



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Chirurgische Klinik und Poliklinik

**Analyse des epigenetischen Regulators BRG1 im
Rahmen der Hepatokarzinogenese**

Benedikt Heinrich Kaufmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Medizin** genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Norbert Hüser

2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 21.12.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.10.2017 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungen.....	VI

1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Leber	1
1.1.1 Makroskopische Anatomie	1
1.1.2 Mikroskopische Anatomie	2
1.1.3 Physiologie der Leber	2
1.2 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	3
1.2.1 Epidemiologie des hepatozellulären Karzinoms	3
1.2.2 Risikofaktoren	5
1.2.3 Histologie und Zytologie des hepatozellulären Karzinoms	6
1.2.4 Klinik des hepatozellulären Karzinoms	7
1.2.5 Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms	8
1.2.6 Therapie des hepatozellulären Karzinoms	9
1.2.7 Molekulare Grundlagen der Pathogenese	10
1.3 Epigenetik und der SWI/SNF-Komplex	14
1.3.1 Epigenetik	14
1.3.2 SWI/SNF-Komplex	15
1.3.3 BRG1	18
1.3.3.1 BRG1 als Untereinheit von Komplexen	18
1.3.3.2 Interagierende Proteine mit BRG1	19
1.3.3.3 BRG1 im Kontext von Zelldifferenzierung, Organentwicklung und Pathologien	21
1.3.3.4 Signalwege und Interaktionen von BRG1	21
1.3.3.5 Rolle von BRG1 in malignen Tumoren	23
1.3.3.6 Rolle von BRG1 im hepatozellulären Karzinom	24
1.4 Intention und Zielsetzung der Arbeit	25

2	Material und Methoden	27
2.1	Materialien	27
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Chemikalien	28
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4	Verwendete Antikörper	30
2.1.5	Puffer.....	30
2.1.6	Medien und Komponenten für Zellkultur	31
2.1.7	Oligonukleotid Primer für qRT-PCR.....	32
2.1.8	siRNA	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Zellkultur	34
2.2.2	Immunhistochemie an Paraffinschnitten	35
2.2.3	Immunreaktiver Score nach Remmele	35
2.2.4	Proteinextraktion	36
2.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
2.2.6	SDS PAGE	37
2.2.7	Western Blot	38
2.2.8	RNA Isolierung aus kultivierten Zellen	38
2.2.9	RNA Isolierung aus humanem Gewebe.....	39
2.2.10	cDNA Synthese	40
2.2.11	qRT-PCR	40
2.2.12	Transfektion.....	41
2.2.13	Erstellen einer Wachstumskurve	42
2.2.13.1	Neubauer Zählkammer.....	42
2.2.13.2	Wachstumskurven.....	42
2.2.14	Untersuchung der Invasivität	43
2.2.15	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	45
3.1	BRG1-Expression im hepatozellulären Karzinom	45
3.1.1	mRNA-Expressionsanalyse an humanem Gewebe.....	45
3.1.2	Expressionanalyse an humanem Gewebe mittels Immunhistochemie.....	47
3.2	Manipulation der BRG1-Expression im hepatozellulären Karzinom.....	50
3.3	Effekt von BRG1 auf die Zellproliferation	53
3.4	Effekt von BRG1 auf die Zellinvasivität	57
3.5	Der Einfluss von BRG1 auf die Genregulation.....	60

4	Diskussion	66
4.1	Überexpression von BRG1 im HCC-Gewebe	66
4.2	Erfolgreiche BRG1-Suppression in humanen HCC-Zelllinien	67
4.3	BRG1 wirkt proliferationsfördernd in HCC-Zelllinien	68
4.4	BRG1 steigert die Invasivität von HCC-Zelllinien.....	70
4.5	BRG1 reguliert onkogene und tumorsuppressive Zielgene im HCC	71
4.5.1	<i>Onkogene und die Prognose limitierende Zielgene</i>	<i>72</i>
4.5.2	<i>Tumorsuppressive Zielgene</i>	<i>74</i>
4.6	Ausblick.....	75
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Anatomie der Leber.....</i>	<i>1</i>
<i>Abbildung 2: Schematische und histologische Darstellung des Leberläppchen</i>	<i>2</i>
<i>Abbildung 3: Todesursachen im zeitlichen Verlauf.....</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 4: Mortalitätsrate des HCCs</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 5: Histologische Aufnahmen des HCCs.....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 6: Therapieplanung beim HCC.....</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 7: Wichtige Signalwege mit Genalterationen im HCC.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 8: Zusammenstezung des SWI/SNF-Komplexes und sein Wirkungsmechanismus.....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 9: Chromatin-modifizierende BRG1-assoziierte Komplexe.....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 10: Mit BRG1 interagierende Proteine</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 11: Mutationen von BRG1 im Hepatozellulären Karzinom</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 12: BRG1-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR im HCC humaner Proben.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 13: Immunhistochemische Untersuchung humaner Proben auf die BRG1-Expression</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 14: Differenzierung der IHC von HCC-Patientengewebe</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 15: BRG1-Expression ermittelt auf Proteinebene.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Transfektion mit siRNA</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 17: BRG1-Expressionsanalyse transfizierter Zelllinien mittels qRT-PCR.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 18: BRG1-Expressionsanalyse transfizierter Zelllinien mittels Western Blot.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 19: Wachstumskurven von HepG2 Zellen begleitend mit BRG1-Expressionniveau</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 20: Wachstumskurven von HuH7 Zellen begleitend mit BRG1-Expressionniveau</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 21: Invasivitätsanalyse der HuH7 Zelllinie mittels Invasion Assay</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 22: Invasivitätsanalyse der HepG2 Zelllinie mittels Invasion Assay</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 23: Gen-Expressionsanalyse BRG1 regulierter Zielgene in HepG2 Zellen.....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 24: Gen-Expressionsanalyse BRG1 regulierter Zielgene in HuH7 Zellen</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 25: Gen-Expressionsanalyse weiterer Zielgene in HepG2 und HuH7 Zellen.....</i>	<i>64</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Die häufigsten Genmutationen im hepatozellulären Karzinom.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabelle 2: Beziehung zwischen den evolutionär konservierten SWI/SNF-Komplexen von Hefe, Drosophila und Säugetieren/ dem Menschen</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 5: Oligonukleotid Primer für qRT-PCR.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 6: Zur Transfektion verwendete siRNAs</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 7: Zelllinien mit zugehörigem Medium</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 8: Immunreaktiver Score nach Remmele</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 9: Programm und Zyklen der qRT-PCR.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 10: Angaben zur statistischen Signifikanz.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 11: Erläuterung der humanen Gewebeproben zur Ermittlung der BRG1-Expression</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 12: Evaluation der IHC für die BRG1-Expression mittels Score nach Remmele.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 13: Analysierte Zielgene.....</i>	<i>60</i>

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AK	Antikörper
AFB	Aflatoxin B
AFU	Alpha-L-fucosidase
ARID	AT-rich Interactive Domain-containing Protein
AXIN1	Axis Inhibitor 1
BAF	BRG1 Associated Factor Komplex
Bcl-xL	B-cell Lymphoma-extra large
BRG1	Brahma Related Gene 1
CTNNB1	Catenin beta 1
Cdkn	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CXCL	Interferon Gamma Inducible Protein 10
DAB	Diaminobenzidin
DCP	Des-gamma-carboxyprothrombin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
Dest.	Destilliertes Wasser
ddH2O	Demineralisiertes Wasser
ESCC	Ösophagus-Plattenepithelkarzinom
FBS	Fetales Bovine Serum
G	Gallengang
GGT II	Gamma-Glutamyl-transferase II
GR	Glukokortikoid-Rrezeptor
GP73	Golgi Protein73
GPC3	Glypican-3
h	Stunde
HMGA	High Mobility Group AT-Hook
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IHC	Immunhistochemie
IPMN	Intraduktale Papilläre Muzinöse Neoplasie

JAK/ STAT	Januskinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription
LKB1	Liver Kinase B1
Lsg.	Lösung
MKP-1	MAP Kinase Phosphatase-1
MAX	MYC-associated Factor X
Min	Minute
MDa	Megadalton
MMP	Matrix-Metalloproteasen
NF-kB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer
NFGI-B	Nerve Growth Factor IB
NFE2L2	Nuclear Factor Erythroid 2-like 2
NS5B	Virale RNA-dependent RNA Polymerase
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
NuRD	Nucleosome Remodeling Deacetylase
P	Pfortader
PanIN-PDA	Intraepitheliale Neoplasie - Pankreas-Adenokarzinom
PAX	Paired box
PBAF	Polybromo BRG1 Associated Factor Komplex
Ppib	Peptidylpropyl Isomerase B
RIPA	Radioimmunoprecipitationassay Buffer
qRT PCR	Real Time Quantitative Polymerase Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
S	Sinusoide
SAHF	Senescence-associated Heterochromatin Foci
SCCA	Squamosa cell carcinoma antigen
SCLC	Small Cell Lung Cancer
Sec	Sekunde
SerpinE	Serin Protease Inhibitor E
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SMARCA4	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4
SOX	Transkription Faktor Sry-related HMG box
Syn	Synonym
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TBS	Tris Buffered Salin
TBST	Tris Buffered Salin + Tween 20
TP53	Tumor protein 53
TNF	Tumornekrose Faktor
V.	Vena
WINAC	WSTF Including Nucleosome Assembly Complex
WSTF	Williams Syndrome Transcription Factor
ZV	Zentralvene

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Leber

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Die Leber ist mit einem Gewicht von 1400-1600 Gramm das größte parenchymatöse Organ des Menschen. Eingebettet in die Glisson-Kapsel, einer bindegewebigen Kapsel, ist sie zum größten Teil im rechten Oberbauch lokalisiert, jedoch mit Ausbreitung bis in den linken Oberbauch. Durch ihre Lage im rechten Oberbauch steht sie in enger Beziehung zur rechten Niere und der rechten Kolonflexur. Linksseitig befindet sich der Magen. Insgesamt besteht die Leber anatomisch aus vier Leberlappen: dem Lobus hepatis sinister, dem größeren Lobus hepatis dexter, dem Lobus Caudatus und dem Lobus quadratus hepatis. Eine weitere Einteilung der Leber orientiert sich an der Funktionalität der einzelnen Abschnitte innerhalb der Leber. Unter diesem Gesichtspunkt wird die Leber in einen rechten und linken Lappen, die jedoch nicht mit der anatomischen Einteilung übereinstimmen, und weiter in 8 Segmente (I-VIII) nach Couinaud eingeteilt. Diese Differenzierung ist im klinischen Alltag essentiell. V.a. chirurgisch sind die funktionellen Segmente von enormer Bedeutung, da sie jeweils unabhängig voneinander durch Gefäße versorgt werden und eine Resektion ohne größere Beeinträchtigung der restlichen Leberfunktion erlauben.

