Verlusten, in 3 Fällen traten weder Zugewinne noch Verluste auf und in 5 Fällen zeigten sich nur genomische Zugewinne.

Die CGH-Durchschnittsprofile von den 13/21 untersuchten HCC-Patienten zeigten sowohl Zugewinne als auch Verluste in den unterschiedlichen chromosomalen Regionen, wobei sich jeder HCC-Fall von den anderen aufgrund des Ausmaßes der vorhandenen Aberrationen unterscheidet. Tumor #21 ist ein typisches Beispiel für die Fälle mit genomischen Imbalancen in Form von Zugewinnen und Verlusten (Abb. 3.2 (a-b)). Die CGH-Durchschnittsprofile des Tumors #21 sind in der Abb. 3.3 (a-b) dargestellt. Die Amplifikationen bei 1q, 8q, distale Bereiche von 2q, 7p, 12q, 13q, und 20q sowie Verluste in 6q, 13p, 16p, 21q, 22, X, regional 4p, 4q, 13q und 10q sind in diesem Fall signifikante Alterationen.

Ausschließlich Vermehrungen an genomischer DNA traten bei 5/21 der HCCs auf. Tumor #6 mit Zugewinnen an 1q, 8q und X ist dafür ein typisches Beispiel. (Abb. 3.4)

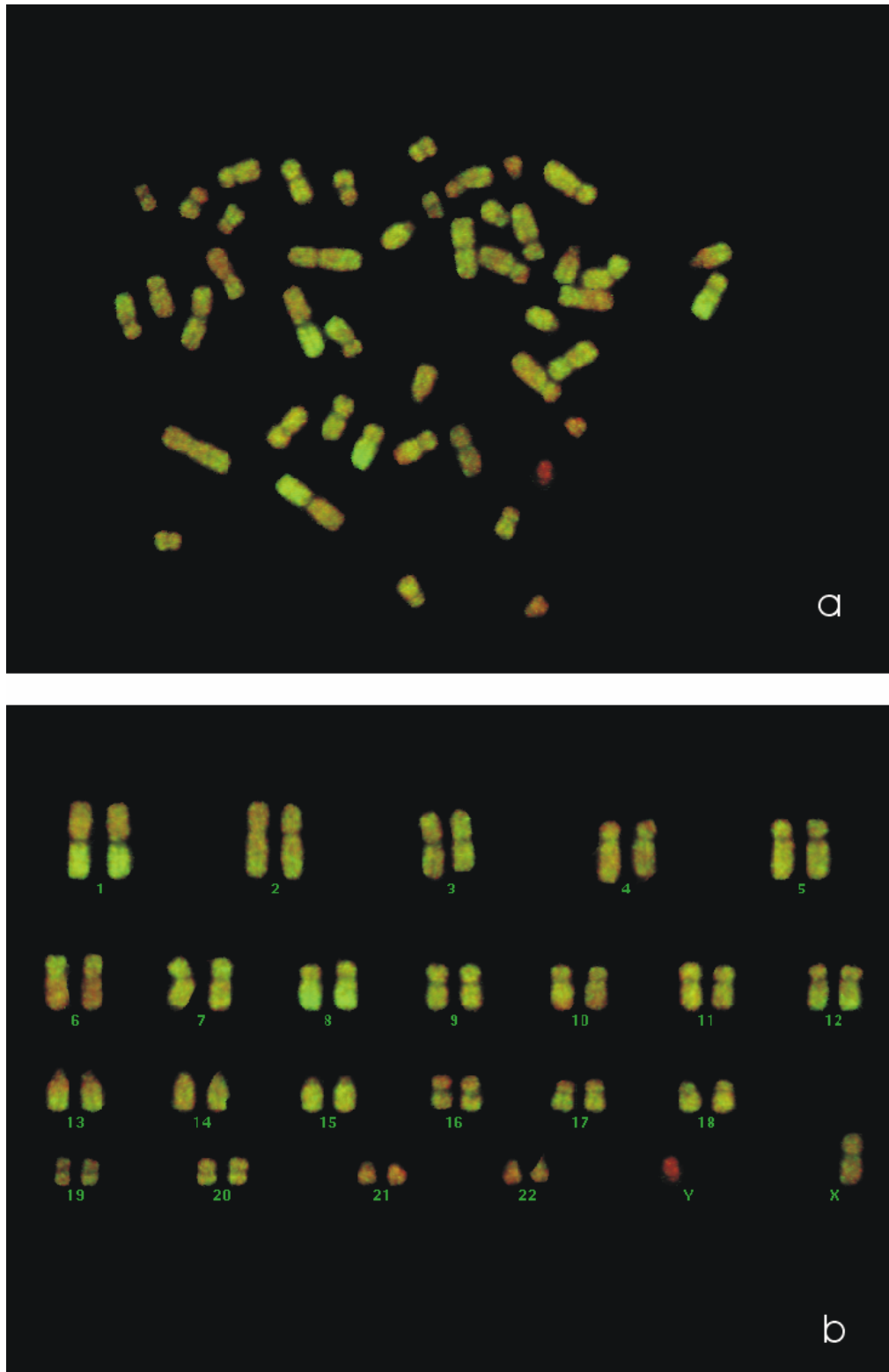


Abb. 3.2: Überlagerungsaufnahmen von DNA aus Tumor #21- und Referenz-DNA-Hybridisierungen auf normalen Metaphasen.

a: Fluoreszenz-Überlagerungsdarstellung einer repräsentativen Metaphase.

b: Karyogramm-Darstellung der Metaphase in a.



Abb. 3.3: CGH-Durchschnittsprofile des Tumors #21. Amplifikationen von 1q, 8q, der distalen Bereiche von 2q, 7p, 12q, 13q, und 20q sowie Verluste in 6q, 13p, 16p, 21q, 22, X, regional 4p, 4q, 13q und 10q stellen sich als signifikante chromosomale Aberrationen dar.

a: Mittelwerte von 10 Metaphasen.

b: Mittelwerte wie in a mit den zugehörigen Konfidenzintervallen.

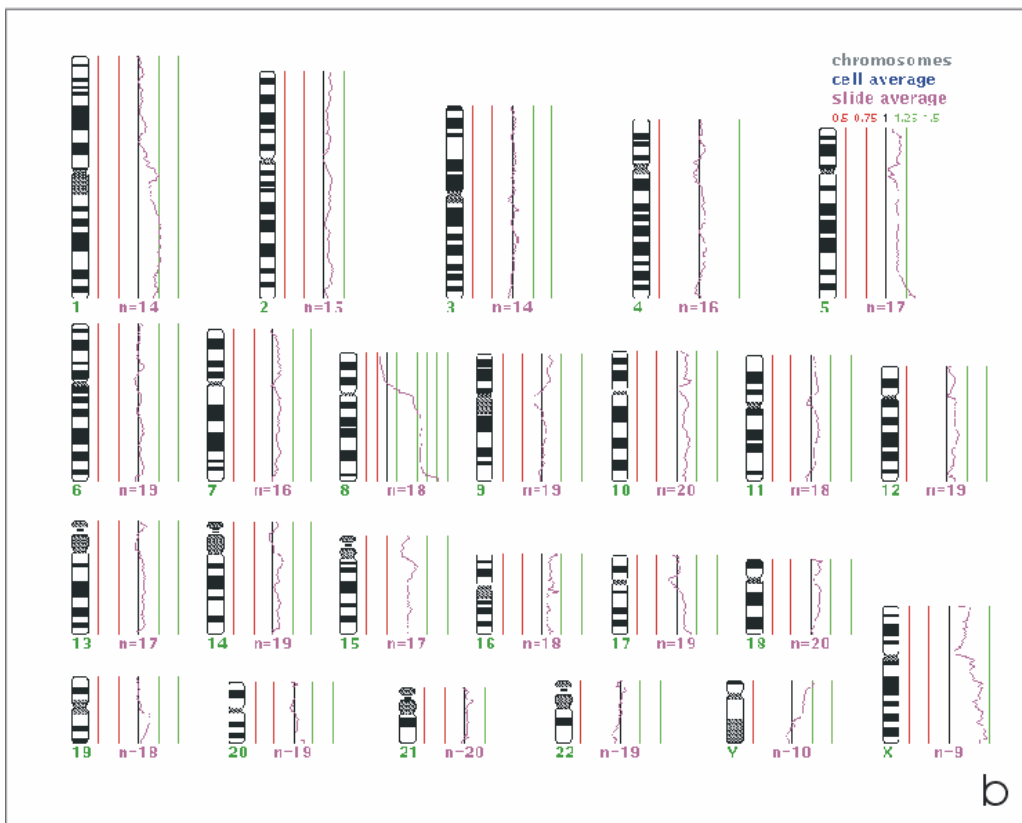
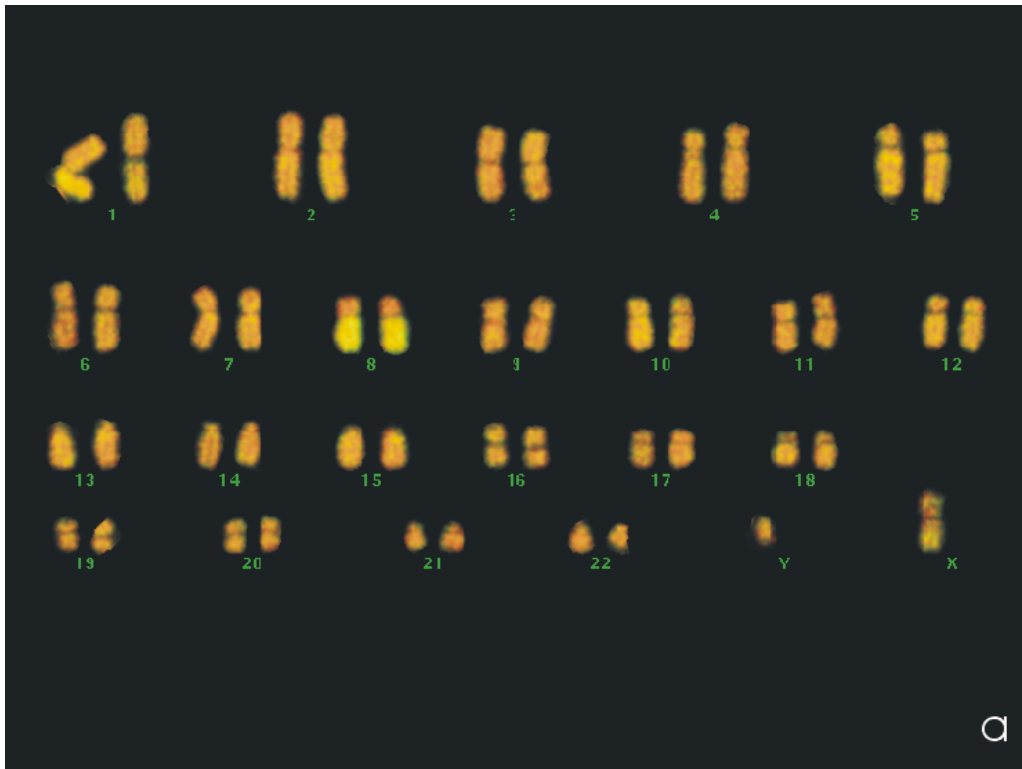
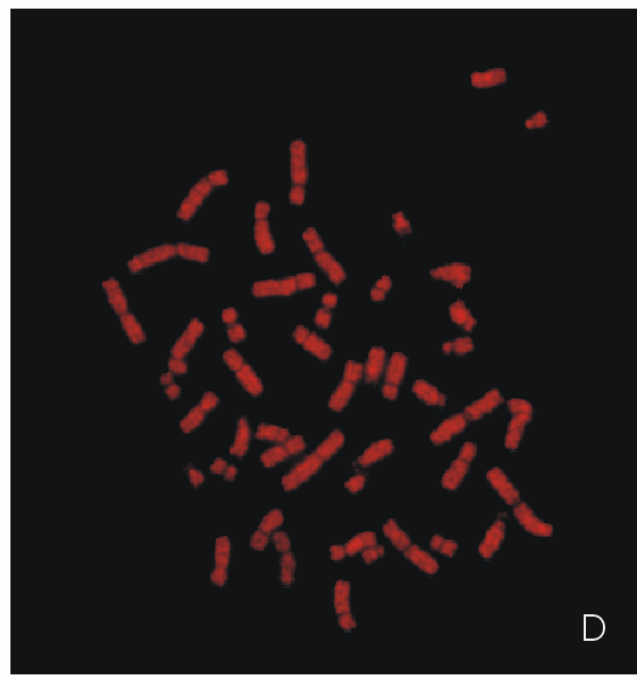
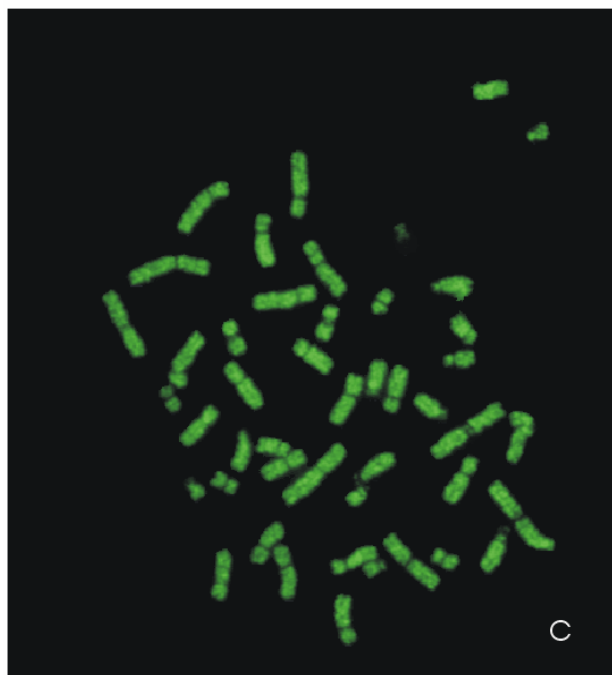
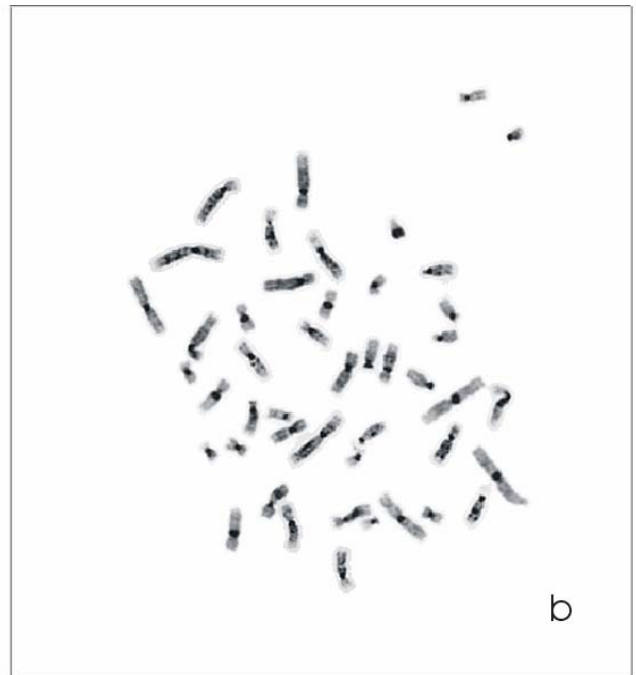
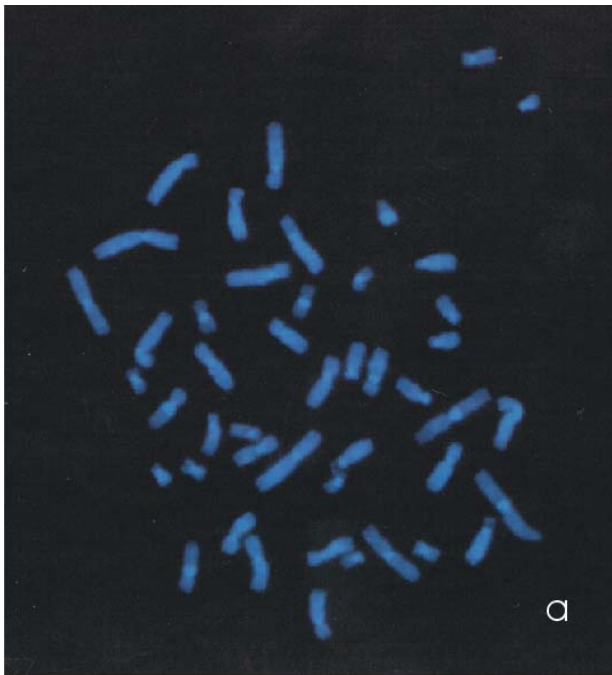


Abb. 3.4: Darstellung genomischer Imbalancen bei Tumor #6 mit Hilfe der CGH-Analyse.

a: Fluoreszenz-Überlagerungsdarstellung eines repräsentativen Karyogramms.

b: Durchschnittsprofile ermittelt aus 10 Metaphasen. Zugewinne sind auf 1q, 8q, und Xq erkennbar.

Die CGH-Analyse der HCCs #3, 10 und 16 zeigten einen balancierten chromosomalen Status. Es wurden keine DNA-Zugewinne oder -Verluste nachgewiesen. Exemplarisch sind in der Abb. 3.5 (a-e) die einzelnen Hybridisierungen des Tumors #10 bzw. die Überlagerung der Test- und Kontroll-DNA Aufnahmen gezeigt. Abb. 3.6 (a-b) zeigt die DNA-Durchschnittsprofile derselben Tumoren.



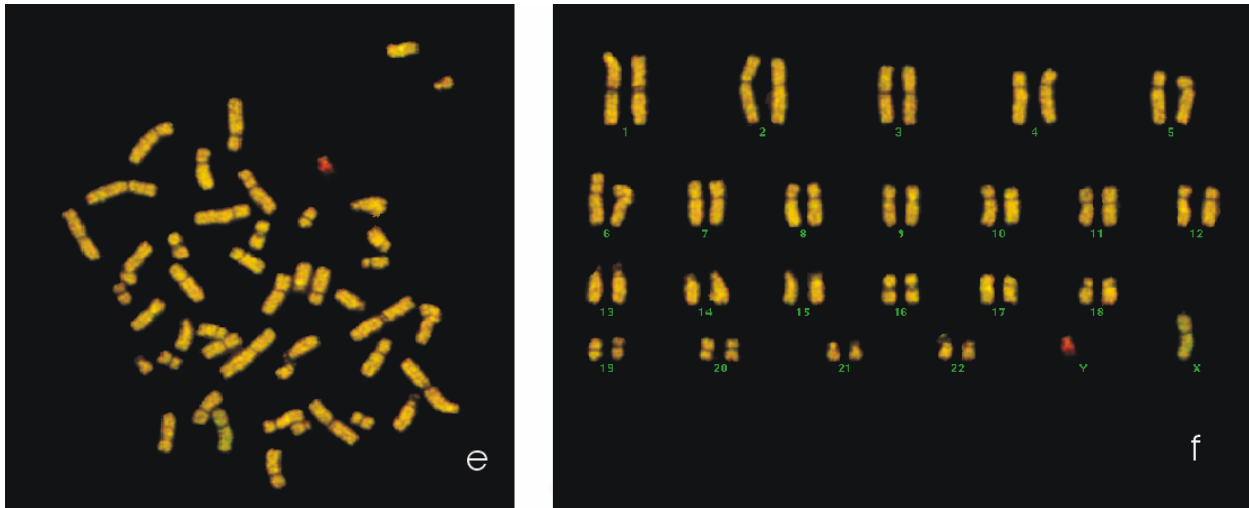


Abb. 3.5: Detektion chromosomaler Imbalancen durch CGH und digitale Bildanalyse in HCC # 10.

Bei der CGH-Analyse wurde ein normaler weiblicher Karyotyp (46, XX) festgestellt.

a: CCD-Aufnahme einer Metaphasenchromosomen-Gegenfärbung mit DAPI zur Chromosomen-Darstellung.

b: Invertierte Darstellung der DAPI-Aufnahme, die ein ähnliches Banden-Muster wie die klassische G-Bandierung liefert und somit die Chromosomen-Identifikation ermöglicht.

c: Metaphasen Hybridisierungsmuster mit Biotin-markierter und mit FITC-detektierter genomischer DNA.

d: Hybridisierungsmuster der Kontroll-DNA, die mit Digoxigenin markiert und mit TRITC detektiert wurde.

e und **f** Mischfarben-Bilder, bearbeitet durch digitale Überlagerung der Aufnahmen c und d.

e: Metaphasen-Platte.

f: Karyogramm derselben Metaphase wie in a-e.



Abb. 3.6: Mittelwert der ermittelten Fluoreszenz-Ratio Profile nach der Hybridisierung mit DNA aus Tumor #10. Wertebereiche für Verluste (links), und Zugewinne (rechts) im Vergleich zur Zentral-Linie (balancierter Status der Chromosomen) werden von 0,5-1,5 dargestellt. Die Durchschnittsprofile liegen alle im Normalwertbereich.

a: Durchschnittsprofile der homologen Chromosomen einer einzelnen Metaphase.

b: Durchschnittsprofile errechnet aus 11 unterschiedlichen Metaphasen.