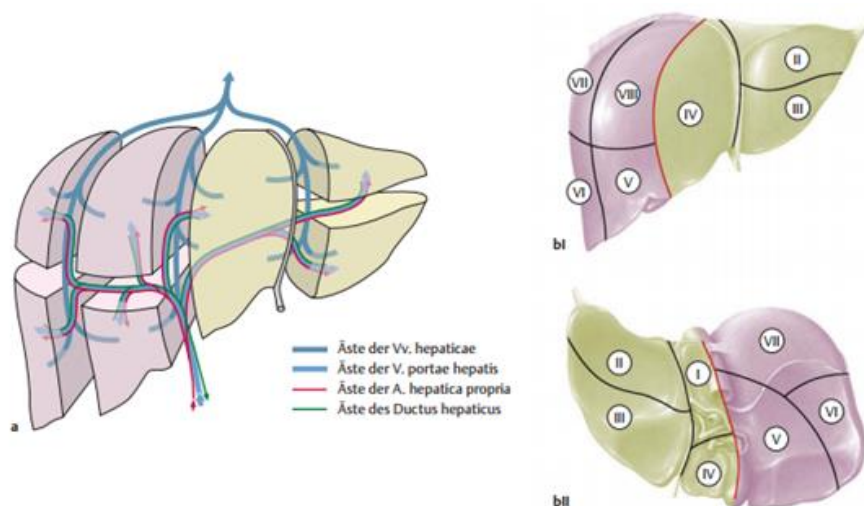


Abbildung 1: Anatomie der Leber

a: Unterteilung der Lebersegmente in Ansicht von ventral. Die Unterscheidung von Pars dextra (hell violett) und Pars sinistra (gelb) erfolgt nach Aufteilung der „portalen Trias“ (Ductus hepaticus, V. portae hepatis und A. hepatica propria) in zunächst jeweils zwei große Äste. **b:** Projektion der Segmentgrenzen auf die Leberoberfläche in der Ansicht von ventral (I) und von kaudal (II).

Zu beachten ist, dass zwischen Pars dextra und sinistra auf der ventralen Seite (b I) keine äußerlich sichtbare Begrenzung liegt, d.h. sie entsprechen nicht dem rechten und linken Leberlappen. Auf der dorsalen Seite (b II) hingegen, werden die Pars dextra und sinistra durch das Bett der V. cava inf. und die Gallenblase äußerlich sichtbar getrennt. Segment I ist identisch mit dem Lobus caudatus. (Aumüller et al., 2010)

Versorgt wird die Leber arteriell durch die Arteria hepatica propria. Darüber hinaus verfügt die Leber über einen weiteren venösen Blutzufuss durch die Vena portae hepatis, welche das venöse Blut des Gastrointestinaltrakts, Pankreas und der Milz führt. Gemeinsam mit dem Ductus hepaticus communis, der die Galle aus der Leber drainiert, bilden die erwähnten Arteria hepatica propria und Vena portae hepatis die portale Trias. Abgeleitet wird das venöse Blut der Leber schließlich über die Lebervenen in die Vena cava inferior. (Abdel-Misih & Bloomston, 2010; Bismuth, 1982; Sutherland & Harris, 2002, Braun et al., 2012; Lüllmann-Rauch, 2015; Schünke et al., 2009)

1.1.2 Mikroskopische Anatomie

Mikroskopisch hat sich die Einteilung in das klassische Leberläppchen durchgesetzt. Dabei besteht das polyedrische Läppchen aus einer Zentralvene in der Mitte des Läppchens, den Hepatozyten und den Sinusoiden. Am Rande verlaufen jeweils gemeinsam Äste der Arterie, der Pfortader und der Gallengänge als sogenannte Glisson-Trias. (Lüllmann-Rauch, 2015)

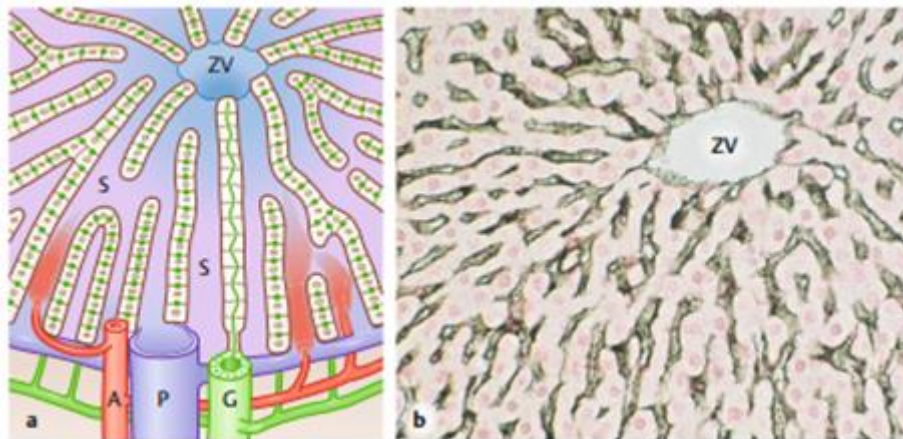


Abbildung 2: Schematische und histologische Darstellung des Leberläppchen

a: Anordnung der Leberzellbälkchen und Sinusoide (S). Die Sinusoide sind speichenförmig auf die Zentralvene (ZV) ausgerichtet. In den Leberzellbälkchen verlaufen die Gallenkanälchen (grün). Im Portalfeld liegen die parallel zur Längsachse des Leberläppchens verlaufenden Äste von Pfortader (P), Arterie (A) und Gallengang (G). **b:** Histologisches Bild von der Leber einer Ratte zur Darstellung der Leberzellbälkchen (rot), der Sinusoide (schwarz) und der Einmündung der Sinusoide in die Zentralvene. Färbung mit Kernechtrot, Vergr. 560fach (Lüllmann-Rauch, 2015)

1.1.3 Physiologie der Leber

Die Leber hat eine zentrale Stellung für verschiedene Funktionen des menschlichen Körpers. Im Energiestoffwechsel spielt sie eine wichtige Rolle für die Glykogenspeicherung, die Glukoneogenese, den Aminosäureabbau und die Bildung von Azetazetat sowie β -Hydroxybutyrat. Auf das Gerinnungssystem hat die Leber durch ihre enorme Bedeutung in der Plasmaproteinsynthese ebenso

erheblichen Einfluss. Zur Entgiftung des Körpers trägt sie über die Harnstoffsynthese und die Biotransformation maßgebend bei. Als größte Drüse des menschlichen Organismus bildet die Leber in den Hepatozyten Galle, welche für die Verdauung von Bedeutung ist. Des Weiteren hat sie als Speicherorgan von Spurenelementen wie Kupfer und Eisen als auch von Vitaminen und Lipiden eine wichtige Funktion. Eine Beteiligung der Leber an der Abwehrfunktion und Hormonbildung des Körpers ist ebenso nachgewiesen worden. (Schmidt et al., 2010)

1.2 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

1.2.1 Epidemiologie des hepatozellulären Karzinoms

Maligne Neoplasien (Syn.: Malignom, bösartiger Tumor) sind eine der häufigsten Todesursachen in westlichen Industrieländern. Sie verzeichnen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die meisten Todesfälle. Aufgrund einer jedoch in den letzten Jahren höheren Abnahme der Sterblichkeit bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen gegenüber den malignen Neoplasien, werden bei fortwährender gleicher Entwicklung maligne Neoplasien in 15-20 Jahren die Todesursache Nummer eins in Deutschland sein (Abbildung 3).

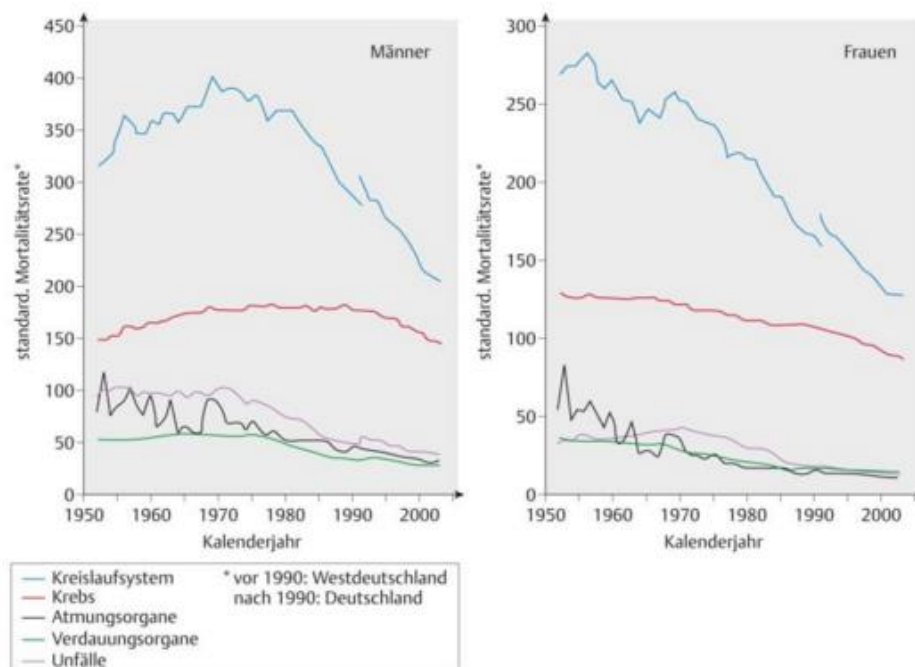


Abbildung 3: Todesursachen im zeitlichen Verlauf

Zeitlicher Verlauf der wichtigsten Todesursachen in Deutschland (Wagener & Müller, 2010, www.rki.de)

Das mittlere Lebensalter aller an einer malignen Neoplasie leidenden Patienten liegt bei ca. 70 Jahren. Trotz des besseren Verständnisses der Pathogenese von malignen Neoplasien und verbesserter Therapiemöglichkeiten ist die Mortalität innerhalb der verschiedenen Malignomentitäten bis heute sehr heterogen verteilt und teils noch immer sehr hoch. Malignen Neoplasien mit einer guten Prognose (Brustkrebs) stehen nach wie vor Tumore mit sehr schlechter Prognose (Pankreastumor) gegenüber. (Wagener & Müller, 2010)

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC), auch Primäres Leberzellkarzinom genannt, ist mit ca. 85% das häufigste primäre Malignom in der Leber (El-Serag & Rudolph, 2007). Unter den häufigsten Malignomen belegt es weltweit gesehen den 5. Platz bei Männern bzw. den 7. Platz bei Frauen. Aufgrund der weiterhin schlechten Prognose ist es unter den Krebs-assoziierten Todesfällen sogar die 2. häufigste Ursache bei Männern bzw. die 6. häufigste Ursache bei Frauen (Jemal et al., 2011). Für das Jahr 2012 wurde die Inzidenz weltweit auf 782.000 Fälle geschätzt, dem gegenüber standen 746.000 HCC-assoziierte Todesfälle (IARC, 2012). In Nordeuropa, Nord- und Südamerika und Ozeanien beträgt die Inzidenz weniger als 5/100.000 Einwohner, wobei nach neuesten Untersuchungen mit einer steigenden Tendenz in den Industrieländern zu rechnen ist. In den USA ist das HCC bereits das Malignom mit der am schnellsten wachsenden Mortalitätsrate. Aufgrund von Präventionsmaßnahmen wie der HBV-Impfung in Hochrisikogebieten konnte demgegenüber die HCC-Rate in einigen Populationen bereits gesenkt werden (El-Serag & Rudolph, 2007; El-Serag, 2002).