3.2.2. Zusammenfassung der CGH-Ergebnisse

Bei den untersuchten HCCs (n=21) zeigten insgesamt 18 Tumore (ca. 86%) sowie alle 3 Zelllinien signifikante genomische Imbalancen in unterschiedlichen chromosomalen Regionen (Tab.3.1), wobei Zugewinne an chromosomalem Material gegenüber Verlusten überwogen. Eine Zunahme an genomischen Veränderungen zwischen den G1- und den G3-differenzierten Tumoren wurde nicht festgestellt. Die durch CGH nachgewiesene chromosomale Imbalancen sind in Abb. 3.7 dargestellt.

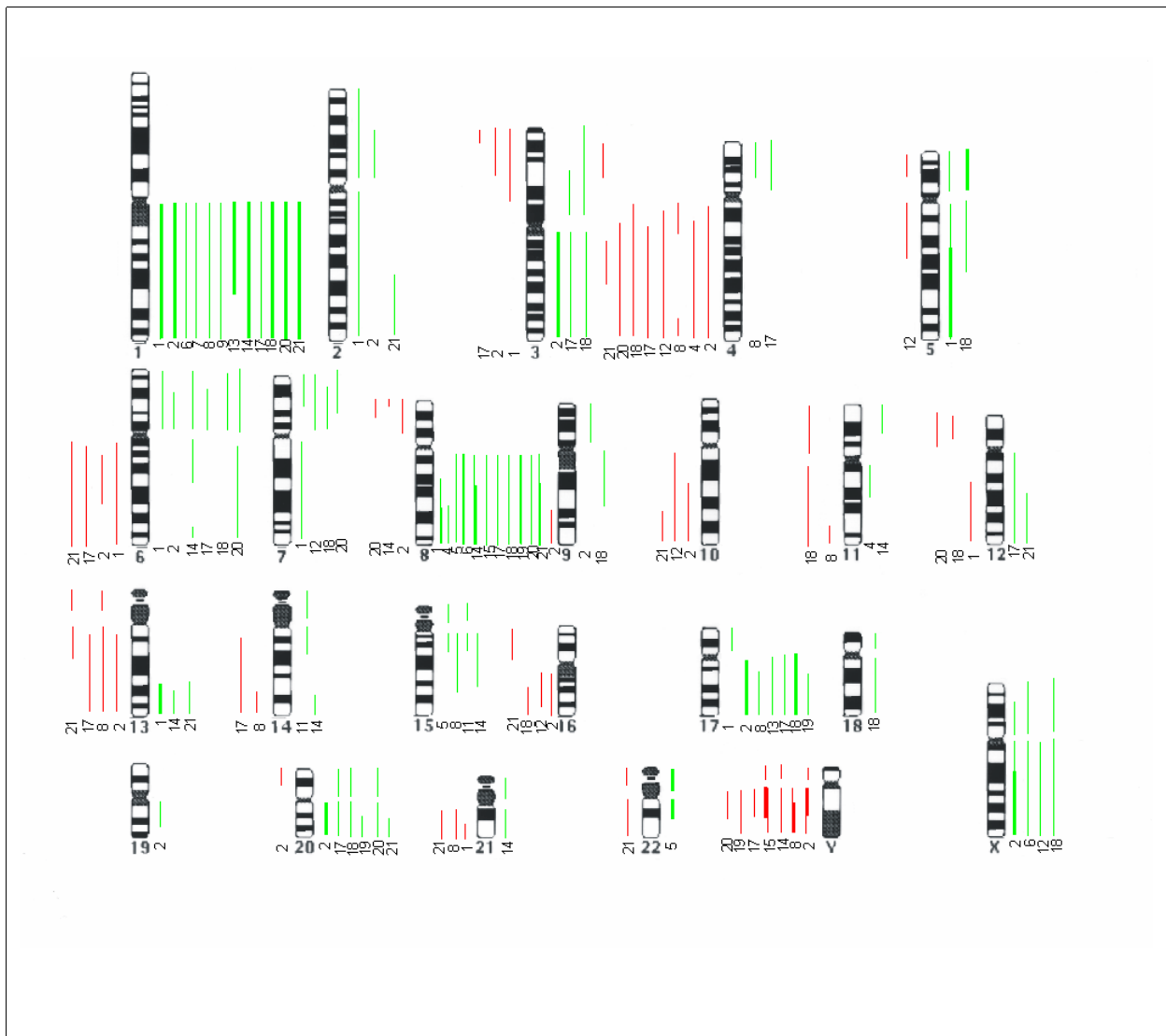


Abb. 3.7: Die Zusammenfassung der mit der CGH-Methode detektierten chromosomalen Imbalancen in 18 HCCs. Zugewinne sind an den rechten Seiten der Chromosomen-Idiogramme (grün) und Verluste auf der linken Seite (rot) dargestellt. Die Strichdicke der Linien korreliert mit dem Ausmaß der Imbalancen (1,25-1,5 bzw. 0,75-0,5 dünne, $\geq 1,5$ und $\leq 0,5$ dicke Linien).

Tab. 3.1. Genomische Imbalancen von HCCs und humanen Lebertumor-Zelllinien

#	GESCH-LECHT	G	ÄTIOLOGIE	ZUGEWINNE	VERLUSTE
1	m	1	HBV	1q, 2, 5, 6p, 7p15-22, 7q, 8q21.1-24.3, 13q31-34, 17p	3p, 6q13-27, 12q15-24.3, 21q22
2	m	2	Ethanol	1, 2p11-16, 3q, 6p11-22, 9p, 17q, 19q12-13.2, 20q, Xp11.1-21, Xq	3p13-26, 4q13-35, 6q14-22, 8p12-23, 9q31-34, 10q22-26, 13q13-34, 16q12.2-24, 20p, Y
3	m	2	HBV	-	-
4	f	2-3	Hämochromatose	8q24-24.3, 11q12-14	4q21-35
5	m	1	n. d.	8q, 15p, 15q11.1-13, 22p, 22q11.1-11.2	-
6	m	1	n. d.	1q, 8q, X	-
7	m	3	HBV	1q	-
8	m	3	Ethanol	1p11-33, 1q, 4p14-16, 15q13-22, 17q21-25	4q12-13/q33-35, 11q24-25, 13, 14q31-32, 21q, Yq
9	m	2	Ethanol	1q	-
10	f	1	n.d.	-	-
11	m	1	n.d.	14p, 14q11.1-12, 15p, 15q11.1-13	-
12	m	1	HBV	7p, Xq	4q13-35, 5p15.1-15.3, 5q11.2-21, 10q, 16q12.1-23
13	m	1	n.d.	1q11-31, 17q	-
14	m	2	HBV	1q, 6p, 6q11-21/q25-27, 8q, 11p15, 13q33-34, 14q32, 15q11.2-15, 21	8p23, Y
15	m	2-3	HBV	8q	Y
16	m	2	Ethanol	-	-
17	m	3	n.d.	1p11-33, 1q, 3p11-14, 3q, 4p, 6p12-21.3, 8q12-24.1, 12q, 17q, 20	3p24-26, 4q13-35, 6q13-27, 13q13-34, 14q13-32, Y11.2
18	f	1	n.d.	1q, 3, 5p, 5q11.1-21, 6p21.2-25, 7p12-15, 8, 9q11-22, 17q, 18, 20, X	4q, 11, 12p12-13, 16q21-24
19	m	2	HBV	8q, 17q21.2-25, 20q13.2-13.3	Yq
20	m	2	HBV	1q, 6, 7p, 8q13-24.3, 20	4q13-35, 8p21-23, 12p, Y11.2
21	f	2-3	n.d.	1q, 2q32-37, 7p14-22, 8q, 12q21-24.1, 13q31-34, 20q	4p16, 4q22-28, 6q12-27, 10q24-26, 13p, 13q11-14, 16p12-13.3, 21q, 22, X
* HEP-3B				1q, 3q21.6-29, 4p, 6p, 7p, 11p, 13qter, 19p, 20q13.2-13.3	4q24-35, 5q14-23, 13q14-22, Y
* SK-HEP1				6p, 17	4, 6q, 9, 18q12-23, Y
* HEP-G2				2, 6p, 16p, 16q, 17q, 19p, 20	13q14-22

*: Zelllinie; n.d.: nicht definiert; G: Grading

Genomische Zugewinne finden sich am häufigsten am q-Arm der Chromosomen 1 und 8, Chromosomale Verluste konnten am häufigsten für 4q, 13q und 6q nachgewiesen werden. Die Kernregionen der häufig veränderten Regionen sind in

Tab. 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2. Häufige genomische Imbalancen in humanen HCCs

	ANZAHL	%	GENOMISCHE IMBALANCEN (Kern-Region)
1 Zugewinne	12	57	1q12-25
	11	52	8q21.2-24.3
	6	29	17q21.3-25
	6	29	20q13.1-13.3
	6	29	6p11.1-22
Verluste	7	33	4q22-28
	4	19	13q12-14
	4	19	6q14-22
	3	14	10q24-26
	3	14	16q13-23

3.2.3. Die Interphasen-FISH-Analyse

Die Interphase-FISH-Analysen wurden als Kontrollexperimente durchgeführt um zu überprüfen, ob die in der CGH-ermittelten genomischen Imbalancen mit einer unabhängigen Methode reproduzierbar sind. Für die FISH-Analyse wurden bei der Darstellung der Zugewinne die Chromosomen 1 und 8 und für die Darstellung von Verlusten Chromosom 13, selektiert. Die Chromosomen 10 und 17 wurden entsprechend der jeweiligen CGH-Ergebnisse als Referenz-Chromosomen für die Interphase-FISH-Analyse verwendet. Tumor #6 mit einer Vermehrung von Chromosom 1, 8 und X gemäß der CGH-Analyse wurde für die FISH-Analyse ausgewählt. Tumor-Zellen wurden mit Hybridisierungsproben von Chromosom 1 bzw. 8 jeweils mit einer Referenzprobe (17 oder 10) cohybridisiert. Die Überzahl der roten Signale für Chromosom 1 zeigt im Vergleich zu den grünen Signalen für Chromosom 17 (Kontrolle) eine Überrepräsentation des Chromosoms 1 (Abb. 3.8a). Für die semiquantitative FISH-Analyse des Chromosoms 8q wurde wiederum Tumor #6 verwendet. Insgesamt waren grüne Signale für Chromosom 8 in der Überzahl gegenüber den roten Signalen für Chromosom 10, das als Kontrolle diente (Abb. 3.8b). Das gelbe Signal auf dieser Abbildung entspricht einer Zentromerüberlagerung der Chromosomen 8 (grün) und 10 (rot).

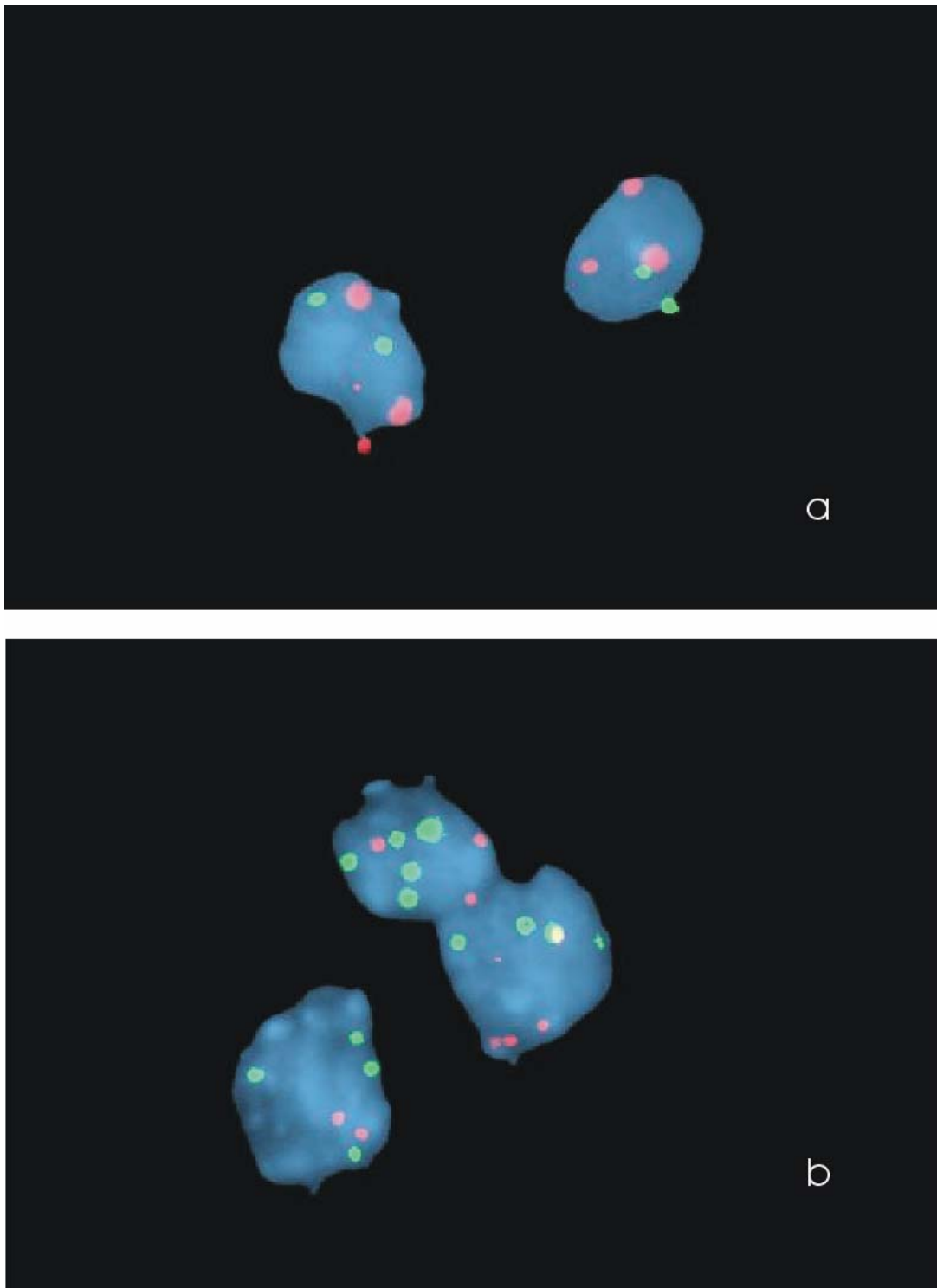


Abb. 3.8: Interphase FISH-Analyse von Tumor #6.

a: Die Zentromer-Region des Chromosoms 1 (1q12) wurde mit Spektrum Orange-markierter sat.II und III DNA (rot) hybridisiert. Das Referenz-Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) wurde mit Spektrum Green-markierter α -sat-DNA (grün) hybridisiert.

b: Spektrum Green-markierte α -sat-DNA von 8p11.1-q11.1(grün) und Spektrum Orange-markierte α -sat-DNA von 10p11.1-q11.1 (rot, Referenz) wurden für die numerische Auswertung des Chromosoms 8 verwendet. Ein gelbes Signal stellt die Überlagerung von grün bzw. rot markierten Zentromeren von Chromosom 8 und 10 dar.

Nach Auswertung der CGH-Ergebnisse der HCCs sind genomische Verluste seltener als chromosomale Zugewinne. Insgesamt zeigten 19% der untersuchten HCC-Fälle Verluste von 13q mit der am häufigsten betroffenen Region 13q12-14. In dieser Region liegt das RB-Gen. Eine Interphase-FISH-Analyse wurde mit einer RB-Gen-Probe auf den Zellen des Tumors #8, der unter anderem einen Verlust von Chromosom 13 zeigte, durchgeführt. Eine Zentromer-Probe des Chromosoms 10 wurde als Kontrolle cohybridisiert (Abb. 3.9b). Die Auswertung der FISH-Analyse ergab in 83,3% der Kerne eine Hemizygotie für das RB-Gen (Tab. 3.3). Im oberen Teil der Abb. 3.9 (a) ist das CGH-Profil für Tumor #8 eingetragen. Das Durchschnittsprofil für Chromosom 13 liegt auf dem Grenzwert 0,75 (linke Linie) und wurde als Monosomie für Chromosom 13 gewertet.

Das FISH-Ergebnis (Tab. 3.3) korreliert insofern mit den Ergebnissen der CGH-Analyse.

Tab. 3.3. Interphasen-FISH-Analyse

TUMOR #	SONDE TEST/REFERENZ	Q≤0,5 (%)	1>Q>0,5 (%)	Q=1 (%)	Q>1 (%)
8	13/10 (13q14 (RB-1) / 10p11.1-q11.1 (α-sat. DNA))	83,3	10,2	5,6	0,9
6	1/17 (1q12 (sat.II and III) / chr.17p11.1-q11.1 (α-sat. DNA))	0	1,9	30,7	67,3
	8/10 (8p11.1-q11.1 (α-sat.DNA) / 10p11.1-q11.1 (α-sat. DNA))	1,8	10,7	40,2	47,3

Für jede FISH-Analyse wurden mindestens 100 Zellkerne ausgewertet.

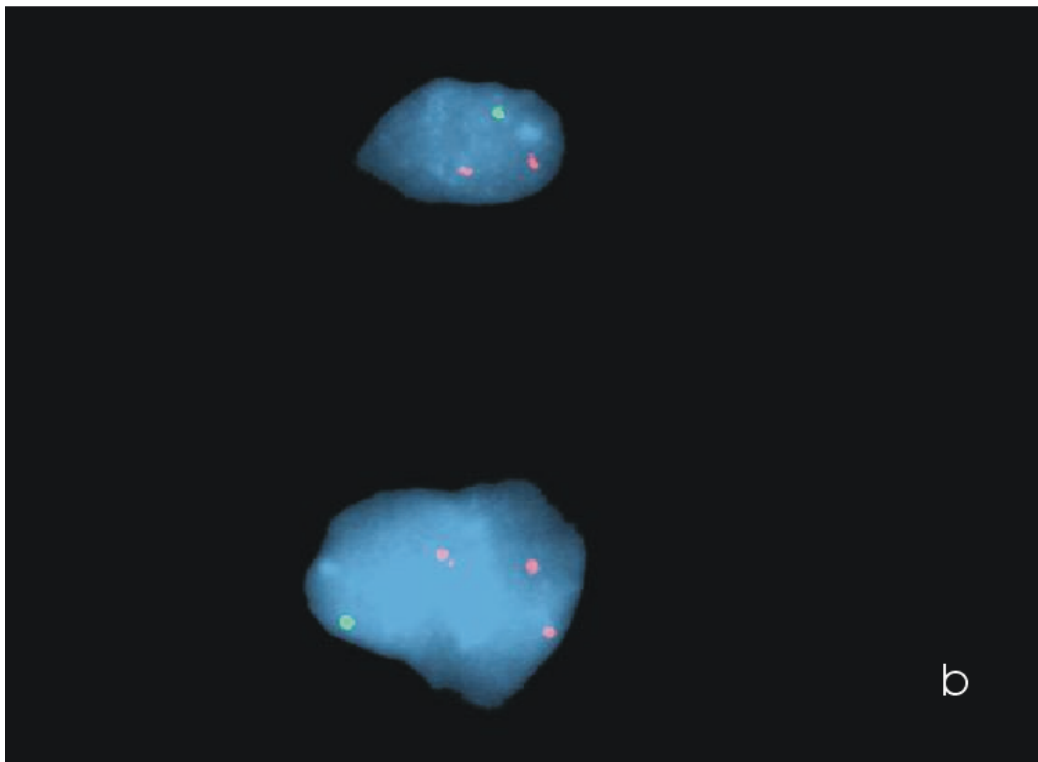
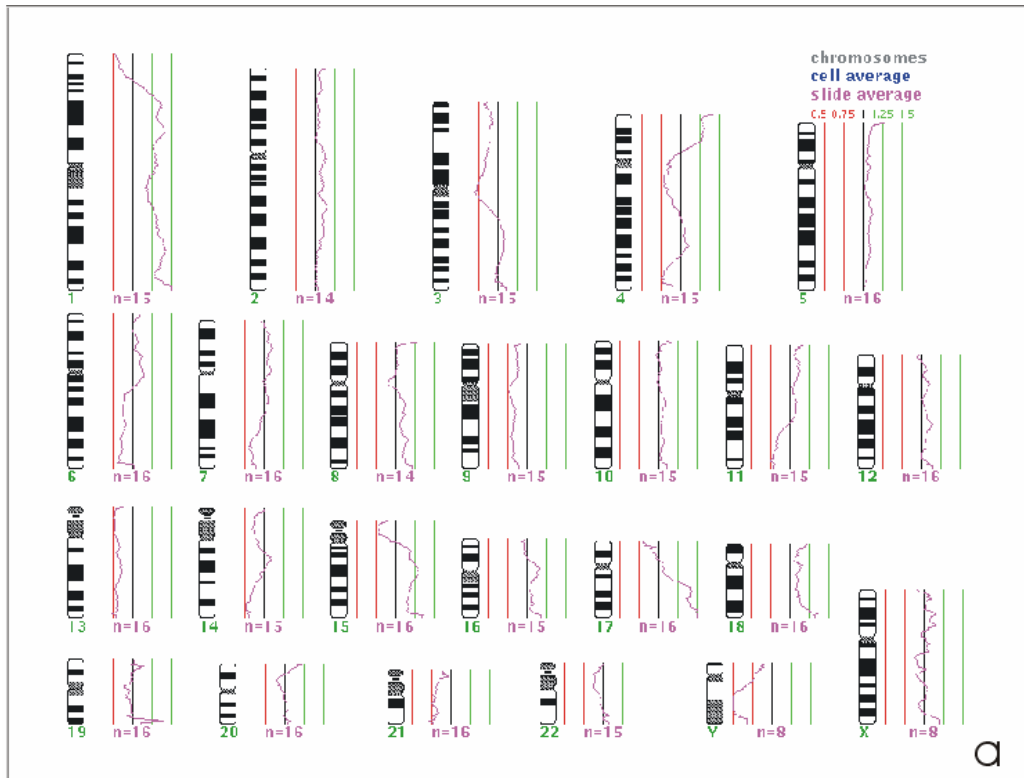


Abb. 3.9: CGH-Untersuchung und Interphase-FISH-Analyse von Tumor #8.

a: CGH Durchschnittsprofile aus 8 Metaphasen, die unter anderem einen Verlust von Chr. 13 zeigen.

b: FISH-Analyse von 13q14 (RB-1-Gen-Locus). Die Probe für 13q14 ist mit Spektrum Green und die Kontroll-Probe für 10p11.1-q11.1 (α -sat.DNA) ist mit Spektrum Orange (rot) markiert. Die Unterrepräsentation der grünen Signale im Vergleich zu den roten Signalen weist auf 13q-Verluste hin.