Weltweit finden sich die meisten Fälle in den Entwicklungsländern in Ost-/Südostasien, Sub-Sahara Afrika und Melanesien (Parkin et al., 2005) (Abbildung 4), wobei allein China mit einer Inzidenz von bis zu 35,2/100.000 bei Männern bzw. 13,3/100.000 bei Frauen mehr als 50% der weltweiten HCC-Fälle zu verzeichnen hat (El-Serag & Rudolph, 2007). Teilweise ist in Entwicklungsländern das HCC-Risiko 100fach erhöht im Vergleich zu den entwickelten Staaten. Diese Diskrepanz ist eine der größten unter den Malignomen (Galun et al., 2015). Männer sind insgesamt deutlich häufiger (2-4mal) von einem HCC betroffen als Frauen (Parkin et al., 2005; El-Serag & Rudolph, 2007). Ein weiteres Ungleichgewicht der Auftrittswahrscheinlichkeit eines HCCs besteht zwischen unterschiedlichen ethnischen Gruppen. So beträgt das Verhältnis der HCC-Inzidenz in den USA zwischen der asiatischen, afroamerikanischen und weißen Bevölkerung 4:2:1, vornehmlich aufgrund einer unterschiedlichen Prävalenz von Risikofaktoren und dem Zeitpunkt, an dem diese erworben werden (El-Serag & Rudolph, 2007).

In Ländern mit geringer Inzidenz als auch in den hochrisikogebieten Asiens tritt das HCC vornehmlich ab dem 75. Lebensjahr auf, während das Haupterkrankungsalter in den hochrisikogebieten Afrikas zwischen 60 und 65 Jahren liegt. Insgesamt erkranken Frauen durchschnittlich ca. 5 Jahre später als Männer (El-Serag & Rudolph, 2007). Darüber hinaus wird in Entwicklungsländern eine Vielzahl der Diagnosen bei Patienten bereits schon in der 4. Lebensdekade gestellt (Galun et al., 2015).

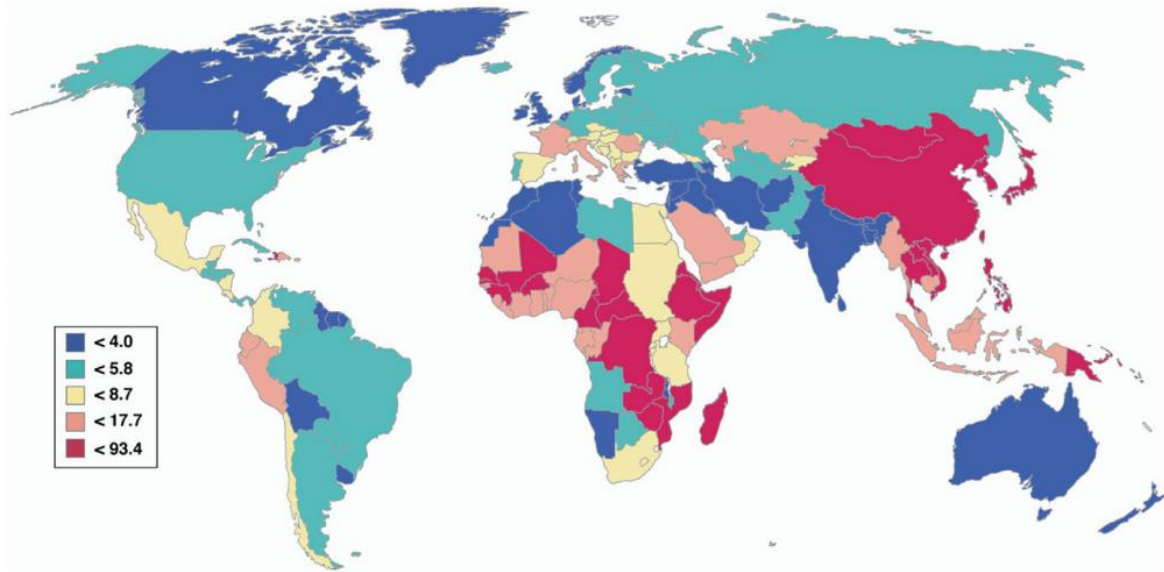


Abbildung 4: Mortalitätsrate des HCCs

Weltweite Mortalitätsrate des HCCs pro 100.000 Einwohnern, altersangepasst (El-Serag & Rudolph, 2007)

1.2.2 Risikofaktoren

Das HCC ist mit 85% das häufigste primäre Leberkarzinom (El-Serag & Rudolph, 2007). In 80-90% der Fälle (Bellissimo et al., 2015) ist für die Entwicklung des HCCs eine Leberzirrhose, die auf unterschiedlichste Einflüsse zurückzuführen ist, ursächlich. Lediglich 5-15% der HCCs entstehen in westlichen Ländern aus zirrhosefreiem Lebergewebe (Galun et al., 2015).

Weltweit gesehen ist die Hepatitis-B Infektion mit ca. 55% aller Fälle die häufigste Ursache für die Entwicklung eines HCC. Dies erklärt die hohe Inzidenz des HCCs in Asien und Afrika, wo eine besonders hohe Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit dem Hepatitis-B-Virus (85% der HCC-Fälle bei Chinesen und Schwarzafrikanern sind auf eine HBV Infektion zurückzuführen) vorliegt (Galun et al., 2015). In diesen Endemiegebieten findet die Übertragung oft bereits perinatal statt, wodurch ein chronischer Verlauf der HBV Infektion begünstigt wird (El-Serag & Rudolph, 2007).

Eine weitere wichtige Ursache für die Entstehung eines HCC, insbesondere in den entwickelten Ländern, ist die Hepatitis-C Infektion (Galun et al., 2015). Ca. 1-3% aller HCV-infizierten werden mit einer Latenz von etwa 30 Jahren ein HCC entwickeln (El-Serag & Rudolph, 2007).

In bestimmten Ländern, v.a. den Endemiegebieten des Hepatitis-B-Virus, ist eine hohe Exposition gegenüber dem Aflatoxin B1 (*Aspergillus flavus*) ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines HCCs (El-Serag & Rudolph, 2007).

Weitere bekannte Faktoren, die die Entwicklung eines HCCs begünstigen, sind der übermäßiger Genuss von Alkohol, die Speicherkrankheit Hämochromatose, Übergewicht, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), die non-alcoholic steatohepatitis (NASH), Diabetes Mellitus, orale Kontrazeptiva,

und Tabakrauch (El-Serag & Rudolph, 2007, Galun et al., 2015). Dabei können sich die verschiedenen Risikofaktoren bei gemeinsamer positiver Anamnese potenzieren, wie es für die HBV Infektion mit gleichzeitiger Exposition gegenüber dem Aflatoxin gezeigt wurde (Yu et al., 1997; El-Serag & Rudolph, 2007). Präventive Maßnahmen wie die HBV-Impfung und die Expositionsminderung gegenüber Aflatoxin B1 haben bereits erste Erfolge gezeigt (El-Serag & Rudolph, 2007).

1.2.3 Histologie und Zytologie des hepatozellulären Karzinoms

Histologie

Histomorphologisch lassen sich verschiedene Typen des HCCs unterscheiden, deren gemeinsamer Ursprung jedoch in der Entartung von Hepatozyten liegt. Vorrangig zu nennen sind der trabekuläre Typ (Leberarchitektur noch gut erkennbar), der pseudoglanduläre und azinäre Typ (oft mit dem trabekulären Typ assoziiert vorkommend), der kompakte Typ (Leberarchitektur weitestgehend aufgehoben), der zirröse Typ (selten vorkommend), und der fibrolamelläre Typ (vor allem bei jungen Patienten ohne zirrhotische Leber). (Drebber & Dienes, 2006)

Zytologie

Zytologisch werden folgende Formen unterschieden:

- hepatozytärer Typ (die meisten Tumorzellen ähneln den Hepatozyten)
- pleomorpher Typ (enorme Unterschiede der Zell- und Kernbeschaffenheit)
- Klarzelltyp (reichlich zytosolische Glykogen und Fetteinlagerungen)
- sarkomatöser Typ (sarkomähnliche Tumorzellen)
- onkozytärer Typ (bei jungen Patienten ohne zirrhotische Leber möglich)

Besonders zu erwähnen sind der trabekulär-sinusoidale Typ als häufigste vorkommende Form und der fibrolamelläre Typ, der meistens aus zirrrosefreier Leber heraus entsteht.

Wichtig ist weiterhin die Aufarbeitung des Tumorgewebes v.a. wegen der Prognosebestimmung. So ist beispielsweise beim fibrolamellären Typ ein prognostisch besserer Verlauf zu erwarten als beim trabekulären und zirrösen Typ. (Drebber & Dienes, 2006; Riede et al., 2009)

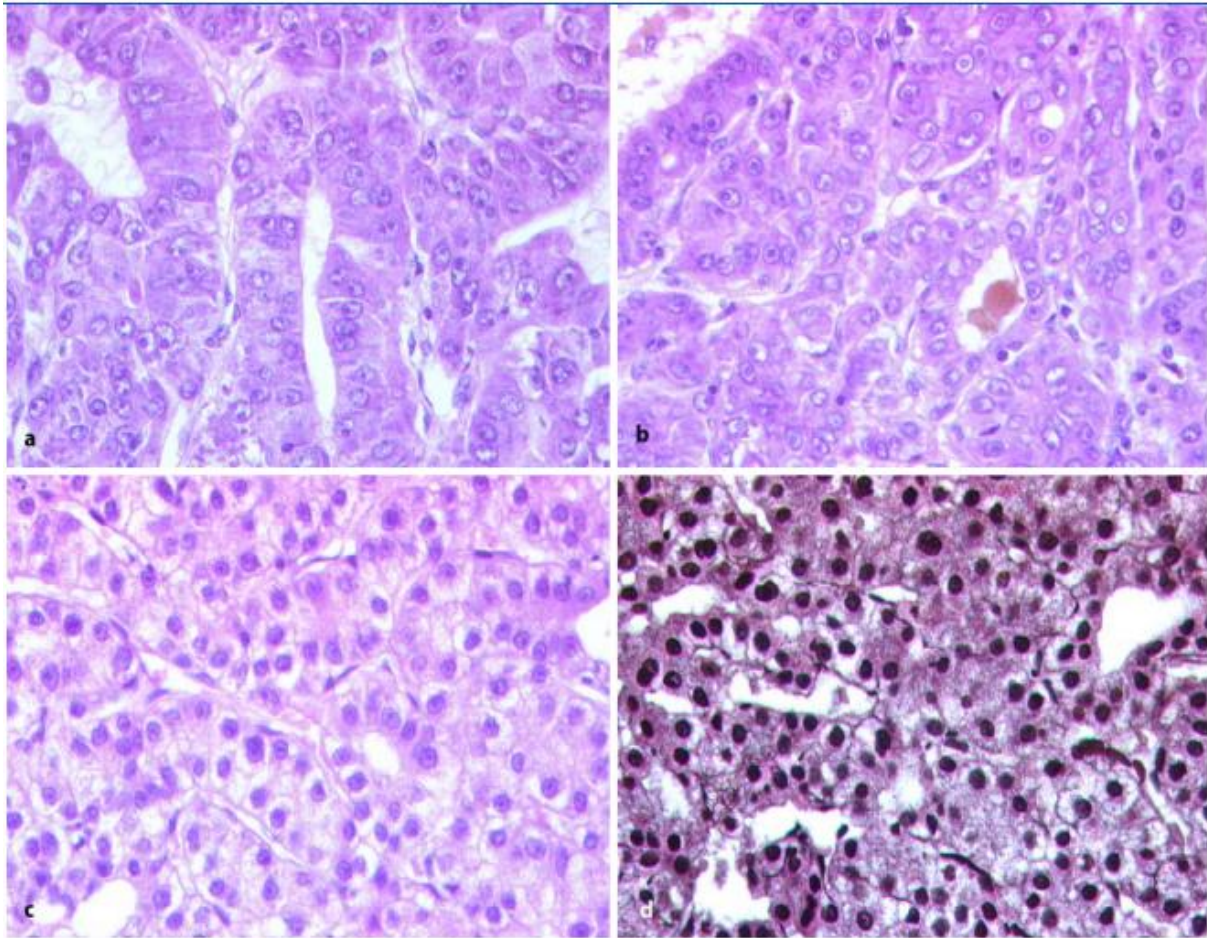


Abbildung 5: Histologische Aufnahmen des HCCs

a Pseudoglanduläres HCC **b** Nachweis von Gallethromben innerhalb der pseudoglandulären Lumina (jeweils HE-Färbung, Vergr. 400:1) **c, d** Trabekuläres und pseudoglanduläres Wachstumsmuster eines mäßig differenzierten HCC (**c** HE-Färbung, **d** Gomori-Versilberung, Vergr. 250:1) (Drebber & Dienes, 2006)

1.2.4 Klinik des hepatozellulären Karzinoms

Das HCC manifestiert sich bei Patienten meist erst zu einem späten Zeitpunkt. Zu diesen Spätsymptomen werden Gewichtsverlust, rechtsseitige Oberbauchbeschwerden, Abgeschlagenheit, Fieber, tastbare Tumore sowie Anorexie gezählt. Aufgrund einer hohen Zahl an Patienten, die gleichzeitig an einer Leberzirrhose leiden, sind die Symptome dieser als auch einer resultierenden Dekompensation bei Patienten mit einem HCC ebenfalls zu finden. Paraneoplastische Syndrome wie bspw. eine Erythrozytose können gelegentlich festgestellt werden. Die engmaschige Kontrolluntersuchung für Zirrhosepatienten führt zunehmend zur Diagnosestellung eines HCCs in einem frühen Tumorstadium und damit verbesserten Prognoseaussichten. (Braun et al, 2012; Hadem et al, 2010; Piper, 2013)

1.2.5 Diagnostik des hepatozellären Karzinoms

Die Anamnese und klinische Untersuchung stehen bei unbekannter Vorgeschichte der Patienten an erster Stelle der Diagnosefindung. Sehr oft jedoch ergeben sich Hinweise für ein HCC im Rahmen von Verlaufskontrollen von Patienten mit Zirrhose. In diesen Fällen ist die genaue Vorgeschichte der Patienten meist bereits bekannt. Bei ausreichendem Verdacht auf ein HCC folgen verschiedene weitere diagnostische Schritte. Mittels Ultraschallsonographie, Kontrastmittelsonographie, Computertomographie oder Kontrast-MRT (Galun et al., 2015; Flores & Marrero, 2014; Sastre et al., 2015) kann der Anfangsverdacht eines HCC erhärtet bzw. bestätigt werden. Erhöhte alpha-Fetoprotein-Werte weisen ebenso auf ein HCC hin (Singal et al., 2012). In bestimmten Fällen ist die Indikation zu einer Biopsie gegeben. Um jedoch Implantationsmetastasen (2% der Fälle) und falsch negative Ergebnisse (bis 10% der Biopsien kleiner Läsionen) zu verhindern, sollte die Indikation einer Feinnadelpunktion als diagnostisches Mittel streng gestellt werden (Galun et al., 2015). Bei unklarem pathologischem Befund sind spezielle Färbungen auf bspw. CD34 oder CK7 von großer Bedeutung (Flores & Marrero, 2014). Für bestimmte Gruppen mit einem hohen Risiko ein HCC zu entwickeln, wie Zirrhosepatienten Child-Pugh A-B, Patienten mit chronischer HCV Infektion, HBV infizierte Patienten mit hohem Risiko der Progression, auf eine Lebertransplantation wartende Zirrhosepatienten und Patienten mit Bridging Fibrosis ist ein regelmäßiges Screening auf ein HCC indiziert. Am besten zum Screening geeignet ist eine Ultraschalluntersuchung der Leber alle 6 Monate (Sastre et al., 2015). Der Einsatz von AFP als Screening Marker wird kontrovers diskutiert, da er in bestimmten Patientengruppen die Sensitivität einer Ultraschalluntersuchung nur geringfügig steigert und das Langzeitüberleben nicht signifikant beeinflusst (Singal et al., 2012; Chen et al., 2003; Singal et al., 2009). Weitere Tumormarker für das HCC wie Glypican-3 (GPC3), Golgi Protein73 (GP73), Alpha-L-fucosidase (AFU), Des-gamma-carboxyprothrombin (DCP), das Isoenzym gamma-Glutamyl-transferase II (GGT II) und Squamosa cell carcinoma antigen (SCCA) werden derzeit hinsichtlich der Bedeutung für das HCC getestet. Nach derzeitigem Stand scheint insbesondere eine Kombination der verschiedenen Marker in der klinischen Anwendung sinnvoll (Waidely et al., 2016).

1.2.6 Therapie des hepatozellulären Karzinoms

Die Prognose des HCCs wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Abhängig ist sie unter anderem von dem Patientenalter, dem allgemeinen Gesundheitsstatus des Patienten, Tumorgröße, Anzahl der Tumoren, Gefäßinvasion, AFP-Wert, Child-Pugh-Score, portaler Hypertension und den zur Verfügung stehenden bzw. möglichen Therapieoptionen, zu deren Evaluation das Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging System herangezogen wird (Llovet et al., 2003; Kao et al., 2015). Im Kontext dieser verschiedenen Faktoren für eine erfolgreiche Behandlung sollte eine Therapieempfehlung für den Patienten stets in einem multidisziplinären Setting diskutiert werden (Galun et al., 2015).

Abhängig vom jeweiligen Tumorstadium stehen unterschiedliche Maßnahmen zur Verfügung. In einem frühen Stadium der Erkrankung wird in erster Linie eine Leberresektion mit kompletter Entfernung des Tumors angestrebt. Jedoch ist eine Rezidivrate des HCCs mit 75% nach 5 Jahren sehr häufig (Tabrizian et al., 2014). Ist eine Resektion nicht möglich, bspw. aufgrund einer vollständig zirrhotischen Leber, besteht in der Lebertransplantation, zu deren Entscheidungsfindung die Milan-Kriterien Anwendung finden, eine weitere kurative Behandlungsoption bei der gleichzeitig auch die Ursache des HCCs beseitigt werden kann (Tabrizian et al., 2014; Galun et al., 2015). Eine weitere kurative Behandlungsmöglichkeit im frühen Stadium besteht in einer lokal ablativen Therapie. Insgesamt liegt die 5-Jahresüberlebensrate des HCCs im frühen Stadium bei kurativer Therapie bei 50-70% (Pons et al., 2005). Patienten mit kompletter Resektion des Tumorgewebes sollten einem anschließenden Follow-up mit Bildgebung und Bestimmung des AFP-Werts unterzogen werden (Sastre et al., 2015).

Im intermediären Stadium wird i.d.R. die transarterielle Chemoembolisation (TACE) angewandt, in einem späteren Stadium für eine längere Überlebenszeit (Bruix & Sherman, 2011; Galun et al., 2015) die systemische medikamentöse Therapie mit Sorafenib (Flores & Marrero, 2014; Sastre, et al., 2015; Tabrizian et al., 2014). Weitere medikamentöse Behandlungsversuche haben bis heute keinen Vorteil gegenüber Sorafenib gezeigt (Galun et al., 2015; Stotz et al., 2015). Als letzte Therapiemaßnahme bleibt im Endstadium nur die symptomatische Behandlung (Sastre et al., 2015; Pons et al., 2005) mit einer Überlebenszeit von lediglich wenigen Monaten (Llovet et al., 2003).



Abbildung 6: Therapieplanung beim HCC

Vorgehen nach Staging mittels BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer), PS Performance Status, N Lymphknoten Klassifikation, M Metastasen Klassifikation, RFA Radiofrequenzablation, TACE Transarterielle Chemoembolisation (Sastre et al., 2015)

1.2.7 Molekulare Grundlagen der Pathogenese

Die Pathogenese des HCCs erfolgt mehrheitlich indirekt auf der Grundlage einer Leberzirrhose. Hierbei führt eine chronische Infektion, bspw. durch HCV oder HBV, bzw. ein auf die Leber chronisch wirkender Stress zu einer inflammatorischen Immunantwort. Diese wiederum resultiert in histologischen Umbauprozessen, welche zur Entstehung einer Leberfibrose führen. Bei einem anhaltenden chronischen Verlauf entwickelt sich schließlich eine Leberzirrhose, in der sich durch inflammatorischen und oxidativen Stress maligne Hepatozyten transformieren können. Diesem indirekten pro-karzinogenen Pathomechanismus der Zirrhosesequenz stehen für Infektionskrankheiten und Stressfaktoren bzw. Toxine auch direkte karzinogene Mechanismen gegenüber, die von der Zirrhosesequenz weitgehend unabhängig sind. (El-Serag & Rudolph, 2007; Lemon & McGivern, 2012)

HCV

Auf molekularer Ebene kann eine HCV Infektion über die virale RNA-dependent RNA polymerase, NS5B, zu einer Repression des Tumorsuppressorgens Rb in den Zellen führen. Eine Repression des Tumorsuppressors p53 durch NS5B wird ebenso diskutiert. Beide Mechanismen fördern schließlich

über fehlende Repression proliferativ wirkender Gene die Hepatokarzinogenese. Andererseits wird auch die These diskutiert, dass durch die HCV induzierte Apoptose eine reaktiv vermehrte Proliferation in dem inflammatorisch umgebenden Gewebe zur Entstehung eines HCCs führt. (Lemon & McGivern, 2012)

HBV

Für eine HBV Infektion sind unterschiedlich pathologische Mechanismen für die Entstehung eines HCCs bereits eruiert worden.

Über epigenetische Veränderungen kann das HB-Virus zur Hepatokarzinogenese beitragen. Dabei kommt es durch das Hbx Protein des HB-Virus zu einer Induktion der DNA Methyltransferasen (DNMTs) Familie, welche über DNA-Hypermethylierungen die Expression des Tumorsuppressorgens E-Cadherin oder des Zykluskontrollproteins p16 supprimieren können und auf diesem Weg die Proliferation fördern. (Kew, 2011)

Eine weitere Regulierung der Zellproliferation bzw. Apoptose ist über eine Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 möglich. Durch eine Komplexbildung von Hbx-Protein und p53 im Zytoplasma wird der Zugang von p53 zum Kern der Zelle verwehrt und somit die Transkription der Zielgene von p53 wie bspw. p21, Bax oder Fas verhindert. (Kew, 2011)

Zum antiapoptotischen Effekt der HBV Infektion ist jedoch auch eine proapoptotische Wirkung bekannt. Dabei reduziert das Hbx-Protein die Expression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-xL (Kew, 2011) oder führt zu einer Daueraktivierung der CyclinB1-CDK1 Kinase (Cheng et al., 2009).