3.2.4. Atlas™ Human cDNA Expression Array

Das Expressionsmuster eines in der CGH analysierten HCCs (#6) wurde mit Hilfe eines cDNA-Expressionsarrays analysiert. Bei der Atlas-Analyse wurde das Expressionsmuster von Tumor #6 (Abb. 3.10a), der bei der CGH-Analyse genomische Imbalancen von Chromosom 1q, 8q und X zeigte (siehe Abb. 3.4 und Tab. 3.1), mit dem Expressionsmuster des nicht tumorösen Lebergewebes des selben Patienten (Abb. 3.10b) verglichen. Nach Auswertung der cDNA-Arrays wurden mehrere Gene identifiziert, die im HCC entweder überexprimiert oder supprimiert waren (siehe Anhang).

Anhand der CGH-Ergebnisse für Tumor #6 (1q, 8q und Xq-Amplifikation) wurden speziell die Gene, die auf 1q, 8q und X lokalisiert sind untersucht (Tab. 3.4). Von den X-chromosomalen Genen sind drei (Interleukin-9-Receptor, ARD [N-Acetyltransferase ARD1] und Zink Finger X-Chromosomal Protein) im tumorösem Gewebe überexprimiert. ARD ist 3,7-fach höher exprimiert. Für die beiden anderen Gene konnte das Ausmaß der Überexpression quantitativ nicht verlässlich berechnet werden.

Das Transcription factor S-II-related Protein ist 27,8-fach überexprimiert und liegt auf dem q-Arm des Chromosoms 8. Drei hochregulierte Gene (Calgranulin B, Interferon-gamma inducible Protein und MNDA) wurden auf 1q lokalisiert. Calgranulin B ist 3,5-fach und Interferon-gamma inducible Protein ist 3,1-fach in tumorösem Gewebe überexprimiert. Das Ausmaß der Überexpression von MNDA im Tumorgewebe konnte nicht verlässlich berechnet werden.

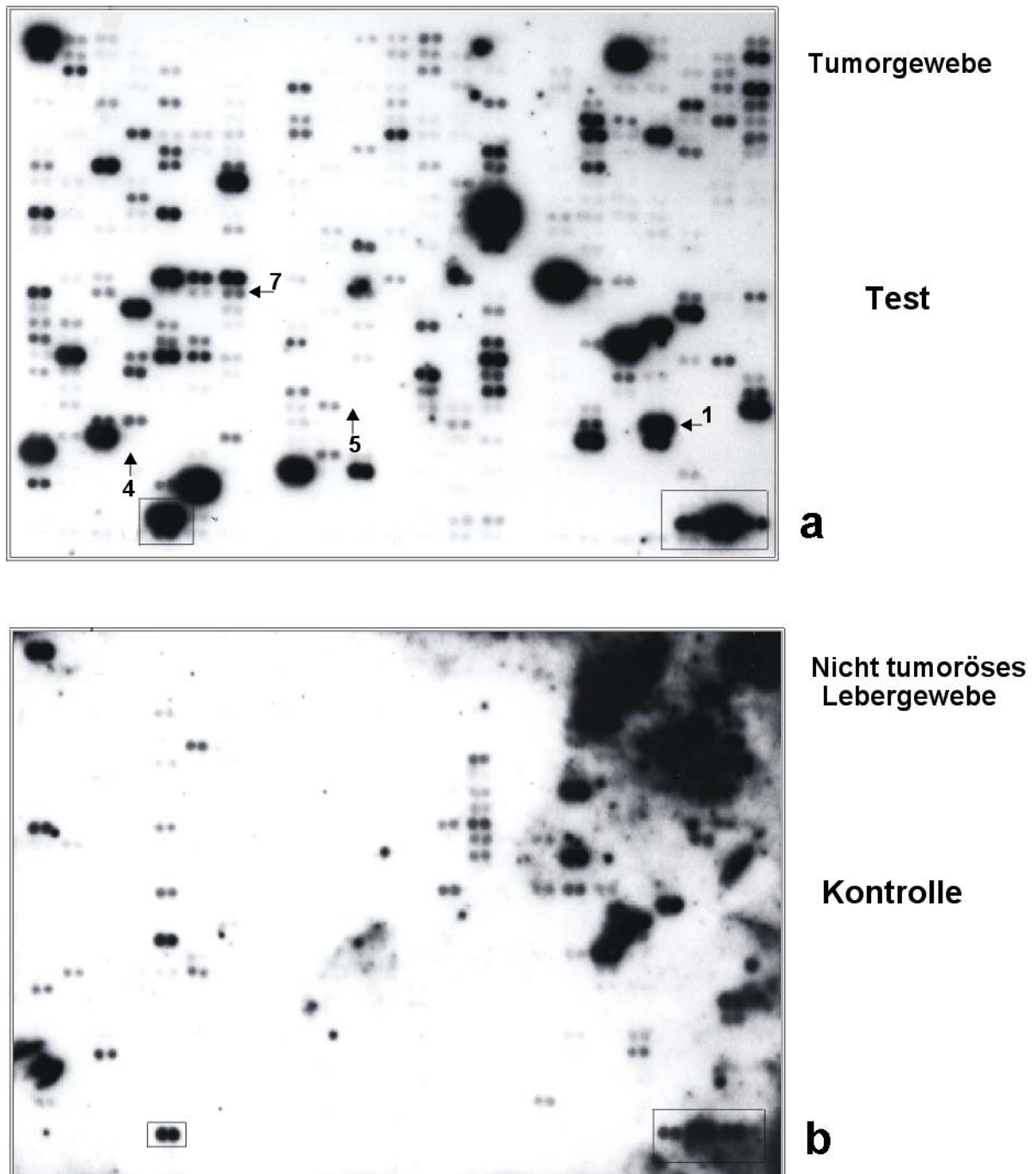


Abb. 3.10: cDNA-Expressionsarrays von Tumor #6.

a: Expressionsmuster des Tumorgewebes.

b: Expressionsmuster des nicht-tumorösen Lebergewebes.

Tab. 3.4. Gene mit erhöhter Expression und Lokalisation auf 1q, 8q oder X

(Tumor #6)

#	GEN	CHROMOSOMALE LOKALISATION	FACHE ÜBER-EXPRESSION
1	Calgranulin (B) MRP-14[calcium-binding protein in macrophages, MIF-related]	1q12-q22	3.5
2	Interferon-gamma inducible Protein	1q22	3.1
3	MNDA Myeloid cell nuclear differentiation antigen	1q22	*
4	Transcription factor SII-related protein (transcription elongation factor [SII])	8q	27.8
5	Interleukin-9-receptor	Xq28	*
6	ARD N-Acetyltransferase ARD1	Xq28	3.7
7	Zinc finger x-chromosomal Protein (ZFX putative transcription activator)	Xp22-p21.3	*

*: konnte nicht verlässlich berechnet werden

3.3. CGH-Analyse Cholangiozellulärer Karzinome (CCC)

Aus 10 verfügbaren, paraffineingebetteten Geweben von CCCs konnte in 6 Fällen auswertbare CGH-Profile erzielt werden. 4 Fälle ergaben aus technischen Gründen (Formalinfixierungszeit, pH-Wert des Mediums, etc.) keine auswertbaren CGH-Profile.

In 5 von 6 untersuchten CCCs wurden zum Teil erhebliche genomische Imbalancen, meist Makrodeletionen, nachgewiesen. Im Folgenden ist die CGH-Analyse des Tumors #4 exemplarisch für die untersuchten CCCs dargestellt (Abb. 3.11).

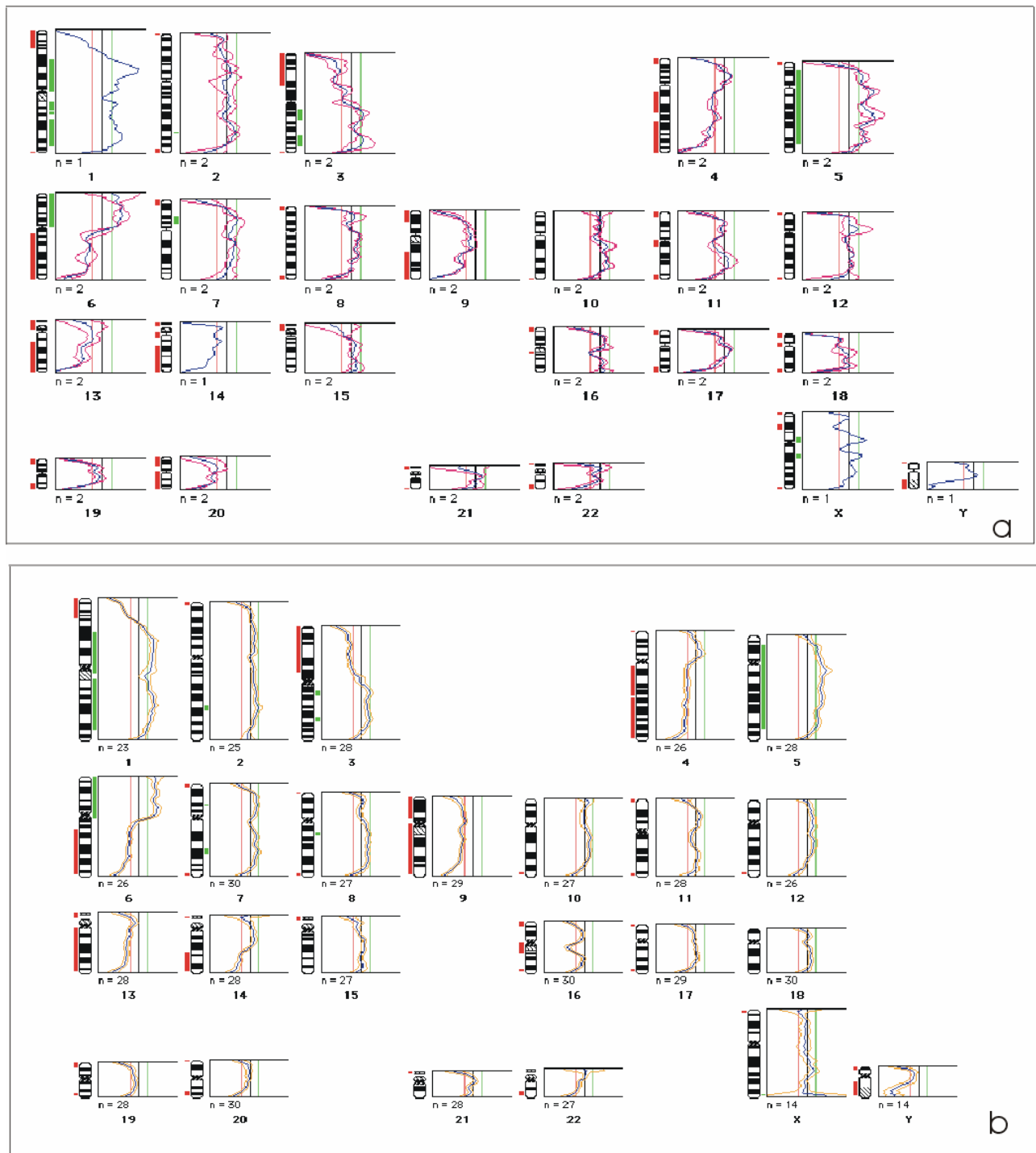


Abb. 3.11: CGH-Analyse von CCC #4.

Die Balken rechts neben dem Chromosomen-Ideogramm stellen die chromosomalen Zugewinne (grün) und links die chromosomalen Verluste (rot) dar. Zugewinne von Chromosom 1q, 1p, 5 und 6p sowie Verluste an 1p, 3p, 4q, 6q, 9, 13 und 14q stellen signifikante Makroimbalancen dar.

a: Durchschnittsprofil einer einzelnen Metaphase.

b: Durchschnittsprofile von 15 Metaphasen.

3.3.1. Zusammenstellung der CGH-Analyse der CCCs

Die chromosomalen Zugewinne sowie die Verluste, die bei der CGH-Analyse der Cholangiozellulären Karzinome ermittelt wurden, sind in Abb. 3.12 zusammengestellt. Deletionen betrafen die Loci 1p36 (4/6), 9q34 (4/6) und 6q23-27 (3/6). Amplifikationen fanden sich an 1q21-24 (3/6) 8q13 (3/6) und 5q21-22 (2/6).

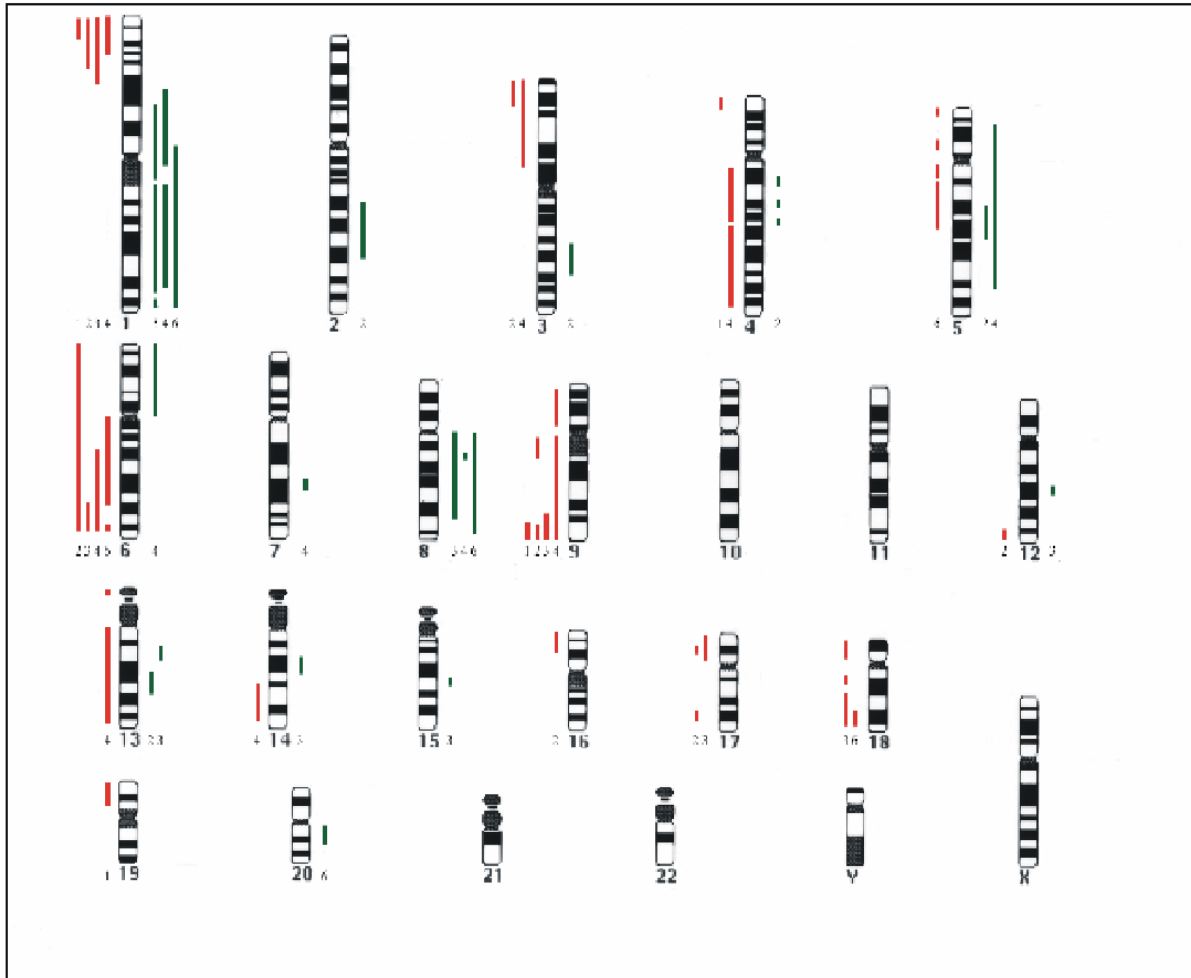


Abb.3.12: Chromosomale Lokalisationen genomischer Imbalancen bei CCCs.

Die Striche neben den Chromosomen-Idiogrammen stellen die chromosomalen Imbalancen dar. Vertikale Linien auf der rechten Seite jedes Chromosomen-Idiogramms repräsentieren chromosomale Zugewinne; Linien auf der linken Seite korrespondieren mit Verlusten an genomischem Material.

3.4. CGH-Analyse präneoplastischer Läsionen (Dysplastische Knoten)

Aus den 7 verfügbaren paraffineingebetteten Geweben der präneoplastischen Läsionen konnten 6 Fälle ausgewertet werden.

Die Zahl der genomischen Imbalancen der präneoplastischen Läsionen, die mit Hilfe der CGH-Analyse nachgewiesen wurden, sind geringer als die der genomischen Aberrationen bei den HCCs. Es wurden Zugewinne beim q-Arm des Chromosoms 1 (3/6) beobachtet. Verluste wurden bei 17p (1/6) und 8p (2/6) detektiert.

In 3 von 6 analysierten Fällen wurden keine Aberrationen beobachtet; alle Profile in diesen Fällen lagen in dem Bereich des normalen diploiden Chromosomensatzes. Im Kontrast dazu zeigten 3 Fälle chromosomale Alterationen. Ein typisches Bild zeigt die CGH-Analyse für Tumor #2, die in der Abb. 3.13 dargestellt. Die Amplifikation von 1q und Deletion von 17p wurden in diesem Tumor als chromosomale Aberrationen nachgewiesen.

Die CGH-ermittelten Daten der untersuchten Gewebe (n=6) sind in Tab. 3.5 dokumentiert.