Bis heute können diese konträren Ergebnisse nicht vollständig in Einklang gebracht werden. Eine mögliche Erklärung lautet, dass die Höhe der Konzentration an Hbx-Protein entscheidend für den pro- oder antiapoptotischen Weg ist. (Kew, 2011)

Eine weitere Beeinflussung durch das HB-Virus ist für die Telomeraseaktivität gezeigt. Es gibt Hinweise, dass das Hbx-Protein die Telomerase reverse transcriptase (TERT) Aktivität erhöht. Dadurch kommt es über die Erhöhung der Lebensdauer der Zellen zu einer malignen Transformation (Kew, 2011). Bekannt ist jedoch konträr zu den erwähnten Ergebnissen auch, dass Telomerase-Mutationen, die zu einer verminderten Telomeraseaktivität führen, die Entstehung einer Zirrhose auf der Grundlage einer chronischen Lebererkrankung begünstigen. Ein möglicher protektiver Schutz dieser Zirrhosepatienten vor der weiteren Entwicklung eines HCCs aufgrund der verringerten Telomeraseaktivität konnte hierbei nicht bestätigt werden (Hartmann et al., 2011). Eine ebenfalls bekannte Interaktion liegt zwischen dem Hbx Protein und den Reparaturmechanismen der Zellen vor. Durch eine Suppression der Reparaturmechanismen und gleichzeitiger Stressinduktion, die zu DNA-Schäden führt, wird die Tumorgenese gefördert (Geng et al., 2015).

Aflatoxin B

Das Aflatoxin B₁ wird durch p450 Enzyme in der Leber weiter verstoffwechselt. Der entstehende Metabolit AFB₁-8,9-exoepoxid besitzt schließlich eine kanzerogene Wirkung, indem er zu einer p53-Mutation führen kann. (Galun et al., 2015)

Übergewicht, NAFLD, NASH

Immer wichtiger werden Übergewicht, die non-alcoholic steatohepatitis (NASH) und die non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) als Ursache für die Entwicklung eines HCCs. Bei diesen Risikofaktoren kommt es durch eine chronische Entzündung zur Zirrhosebildung mit folglich hohem HCC-Risiko. Für die Entzündungsreaktion spielen erhöhte Glucosespiegel, Fettsäuren und Leptinwerte eine wichtige Rolle, indem sie proinflammatorische und karzinogene Signalmoleküle wie NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer), TNF (Tumornekrose Faktor) oder JAK/STAT überexprimieren. (Galun et al., 2015; Siegel & Zhu, 2009)

Mutationen und pathologische Genexpressionsniveaus im hepatozellären Karzinom

Bis heute ist eine Vielzahl von Genmutationen im HCC bekannt (Tabelle 1). Die häufigste Mutation hierbei ist für das Telomerase reverse transcriptase (TERT)-Gen eruiert worden, welche in ca. 50% aller HCC-Fälle nachgewiesen werden konnte. Eine solche Mutation führt über eine verstärkte Aktivierung der TERT zu einer Immortalisierung von somatischen Zellen und somit zur Entstehung einer malignen Neoplasie. (Totoki et al., 2014; Kim et. al., 1994)

Weitere häufige Genmutationen sind für Tumor protein 53 (TP53), Catenin beta 1 (CTNNB1), AT-rich interaction domain 1A bzw. 2 (ARID1A, ARID2), Axis Inhibitor 1 (AXIN1), Nuclear factor erythroid 2-like 2 (NFE2L2) und Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2a (Cdkn2a) gezeigt worden. (Totoki et al., 2014; Lee, 2015)

Weiter konnte in neuesten Untersuchungen auch ein Expressionsanstieg für Never in mitosis gene A-related kinase6 (NEK6) im HCC gezeigt werden, welcher über einen positiven Effekt auf CyclinE durch Modulation von cdk1/cdc2 zu einer gesteigerten Zellproliferation führt (Zhang et al., 2014). Ähnliches ist für den Transkriptionsfaktor HOXA7 beschrieben, welcher durch die Modulation von CyclinE1/CDK2 die Proliferation fördert (Li et al., 2015).

Gene*	Mutation frequency (%)	Function
TERT	47.1	Maintaining telomere length
TP53	29.2	Tumor suppressor
CTNNB1	27.4	Transcriptional regulator
ARID1A	10.0	Chromatin remodeling
ARID2	9.5	Chromatin remodeling
JAK1	7.7	Kinase
ALB	7.6	Serum protein
AXIN1	7.5	Signal transducer
NFE2L2	5.1	Transcriptional regulator
RPS6KA3	4.6	Kinase
CDKN2A	4.1	Cell cycle regulator
COL11A1	4.1	Cytoskeletal protein
RB1	4.0	Tumor suppressor
ACVR2A	3.9	Kinase receptor
KEAP1	3.2	Proteinase adaptor
AR	3.2	Growth hormone receptor
BRINP3	2.9	Unknown

Tabelle 1: Die häufigsten Genmutationen im hepatozellulären Karzinom
(Lee, 2015, The Korean Association for the Study of the Liver)

Die Genmutationen betreffen verschiedene Signalwege und Wirkungsweisen, welche zu einer malignen Transformation der Zelle führen. Betroffen sind hierbei u.a. die Signalwege von Zellzyklus, Proliferation, Chromosomen-Remodeling, Histonmodifikation und oxidativer Stressantwort einer Zelle (Abbildung 7). (Totoki et al., 2014; Lee, 2015)

Besonderes Interesse in dieser Arbeit gilt dem Signalweg des Chromatin-Remodelings. Wie bereits erwähnt sind die Genmutationen von ARID1A und ARID2 häufig im HCC anzutreffen. ARID1A und ARID2 selbst sind Mitglieder der ARID-Familie, welche aus Proteinen mit einer DNA-bindenden Domäne gebildet wird. Insgesamt besteht diese Familie aus 7 Unterklassen, ARID1-5 und JARID1-2, die mit weiteren Proteinen Bestandteil verschiedener Komplexe sind. (Wilsker et al., 2005)

ARID1A und ARID2 bilden hierbei jeweils eine Untereinheit eines Chromatin Remodeling Komplexes. ARID1A ist exklusiv für den BRG1-associated factor (BAF)-Komplex, ARID2 exklusiv für den polybromo BRG1-associated factor (PBAF)-Komplex reserviert. Beide Komplexe wiederum sind Unterfamilien des SWI/SNF-Komplexes (switching/ sucrose non-fermenting) (Kapitel 1.3.2). (Wilson & Roberts, 2011; Yan et al., 2005). Insgesamt sind im HCC für den SWI/SNF-Komplex Alterationen in 9 Untereinheiten nachgewiesen worden. (Totoki et al., 2014)

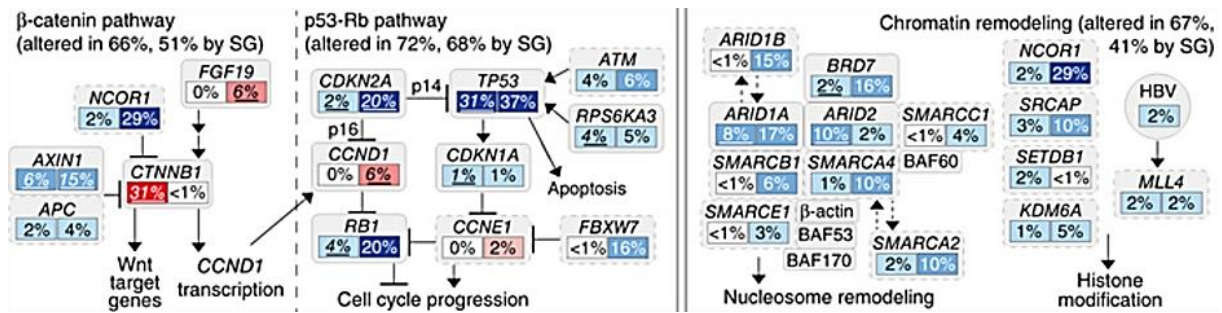


Abbildung 7: Wichtige Signalwege mit Genalterationen im HCC

Gezeigt sind wichtige Signalwege, die im HCC Modifikationen unterliegen. Links unter den Schlüsselgenen Prozentzahl der Genmutationen, rechts unter den Schlüsselgenen Prozentzahl der Genkopie-Änderungen. Schlüsselgene umrahmt mit durchgezogener Linie zeigen signifikante Alterationen, die anderen Schlüsselgene sind umrahmt mit einer gestrichelten Linie, SG=signifikant (Totoki et al., 2014)

Eine weitere Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes mit Alterationen im HCC ist BRG1 (Brahma related gene 1, Syn.: SMARCA4) (Kapitel 1.3.3) (Totoki et al., 2014, Endo et al., 2013).

In einer Arbeit von Endo et al., 2013 konnten in einigen Fällen im HCC-Gewebe BRG1-Mutationen und DNA-Kopiealterationen sowie eine Überexpression der Untereinheit BRG1 nachgewiesen werden (Kapitel 1.3.3.6). Welcher genaue Pathomechanismus und welche Folgen sich daraus ergeben ist bisher weitestgehend unverstanden.

1.3 Epigenetik und der SWI/SNF-Komplex

1.3.1 Epigenetik

Die Ursachen der Entstehung von Malignomen sind sehr vielfältig und stellen die Grundlage zahlreicher Forschungsschwerpunkte dar. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass eine mögliche Ursache für die Entwicklung von Malignomen im Fachgebiet der Epigenetik zu finden ist (McKenna & Roberts, 2009). Die Epigenetik befasst sich mit dem Mechanismus mit welchem die Zelle die Regulierung und Expression von Genen übergeordnet beeinflussen kann. Für diese Art der Regulation wird vorrangig eine Modifikation der Verpackung der DNA genutzt. Um die DNA trotz ihrer Größe in den Zellkern einer eukaryotischen Zelle integrieren zu können, greift die Zelle auf eine besondere Form der Verpackung der DNA zurück. Durch das Zusammenwirken verschiedener Strukturen wie den Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4 wird die DNA in Form von Chromatin auf einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Länge verkürzt. Hierbei formieren je zwei Untereinheiten bestehend aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 ein Oktamer. Dieses bildet zusammen mit der DNA und dem Linker Histon H1 ein Nukleosom, die primäre Untereinheit des Chromatins. In einem Nukleosom windet sich die DNA mit einer Länge von 147 Basenpaaren in einer linksdrehenden Helix mit 1,7-facher Windung

um das aus Histonen bestehende Oktamer. Verbunden über ein H1 Histon, jeweils am Beginn und Ende eines Nucleosoms, reihen sich die Nucleosomen zum Chromatin auf. Es werden weiter zwei Arten des Chromatins unterschieden, das Euchromatin und das Heterochromatin. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal zwischen beiden Formen ist die Dichte des Chromatins. So ist das Euchromatin von einer wesentlich geringeren Dichte als das Heterochromatin geprägt. Dies erklärt auch die Tatsache, dass die DNA, die in Form von Euchromatin gespeichert ist, die meisten für die jeweilige Zelle essentiellen Gene codiert. Über Modifikationen wie beispielsweise Ubiquitierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Sumoylierung, Ribosylierung oder Methylierung kann die Struktur des Chromatins geändert werden und die DNA somit für verschiedene Prozesse wie die Transkription, Replikation und DNA-Reparaturen zugänglich werden. (Hergeth & Schneider, 2015; Horn & Peterson, 2006; Kornberg & Thomas, 1974)

1.3.2 SWI/SNF-Komplex

ATPase abhängige Chromatin Remodeling Komplexe ändern die Struktur des Chromatins und machen es damit für die Transkription zugänglich (Abbildung 8). Derzeit werden vier Subfamilien der ATPase abhängigen Chromatin Remodeling Komplexe unterschieden. Hierbei handelt es sich um den SWI/SNF (switching/ sucrose non-fermenting)-Komplex, den ISWI-Komplex, den NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase)-Komplex und den INO80-Komplex. Jeder Einzelne wird durch seine spezifische katalytische Untereinheit gekennzeichnet (Trotter & Archer, 2008). Eine wichtige Position im Zusammenspiel von Epigenetik und der Entwicklung von Malignomen nimmt der SWI/SNF-Komplex ein (Wilson & Roberts, 2011). Der SWI/SNF-Komplex ist ein Chromatin Remodeler, der die durch ATP-Hydrolyse gewonnene Energie für Strukturveränderungen von Chromatin nutzt. In diesem Zusammenhang kann er die Funktion eines Transkriptionsfaktors einnehmen und somit die Genregulation beeinflussen (Peterson & Tamkun, 1995). Der gesamte Komplex besteht aus mehreren (9-12) Untereinheiten (Wilson & Roberts, 2011) und besitzt eine Masse von ca. 1,14MDa (Smith et al., 2003) bzw. 2MDa (Wang et al., 1996). Der SWI/SNF-Komplex kann evolutionsgeschichtlich in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. Einige Untereinheiten haben sich während dieses Prozesses konserviert (Tabelle 2) (Wilson & Roberts, 2011; Mohrmann & Verrijzer 2005).

Yeast		Drosophila		Human	
SWI/SNF	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF
Swi2/Snf2	Sth1	Brahma	Brahma	BRG1 or hBRM	BRG1
Swi1/Adr6		OSA		BAF250	
	Rsc1, Rsc2, Rsc4		Polybromo		Polybromo/BAF180
	Rsc9*		BAP170*		
Swi3	Rsc8	Moira	Moira	BAF170 & BAF155	BAF170 & BAF155
		BAP111	BAP111	BAF57	BAF57
Swp73	Rsc6	BAP60	BAP60	BAF60a	BAF60a or BAF60b
Swp61/Arp7	Rsc11/Arp7	BAP55	BAP55	BAF53	BAF53
Swp59/Arp9	Rsc12/Arp9				
		actin	actin	actin	actin
Snf5	Sfh1	Snr1	Snr1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1
	Rsc5, 7, 10, 13-15				
	Rsc3, Rsc30				
Swp82					
Swp29/Tfg3/TAF30/Anc1					
Snf6, 11					

Tabelle 2: Beziehung zwischen den evolutionär konservierten SWI/SNF-Komplexen von Hefe, Drosophila und Säugetieren/ dem Menschen (Mohrmann & Verrijzer, 2005)

Bei Säugetieren wird der SWI/SNF-Komplex weiter spezifiziert (Tabelle2 und Abbildung 8). In Bezug darauf werden der BRG1 associated factor Komplex (BAF, SWI/SNF-A) und der polybromo BRG1 associated factor Komplex (PBAF, SWI/SNF-B) unterschieden. Als katalytische Untereinheit für die ATPase fungiert entweder Brahma (BRM, SMARCA2) oder BRG1 (Brahma related gene 1, SMARCA4) im BAF-Komplex oder BRG1 exklusiv im PBAF-Komplex. (Mohrmann & Verrijzer 2005; Wilson & Roberts, 2011; Wang et al., 1996; Phelan et al., 1999; Muchardt & Yaniv, 2001; Hugo gene nomenclature committee)

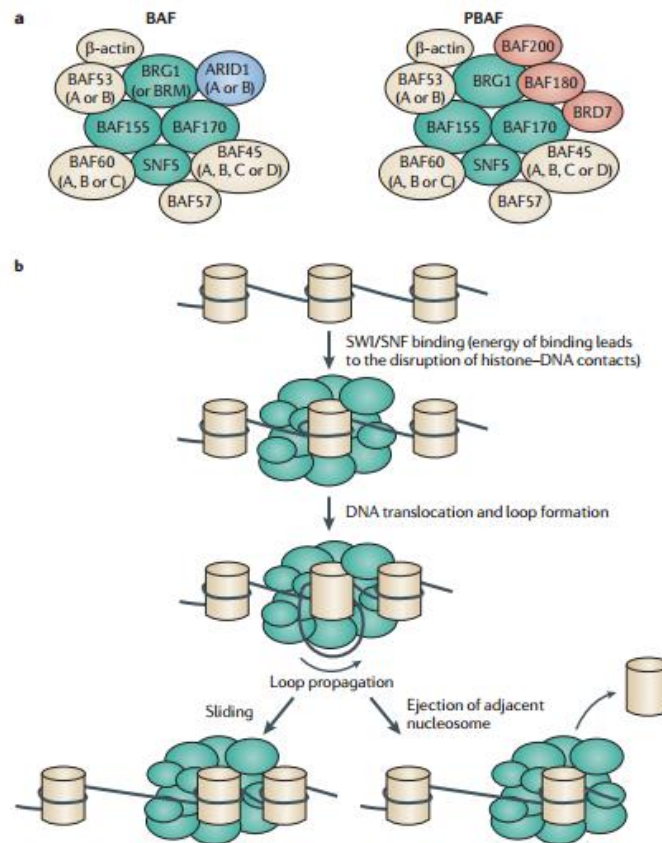


Abbildung 8: Zusammenstellung des SWI/SNF-Komplexes und sein Wirkungsmechanismus

a SWI/SNF-Komplexe BAF und PBAF setzen sich aus evolutionär konservierten (grün und gelb) und komplexspezifischen Untereinheiten (blau und rot) zusammen. **b** Wirkungsweise des SWI/SNF-Komplexes: Zunächst bindet der SWI/SNF-Komplex an die Zielstruktur, es folgt die Lösung der DNA von den Histonen, hierdurch formt die DNA eine Schleife und wird zugänglich für Transkriptionsfaktoren, abschließend erfolgt die Reposition der DNA. (Wilson & Roberts, 2011)

Die weiteren bekannten Untereinheiten des SWI/SNF Komplexes sind teils in beiden Komplexen, dem BAF und dem PBAF, repräsentiert oder jeweils für einen der beiden Komplexe spezifisch. Zu nennen sind u.a. BAF250A (auch: AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A)) und BAF250B (ARID1B), die ausnahmslos im BAF-Komplex zu finden sind. BAF200 (ARID2) und BAF180 wiederum sind ausschließlich für den PBAF-Komplex bestimmt (Trotter & Archer, 2008; Wilson & Roberts, 2011; Yan et al., 2005).

Der Anteil aller Gene, die durch den SWI/SNF-Komplex reguliert werden, wird auf ca. 6 % geschätzt. Hierbei überwiegt der Anteil an negativ regulierten Genen. Bei Vorliegen von inaktivierenden SWI/SNF-Mutationen konnte nämlich gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der meisten durch den SWI/SNF-Komplex regulierten Genen kommt (Holstege et al., 1998).

Insgesamt wird davon ausgegangen, dass nahezu 20% aller Malignome des Menschen eine Mutation im SWI/SNF-Komplex aufweisen. Damit ist es der häufigste mutierte Chromatin Remodeling Komplex in Malignomen beim Menschen (Kadoch et al., 2013).

1.3.3 BRG1

1.3.3.1 BRG1 als Untereinheit von Komplexen

BRG1 (Brahma related gene 1, Syn.: SMARCA4= SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4) ist eine Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes und auf der Chromosomenregion 19p13.2 lokalisiert. Gemeinsam bilden BRG1 und hBRM (humanes Brahma) die beiden wichtigsten ATPase Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes. Durch unterschiedliche Splicevorgänge sind mehrere Isoformen von BRG1 beim Menschen bekannt (Medina & Sanchez-Cespedes, 2008). Das BRG1 Protein setzt sich aus 1614 Aminosäuren zusammen und hat eine molekulare Masse von 180kD (Medina & Sanchez-Cespedes, 2008) bis 205kDa (Khavari et al., 1993). Evolutionär gesehen ist BRG1 das Homolog zu SWI2, der katalytischen Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes in *Saccharomyces cerevisiae* (Khavari et al., 1993; Phelan et al., 1999; Muchardt & Yaniv, 2001). Das Gen selbst setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen, wobei vier dieser Domänen sehr nahe verwandt zu den Domänen des BRM-Gens sind (Khavari et al., 1993). Trotz einer Sequenzidentität von 74% beider Proteine, BRG1 und hBRM, haben sie dennoch unterschiedliche regulative Effekte hinsichtlich verschiedener Zellprozesse (Trotter & Archer, 2008).

BRG1 ist nicht nur eine bekannte Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes, sondern auch Teil von einigen weiteren Komplexen (Abbildung 9). Zu nennen sind der WINAC Komplex (Williams syndrome transcription factor (WSTF) including nucleosome assembly complex), der NUMAC Komplex (Nucleosomal methylation activation complex), der NCoR-1 Komplex (Nuclear receptor corepressors-1) und der mSin3A/HDAC Komplex (histone deacetylases-3) (Trotter & Archer, 2008).

All diesen BRG1 assoziierten Komplexen ist eine nukleäre Wirkungsweise gemeinsam. Einfluss nehmen sie in unterschiedlicher Weise auf DNA-Replikation, DNA-Reparaturen, die Elongation und die Transkription, welche beispielsweise durch Modifikation von Histon-Methylierung und Histon-Acetylierung durch den NUMAC Komplex und den NCoR-1 Komplex (Abbildung 9) reguliert wird (Trotter & Archer, 2008; Smith-Roe et al., 2015).