Tab.3.5. Genomische Imbalancen von präneoplastischer Läsionen

DN #	ZUGEWINNE	VERLUSTE
1	-	-
2	1q	17p
3	1q22-q43	8p
4	-	-
5	-	-
6	1q	8p

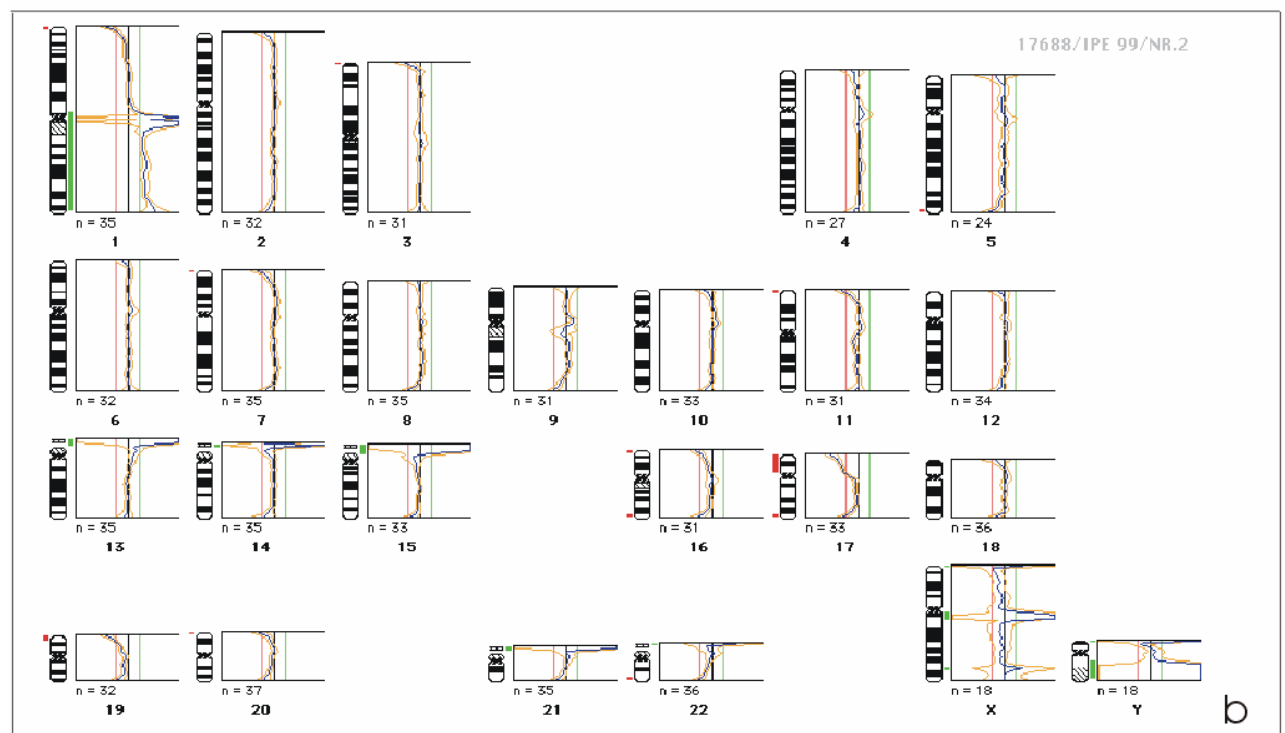
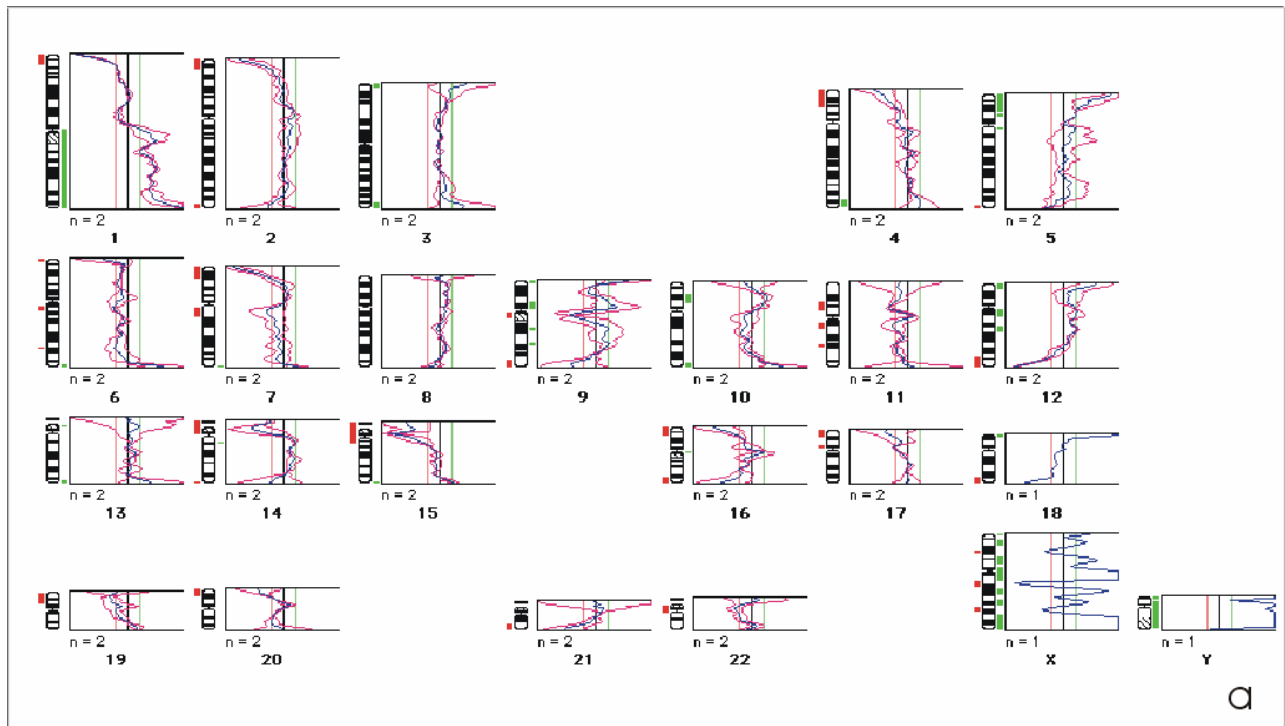


Abb. 3.13: Genomische Makroimbilanzen des Dysplastischen Knotens #2 detektiert durch die CGH-Analyse. Es lassen sich 1q-Zugewinne und 17p-Verluste nachweisen.

a: Durchschnittsprofile zweier homologer Chromosomen.

b: Mittelwert von 19 analysierten Metaphasen mit 95% Konfidenzintervall (hellbraune Linien).

3.4.1. Zusammenstellung der CGH-Daten der Dysplastischen Knoten

Die chromosomalen Makroimbilanzen der untersuchten Dysplastischen Knoten sind in Abb. 3.14 dargestellt. Die 1q-Amplifikation (3/6) ist der einzige, detektierbare, genomische Zugewinn in dieser Analyse. Verluste konnten auf den Chromosomenarmen 8p und 17p nachgewiesen werden.

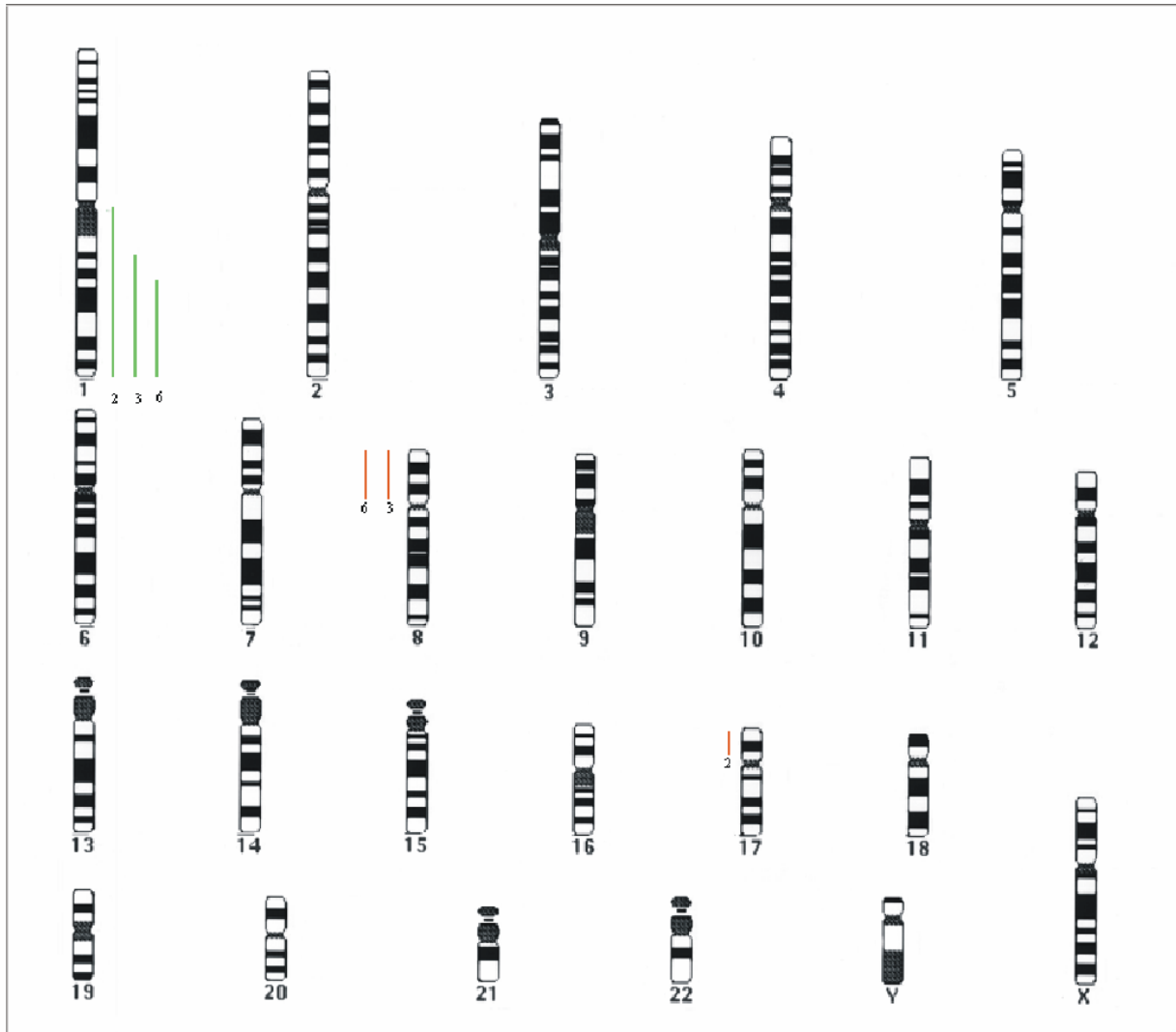


Abb. 3.14: Zusammenstellung der CGH-Analysen von 6 Dysplastischen Knoten.

Zugewinne sind auf der rechten Seite (grün) des Chromosomen-Ideogramms und Verluste auf der linken Seite (rot) dargestellt.

4. Diskussion

4.1. Methodendiskussion

Die CGH erlaubt eine umfassende Analyse von Zugewinnen bzw. Verlusten an chromosomalem Material. DNA-Segmente, die im Tumorgenom über- oder unterrepräsentiert sind, werden durch den Vergleich mit der normalen genomischen DNA identifiziert (Kallioniemi et al., 1992; Du Manoir et al., 1993). Das Verfahren bedarf weder der Kultivierung von Tumorzellen noch der Verfügbarkeit geeigneter DNA-Sonden. Darüber hinaus ist die Sensitivität für den Nachweis von DNA-Amplifikationen bei der CGH vergleichsweise hoch. Die Grenzen der Methode bestehen darin, dass nur Netto-Zugewinne oder -Verluste gemessen werden und daher balancierte Aberrationen nicht nachgewiesen werden können. Darüber hinaus können Veränderungen, die nur in einem kleinen (Tumor-) Subklon vorkommen, nicht sicher nachgewiesen werden, da die Analyse nicht auf Einzelzellniveau erfolgt.

Die Auflösung der CGH-Methode ist ähnlich wie bei der Chromosomenbänderung, das heißt Gewinne und Verluste sind erst ab ca. 10 Mbp Größe nachweisbar. Eine Ausnahme bilden hier die in Tumoren auftretenden Genamplifikationen: In Bänderungsanalysen indizieren homogen gefärbte Regionen (HSRs, homogeneously stained regions) oder „double minute“ Chromosomen (DMIN) die Existenz solcher Amplifikationen, ohne jedoch Information über die im Amplikon enthaltenen genomischen Abschnitte liefern zu können. Im Gegensatz dazu wird durch CGH die chromosomale Lokalisation des amplifizierten Bereiches aufgezeigt, so dass das Amplikon auf eine vergleichsweise eng umgrenzte Region eingegrenzt werden kann (Joos et al., 1993).

Da bei der CGH auch Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Material verwendet werden kann, besteht die Möglichkeit, diese Methode auch zur Analyse von Archivmaterial einzusetzen. In einigen Studien konnte auch gezeigt werden, dass selbst kleine, z.B. über Mikrodissektion angereicherte Zellpopulationen nach PCR-Amplifikation, Grundlage für CGH-Untersuchungen sein können (Speicher et al., 1993; 1995).

Die Validität der CGH-Verfahren wurde in dieser Arbeit anhand zweier unabhängiger

Methoden, nämlich der Giemsa-Bandenfärbung und der Interphase-FISH-Analyse nachgewiesen. Eine humane Leberzelladenom Zelllinie (HACL1) (Schleger et al., 1997) wurde erst für die Identifizierung der chromosomalen Imbalancen mit Hilfe der Giemsa-Bandenfärbung bzw. CGH-Methode zytogenetisch analysiert. Die beiden oben durchgeführten Verfahren ergaben übereinstimmende Informationen über den Genomzustand der HACL1-Zellen. Unter dieser Voraussetzung wurde die CGH-Methode für die Analyse der genomischen Imbalancen beim HCC eingesetzt. Weiterhin wurden Interphasen FISH-Experimente für die Überprüfung der CGH-Validität an zwei ausgewählten HCCs (#6 und #8) durchgeführt. Die mit CGH ermittelten Daten des Tumors #6 zeigten 1q-, 8q- und Xq-Zugewinne. Die entsprechenden FISH-Analysen identifizierten die Überrepräsentation von Chromosom 1 und 8 in Interphasekernen von Tumor #6.

Die Interphase-FISH-Analyse des Tumors #8, der unter anderem einen Verlust von Chromosom 13 zeigte, mit einer RB-Gen-Probe (13q14), zeigte entsprechend eine Hemizygotie für das RB-Gen in über 80% der Zellen. Die Korrelation zwischen den FISH-Ergebnissen und den Ergebnissen der CGH-Analyse bestätigen wiederum die Validität der CGH-Analysen.

4.2. Genomische Imbalancen bei HCCs

Die vorgestellte CGH-Analyse der humanen HCCs identifizierte eine Anzahl HCC-relevanter genomischer Imbalancen, die in Tab. 3.1 und Abb. 3.7 zusammengefasst sind. Signifikante Vermehrungen von 1q, 6p, 8q, 17q und 20q sowie Verluste von 4q, 6q, 10q, 13q und 16q wurden als spezifische chromosomale Imbalancen der HCCs identifiziert. Ein Teil der Alterationen, wie die Amplifikation von 1q und 8q korreliert mit einer vorangegangener CGH-Untersuchung an HCCs (Marchio et al., 1997), während auch signifikante Unterschiede zu dieser Studie existieren. Die vorliegende Arbeit weist einen niedrigeren durchschnittlichen Prozentsatz von genomischen Imbalancen auf. Dies liegt möglicherweise an der Fall-Selektion, da die Studie nicht auf HBV-induzierte HCCs begrenzt wurde. Manche der Alterationen in der Studie von Marchio et al. (1p del, 4p del, 17p del, 19q amp) wurden in unserer Analyse nicht detektiert. Im Gegensatz hierzu zeigt eine Arbeit von Wong et al. (1999) genomische Imbalancen, die in Art und Verteilung gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen. Allerdings ist auch hier der Prozentsatz der Imbalancen

höher als in vorliegender Arbeit. Es kann daher spekuliert werden, dass der Umfang und der Typ von genomischen Imbalancen auch Folge der zugrunde liegende HCC-Ätiologie sein kann. Darüber hinaus wurde einer Metaanalyse der insgesamt 25 CGH-Studien der HCCs von Moizadeh et al., (unpublizierte Daten) durchgeführt. Nach dieser Studie wurden 1q (57,1%), 8q (46,6%), 6p (22,3%) und 17q (22,2%) als häufigste Vermehrungen und 8p (38%), 16q (35,9%), 4q (34,3%), 17p (32,1%) und 13q (26,2%) als häufigste Verluste genomischen Materials bei HCCs benannt. Die 1q-Vermehrung wurde als ein frühes, ätiologie-unabhängiges Ereignis und Verluste von 4q und 13q wurden als typische Alterationen bei HBV-induzierten HCCs, klassifiziert. Dieser Daten sprechen weiterhin dafür, dass Ätiologie und Differenzierung Parameter sind, die mit dem Muster der genomischen Imbalancen in humanen HCCs korrelieren.

Entsprechend identifizierte die cDNA-Microarray Expression-Analyse des Tumors #6 mit genomischen Zugewinnen an 1q, 8q, und X (siehe Tab. 3.1) zahlreiche Gene, die im Vergleich mit nichttumorösem Gewebe überexprimiert sind (siehe Anhang); einige dieser Gene wurden in den amplifizierten Regionen von 1q, 8q und Xq lokalisiert. Die Korrelation der CGH-Analyse mit einem Teil der Expressionsergebnissen der Microarray-Expression-Analyse des Tumors #6 ist ein Hinweis für die mögliche Korrelation von DNA-Amplifikation und -Überexpression. Da genomische Zugewinne eine Ursache erhöhter Genexpressionen bei humanen Karzinomen sein kann, kann dies auch auf eine tumorrelevante Funktion dieser Gene hinweisen.

4.2.1. Genomische Alterationen des HCC im Vergleich zu anderen Tumoren des Verdauungstraktes

Verluste an 6q und Zugewinne von 1q, 8q sind die häufigsten Alterationen, die beim HCC sowie beim CCC nachweisbar sind. Im Kontrast dazu sind Deletionen von 1p und 9q signifikante chromosomale Verluste nur beim CCC nachweisbar.

Chromosomale Imbalance bei Pankreas-Karzinomen (Mahlamaki et al., 1997) zeigen Ähnlichkeiten zum HCC, nämlich Zugewinne an 1q, 8q, 17q, 20q und Verluste an 13q. Chromosomale Veränderungen bei colorectalen Karzinomen (De Angelis et al., 1999) ähneln ebenfalls den chromosomalen Imbalancen des HCC. Vergleichbar sind Zugewinne an 8q, 13q, 17q, 20q und Verluste an 4, 6q, 10. Die beschriebenen Daten zeigen, dass die Muster von genetischen Alterationen der HCC- Pankreas- und

Colon-Karzinomen eher dem HCC ähneln als dem CCC.

4.3. Tumorgenese

Aufgrund morphologischer Analysen (Giannini et al., 1987; Theise, 1995; Szczepanski, 1997; Kojiro, 2000) wurden Dysplastische Knoten als Vorläufer Läsionen hepatozellulärer Karzinome angesehen. Genetische Profile von Dysplastischen Knoten wurden bisher sehr wenig definiert. Die Expression von E-Cadherin, das bei HCCs häufig reduziert ist, wurde bei Dysplastischen Knoten auch oft in reduzierte Zustand detektiert (Zhao und Zimmermann, 1998). Eine erhöhte Expression von IGF-II, die beim HCC oft nachweisbar ist, wurde in Dysplastischen Knoten von Aihara et al. (1998) nachgewiesen. Die Telomerase Reverse Transkriptase, die bei HCCs oft hoch exprimiert ist (Toshikuni et al., 2000), wurde als möglicher Marker einer malignante Transformation Dysplastischer Knoten vorgeschlagen (Hytiroglou et al., 1998). Die in dieser Arbeit ermittelte genomischen Imbalancen in Dysplastischen Knoten deuten ebenfalls auf eine prämaligene Rolle hin.

Die Aberrationen in Dysplastischen Knoten sind erwartungsgemäß im Gegensatz zu HCC zahlenmäßig relativ gering. Zugewinne von 1q und Verluste von 8p und 17p sind die genomischen Veränderungen der Dysplastischen Knoten, die mittels CGH identifiziert wurden. 17p-Verluste wurden in eines anderen Studie ebenfalls als häufige Alteration (25%) bei Dysplastische Knoten identifiziert (Zondervan et al., 2000). Andere Alterationen dieser Arbeit (4q del (25%), 16q del (33%), 17q amp (25%)) wurden in unserer Analyse nicht detektiert. In unsere Studie wurden die 1q-Amplifikation (50%) als häufigste chromosomale Imbalance bei Dysplastischen Knoten identifiziert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Zugewinn 1q ein frühes Ereignis während der Hepatokarzinogenese darstellt.

4.4. Betroffene potentiell tumorrelevante Gene beim HCC

Chromosomale Regionen mit häufigen genomischen Imbalancen beherbergen vermutlich Gene, die mit der Initiation, Entwicklung und Progression des Tumors in Zusammenhang stehen. Die Analyse dieser Regionen in der OMIM-NCBI Datenbank ergab mehrere Kandidatgene (Abb. 4.1), deren Überexpressionen wie zum Beispiel *Rxry* auf 1q, und *c-myc* auf 8q bzw. Verluste, wie z.B. *RB-1* auf 13q und *smad1* auf 4q mit der Entwicklung epithelialer Tumoren in Verbindung gebracht wird.