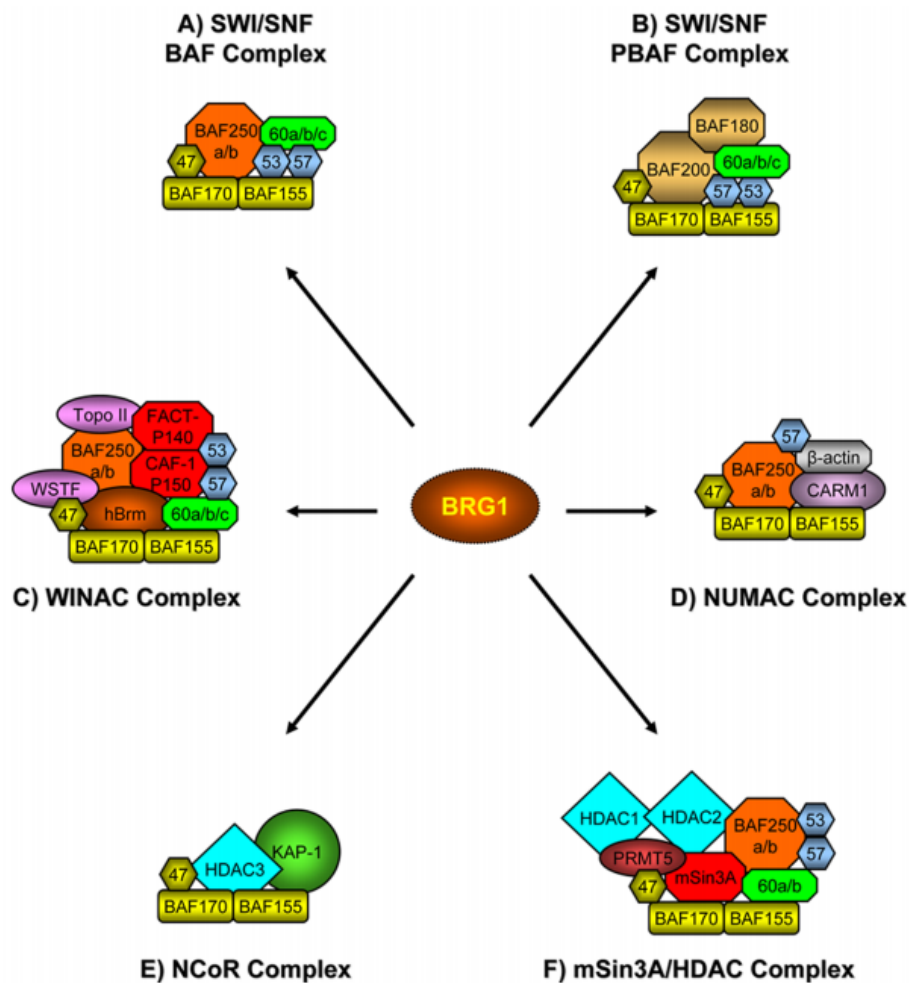


Abbildung 9: Chromatin-modifizierende BRG1-assoziierte Komplexe

BRG1 kann mit verschiedenen Chromatin-modifizierenden Komplexen assoziieren. In den transkriptionsaktivierenden als auch –supprimierenden SWI/SNF-BAF bzw. –PBAF Komplexen ist BRG1 die zentrale katalytische Untereinheit. Weiter ist das Vorkommen von BRG1 in Komplexen mit Transkriptions-Coaktivatoren und Histon-modifizierenden Enzymen wie dem WINAC und NUMAC Komplex beschrieben. BRG1 kann ebenso Bestandteil von Komplexen sein, welche die Transkription unterdrücken, u.a. dem NCoR und mSin3A/HDAC Komplex. (Trotter & Archer, 2008)

1.3.3.2 Interagierende Proteine mit BRG1

Interaktionen von BRG1 mit Proteinen konnten bereits zahlreich nachgewiesen werden. Hierbei zeigt sich ein breites Spektrum an interagierenden Proteinen, die in verschiedensten Zellprozessen eine wichtige Rolle spielen. Abbildung 10 gibt eine Übersicht dieser wieder. Hervorzuheben ist der hierbei sowohl aktivierende als auch repressiv resultierende transkriptionale Effekt auf entsprechende Zielgene vermittelt durch die Interaktion von BRG1 und bestimmten Proteinen (Trotter & Archer, 2008).

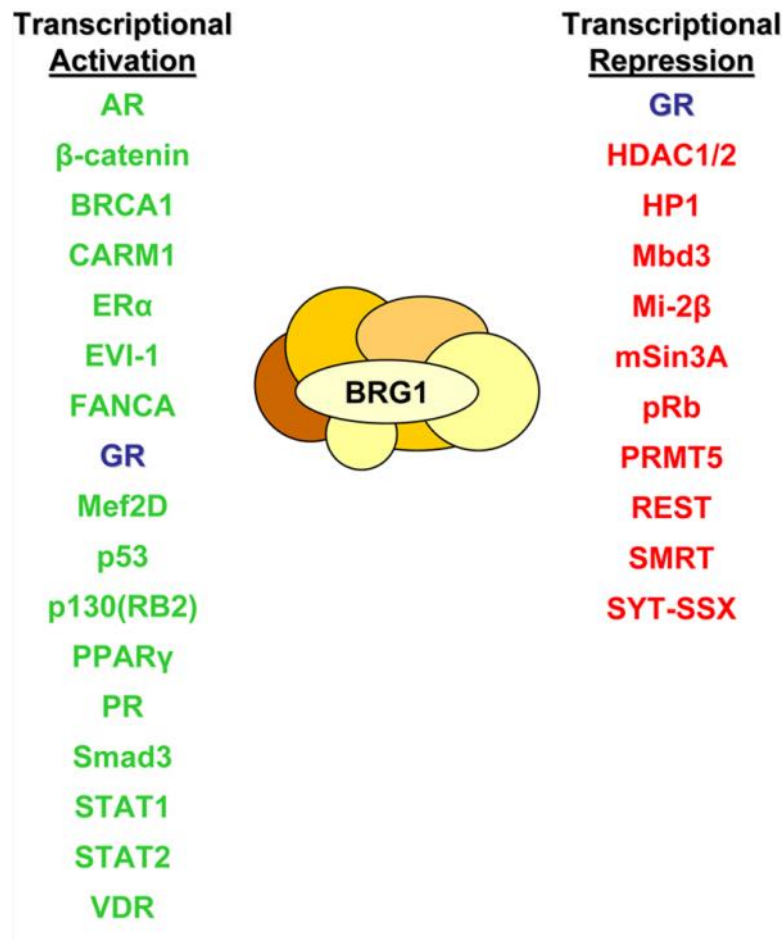


Abbildung 10: Mit BRG1 interagierende Proteine

Mit BRG1 interagierende Proteine, kategorisiert nach dem resultierenden aktivierenden oder repressiven Effekt auf die Transkription jeweiliger Zielgene (Trotter & Archer, 2008)

Interessanterweise konnte ein sowohl aktivierender als auch repressiver resultierender Effekt auf die Transkription durch die Interaktion von BRG1 mit ein und demselben Protein gezeigt werden. Ein solcher Effekt ist u.a. für den Östrogen-Hormonrezeptor nachgewiesen. Diese konträre Verhaltensweise trotz Bindung am gleichen Promotor scheint durch eine unterschiedliche Zusammensetzung verschiedenster Liganden des SWI/SNF-Komplexes hervorgerufen zu werden (Zhang et al., 2007). Ein ähnlicher Effekt von BRG1 ist für den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) gezeigt. Auf der einen Seite führt eine BRG1-assoziierte Interaktion des GR zu einer Aktivierung entsprechender Transkriptionsvorgänge (Fryer & Archer, 1998), während auf der anderen Seite BRG1 für eine Transrepression zwischen dem GR und NFGI-B (nerve growth factor IB) benötigt wird (Bilodeau et al., 2006).

1.3.3.3 BRG1 im Kontext von Zelldifferenzierung, Organentwicklung und Pathologien

Ein konkreter definitiver Effekt von BRG1 ist bereits für einige Malignome (Medina & Sanchez-Céspedes, 2008, näheres Kapitel 1.3.3.5) und die frühe Embryonalentwicklung bzw. embryonale Stammzellen bewiesen. Kommt es in der frühen Embryonalentwicklung zu einem Verlust an BRG1, ist dies mit der weiteren Entwicklung und dem Leben nicht vereinbar (Bultman et al., 2000). Während der Organogenese spielt BRG1 ebenfalls eine zentrale Rolle. Für die Entwicklung des Herzens, v.a. des Myokards und der Herzklappen, konnte hierbei eine wichtige Funktion für BRG1 nachgewiesen werden (Stankunas et al., 2008, Akerberg et al., 2015). Weiter ist bekannt, dass BRG1 die neuronale Entwicklung beeinflusst (Bultman et al., 2000) und ebenso in der Erythropoese (Bultman, Gebuhr & Magnuson, 2005; Griffin, Brennan & Magnuson, 2008) eine bedeutende Rolle einnimmt. Auch für die Entwicklung eines suffizienten Immunsystems ist BRG1 ein zentrales Element. So zeigten Chi et al., 2003 eine wichtige Funktion für BRG1 in der Thymus- und T-Zell-Entwicklung.

In hepatischem Gewebe von Mäusen konnte in Progenitorzellen nachgewiesen werden, dass diese eine erheblich höhere Reprogrammierungseffizienz aufweisen als differenzierte Leberzellen. Eine mögliche Erklärung liegt in der gesteigerten Expression der BAF-Komplex Untereinheiten BRG1 und BAF155 begründet. Durch epigenetische Modulationen während der Reprogrammierungsphase tragen sie wahrscheinlich zum beschriebenen Effekt bei. Ein Knock-down dieser Untereinheiten führte schließlich zum Verlust der effizienteren Reprogrammierung der Progenitorzellen gegenüber den differenzierten Leberzellen. (Kleger et al., 2012)

Darüber hinaus ist ein Zusammenhang von BRG1 mit einigen Pathologien wie beispielsweise der Herzhypertrophie (Mehta et al., 2015) untersucht und gezeigt worden.

1.3.3.4 Signalwege und Interaktionen von BRG1

Der molekulare Signalweg und die speziellen Interaktionen von BRG1 unterliegen derzeit intensiven Forschungen. Auf der einen Seite ist die Funktion von BRG1 als Tumorsuppressor für eine Reihe von Zielstrukturen und Signalwege eruiert worden. Eine wichtige bereits bekannte direkte Beziehung durch Proteininteraktion besteht zwischen BRG1 und dem Retinoblastom Protein pRb (Dunaief et al., 1994). Diese Beziehung führt zu einer Verstärkung der Senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) (Tu et al., 2013), welche wiederum als Korepressor auf die Transkriptionsfaktoren der E2Familie wirken. Aufgrund der fehlenden Aktivierung von Cyclinen und Cyclin dependent Kinasen durch die supprimierte E2F Familie (Trotter & Archer, 2008; Hendricks et al., 2004, Muchardt & Yaniv, 2001) resultiert ein hemmender Einfluss auf die Zellproliferation (Narita et al., 2003). Es gibt aber

auch eine weitere Theorie die keinen direkten Einfluss von BRG1 auf pRb voraussetzt. Vielmehr reguliert BRG1 die p21 Expression über den p21 Promotor in einer positiven Korrelation, welche schließlich in einem weiteren Schritt die pRb Funktion beeinflusst (Kang et al., 2004; Hendricks et al., 2004). Entgegen dieser Daten weist jedoch eine Arbeit von Li et. al., 2013 eine inverse Beziehung von BRG1 zu p21 nach. Eine weitere positive Wechselwirkung ist für den Cyclin dependent kinase Inhibitor 2a (Cdkn2A/ p16) (Kia et al., 2008) bewiesen. Mittels einer Inhibition der für den Zellprogress wichtigen Cycline durch Cdkn2A/p16 wird die Zellproliferation folglich gestoppt. Bekannt ist weiter ein antagonistischer Einfluss von BRG1 auf die Onkogene MYC, nachgewiesen für das Lungenkarzinom, (Romero et al., 2012; Hendricks, Shanahan, & Lees, 2004) und c-fos, wobei der Einfluss auf c-fos über einen pRB abhängigen Signalweg ohne Einbeziehen der E2F-Familie vollzogen wird (Murphy et al., 1999). Eine Assoziation des SWI/SNF-Komplexes und BRG1 mit dem Tumorsuppressorgen BRCA1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Muchardt & Yaniv, 2001).