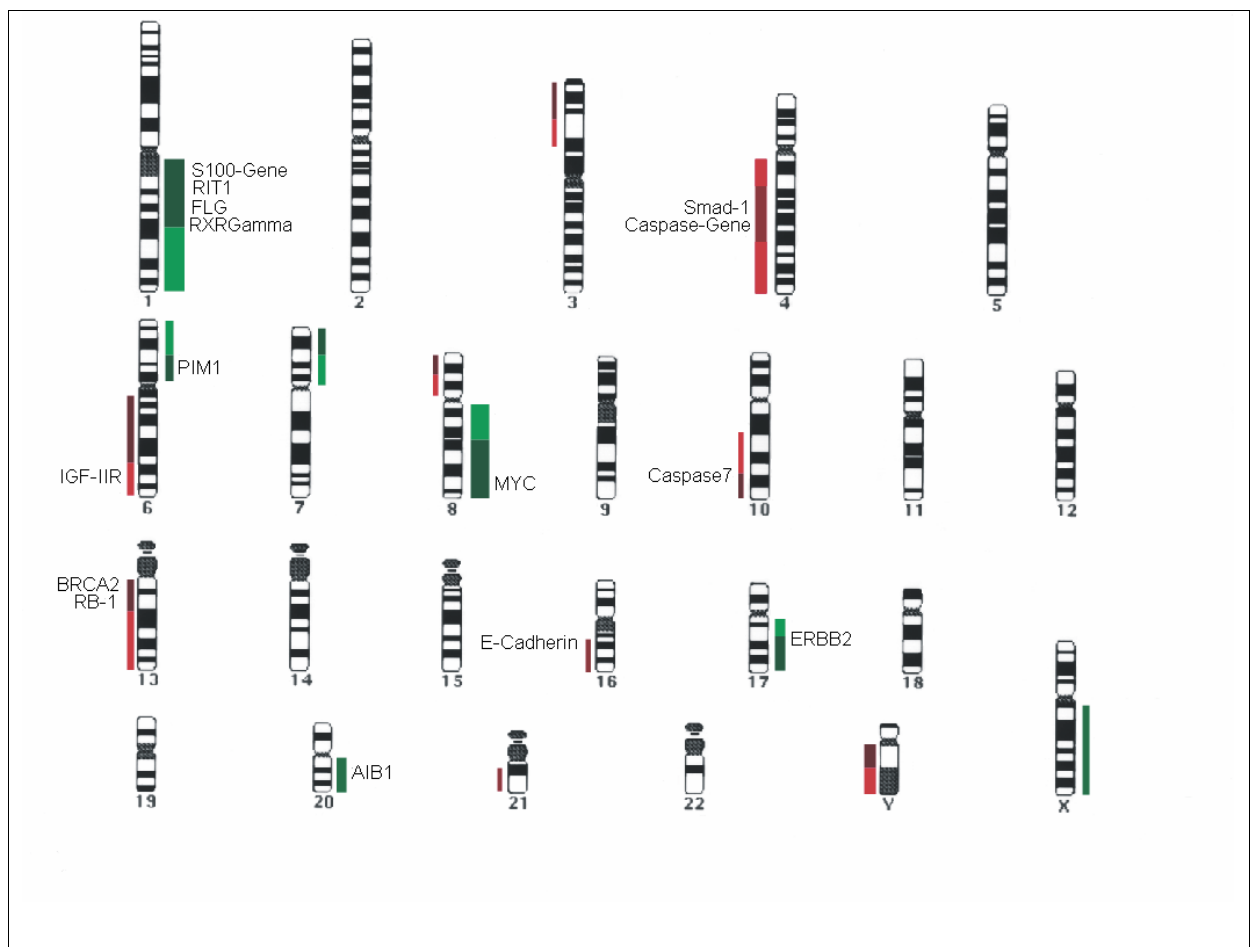


Abb.4.1: Darstellung der häufig vorkommenden spezifischen Chromosomenrearrangements und potentiell betroffener tumorrelevanter Gene. Die Balken rechts neben dem Chromosomenideogramm (grün) zeigen die chromosomalen Amplifikationen und die roten Balken links neben dem Chromosomen-Ideogramm symbolisieren die chromosomalen Verluste. Die Dicke der Balken korreliert mit der Häufigkeit der entsprechenden Veränderungen. Die dunkleren Areale stehen für die Kernregionen der Imbalancen.

4.4.1. Genomische Verluste als Zeichen mögliche Tumor-Suppressor-Gene im HCC

4q-, 6q-, 10q-, 13q- und 16q-Verluste sind die genomischen Verluste bei der untersuchten HCCs im Rahmen dieser Arbeit und repräsentieren möglicherweise genomische Sequenzen für potenzielle HCC-Suppressor-Gene, die in der Hepatokarzinogenese beteiligt sein können.

4q- Makrodeletionen wurden bei den HCCs mit der Häufigkeit 17-77% beschrieben (Buetow et al., 1989; Zhang et al., 1990; Konishi et al., 1993; Yeh et al., 1996; Boige et al., 1997; Chou et al., 1998). Außerdem wurde eine 4q chromosomale Bruchstelle in vier von 50 HCCs sowie eine HBV-Integrationsstelle bei einem HCC bei 4q32.1 gefunden (Pasquinelli et al., 1988). Diese Ergebnisse deuten auf die Lokalisation wenigstens eines Tumor-Suppressor-Gens auf 4q hin, das für die HCC-Entwicklung relevant ist. Als mögliche Verantwortliche Gene wurden Smad-1-Gen (4q28) und die Caspase Gene Caspase-3 (4q35) und Caspase-6 (4q25) diskutiert. Die Caspase-Gene (Apoptosis-Related Cysteine Protease) sind als negative Regulatorgene bei der Tumorgenese bekannt. Dennoch wurde ein Ziel-Tumor-Suppressor-Gen auf 4q bislang definitiv noch nicht identifiziert.

Die 6q-Deletionen wurden in mehreren humanen Karzinomen einschließlich des HCCs nachgewiesen (Boige et al., 1997; Nagaie et al., 1997; Imazeki und Saisho, 1999; Okabe et al., 2000; Li et al., 2001). Der IGF-II-R ist auf Chromosom 6q26 lokalisiert und an der lysosomalen Degradation beteiligt. Seine biologische Rolle bei der Aktivierung von TGF- β - einem starken Wachstumshemmer - und der Degradation von IGF-II - ein Mitogen - der oft von Tumoren überexprimiert wird, ordnet IGF-II-R den Tumor-Suppressor-Genen zu. Bis zu 70% der humanen hepatozellulären Karzinome zeigen einen Verlust der Heterozygotie des M6P/IGF-II-R-Locus auf Chromosom 6q26 (De Souza et al., 1995). Motyka et al. (2000) haben die Funktion des IGF-II-R als Serine Proteinase Granzyme B (GZMB)-Rezeptor gezeigt. GZMB ist entscheidend für die schnelle Induktion von Apoptose in den Ziellzellen durch die zytotoxische T-Zellen. Die Inhibition der GZMB/IGF-II-R-Interaktion verhindert den Inhibitions-Effekt auf die Induktion der Apoptose.

Der Verlust von Heterozygotie auf 10q ist eine genomische Alteration, die ungefähr bei 80% der Medulloblastome und dem Glioblastoma multiforme (GBM) einem malignanten Gehirntumor bei Kindern und Erwachsenen vorkommt (Maier et al., 1998). Die Analyse des GBM, des Prostata-Karzinoms, des malignen Melanoms und

des Endometrium-Karzinoms liefert Anhaltspunkte für die Existenz zweier Tumor-Suppressor-Gene auf 10q23-qter (Rasheed et al., 1995; Albarosa et al., 1996).

Über den Verlust von Heterozygotie von Chromosom 13q bei HCCs (über 49%) wurde bereits von Murakami et al. (1991) berichtet. Die LOH-Analysen bei HCCs zeigten oft zwei separate Regionen, die häufig deletiert sind; eine der beiden Region enthält das RB1-Gen. In der anderen Region wurde das BRCA2-Gen lokalisiert (Kuroki et al., 1995). Die Inaktivierung des RB1-Gens spielt in der Genese und Progression von mehreren humanen Karzinomen eine grundlegende Rolle. Das RB-Protein (pRB) fungiert als transkriptionaler Regulator von Genen, und ist in die DNA-Synthese und die Zell-Zyklus-Kontrolle involviert. Inzwischen wurden die RB1-Mutationen in einer Anzahl mesenchymaler und epithelialer Malignome festgestellt. Bei LOH-Analysen von HCCs wurden in über 25% Sequenz-Abnormalien im RB1-Gen Locus (13q14.1-14.2) nachgewiesen (Murakami et al., 1991). Die Rolle des BRCA2-Gens als Tumor-Suppressor-Gen im Mamma-Karzinom ist gut dokumentiert (Wooster et al., 1994, 1995). Darüber hinaus wurde über seine Suppressor-Funktion in sporadischen Karzinomen des exokrinen Pankreas von Schutte et al. (1995) und Teng et al. (1996) berichtet. Über einen Verlust der BRCA2-Funktion bei HCCs wurde erstmals von Kuroki et al. (1995) berichtet. Die CGH-Analyse der HCCs zeigen in vorliegender Arbeit den Verlust der 13q-Region, die nicht nur das RB1-Gen, sondern auch das Gen BRCA2 (13q12.3) enthält.

Die chromosomale Makrodeletion von 16q ist eine der häufigsten Deletionen bei humanen Karzinomen. Sie wurde z.B. bei Mamma- (Cleto-Jansen et al., 1994; Schmutzler et al., 1996), Prostata- (Cher et al., 1995; Elo et al., 1999) und Endometrium-Karzinomen (Kihana et al., 1996) sowie Wilm's Tumoren (Mason et al., 2000) beobachtet. Es korreliert bei einigen Tumoren, wie dem Prostata- (Pan et al., 1998; Li et al., 1999) und dem Mamma-Karzinom (Driouch et al., 1997), mit dem Metastasierungsverhalten. Ein LOH von Chromosom 16q wurde bei 40-70% der HCCs beobachtet (Tsuda et al., 1990, Nishida et al., 1992; Yeh et al., 1996, Piao et al., 1999). Kuroki et al. (1995) und Tsuda et al. (1990) zeigten, dass eine aggressiveres Tumor-Verhalten während der HCC-Progression mit einem LOH von 16q in Zusammenhang steht. In einem HCC wurde die undifferenzierte Tumor-Morphologie mit einem Allel-Verlust von 16q korreliert (Shimoyama et al., 1991). Die vorhandenen Daten zeigen, dass der Verlust der Heterozygotie von Chromosom 16q ein wesentliche Grundlage in der Genese von Metastasen bei vielen Tumoren ist. Dies würde in dieser Region auf die Existenz eines oder mehrerer Gens/e, welche

das Tumorwachstum hemmen, hindeuten. Das E-cadherin-Gen wurde von Chen et al. (1991) auf 16q22.1 lokalisiert. Eine reduzierte E-cadherin-Expression kann zur Störung der Zell-Zell-Adhäsion und damit zu Tumor-Invasion und Metastasierung führen (Frixen et al., 1991; Vleminckx et al., 1991; Berx et al., 1995). Ein häufiger Allel-Verlust unter Beteiligung des Cadherin-Gen-Klusters inklusive E-Cadherin (16q22.1) wurde z.B. beim Prostata- (Pan et al., 1998; Li et al., 1999) und Mamma-Karzinom (Driouch et al., 1997; Huipin et al., 1999) nachgewiesen. Slagle et al. (1993) berichten von Allel-Verlusten unter Beteiligung des E-cadherin-Gens in 85% der untersuchten HCCs. Funktionelle Inaktivierung von E-cadherin kann zusätzlich epigenetisch durch Hypermethylierung entstehen (Graff et al., 1995). Eine erblich bedingte Inaktivierung eines E-cadherin- Alleles ist Ursache des hereditären Magen-Karzinoms (Guilford et al., 1998).

4.4.2. Genomische Zugewinne als Hinweis auf potentielle Onkogene beim HCC

Vermehrungen genomischen Materials der untersuchten HCCs auf 1q, 6p, 8q, 17q und 20q repräsentieren möglicherweise genomische Sequenzen für relevante protumorigene Faktoren, die in der Hepatokarzinogenese eine Rolle spielen können. Die 1q-Amplifikationen wurden bei verschiedenen Malignancen wie z.B. dem Prostata-Karzinom (Brothman, 1997; Nupponen und Visakorpi, 2000), dem Mamma-Karzinom (Burki et al., 2000; Larramendy et al., 2000; Seute et al., 2001), dem papillären Schilddrüsen-Karzinom (Kjellman et al., 2001) und dem Wilms' Tumor (Hing et al., 2001) nachgewiesen. Diese Daten deuten auf die Lokalisation von relevanten Protoonkogenen oder anderen potenziellen Tumorgenen auf dem q-Arm des Chromosoms 1 hin, die auch bei der HCC-Tumorgenese von Bedeutung sind. Der Chromosomenabschnitt 1q12-25 ist die Kernregion des amplifizierten Bereichs. In dieser Region liegen mehrere Gene, von denen einige an der Hepatokarzinogenese beteiligt sein können. Das FLG Gen (Filaggrin) wurde auf 1q21-22 lokalisiert. Profilaggrin ist eine Protein-Komponente der Keratohyalin granuler der Epidermis. Die Amplifikation des FLG-Gens wurde in mehreren Sarkomen beobachtet (Forus et al., 1998). Die S100-Proteine werden von Genen kodiert, die auf dem Chromosom 1q21 lokalisiert sind. Die Überexpression von CAPL (S100A4, S100D, S100A5) und CACY (S100A6) ist mit Tumor-Progression und Metastasierung assoziiert (Engelkamp et al., 1993; Forus et al.,

1998). RXR γ (Retinoic Acid Receptor Gamma Gen) ist auf 1q22-23 lokalisiert; dieses Gen wurde ursprünglich aus dem HCC eines Patienten kloniert und wurde häufig in HCCs als überexprimiert nachgewiesen (de The et al., 1987; Benbrook et al., 1988). Das „RIT1 Gen“ ist auf 1q21.3 lokalisiert und ist ein Mitglied der Ras-Familie. Das RIT1-Protein ist in molekularer Struktur und Funktion dem Ras-Protein sehr ähnlich. Amplifikationen des RIT1-Gens wurden in vielen HCCs gefunden (Li et al., 2003). Das Onkogen PIM1 eine Serin/Threonin-Kinase wurde von Ragoussis et al. (1992) auf 6p21.2 lokalisiert. Es ist in der Leber und der Milz während der fötalen Hematopoese hoch exprimiert. Im Kontrast dazu ist es bei Erwachsenen nur gering in zirkulierenden Granulozyten exprimiert. PIM1-Überexpressionen sind aus akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien bekannt (Amson et al., 1989). Dhanasekaran et al. (2001) berichten von PIM1-Überexpression beim Prostata-Karzinom.

Zugewinne von 8q wurden bei Karzinomen der Brust (Tirkkonen et al., 1998), der Pancreas (Mahlamaki et al., 1997), der Kopf und Hals-Region (Bockmuhl et al., 1998), der Lunge (Bjorkqvist et al., 1998) und der Leber (Marchio et al., 1997; Wong et al., 1999) nachgewiesen.

Das *c-myc* Protoonkogen befindet sich bei Chromosom 8q24 wahrscheinlich auf 8q24.1 (Taub et al., 1982; Berge-Lefranc et al., 1985). Das *c-myc*-Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor (MYC), der in die Kontrolle von Zellproliferation und Differentiation involviert ist. Die Deregulation der *c-myc* Expression, die durch retrovirale Insertion, chromosomale Translokation oder Genamplifikation verursacht werden kann, ist oft mit der Tumorgenese assoziiert. Rearrangements des *c-myc*-Gens wurde wegen der Insertion von DNA-Sequenzen des humanen Papillomvirus (HPV), hauptsächlich HPV16 und HPV18 mit der Entstehung des Gebärmutterhals-Karzinoms und seinen nichtinvasiven Vorläufern in Verbindung gebracht. Morse et al. (1988) berichten vom Rearrangement des *c-myc*-Gens durch Insertion von LINE-1-Elementen im Mamma-Karzinomen. Über die direkte Aktivierung der Telomerase durch MYC berichten Wu et al. (1999). Die MYC-Überexpression in der humanen Hepatom-Zelllinie Hep G2 ist bekannt (Huber und Thorgeirsson, 1987), außerdem wurde eine Überexpression von *c-myc* in vielen HCCs nachgewiesen (Tabor, 1994). Die MYC-Überexpression als Folge einer genomische Amplifikation wurde von Koskinen et al. (1993) nachgewiesen.

Wang et al. (2002) haben eine größere Frequenz von *c-myc* Amplifikationen in metastasierenden HCCs (45%) im Vergleich zu nicht-metastasierenden HCCs (29%) sowie in rekurrenten HCCs (60%) im Vergleich zu primären HCCs (38%) nachgewiesen. Sie spekulieren, dass die Amplifikation des *c-myc* Protooncogens eine späte genetische Alteration in der Progression des HCCs darstellt, die mit einer schlechteren Prognose korreliert. Das Onkogen PVT1 (MYC-Aktivator) liegt 100 bis 500 Kb vom *c-myc*-Gen entfernt auf 8q24 und ist häufig in amplifizierter Form zusammen mit *c-myc* in Tumorzellen nachweisbar (Shtivelman und Bishop, 1989; Shtivelman et al., 1989).

Die 17q-Amplifikation ist in die Tumorgenese zahlreicher Tumoren involviert. Der ERBB2-Locus wurde von Muleris et al. (1997) auf dem Chromosom 17q21.1 lokalisiert. Es wird mit der Entwicklung von Leukämien (Kaneko et al., 1987), Adenokarzinomen der Speicheldrüse (Semba et al., 1985) und Mamma-Karzinomen in Verbindung gebracht. Die Überexpression von ERBB2 führt zu einer Taxol-Resistenz im Mamma-Karzinom. Yu et al. (1998) zeigten, dass die Taxol-induzierte Apoptose durch Überexpression von ERBB2 inhibiert wird.

Amplifikationen von 20q wurden u.a. beim Pankreas-Karzinom (Mahlamaki et al., 1997), Mamma-Karzinom (Trikkonen et al., 1998), Colon-Karzinom (Schlegel et al., 1995) und Harnblasen-Karzinom (Reznikoff et al., 1996) nachgewiesen. Das AIB1 (amplification in breast cancer-1) wurde auf 20q12 lokalisiert und ist ein Mitglied der nukleären Rezeptor-Coaktivatoren (SRC)-1-Familie. AIB1 ist in Mamma- und Ovarial-Karzinom-Zelllinien sowie in Mamma-Karzinom-Biopsien amplifiziert und überexprimiert. Es interagiert ligandabhängig mit dem Östrogen-Rezeptor und führt zu starker, östrogenabhängiger Transkription. Daher könnte die alterierte AIB1-Expression zur Entwicklung von östrogenabhängigen Karzinomen beitragen (Anzick et al., 1997). Die AIB1-Amplifikation wurde in HCCs nachgewiesen und als ein späteres Ereignis in der Progression von HCCs gedeutet (Wang et al., 2002).

Der Zugewinn an genomischen Material aus den genomischen Regionen von Wachstumsfaktor-Genen, die häufig in HCCs überexprimiert sind, wie z. B. IGF-II (11p15.5), wurden bei der CGH-Analyse im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Eine ca. 12-fache IGF-II Überexpression wurde bei der Microarray-Analyse von Tumor# 6 nachgewiesen (siehe Anhang), obwohl die CGH-Analyse von Tumor# 6 (Tab. 3.1) nur Zugewinne an 1q, 8q und Xq zeigte.

Alle diese Daten deuten darauf hin, dass in diesen Tumor eine genomische Amplifikation eher nicht für die Überexpression dieses Wachstumsfaktors verantwortlich ist.

5. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit ungefähr 1,000,000 neuen Fällen pro Jahr einer der häufigsten malignen Tumore weltweit. Es ist hauptsächlich in Südostasien und im südlichen Afrika verbreitet. Risikofaktoren sind chronische Infektionen mit Hepatitis Viren (HBV, HCV), Aflatoxin B1-Belastung und chronischer Alkoholkonsum. Die Hepatokarzinogenese ist ein komplexer Prozess, der mit der Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen assoziiert ist. Die diagnostischen Kriterien des HCC sind gut etabliert und basieren auf architektonischen und zytologischen Veränderungen.

Um Veränderungen auf genomischer Ebene in HCCs zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Untersuchung Frischgewebeproben von 21 Patienten mit HCCs und formalin-fixiertes, paraffineingebettetes Material von 6 Dysplastischen Knoten sowie formalin-fixiertes, paraffineingebettetes Material von 6 Cholangiozellulären Karzinomen (CCCs) mittels Comparativer genomischer Hybridisierung (CGH) analysiert. In den untersuchten HCCs konnte Zugewinne auf 1q (12/21), 6p (6/21), 8q (11/21), 17q (6/21), 20q (6/21), sowie Verluste auf 4q (7/21), 6q (4/21), 10q (3/21), 13q (4/21), 16q (3/21) identifiziert werden. Die Validität der mit diesem Ansatz erzielten Ergebnisse konnte anhand von unabhängigen Kontrollexperimenten mit Interphase-FISH-Analyse nachgewiesen werden. Die erzielten Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer mittlerweile ebenfalls publizierter Studien. Die in Dysplastische Knoten identifizierten Veränderungen sind Gewinne auf 1q (50%) sowie Verluste auf 8p und 17p. Daher stellt 1q eine Kandidatenregion für die Identifizierung jener Gene dar, die bereits im frühem Stadium der Hepatokarzinogenese aktiviert sind.

In den untersuchten CCCs konnten Verluste auf 1p36 (4/6), 9q34 (4/6), 6q23-27 (3/6) und Zugewinne auf 1q21-24 (3/6), 8q13 (3/6), 5q21-22 (2/6) nachgewiesen werden. Im Vergleich mit HCCs zeigten sich Gemeinsamkeiten im Bereich der Zugewinne (1q und 8q), bei den Verlusten jedoch deutliche Unterschiede.

Die Gen-Expressionsanalyse eines HCCs mit Gewinnen auf 1q, 8q, und Xq zeigte die Überexpression von einigen Genen, die in den amplifizierten Regionen liegen. Daher kann spekuliert werden, dass die DNA-Amplifikation in der Hepatokarzinogenese bei einigen Genen ein Mechanismus der Aktivierung sein kann.

Zusammengefasst konnte somit durch CGH-Analyse charakteristische, genomische Imbalances des HCC ermittelt werden. Der Vergleich mit Veränderungen bei prämaligen Läsionen erlaubt die Unterscheidung früher (prämaligener) und später (progressionsassoziierter) Veränderungen.

6. Literaturverzeichnis

Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science*, 254:1146-1153 (1991)

Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G → T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:8586-8590 (1993)

Aihara T, Noguchi S, Miyoshi Y, Nakano H, Sasaki Y, Nakamura Y, Monden M, Imaoka S. Allelic imbalance of insulin-like growth factor II gene expression in cancerous and precancerous lesions of the liver. *Hepatology*, 28:86-89 (1998)

Albarosa R, Colombo BM, Roz L, Magnani I, Pollo B, Cirenei N, Giani C, Conti AM, DiDonato S, Finocchiaro G. Deletion mapping of gliomas suggests the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am J Hum Genet*, 58:1260-1267 (1996)

Albertoni M, Daub DM, Arden KC, Viars CS, Powell C, Van Meir EG. Genetic instability leads to loss of both p53 alleles in a human glioblastoma. *Oncogene*, 16: 321-326 (1998)

Amson R, Sigaux F, Prezdborski S, Flandrin G, Givol D, Telerman A. The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:8857-8861 (1989)

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, 277:965-968 (1997)

Balsara BR, Pei J, De Rienzo A, Simon D, Tosolini A, Lu YY, Shen FM, Fan X, Lin WY, Buetow KH, London WT, Testa JR. Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23.1-24.1. *Genes Chromosomes Cancer*, 30:245-253 (2001)

Bannasch P, Schröder CH. Tumors and tumors-like lesions of the liver and biliary tract: pathogenesis of primary liver tumors. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP, (eds.), Pathology of the liver, New York: Churchill Livingstone pp. 777-825 (2002)

Benbrook D, Lernhardt E, Pfahl M. A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature*, 333:669-672 (1988)

Berge-LeFranc JL, Cartouzou G, Mattei MG, Passarge E, Malezet-Desmoulins C, Lissitzky S. Localization of the thyroglobulin gene by in situ hybridization to human chromosomes. *Hum Genet*, 69:28-31 (1985)

Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, Van de Vijver M, Cornelisse C, Van Roy F. *E-cadherin* is a tumor/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*, 14:6107-6115 (1995)

Bentz M, Döhner H, Huck K, Schütz B, Ganser A, Joos S, du Manoir S, Lichter P. Comparative genomic hybridization in the investigation of myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer*, 12:193-200 (1995)

Bjorkqvist AM, Tammilehto L, Nordling S, Nurminen M, Anttila S, Mattson K, Knuutila S. Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung. *Br J Cancer*, 77:260-269 (1998)

Bockmuhl U, Wolf G, Schmidt S, Schwendel A, Jahnke V, Dietel M, Petersen I. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck*, 20:145-151 (1998)

Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Capron F, Schmitz A, Olschwang S, Thomas G. Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer Res* 57:1986-1990 (1997)

Bosch FX. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma. in: Okuda K, Tabor E, (eds.), Liver cancer. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo: Churchill Livingstone pp. 13-28 (1997)

Bressac J, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of the p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350:429-431 (1991)

Brothman AR. Cytogenetic studies in prostate cancer: are we making progress? *Cancer Genet Cytogenet*, 95:116-121 (1997)

Buetow KH, Murray JC, Israel JL, London WT, Smith M, Kew M, Blanquet V, Brechot C, Redeker A, Govindarajah S. Loss of heterozygosity suggests tumor suppressor gene responsible for primary hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:8852-8856 (1989)

Burki NG, Caduff R, Walt H, Moll C, Pejovic T, Haller U, Ward DC. Comparative genomic hybridization of fine needle aspirates from breast carcinomas. *Int J Cancer*, 88:607-613 (2000)

Cariani E, Dubois N, Lasserre C, Briand P, Brechot C. Insulin-like growth factor II (IGF-II) mRNA expression during hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *J Hepatol* 13:220-226 (1991)

Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Ullrich A, Brechot C. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res*, 48:6844-6849 (1988)

Casola S, Ungaro P, Pedone PV, Lazzaro D, Fattori E, Ciliberto G, Zarrilli R, Bruni CB, Ricco A. Loss of heterozygosity of imprinted genes in SV40/T antigen-induced hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 11:711-721 (1995)

Chen LZ, Harris PC, Apostolou S, Bake E, Holman K, Lane SA, Nancarrow JK, Whitmore SA, Stallings RL, Hildebrand CE, Richards RI, Sutherland GR, Callen DF. A refined physical map of the long arm of human chromosome 16. *Genomics* 10:308-312 (1991)

Cher ML, Ito T, Weidner N, Carroll PR, Jensen RH. Mapping of regions of physical deletion on chromosom 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Urol*, 153:249-254 (1995)

Chou YH, Chung KC, Jeng LB, Chen TC, Liaw YF. Frequent allelic loss on chromosomes 4q and 16q associated with human hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Lett.*, 123:1-6 (1998).

Chung YH, Kim JA, Song BC, Lee GC, Koh MS, Lee YS, Lee SG, Suh DJ. Expression of transforming growth factor-alpha mRNA in livers of patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 89:977-982 (2000)

Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Callen DF, Sutherland GR, Hansen B, Deville P, Cornelisse CJ. At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 9:101-107 (1994)

Collonge-Rame MA, Bresson-Hadni S, Koch S, Carbillet JP, Blagosklonova O, Manton G, Miguet JP, Heyd B, Bresson JP. Pattern of chromosomal imbalances in non-B virus related hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 127:49-52 (2001)

Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, 64:271-280 (1991)

Cullan KJ, Yee D, Rosen N. Insulinlike growth factors in human malignancy. *Cancer Invest*, 9:443-454 (1991)

De Angelis PM, Clausen OP, Schjolberg A, Stokke, Ø. Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer*, 80:526-535 (1999)

de la Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutation of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:8847-8851 (1998)

del Olmo JA, Serra MA, Rodriguez F, Escudero A, Gilabert S, Rodrigo JM. Incidence and risk factors for hepatocellular carcinoma in 967 patients with cirrhosis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124:560-564 (1998)

D'Errico A, Grigioni WF, Fiorentino M, Baccarini P, Lamas E, De Mitri S, Gozzetti G, Mancini AM, Brechot C. Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) in human hepatocellular carcinomas: An immunohistochemical study. *Pathol Int*, 44:131-137 (1994)

Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res*, 47:707-712 (1987)

De Souza AT, Hankins GR, Waschington MA, Fine RL, Orton TC, Jirtle RL. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphatase/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene*, 10:1725-1729 (1995)

de The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 330:667-670 (1987)

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurashi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, 412:822-826 (2001)

Di Bisceglie AM, Rustgi VK, Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Lotze MT. Hepatocellular carcinoma. *Ann Intern Med*, 108:390-401 (1988)

Driouch K, Dorion Bonnet F, Briffod M, Champeme MH, Longy M, Lidereau R. Loss of heterozygosity on chromosome arm 16q in breast cancer metastases. *Genes Chromosomes Cancer*, 19:185-191 (1997)

Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:27-41 (1995).

Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*, 90:590-610 (1993)

Elo JP, Harkonen P, Kyllonen AP, Lukkarinen O, Vihko P. Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient. *Br J Cancer*, 79:156-160 (1999)

El-Serag HB, Mason AC. Rising risk of hepatocellular carcinoma. In the United States. *N Engl J Med* 340:745-750 (1999)

Engelkamp D, Schafer BW, Mattei MG, Erne P, Heizman CW. Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:6547-6551 (1993)

Farber E. The step-by-step development of epithelial cancer: From phenotype to genotype. *Adv Cancer Res*, 70:21-48 (1996)

Forus A, Berner JM, Meza-Zepeda LA, Saeter G, Mischke D, Fodstad O, Myklebost O. Molecular characterization of a novel amplicon at 1q21-q22 frequently observed in human sarcomas. *Br J Cancer*, 78:495-503 (1998)

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 113:173-185 (1991)

Fu XX, Su CY, Lee Y, Hintz R, Biempica L, Snyder R, Rogler CE. Insulinlike growth factor II expression and oval cell proliferation associated with hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus carriers. *J Virol*, 62:3422-3430 (1988)

Fujimoto Y, Hampton LL, Wirth PJ, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinomas in China. *Cancer Res*, 54:281-285 (1994)

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281:646-650 (1979)

Geissler M, Gesien A, Wands JR. Molecular mechanisms of hepato-carcinogenesis. In: Okuda K, Tabor E, (eds.), Liver Cancer. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo: Churchill Livingstone pp. 59-88 (1997)

Giannini A, Zampi G, Bartoloni F, Omer S. Morphological precursors of hepatocellular carcinoma: a morphometrical analysis. *Hepatogastroenterology*, 34:95-97 (1987)

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res*, 55:5195-5199 (1995)

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatly K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I,

Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1.612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The medical research council adult and children's leukaemia working parties. *Blood*, 92:2322-2333 (1998)

Grisham JW. Interspecies comparison of liver carcinogenesis: Implications for cancer risk assessment. *Carcinogenesis*, 18:59-81 (1997)

Gschwend M, Levrán O, Kruglyak L, Ranade K, Verlander PC, Shen S, Faure S, Weissenbach J, Altay C, Lander ES, Auerbach AD, Botstein D. A locus for Fanconi anemia on 16q determined by homozygosity mapping. *Am J Hum Genet*, 59:377-384 (1996)

Guan XY, Fang Y, Sham JS, Kwong DL, Zhang Y, Liang Q, Li H, Zhou H, Trent JM. Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 29:110-116 (2000)

Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taita H, Scoular R, Miller A, Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392:402-405 (1998)

Hankel T, Schmidt ER. Cotransposition of a highly repetitive DNA element with flanking sequences in the genome of the midge *Chironomus thummi*. *J Mol Evol*, 26:311-319 (1987)

Harris TM, Rogler LE, Rogler CE. Reactivation of the maternally imprinted IGFII allele in TGF α induced hepatocellular carcinoma in mice. *Oncogene*, 16:203-209 (1998)

Hing S, Lu YJ, Summersgill B, King-Underwood L, Nicholson J, Grundy P, Grundy R, Gessler M, Shipley J, Pritchardjones K. Gain of 1q is associated with adverse

outcome in favorable histology Wilms`tumors. *Am J Pathol*, 158:393-398 (2001)

Hirohashi S, Ishak KG, Kojiro M, Wanless IR, Theise ND, Tsukuma H, Blum HE, Deugnier Y, Laurent Puig P, Fischer HP, Sakamoto M. in: Hamilton ST, Aaltonen LA (eds.), Pathology & Genetics. Tumors of the digestive system. WHO, Geneva, pp. 159-180 (2000)

Hsia CC, Axiotis CA, Di Bisceglie AM, Tabor E. Transforming growth factor-alpha in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. *Cancer*, 70:1049-1056 (1992)

Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutation hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350:427-428 (1991)

Hsu T, Möröy T, Etiemble J, Louise A, Trepo C, Tiollais P, Buendia M. Activation of *c-myc* by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell*, 55:627-635 (1988)

Huber BE, Thorgeirsson SS. Analysis of *c-myc* expression in human hepatoma cell line. *Cancer Res*, 47:3414-3420 (1987)

Huiping C, Sigurgeirsdottir JR, Jonasson JG, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT, Egilsson V, Ingvarsson S. Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer. *Br J Cancer*, 81:103-110 (1999)

Hytiroglou P, Kotoula V, Thung SN, Tsokos M, Fiel MI, Papadimitriou CS. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer*, 82:1831-1838 (1998)

Imazeki F, Saisho H. Molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *Gan To Kagaku Ryoho*, 26:2154-2161 (1999)

International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*, 22:983-993 (1995)

Jackson PE, Groopman JD. Aflatoxin and liver cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 13:545-555 (1999)

Joos S, Schertan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P. Detection of amplified genomic sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet*, 90:584-589 (1993)

Kallioniemi OP, Kallioniemi AH, Piper J, Isola JJ, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10:231-243 (1994)

Kallioniemi AH, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258:818-820 (1992)

Kaneko Y, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Toyoshima K, Yamamoto T. Human c-erbB-2 remains on chromosome 17 in band q21 in the 15;17 translocation associated with acute promyelocytic leukemia. *Jpn J Cancer Res*, 78:16-19 (1987)

Kihana T, Yano N, Murao S, Iketani H, Hamada K, Yano J, Matsuura S. Allelic loss of chromosome 16q in endometrial cancer: correlation with poor prognosis of patients und less differentiated histology. *Jpn J Cancer Res*, 87:1184-1190 (1996)

Kishimoto Y, Morisawa T, Kitano M, Shiota G, Horie Y, Suou T, It Kawasaki H, Hasegawa J. Loss of heterozygosity of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and p53 genes in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 20:68-83 (2001)

Kjellman P, Lagercrantz S, Hoog A, Wallin G, Larsson C, Zedenius J. Gain of 1q and loss of 9q21.3-q32 are associated with a less favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 32:43-49 (2001)

Kojiro M. Premalignant lesions of hepatocellular carcinoma: pathologic viewpoint. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 7:535-541 (2000)

Kondo Y. Pathology of early hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions in the liver. In: Okuda K, Tabor E. (eds.), Liver Cancer. New York: Churchill Livingstone, pp. 135-154 (1997)

Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Sato C, Tsuruta K, Maeda Y, Koike M, Tanaka S, Nakamura Y, Hattori N, Miyaki M. Genetic changes and histopathological grades in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 54:893-899 (1994)

Koskinen PJ, Alitalo K. Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death. *Semin. Cancer Biol*, 4:3-12 (1993)

Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*, 17:1595-1606 (1997)

Kuroki T, Fujiwara Y, Nakamori S, Imaoka S, Kanematsu T, Nakamura Y. Evidence for the presence of two tumour-suppressor genes for hepatocellular carcinoma on chromosome 13q. *Br J Cancer* 72:383-385 (1995)

Kusano N, Shiraishi K, Kubo K, Oga A, Sasaki K. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: Their relationship to clinicopathological features. *Hepatology*, 29:1858-1862 (1999)

Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:6633-6637 (1981)

Larramendy ML, Lushnikova T, Bjorkqvist AM, Wistuba II, Virmani AK, Shivapurkar N, Gazdar AF, Knuutila S. Comparative genomic hybridization reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, 119:132-138 (2000)

Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-rossi J. Genetic alterations associated with

hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 120:1763-1773 (2001)

Lee WH, Shew JY, Hong FD, Sery TW, Donoso A, Young LJ, Bookstein R, Lee E. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*, 329: 642-645 (1987)

Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 19:3717-3726 (2000)

Li C, Berx G, Larsson C, Auer G, Aspenblad U, Pan Y, Sundelin B, Ekman P, Nordenskjold M, van Roy F, Bergerheim US. Distinct deleted regions on chromosome segment 16q23-24 associated with metastases in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 24:175-182 (1999)

Li JT, Liu W, Kuang ZH, Chen HK, Li DJ, Feng QS, Liu QC, Hu B. Amplification of RIT1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Ai Zheng*, 22:695-699 (2003)

Li SP, Wang HY, Li JQ, Zhang CQ, Feng QS, Huang P, Yu XJ, Huang LX, Liang QW, Zeng YX. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in hepatocellular carcinoma in Southern China. *J Hepatol*, 34:840-849 (2001)

Li X, Nong Z, Ekström C, Larsson E, Nordlinder H, Hofmann WJ, Trautwein C, Odenthal M, Dienes HP, Ekström TJ, Schirmacher P. Disrupted IGF-II promoter control by silencing of promoter P1 in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 57:2048-2054 (1997)

Lichter P, Cremer T. Chromosome analysis by nonisotopic in situ hybridization. In: Rooney DE, Czepulkowski BH (eds.), Human cytogenetics: A practical approach. 2nd

ed. IRL Press, Oxford, pp. 157-192 (1992)

Lichter P, Bentz M, Du Manoir S, Joos S. Comparative genomic hybridization. In: Verma R. Babu A. (eds.), Human chromosomes. New York: Mc Graw-Hill, pp. 191-210 (1994)

Liu P, Terradillos O, Renard CA, Feldman G, Buendia MA, Bernuau D. Hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus/c-myc mice: Sustained cell proliferation and biphasic activation of insulin-like growth factor II. *Hepatology*, 25:874-883 (1997)

Maggioni M, Coggi G, Cassani B, Bianchi P, Romagnoli S, Mandelli A, Borzio M, Colombo P, Roncalli M. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology*, 32:942-946 (2000)

Maier D, Zhang Z, Taylor E, Hamou MF, Gratzl O, Van Meir EG, Scott RJ, Merlo A. Somatic deletion mapping on chromosome 10 and sequence analysis of PTEN/MMAC1 point to the 10q25-26 region as the primary target in low-grade and high-grade gliomas. *Oncogene*, 16:3331-3335 (1998)

Mahlamaki EH, Hoglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Kallioniemi OP, Johansson B. Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 20:383-391 (1997)

Marchio A, Pineau P, Meddeb M, Terris B, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Distinct chromosomal abnormality pattern in primary liver cancer of non-B, non-C patients. *Oncogene*, 19:3733-3738 (2000)

Marchio A, Meddeb M, Pineau P, Danglot G, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridisation. *Genes Chromosomes Cancer*, 18:59-65 (1997)

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DS, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci*

USA 77:2941-2945 (1980)

Marion PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays*, 21:1021-1030 (1999)

Mason JE, Goodfellow PJ, Grundy E, Skinner MA. 16q loss of heterozygosity and microsatellite instability in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg*, 35:891-896 (2000)

Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36:829-836 (1980)

Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 95:1-8 (1997)

Montella M, Crispo A, Izzo F, Ronga D, Tamburini M, De Marco M, Tridente V, Desicato S, Fabbrocini G, Cuomo O. HCV and hepatocellular carcinoma: A case-control study in an area of hyperendemicity. *Int J Mol Med*, 6:571-574 (2000)

Morimitsu Y, Hsia CC, Kojiro M, Tabor E. Nodules of less-differentiated tumor within or adjacent to hepatocellular carcinoma: Relative expression of transforming growth factor-alpha and its receptor in the different areas of tumor. *Hum Pathol*, 26:1126-1132 (1995)

Morse B, Rotherg PG, South VJ, Spandorfer JM, Astrin SM. Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature*, 333:87-90 (1988)

Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gauldie J, Bleackley RC. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*, 103:491-500 (2000)

Muleris M, Almeida A, Malfoy B, Dutrillaux B. Assignment of v-erb-B2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome

band 17q21.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 76:34-35 (1997)

Murakami Y, Hayashi Y, Hirohashi S, Sekiya T. Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 51:5520-5525 (1991)

Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A. Comprehensive allelotyping of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 14:2927-2933 (1997)

Ng IO, Lee JM, Srivastava G, Ng M. Expression of insulin-like growth factor II mRNA in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 13:152-157 (1998)

Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Sedamoto T, Isowa G, Honda K, Yamaoka Y, Ikenaga M, Imura H, Ishizaki K. Accumulation of allelic loss on arms of chromosome 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 51:862-868 (1992)

Nong Z, Siegel K, Odenthal M, Becker R, Oesch F, Dienes HP, Schirmacher P, Steinberg P. The role of insulin-like growth factor II in the malignant transformation of liver oval cells. *Hepatology*, 25:900-905 (1997)

Nupponen NN, Visakorpi T. Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc Res Tech*, 51:456-463 (2000)

O'Gorman DB, Costello M, Weiss J, Firth SM, Scott CD. Decreased insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor expression enhances tumorigenicity in JEG-3 cells. *Cancer Res*, 59:5692-5694 (1999)

Okabe H, Ikai I, Matsuo K, Satoh S, Momoi H, Kamikawa T, Katsura N, Nishitai R, Takeyama O, Fukumoto M, Yamaoka Y. Comprehensive allelotype study of hepatocellular carcinoma: potential differences in pathways to hepatocellular carcinoma between hepatitis B virus-positive and -negative tumors. *Hepatology*, 31:1073-1079 (2000)

Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 32:225-237 (2000)

Ong ST, Le Beau MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-

Hodgkin`s lymphoma. *Semin Oncol*, 25:447-460 (1998)

Otsuka M, Kato N, Lan KH, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA-binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem*, 275: 122-130 (2000)

Pan Y, Matsuyama H, Wang N, Yoshihiro S, Haggarth L, Li C, Tribukait B, Ekman P. Chromosome 16q24 deletion and decreased E-cadherin expression: possible association with metastatic potential in prostate cancer. *Prostate*, 36:31-38 (1998)

Pasquinelli C, Garreau F, Bougueleret L, Cariani E, Grzeschik KH, Thiers V, Croissant O, Hadchouel M, Tiollais P, Brechot C. Rearrangement of a common cellular DNA domain on chromosome 4 in human liver tumors. *J Virol*, 62:629-632 (1988)

Pasquinelli C, Bhavani K, Schirmacher P, Rogler CE, Chisari FV. Expression of hepatocyte mitogens and mitogen receptors during hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus transgenic mice. *Transgenics*, 1:451-457 (1994)

Piao Z, Park C, Kim JJ, Kim H. Deletion mapping of chromosome 16q in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 80:850-854 (1999)

Piao Z, Park C, Park JH, Kim H. Allelotype analysis of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 75:29-33 (1998)

Pitot HC. Hepatic neoplasia: Chemical induction. In: 3rd ed., Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. (eds.), The liver. Biology and pathobiology. pp. 1467-1495 (1994)

Qin Lx, Tang ZY, Sham JS, Ma ZC, Ye SL, Zhou XD, Wu ZQ, Trent JM, Guan XY. The association of chromosome 8p deletion and tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 59:5662-5665 (1999)

Ragoussis J, Senger G, Mockridge I, Sanseau P, Ruddy S, Dudley K, Sheer D, Trowsdale J. A testis-expressed Zn finger gene (ZNF6) in human 6p21.3 centromeric

to the MHC is closely linked to the human homolog of the t-complex gene tcp-11. *Genomics*, 14:673-679 (1992)

Rao UN, Gollin SM, Beaves S, Cieply K, Nalesnik M, Michalopoulos GK. Comparative genomic hybridization of hepatocellular carcinoma: Correlation with fluorescence in situ hybridization in paraffin-embedded tissue. *Mol Diag*, 6:27-37 (2001)

Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene*, 10:2243-2246 (1995)

Reynolds SH, Stowers SJ, Patterson RM, Maronpot RR, Aaronson SA, Anderson MW. Activated oncogenes in B6C3F1 mouse liver tumors: implications of risk assessment. *Science*, 237:1309-1316 (1987)

Reynolds HR, Stowers SJ, Maronpot RR, Anderson MW, Aaronson SA. Detection and identification of activated oncogenes in spontaneously occurring benign and malignant hepatocellular tumors in the B6C3F1 mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:33-37 (1986)

Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR, Savelieva E, Blelloch RH, Puthenveetil JA, Cuthill S. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Semin Oncol*, 23:571-584 (1996)

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol*, 113:237-251 (1977)

Sakakura C, Hagiwara A, Taniguchi H, Yamaguchi T, Yamaguchi H, Takahashi T, Koyama K, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. Chromosomal aberrations in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer*, 80:2034-2039 (1999)

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: Ford N, Nolan C, Ferguson M. (eds.): *Molecular cloning: a laboratory*

manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)

Sandgren EP. Transgenic models of hepatic growth regulation and hepatocarcinogenesis. In: Jirtle RL. (eds.), Liver regeneration and carcinogenesis. Academic Press, San Diego, pp. 257-300 (1995)

Schirmacher P, Rogler CE, Dienes HP. Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 63:71-89 (1993)

Schirmacher P, Held WA, Yang D, Chisari FV, Rustum Y, Rogler CE. Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res*, 52:2549-2556 (1992)

Schirmacher P, Rogler CE, Dienes HP. Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis. *Cell Pathol*, 63:71-89 (1992b)

Schirmacher P, Held WA, Yang D, Biempica L, Rogler CE. Selective amplification of periportal transitional cells precedes formation of hepatocellular carcinoma in SV40 large Tag transgenic mice. *Am J Pathol*, 139:231-241 (1991)

Schlegel J, Stumm G, Scherthan H, Bocker T, Zirngibl H, Rüschoff J, Hofstädter F. Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. *Cancer Res*, 55:6002-6005 (1995)

Schleger C, Heck R, Niketeghad F, Schirmacher P, Radaeva S, Oesch F, Dienes HP, Bannasch P, Steinberg P. Establishment and characterization of a nontumorigenic cell line derived from a human hepatocellular adenoma expressing hepatocyte-specific markers. *Exp Cell Res*, 236:418-426 (1997)

Schmidt ER. Multicolor in *situ*-hybridization – a helpful technique for precise gene localisation. *Sci Tech Inf*, X:80-84 (1992)

Schmutzler RK, Fimmers R, Bierhoff E, Lomar B, Homann A, Speiser P, Kubista E, Jaeger K, Krebs D, Zeillinger R, Wiestler OD, Von Deimling A. Association of allelic

losses on human chromosomal arms 11q and 16q in sporadic breast cancer. *Int J Cancer*, 69:307-311 (1996)

Schutte M, da Costa LT, Hahn SA, Moskaluk C, Hoque ATMS, Rozenblum E, Weinstein CL, Bittner M, Meltzer PS, Trent JM, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the BRCA2 region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:5950-5954 (1995)

Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:6497-6501 (1985)

Seute A, Sinn HP, Schlenk RF, Emig R, Wallwiener D, Grischke EM, Hohaus S, Dohner H, Haas R, Bentz M. Clinical relevance of genomic aberrations in homogeneously treated high-risk stage II/III breast cancer patients. *Int J Cancer*, 93:80-84 (2001)

Shimoyama Y, Hirohashi S. Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett*, 57:131-135 (1991)

Shiraishi K, Okita K, Kusano N, Harada T, Kondoh S, Okita S, Ryozaawa S, Ohmura R, Noguchi T, Iida Y, Akiyama T, Oga A, Fukumoto Y, Furuya T, Kawauchi S, Sasaki K. A comparison of DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization in malignancies of the liver, biliary tract and pancreas. *Oncology*, 60:151-161 (2001)

Shtivelman E, Bishop JM. The PVT gene frequently amplifies with myc in tumor cells. *Mol Cell Biol* 9:1148-1154 (1989)

Shtivelman E, Henglein B, Groitl P, Lipp M, Bishop JM. Identification of a human transcription unit affected by the variant chromosomal translocations 2;8 and 8;22 of

Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:3257-3260 (1989)

Slagle BL, Zhou YZ, Birchmeier W, Scorsone KA. Deletion of the E-cadherin gene in hepatitis B virus-positive chinese hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 18:757-762 (1993)

Sohda T, Oka Y, Iwata K, Gunn J, Kamimura S, Shijo H, Okumura M, Yun K. Co-localisation of insulin-like growth factor II and the proliferation marker MIB1 in hepatocellular carcinoma. *Cells J Clin Patol*, 50:135-137 (1997)

Speicher MR, du Manoir S, Schröck E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T. Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet*, 2:1907-1914 (1993)

Speicher MR, Jauch A, Walt H, Du Manoir S, Ried T, Jochum W, Sulse T, Cremer T. Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin-fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization, and interphase cytogenetic. *Am J Pathol*, 146:1332-1340 (1995)

Sprengel R, Kaleta EF, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol*, 62:3832-3839 (1988)

Summers J, Smolec JM, Synder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:4533-4537 (1978)

Szczepanski W. Liver cell dysplasia in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pol J Pathol*, 48:147-157 (1997)

Tabor E. Tumor suppressor genes, growth factor genes, and oncogene hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Med Virol*, 42:357-365 (1994)

Tada M, Omata M, Ohto M. Analysis of ras gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer Res*,

50:1121-1124 (1990)

Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Nat Acad Sci USA*, 97:7837-7841 (1982)

Taylor-Robinson SD, Foster GR, Arora S, Hargreaves S, Thomas HC. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94. *Lancet*, 350:1142-1143 (1997)

Teng DHF, Bogden R, Mitchell J, Baumgard MLR, Berry S, David T, Ha PC, Kehrer R, Jammulapati S, Chen Q, Offit K, Skolnick MH, Tavtigian SV, Jhanwar S, Swedlund B, Wong AKC, Kamb A. Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other cancers. *Nat Genet*, 13:241-244 (1996)

Theise ND. Macroregenerative (dysplastic) nodules and hepatocarcinogenesis: theoretical and clinical considerations. *Semin Liver Dis*, 15:360-371 (1995)

Tiribelli C, Melato M, Croce LS, Giarelli L, Okuda K, Ohnishi K. Prevalence of hepatocellular carcinoma and relation to cirrhosis: comparison of two different cities of the world – Trieste, Italy, and Chiba, Japan. *Hepatology*, 10:998-1002 (1989)

Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioni OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*, 21:177-184 (1998)

Tornillo L, Carafa V, Richter J, Sauter G, Moch H, Minola E, Gambacorta M, Bianchi L, Vecchione R, Terracciano LM. Marked genetic similarities between hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinomas. *J Pathol*, 192:307-312 (2000)

Toshikuni N, Nouse K, Higashi T, Nakatsukasa H, Onishi T, Kaneyoshi T, Kobayashi Y, Kariyama K, Yamamoto K, Tsuji T. Expression of telomerase-associated protein 1

and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 82:833-837 (2000)

Tsuda H, Zhang W, Shimosato Y, Yokota J, Terada M, Sugimura T, Miyamura T, Hirohashi S. Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:6791-6794 (1990)

Tsuda H, Oda T, Sakamoto M, Hirohashi S. Different pattern of chromosomal allele loss in multiple hepatocellular carcinomas as evidence of their multifocal origin. *Cancer Res*, 52:1504-1509 (1992)

Ueno T, Takahashi K, Matsuguchi T, Ikejiri K, Endo H, Yamamoto M. Reactivation of rat insulin-like growth factor II gene during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 9:1779-1783 (1988)

Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, Fiers W, Roy FV. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumour cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66:107-119 (1991)

Vogel W, Speit G. Zytogenetik. in: Wolf U, Winkler U, (eds.), Humangenetik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 10-16 (1985)

Walker GJ, Hayward NK, Falvey S, Cooksley WG. Loss of somatic heterozygosity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 51:4367-4370 (1991)

Wang G, Zhao Y, Liu X, Wang L, Wu C, Zhang W, Liu W, Zhang P, Cong W, Zhu Y, Zhang L, Chen S, Wan D, Zhao X, Huang W. Allelic loss and gain, but not genomic instability, as the major somatic mutation in primary hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 31:221-227 (2001)

Wang Y, Wu MC, Sham JS, Zhang W, Wu WQ, Guan XY. Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer*, 95:2346-2352 (2002)

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81:323-330 (1995)

Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*, 254:1138-1146 (1991)

Weinstein S, Scottalini AG, Loo SYT, Caldwell PC, Bhagavan NV. Ataxia teleangiectasia with hepatocellular carcinoma in a 15 year old girl and studies of her kindred. *Arch Patol Lab Med*, 109:1000-1004 (1985)

Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, Nessling M, Lampel S, Goettel D, Kuepper M, Joos S, Hopman T, Kokocinski F, Dohner H, Bentz M, Schwaenen C, Lichter P. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest*, 82:47-60 (2002)

Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutat Res* 462:381-393 (2000)

Wild CP, Turner PC. Exposure biomarkers in chemoprevention studies of liver cancer. *IARC Sci Publ*, 154:215-222 (2001)

Wilkins L, Bredt M, Flemming P, Becker T, Klemptner J, Kreipe HH. Differentiation of liver cell adenomas from well-differentiated hepatocellular carcinomas by comparative genomic hybridization. *J Pathol*, 193:476-482 (2001)

Wong CM, Fan ST, Ng IO. Beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*, 92:136-145 (2001)

Wong N, Lai P, Pang E, Fung LF, Sheng Z, Wong V, Wang W, Hayashi Y, Perlman E, Yuna S, Lau JW, Johnson PJ. Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies. *Clin Cancer Res*, 6:4000-4009 (2000)

Wong N, Lai P, Lee SW, Fan S, Pang E, Liew CT, Sheng Z, Lau JW, Janson PJ. Assessment of genetic changes in hepatocellular carcinoma by comparative genomic

hybridization analyses: relationship to disease stage, tumor size, and cirrhosis. *Am J Pathol*, 154:37-43 (1999)

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal Tran T, Averill D, Fields P, Marshall G, Narod S, Lenoir GM, Lynch H, Feunteun J, Devilee P, Cornelisse CJ, Menko FH, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Pye C, Lewis CM, Cannon-Albright LA, Peto J, Ponder BAJ, Skolnick MH, Easton DF, Goldgar DE, Stratton MR. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265:2088-2090 (1994)

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G, Barfoot R, Hamoudi R, Patel S, Rice C, Biggs P, Hashim Y, Smith A, Connor F, Arason A, Gudmundsson J, Ficenec D, Keisell D, Ford D, Tonin P, Bishop DT, Spurr NK, Ponder BAJ, Eeles R, Peto J, Devilee P, Cornelisse C, Lynch H, Narod S, Lenoir G, Egilsson V, Barkadottir RB, Easton DF, Bentley DR, Futreal PA, Ashworth A, Stratton MR. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378:789-792 (1995)

Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R. Direct activation of TERT transcription by c-myc. *Nat Genet*, 21:220-224 (1999)

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*, 61:3176-3181 (2001)

Yakicier MC, Legoix P, Vaury C, Gressin L, Tubacher E, Capron F, Bayer J, Degott C, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Identification of homozygous deletions at chromosome 16q23 in aflatoxin B1 exposed hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 20:5232-5238 (2001)

Yamada T, De Souza AT, Finkelstein S, Jirtle RL. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver

carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 94:10351-10355 (1997)

Yang D, Alt E, Rogler CE. Coordinate expression of N-myc 2 and insulin-like growth factor II in precancerous altered hepatic foci in woodchuck hepatitis virus carriers. Cancer Res, 53:2020-2027 (1993)

Yeh YC, Tsai JF, Chung LY, Yeh HW, Tsai JH, Florine DL, Tam JP. Elevation of transforming growth factor alpha and its relationship to the epidermal growth factor and alpha-fetoprotein levels in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 47:896-901 (1987)

Yeh SH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Allelic loss on chromosomes 4q and 16q in hepatocellular carcinoma: association with elevated α -fetoprotein. Gastroenterology, 110:184-192 (1996)

Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, Mc Donnell TJ, Hung MC. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. Mol Cell, 2: 581-591 (1998)

Zeuzem S. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in patients with cirrhosis. J Viral Hepat, 7:327-334 (2000)

Zhang W, Hirohashi S, Tsuda H, Shimosato Y, Yokota J, Terada M, Sugimura T. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 16 and 4 in human hepatocellular carcinoma. Jpn J Cancer Res, 81:108-111 (1990)

Zhao M, Zimmermann A. Liver cell dysplasia: reactivities for c-met protein, Rb protein, E-cadherin and transforming growth factor-beta 1 in comparison with hepatocellular carcinoma. Histol Histopathol, 13:657-670 (1998)

Zondervan PE, Wink J, Alers JC, Jn IJ, Schalm SW, de Man RA, van Dekken H. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular

carcinoma: Analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol*, 192:207-215 (2000)

Eigene Veröffentlichungen

Schleger C, Heck R, Niketeghad F, Schirmacher P, Radaeva S, Oesch F, Dienes HP, Bannasch P, Steinberg P. Establishment and characterization of a nontumorigenic cell line derived from a human hepatocellular adenoma expressing hepatocyte-specific markers. *Exp Cell Res*, 236:418-426 (1997)

Lund P, Niketeghad F, Dienes HP, Schirmacher P. Chemotherapy-sensitivity of human liver tumor cells is enhanced by interfering with the IGF-II/IGF-I-receptor signalling pathway. In: Beger HG, Link KH (eds.) Gastroenterological Carcinogenesis. Monduzzi Editore, Bologna, pp 179-182 (1999)

Olert J, Wiedom KH, Goldmann T, Kuhl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Muller AM, Muller-Navia J. HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract*, 197:823-826 (2001)

Niketeghad F, Decker HJ, Caselmann WH, Lund P, Geissler F, Dienes HP, Schirmacher P. Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumor genes in human hepatocarcinogenesis. *Br J Cancer*, 85:697-704 (2001)

Auszeichnungen

2. Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (1998)

Young Investigator Travel Award der IASL in Chicago 4.-6.11.1998

7. Anhang

		A	A	B	B	C	C
		GF1/K	GF1/TU	GF1/K	GF1/TU	GF1/K	GF1/TU
	1	35214,2	21657,1	495,1	85,5	550,1	248,3
	2	-1844,1	-323	-111,1	140,1	-582,3	-227,6
a	3	-471,3	672,1	773,5	494,6	1850,4	1203,7
	4	-725,7	-63,5	-988,1	371,7	-9207,2	177,2
	5	253,8	-64,5	1262,1	635,5	-8955,8	20,6
	6	271,9	54	135,3	-753,9	350,6	-8,2
	7	773,3	269,1	864,1	592,7	-4236,3	908,5
	1	9202,9	6382,4	179,6	69,8	51	148,4
	2	1410,4	558,6	-604,7	105,6	-657,7	-1771
b	3	71,1	527,3	-462,6	148	3805,4	18695,1
	4	-555,8	411	-810,7	557,7	7985,5	-594,8
	5	-335,6	138,5	770,7	531,5	-3293,4	126,1
	6	347	201,7	1649,1	-541,6	-206,7	542,5
	7	838,8	145,6	413,7	1638,2	4927,4	2404,9
	1	340,5	228,6	-486,8	169,7	1498,8	515,5
	2	489,5	2457,2	-987,8	255,8	392,2	-372,2
c	3	-1100,3	-68,4	-225,6	40,5	16258,6	1052,2
	4	494,4	337,9	262,4	144,5	3161,9	-373,6
	5	465,1	730,7	-227	1123,4	-2428	448,2
	6	1570,1	-7,6	492	-125,6	2520,4	768,5
	7	-21,6	-0,9	-184,1	68,8	3582,8	443
	1	-207,8	82,9	739	1720,9	-337,5	516,5
	2	1201,8	551,9	-73,7	16,7	-9178	370,8
d	3	698,1	-50,5	208,9	287,4	5356,3	439,2
	4	316,4	419,6	-381,3	466,2	-696,6	322,7
	5	1199,5	74,8	-451,5	-80,1	1000,1	-1,8
	6	193,6	-100,2	327,1	278,1	-458	876,9
	7	272,9	196,7	126	-575,1	-4541,8	3039,4
	1	-514,9	659,8	1408,5	160,1	-233,1	-109,9
	2	490,7	184,2	-44,6	182,3	-17931,9	620,2
e	3	1942,7	981	-388,5	17,6	-7925,4	-43,8
	4	-199,8	-3,6	1577,7	855,9	-1224,1	6,5
	5	6031,8	1506,5	47,3	13,8	3666,3	2084,9
	6	-66,9	23,4	547,7	-1738	-42,2	199,4
	7	2450,4	409,1	2490,4	-955,8	934,9	1429,9
	1	-663,6	162,4	470,4	1094,5	-618,3	-254
	2	-314,6	-23,3	-888,8	135,4	-23417,3	2572,1
f	3	91,8	321,7	-1002,1	-118,4	-6194,7	905,1
		-29,2	241,8	-96,2	452	-1189,9	141,9
	5	422,9	286,8	669,4	280,4	564,3	494,9

	6	244,2	64,6	277,4	79,2	6783,1	1492,5
	7	625,2	445,7	-963,5	114,6	4603,5	980,3
	1	-156,1	61,4	266,4	1691,6	289,9	-687,8
	2	88,3	248,6	-404,6	6,1	4137,1	2737,2
g	3	232,1	-64,6	-302,9	-5,7	3307,8	84,2
	4	2049	1733,8	-107,7	2256,2	-153,1	4406,5
	5	1257	473,8	1563,1	357,6	5183,2	-7,7
	6	6555,4	698,5	672,6	253,8	-1730,1	99,3
	7	463,6	790,2	892,8	-32,2	11522,2	1242,6
	1	-395,3	456,4	238,4	165,4	-845,5	-176,7
	2	-49,5	-67,6	-356,1	19,2	1032	591,8
h	3	-77,7	65,7	1619,2	975,1	-384,9	28,2
	4	-254	-33,1	317,4	273,5	-650,5	360,1
	5	2745,9	1768,6	489,2	163,7	10192,8	851,2
	6	282,2	505,1	-12	68,7	5680,5	-225,7
	7	225,2	542,1	7219,7	1710,8	25,8	486,9
	1	-930,4	1385	-74	-196,7	412,3	-183,3
	2	-462,9	-330,3	284,9	167,3	4663,1	1779,1
i	3	3023,4	5714,9	88,9	-41,3	-8,6	42,6
	4	-354,1	-355,4	161,9	302,3	1646,6	178,1
	5	1082,3	2053,9	295,4	886,5	2159,6	308,1
	6	-207,2	-139,8	7,5	-298,7	5381,2	132,3
	7	813,1	1792	2482,4	764,5	-367,1	41,3
	1	492,9	346,3	-236,9	408,4	-574,2	-163,3
	2	1770,2	276,1	930	179,9	37767,4	397,3
j	3	537,1	52,8	-359	98,1	-1480,2	-17,6
	4	-217,7	336,8	573,6	393,2	-1548,9	55,1
	5	-92	-10,2	-696,7	179,6	-1778,3	51
	6	706,7	-776,5	1269,8	697,9	2289,7	322,4
	7	-132,5	10461,8	3907,4	596,1	1623,1	169,4
	1	1601,7	227,1	-68,6	335,7	-167,8	-99
	2	-31,1	125,9	493,9	179	1804,5	223,8
k	3	21,3	22,2	380,8	62,8	859,5	195,2
	4	285,6	1459,6	270,2	-146,5	1517,7	124,3
	5	1000,6	257,4	272,6	361,9	521,3	89,1
	6	89	-283,9	579	-160,1	1696,3	441,8
	7	25,8	653,9	3527,3	5564,5	430,8	107
	1	4095	2509,6	-95,1	133,8	1026,8	96,7
	2	-9231,4	314,1	572,4	117	-159,6	-90,2
l	3	40,7	68,4	636,5	189,1	228,7	203,7
	4	-30,6	268,2	131	33,1	1440,6	75,8
	5	5747,6	3148,7	-109,4	179,5	-1145,3	16,9
	6	-699,9	-39	4652,7	-2108,8	1652,3	260,5
	7	251,9	309,7	8684,9	54122,7	-1414,9	56,7
	1	187,2	749,9	-412,7	16,3	3013,5	306,5
	2	3336,1	-155,3	356,4	637,5	5157,7	54,9
m	3	657,8	450,4	114,9	309,2	87,3	179
	4	72,8	402,8	2279,3	388,3	679,7	482,1

	5	-394,1	360,6	252	-19,4	-376,6	249,6
	6	287,6	-3	221,5	-479,4	7414,3	67,8
	7	747,5	1107,6	6161,7	4650	-1132,7	185,7
	1	601,7	262,5	643,1	73,6	-2580,6	-45,7
	2	-97,7	127,2	252,3	258,6	24425,9	133,2
n	3	232,7	93,4	730,4	1942,1	1409,5	-49,9
	4	-303,7	81,3	1386,1	-150,2	309	185,1
	5	164,7	161	589,9	235,9	-317,5	324,1
	6	525,1	111	32,4	-168,9	-801,1	47,6
	7	271,7	48,2	6237,7	2259	3104,9	-41,5

		D	D	E	E	F	F
		GF1/K	GF1/TU	GF1/K	GF1/TU	GF1/K	GF1/TU
	1	73,9	264,4	1260,9	747	3386,8	39522,5
	2	553,8	411,9	147,9	-45,1	6100,9	-5625,1
	3	297,5	720	965,1	1806	3727,5	835,2
a	4	-687,6	-113,2	424,4	855,4	-451,6	-105,9
	5	7256,4	4544,3	-812,2	-262,1	332,1	87,5
	6	-817,6	-1110,2	7939,2	2965,1	-820,4	123
	7	-36,6	2459,1	-863,8	-50,1	2476,2	170,1
	1	-476,5	2637,7	-37,9	81,8	882,1	3070,4
	2	-183,2	-206,1	79	-101,3	94,7	-1281,5
	3	285,4	1023,2	32,2	1806	-1141,1	-131,4
b	4	-539	10,7	758,7	-119,9	-2881	142,7
	5	965,8	620,9	-231,7	-218,4	20105,1	1213,4
	6	-617,3	283,3	896,6	-122,7	-2956,6	-36,7
	7	-279,8	339,3	327,5	151,8	-89,9	1103,9
	1	808,9	847,3	256,1	-43,9	22,7	144,1
	2	595,3	274,2	268,1	218,4	-1221,6	235,1
	3	-113,6	-271,8	-393,9	169,4	-1301,5	85,9
c	4	-459,7	5942	567,8	-21,3	16735,5	250,1
	5	1795,2	-1260	33,6	393,4	-52,2	4355,6
	6	274,2	-120,1	1031	314,1	-1575,8	-583,8
	7	3872,9	372,4	218,4	1247,7	-267,3	156,5
	1	91,7	961,3	-249,7	408,9	344,1	106,4
	2	122,1	782,9	-690,8	-102,7	-1259,4	-163,7
	3	-193,8	-213,9	5546,9	590,4	3816	1189,3
d	4	-714	378,8	578,8	-157,7	-6688,2	7508,4
	5	15248,2	468,4	-457,8	1817,8	-1247,2	-371,3
	6	-1213,3	-313,4	-419,2	54,3	-1368,1	-164,1
	7	2314,4	297,6	-446,2	159,1	964,7	106,6
	1	67,8	1396,4	-91,1	1313,7	-251,1	122,5
	2	311,6	496,3	-33	-118,7	1067,6	-1,1
	3	-84,8	54,7	270,7	-97,8	33648,3	21422,9
e	4	-151,5	41,1	533,8	-176	-1438,5	-1267,1
	5	831	1208,4	-378,2	108,4	-1280,7	-27,9
	6	2615,9	1060	-621,3	-65,3	-2146,5	21,4

	7	157,6	-188	466,6	2175,1	5987	-28,4
	1	603,6	288,8	252,5	175,8	-328,5	122,8
	2	4804,5	7429,5	1433,8	-102,3	-572	-224,3
	3	-58,7	-586	1042,3	734,1	2721,8	1384,5
f	4	1749,6	1063,4	75,4	-47,2	-69,1	-246,9
	5	1517,2	3375,6	-242,9	345,2	803,9	504,8
	6	4822,1	1052	-64,1	-68,8	-1216,4	1475,1
	7	-344,7	388,5	1750,3	4144,1	-1833,5	-59,2
	1	5767,6	889,7	559,6	70	505,2	181,2
	2	-632,6	944	280,7	-67,9	190,5	-120,2
	3	-1144,7	-77,8	-1279,2	123,5	1419,2	1000,7
g	4	1457,3	2159,5	-858,1	-98,8	1039,8	495,1
	5	134,7	-63,7	1990,8	3145,4	-1494,8	-103,5
	6	730,3	143	-238,3	-284,5	1260,1	-41,2
	7	143,5	478,5	83	1571	-173	767
	1	-268	-52,3	-2596,9	1404,2	130,9	88,2
	2	-519,3	369	-1872,7	-20,7	-50,6	77,6
	3	-20,8	58	-23,4	7,9	-368,3	503,1
h	4	23,9	167,5	-511,2	72,4	237,7	76,9
	5	498,2	18,2	1855,4	1307	371,6	-87,8
	6	913,5	421,8	-685	-44,4	-1271,9	-196
	7	208,3	50,2	556,3	2424,6	16619,6	1695,2
	1	-82,4	296,5	-446,2	588,3	779,9	321
	2	314,8	623,4	-104,3	1139,8	1168,5	817,4
	3	48,3	181,1	-218,8	13,3	316,4	-128,5
i	4	-317,7	149,1	-98	145	332,6	1046,1
	5	-82,9	7,4	833,2	850,2	-933,6	-353,9
	6	755,3	-7	-30,2	436,9	-1143,9	-360
	7	98,1	49,7	442,9	516,8	5914,3	8419,7
	1	138,8	86,8	280,8	579,3	-84,8	125,4
	2	-941,3	-113	3990,6	25	1620,5	2054,1
	3	1808	1514,8	-984,8	-113,3	-229,7	-547,3
j	4	1159,6	1235,7	28,1	-65,3	2773,9	9793,4
	5	-244,2	-390,4	953,7	492,4	-1157,7	-1536,6
	6	474,2	225,3	96,4	799,6	368,6	-169,8
	7	641,4	115,7	-54,8	58,1	520,8	263,8
	1	2745	1486,3	-252,4	193,7	-153,1	-435,5
	2	-3113,4	-456,7	150,5	130,2	1193,8	6770,3
	3	8519,8	13249,5	20,3	-113,7	-291,8	-457,9
k	4	-44,1	-297,2	-568,8	-70,6	4369,7	3614
	5	248,8	80,8	338,3	-43,1	-174,5	-277,7
	6	74,7	281,2	66,6	364,4	210,3	-50,5
	7	890,8	1115,9	498,8	423,7	745,8	-52,4
	1	19729,8	14159	-174	608,2	877,9	26,7
	2	-7556,7	-778,6	2420,9	816,7	187,1	140,5
	3	-303,9	596,8	284,7	491,8	74,8	-5,9
l	4	-172,5	-43,1	-285	-74,1	801,3	36,8
	5	96,3	125,5	-438,4	108,6	210,6	88,2

	6	78,9	294,1	1155,1	122	-1051,3	76,2
	7	-116,7	-210,2	420,6	126,1	388,5	-21,5
	1	4168,9	471,6	508,4	15102,8	2103,5	30,3
	2	-584,7	25,6	357,6	-474,5	76,5	-9,9
	3	-273,5	38,3	-227	4635,8	-860,5	-19,1
m	4	17,4	484,5	160,8	-322	144	-42,2
	5	266,6	-7,3	691,5	260	293,2	532,3
	6	67,2	2168,2	107,2	83,5	-447,8	-64,5
	7	-532,6	-582,3	4,1	199,8	2111,7	54,6
	1	3363,5	1648,9	74,6	968,9	5660,4	36,6
	2	62	236,7	626	-263,1	32,2	130
	3	-1206,9	95,1	287,3	294,8	497,3	93,9
n	4	-186,5	68,9	10,7	-228,9	680,1	-48,2
	5	736	200,5	42,5	-61,2	-635,7	-5,3
	6	-48,2	38463,4	232,6	334,4	302,9	217,2
	7	250	-3144,1	-309,2	-1,7	-1052,4	-142,4

Ski oncogene (A3a)	+	Ch1q ^{22-q²⁴}
Ski-related oncogene snon (A3b)	7.4	Ch3
Cyclin G2 (G2/mitotic-specific cyclin G) (A7b)	-5.7	Ch.4q
Vascular permeability factor receptor (vascular endothelial growth factor receptor 1/Fms-related tyrosine kinase1) (A2c)	5	Ch.13q ¹²
DNA-binding protein inhibitor ID-1 (A5e)	-4	20q ¹¹
TOB (A7e){ anti-proliferative protein }	-6	17q ^{21-q²²}
FRA-1 (fos-related antigen 1) (A4f)	+	Ch11
Cyclin A (G2/mitotic-specific) (A6f)	-3.7	Ch.4q ²⁷
Cyclin D1 (G1/S-specific) (A6g)	-9.4	Ch.12p ¹³
Coup transcription factor (v-erbA-related ear-3 protein) (A1i)	+	Ch.5q ⁷
PIM-1 proto-oncogene (serine/Threonine-protein kinase) (A2j)	-6.4	Ch.6p ^{21.2}
EB1 (A4k)	5	Ch.20, Ch.17
Plectin (bullous pemphigoid antigen) (A5k)	3.8	Ch.6p ^{12-p¹¹}
Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MND1) (A2l)	+	1q22
Proto-oncogene c-cbl (A4l)	+	Ch.3q
Hyaluronidase (tumor suppressor [LUCA-1]) (A2m)	-	Ch.3p
Mothers against DPP protein (chromosome 4 mad homolog Smad1; transforming growth factor-beta signaling protein-1[bsp-1]) (A4m)	5.5	Ch.4
Cdk inhibitor (p191nk4d) (A6n)	-4.7	Ch.19
P14-cdk inhibitor (A7n)	-5.6	?
Ras-related protein RAB-3b (B4a)	+	?
Tyrosine-protein kinase receptor TIE-1 (B1g)	6.3	Ch.1p
Guanine nucleotide regulatory protein NET1 (B4g)	+	Ch.10p
Natural killer cell enhancing factor B (NKEFB) (B7h)	-4.7	?
Heat shock (heat shock 60-kDa protein 1 [chaperonin]; mitochondrial matrix protein (p1) (B7j)	-6.6	Ch.9q
Tyrosine-protein kinase JAK1 (B5l)	+	?
Plasma serine protease inhibitor (protein c inhibitor) (B6l)	-	Ch.14q ^{32.1}
Heat shock (heat shock 27-kDa protein1) (B7l)	6.2	Ch.1p, Ch.13
Glutathione s-transferase p (C3b)	4.9	?
Glutathione s-transferase A1-1 (glutathione s-transferase [GST] Ha subunit 1) (C3c)	-15	Ch.6p ^{12.2} [for A2]
DAD-1 (defender against cell death 1) (C2f)	+	Ch.14
Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17kd (HHR6A [Yeast RAD 6 homolog]) (C6f)	-4.5	Ch.1q
Growth Arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 (C7f)	-4.7	1p ³⁴ -p12
Clusterin (complement lysis inhibitor; testosterone-repressed prostate message 2; apolipoproteinJ; sulfated glycoprotein-2) (C2j)	-95	Ch.8p ²¹ -p ¹²
Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase (o-6-methylguanine-DNA methyltransferase) (C6m)	-109	10q ²⁶
Glutathione s-transferase microsomal (C2n)	-183	Ch.12p
Nuclear factor NF-KAPPA-B p105 subunit (D1a)	3.6	Ch.4q ^{23-q²⁴}
Transcription factor GATA-3 trans-acting T-cell specific (D7a)	+	Ch.10p
Endothelial transcription factor GATA-2 (D1b)	+	Ch.3q
DB1 (Zinc finger protein 91) (D3b)	3.6	Ch.17q
Zinc finger x-chosomal protein (ZFX putative transcription activator, isoform 1) (D7b)	+	Ch. xp ²² -p ^{21.3}
Transcription factor AP-2 (sequence-specific DNA-binding protin) (D4c)	+	6p ¹² (AP-2 beta)
Homeobox protein Hox.B5 (homeobox 2.1 protein [Hox2A]) (D5e)	-	Ch. 17q ^{21-q²²}
Proliferation-associated protein PAG (D7c)	-10.5	Ch.1p ^{34.1}
DNA-binding protein inhibitor ID-3 (helix-loop-helix protein 1R21) (D1d)	10.5	Ch. 1p ^{36.13} -p ^{36.12}
Transcriptional activator hSNF2b (estrogen receptor hSNF2b) (D2d)	6.4	Ch. 19
Tristetraproline (zinc finger transcriptional regulator) (D5d)	-32.6	Ch.19q ^{13.1}
Erythroid krueppel-like transcription factor (GC-box binding protein BTEB2)(D1e){ binds to the cacc-c-box in the β-globin gene promotr and activates TK., probably serves as a general swich factor for erythroid development. }	20.6	?
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21;cip1; melanoma diferentiation-associated [mda-6]) (D6f)	-4.6	Ch.6p

DNA-binding protein inhibitor ID-2 (helix-loop-helix protein ID-2) (D1g)	-6.5	Ch.2p ²⁵ , Ch.3p ^{cent.}
Transcriptional enhancer factor TEF-1(D4h)	7	?
DNA-binding protein SATB1 (special AT-rich sequence binding protein 1[binds to nuclear matrix/scaffold-associating DNAs]) (D5h)	-27	Ch.3p
Nuclear factor I-x (CCAAT-binding transcription factor) (D3i)	3.7	Ch.19p ^{13.3}
N-Acetyltransferase _x ARD1 (ARD) (D6l)	3.7	Xq28
Transcription factor S-II-related protein (transcription elongation factor [SII]) (D4m)	27.8	Ch.8q
Transcription factor ZFM1 (alternatively spliced product) (D2n)	3.8	Ch.11
Transcription factor LSF (alpha-globin transcription factor CP2) (D5n)	-3.6	Ch.12
Delta-like protein (dl k) (D6n)	+	?
Erythropoietin receptor (E1c)	-	Ch.19p ^{13.3} -p ^{13.2}
T-cell surface glycoprotein CD4 (E5c)	11.7	Ch.12p ^{ter} -p ¹²
Integrin alpha-3 (E7c){receptor for fibronectin,lamin, collagen}	5.7	?
Vitronectin receptor alpha (integrin, alpha V; antigen CD51) (E5d)	+	?
CD44 antigen hematopoietic form (cell adhesion molecule ;CD44)(E6d)	+	Ch.11p ^{ter} -p ¹³
Integrin alpha x (leukocyte adhesion glycoprotein p150,95 alpha chain; antigen CD11C ;p150) (E7d){ mediates cell-cell interaction during inflammatory responses. it is especially important in monocyte adhesion and chemotaxis. }	+	Ch.16p ^{11.2}
Epidermal growth factor receptor (E1e)	+	Ch.7p ^{12.3} -p ^{12.1}
Fibronectin receptor (alpha subunit)(integrin alpha 5) (E7e)	4.7	Ch.12q ¹¹ -q ¹³
CD30L receptor (lymphocyte activation antigen CD30; Ki-1 antigen) (E5f)	+	Ch.1p
Integrin alpha-6 (E7g)	19	Ch.2q
Endothelin B receptor (EDNRB) (E1h)	+	Ch.13q ²²
Integrin beta-4 (E7h) { alpha6/beta4 may mediate adhesive and/or migratory functions of epithelial cells. }	4.4	Ch.17q ¹¹ -q ^{ter}
Insulin receptor (E1i) { tyrosine-protein kinase activitat. }	+	Ch.19p ^{13.2}
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain (hGM-CSF-R) (E2i)	+	?
Interleukin-9 receptor (E3i)	+	Ch.Xq ²⁸
Glutamate receptor metabotropic (subtype 5a) (E4i)	+	Ch.11q
Platelet membrane glycoprotein IIIA (E6j)	8.3	Ch.17q ²¹ -q ³²
Platelet-derived growth factor receptor beta (E1k) { tyrosine kinase activity,bind specifically to PDGF-B }	+	Ch.5q ³¹ -q ³²
Integrin alpha M (neutrophil adherence receptor alpha-M subunit; complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b [p170], macrophage antigen alpha polypeptide) (E6k)	5.5	Ch.16p
Interleukin-7 receptor alpha chain (E2l)	-3	Ch.5p ¹³
CD33 myeloid cell surface antigen (differentiation antigen [CD33]) (E5l)	+	Ch.19q ^{13.3} -q13.4, Ch.1q
Integrin beta-5 (E6l)	-9.5	Ch.3q
Granulocyte colony stimulating factor receptor (E1m)	30	Ch.1p ³⁵ -p ^{34.4}
Ciliary neurotrophic factor receptor alpha (cytokine receptor EB13) (E3m)	+	Ch.19p
Beta-catenin (E7m)	49	Ch. 3p ²² -p ^{21.3}
C5A anaphylatoxin chemotactic receptor (E1n)	19	Ch.19
Insulin-like growth factor II (somatomedinA) (F1a)	11.7	Ch.11p ^{15.5}
Hepatoma-derived growth factor (Fa)	-	Ch.1
Monocyte chemotactic protein 1{ anti tumor activity } (Fa)	-4.5	Ch.17q ^{11.2} -q ¹²
Platelet-derived growth factor B chain (PDGF-B) (F1b)	3.5	Ch.22q ^{12.3} -q ^{13.1}
Macrophage inflammatory protein-2-alpha (MIP2 alpha) (F5b)	-16.6	Ch.4q ²¹
Inhibin beta (A chain; activinA, activin AB alpha polypeptide; erythroid differentiation protein mRNA [EDF]) (F7b)	+	Ch.7p ¹⁵ -p ¹³
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (F1c)	6.3	Ch.5q ^{31.1??}
Hepatocyt growth factor-like protein (macrophage-stimulating 1) (F4c)	-67	Ch.3p ²¹
Placental growth factor (PIGF) (F5c)	+	Ch.14q ²⁴ -q ³¹ , Ch.12p
Transforming growth factor beta (1) (F1e)	+	Ch.19
Glucose-6-phosphate isomerase (neuroleukin) (F2e)	-	Ch.19q ^{13.1}

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (F1f)	+	Ch.17q ^{11.2} -q ¹²
Interleukin-10 (F6f)	+	Ch. 1
Endothelial-monocyte activating polypeptide II	-2.1	?
Acyl-coA-binding protein (diazepam-binding inhibitor) (F7h)	-10	Ch.2q
Interferon-gamma inducible Protein (F4i)	3.1	1q22
Calgranulin (B) (MRP-14[calcium-binding protein in macrophages, MIF-related]) (F4j)	3.5	Ch.1q ¹² -q ²²
Bone morphogenetic protein 1 (F2k)	5.7	Ch.8p ²¹
Hepatocyte growth factor activator (F1n)	-154.6	?
Macrophage inflammatory protein 1-alpha (GOS19-1) (F2n) {monokine with inflammatory and chemokinetic properties.}	4	Ch.17q ¹¹ -q ²¹