Auf der anderen Seite zeigten spezifische Untersuchungen in einigen Malignomen, dass BRG1 als Onkogen zum Tragen kommt. In Leukämiezellen ist die BRG1-Expression wichtig für die Progression der Erkrankung. Ein Knock-down von BRG1 führte in Leukämiezellen zu einem Wachstumsstopp (Shi et al., 2013; Cruickshank et al., 2015). Dabei spielt die Beziehung zwischen BRG1 und MYC eine entscheidende Rolle. Durch eine positive Korrelation beider Strukturen ist BRG1 entscheidend an der Expression des Onkogens MYC beteiligt (Shi et al., 2013). Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen zeigen neueste Untersuchungen, dass der onkogene Effekt von BRG1 in Leukämiezellen auf einen noch unbekanntem Effekt zurückzuführen ist und somit nicht auf einer Regulation bzw. Wechselwirkung mit MYC beruht (Cruickshank et al., 2015).

Ein weiterer wachstumsfördernder Effekt von BRG1 konnte durch eine positive Korrelation von BRG1 mit Mitgliedern der Cyclin-Familie eruiert werden. Experimentell nachgewiesen ist dies für CyclinB1, CyclinE1 und CyclinD1 (Lin et al., 2010; Watanabe et al., 2011; Bai et al., 2013; Bai et al., 2012). Dabei scheint insbesondere CyclinD1 eine entscheidende Rolle während der G1-Phase und somit für das Proliferationsverhalten der Zelle zu besitzen (Bai et al., 2012). Eine Interaktion von CyclinE und BRG1 ist auch ohne Vermittlung durch die pRB-Familie gezeigt worden (Shanahan et al., 2013).

Für die Mitglieder der MMP-Familie ist eine Regulation durch BRG1 ebenfalls demonstriert worden. Durch proteolytische Prozesse nehmen die verschiedenen MMP-Familienmitglieder Einfluss auf die extrazelluläre Matrix und korrelieren mit der Invasivität und Angiogenese von Malignomen (Ma et al., 2004). Positiv durch BRG1 regulierte MMP-Familienmitglieder sind MMP7, MMP2, MMP9, MMP10 und MMP14, eine negative Korrelation ist für MMP1 und MMP16 beschrieben. Die positive Wirkung zwischen BRG1 und den meisten MMP-Familienmitgliedern erklärt die Invasivität einiger Malignome, experimentell gezeigt u.a. für MMP2. (Orvis et al., 2014; Bai et al., 2012; Bai, et al., 2013; Ma et al., 2004; Torkamandi et al., 2014; Saladi et al., 2010)

Eine inverse Korrelation besteht zwischen Cdkn1B/p27 und BRG1 (Bai, et al., 2013, Xiong, et al., 2013). Über diesen hemmenden Einfluss von BRG1 auf den Cyclin dependent kinase Inhibitor 1B kommt es korrelierend mit der Wirkung auf die Cyclin-Familie zu einem proliferationsfördernden Eingriff in den Zellzyklus.

Eine weitere positive Korrelation konnte zwischen BRG1 und HMGA2 nachgewiesen werden (Figura et al., 2014). HMGA2 ist Teil der HMGA (High Mobility Group AT-Hook) Familie. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung, Genexpression, Apoptose und der Tumorentstehung. So konnte in neoplastischen Transformationen und Tumoren bereits eine erhöhte Expression an HMGA gezeigt werden (Sgarra et al., 2004). Durch die positive Korrelation zwischen BRG1 und HMGA2 kann BRG1 vermutlich bei einem Expressionsanstieg die Entstehung maligner Neoplasien fördern.

1.3.3.5 Rolle von BRG1 in malignen Tumoren

BRG1 konnte bereits eine Rolle in verschiedenen Malignomen zugeschrieben werden (Wong et al., 2000; Medina et al., 2008; von Figura et al., 2014; Romero et al., 2012; Bai et al., 2012; Karanian-Philippe et al., 2015; Muchardt & Yaniv, 2001). Mutationen oder unterschiedliche Expressionsniveaus von BRG1 wurden dabei für Krebszellen von Leber, Pankreas, Magen, Prostata, Ösophagus, Kolon, Brust, Lunge, Haut, dem Ovar sowie in Leukämie- und Gliomazellen nachgewiesen (Endo et al., 2013; Sentani et al., 2001; Medina & Sanchez-Cespedes, 2008; Wu et al.; Torkamandi et al., 2014; Bai et al., 2012; Karnezis et al., 2015). Das Expressionsniveau von BRG1 und dessen Auswirkung auf das Proliferationsverhalten der Zellen sind in den genannten Malignomen indessen teils konträr. Während zum einen Malignome mit einem Verlust bzw. einer verminderten Expression von BRG1 einhergehen, zu nennen sind das Lungenkarzinom (v.a. NSCLC, non-small cell lung cancer (Medina et al., 2008)), das Mammakarzinom, das Pankreaskarzinom, das Prostatakarzinom (Wong et al., 2000), das Melanom (Becker et al., 2009) und die SW13 Zelllinie des Nebennierenkarzinoms (Dunaief, et al, 1994), sind bestimmte Malignome mit einer erhöhten Expression an BRG1 assoziiert. Berichtet ist diese Expressionssteigerung an BRG1 für das Melanom (Lin et al., 2010), das Ösophaguskarzinom (ESCC) (Torkamandi, et al., 2014), das Prostatakarzinom (Sun et al., 2007), das kolorektale Karzinom (Watanabe et al., 2011), das Magenkarzinom (Sentani et al., 2001), das Mammakarzinom (Wu et al., 2015; Bai et al., 2013), das Gliom (Bai et al., 2012) und das hepatozelluläre Karzinom (Endo et al., 2013). Für Fibroblasten-Zelllinien konnte eine proliferative Wirkung von BRG1 ebenfalls gezeigt werden (Bourgo et al., 2009).

Für Malignome mit einer verminderten bzw. fehlenden BRG1-Expression konnte gezeigt werden, dass eine Reinduktion von BRG1 zu einer Wachstumsverlangsamung als auch zu morphologischen

Veränderung führt (Romero et al., 2012; Hendricks, Shanahan, & Lees, 2004; Wong et al., 2000) und das Gen-Expressionsmuster normaler Zellen wiederhergestellt wird (Dunaief et al., 1994).

Für Malignome mit einer gesteigerten BRG1-Expression sind gegenläufige Experimente ebenso berichtet. In Krebszellen des Glioms als auch von Brustkrebs und dem kolorektalen Karzinom führte ein induzierter Knock-down von BRG1 zu einer Verringerung von Migration und Invasion bzw. einem verminderten Wachstum (Wu et al., 2015; Watanabe et al., 2011; Bai et al., 2012; Bai et al., 2013).

Für bestimmte Malignome bzw. deren Krebszelllinien wie dem Prostatakarzinom (Wong et al., 2000, Sun et al., 2007), dem Mammakarzinom (Wu et al., 2015; Wong et al., 2000) sowie dem Melanom (Becker et al., 2009, Lin, Wong, Martinka, & Li, 2010) ist sowohl eine gesteigerte als auch verminderte BRG1-Expression eruiert worden. Entsprechende artifizielle Gegenregulationen von BRG1 führten teils zu einer verminderten Malignität.

Wann BRG1 seine tumorsuppressive Funktion entfaltet und wann die onkogene Wirkungsweise zum Tragen kommt, ist noch weitestgehend unverstanden. Es scheint, als ob BRG1 kontextabhängig seinen jeweiligen Effekt zeigt.

Für das Pankreaskarzinom konnte ein konträrer Effekt von BRG1 auf die Tumorgenese in unterschiedlichem Kontext eindrücklich gezeigt werden. Während ein Verlust von BRG1 zu einer schnelleren malignen Transformation von duktalem IPMN-Läsionen (intraduktales papilläres muzinöses Neoplasie) führt, vermutlich durch seine regulative Wirkung auf p21 und p16, scheint der Verlust von BRG1 der Entwicklung eines PanIN-PDA (Pankreatische intraepitheliale Neoplasie assoziiertes Pankreas-Adenokarzinom) aus Azinuszellen entgegen zu wirken. Überraschenderweise zeigt die schneller voranschreitende maligne Transformation der IPMN-Läsion jedoch eine bessere Prognose als die PanIN-PDA, wahrscheinlich durch eine Beeinflussung von Zielgenen der Tumorprogression. Diese Ergebnisse verdeutlichen eindrücklich eine kontextabhängige Wirkung bzgl. Zeitpunkt und Differenzierung von BRG1, in der gleichzeitig der tumorsuppressive als auch proliferative Effekt von BRG1 zum Ausdruck kommt. (von Figura et al., 2014; Roy et al., 2015)

1.3.3.6 Rolle von BRG1 im hepatozellulären Karzinom

Für das HCC sind eine Reihe von Risikofaktoren und molekularen Fehlregulationen, die zur malignen Transformation führen, bereits erforscht worden (Kapitel 1.2.2 und 1.2.7).

Ein neu untersuchtes Protein, das im Verdacht steht die Hepatokarzinogenese zu beschleunigen, ist BRG1. In einer Arbeit von Endo et al., 2013 konnten vier somatische Missense-Mutationen von BRG1 eruiert werden (Abbildung 11).

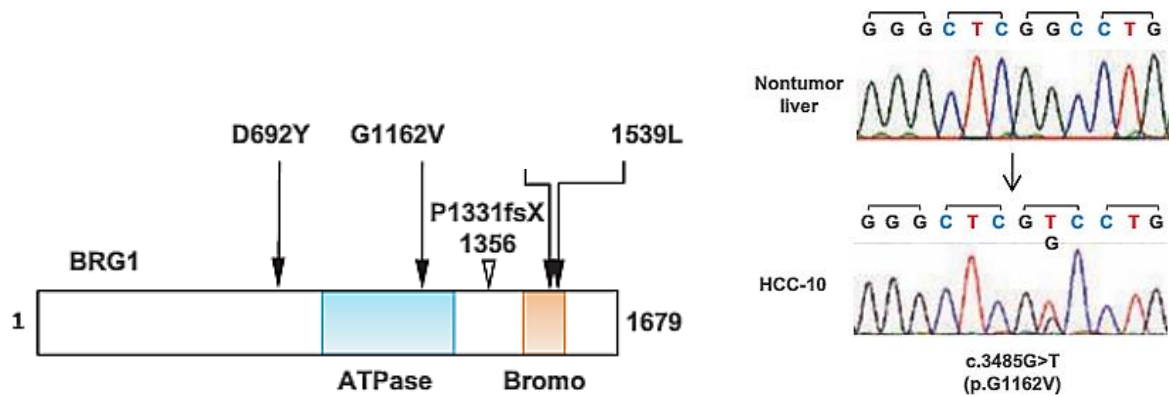


Abbildung 11: Mutationen von BRG1 im hepatozellulären Karzinom

Die schwarzen Pfeile zeigen vier somatische Missense-Mutationen im BRG1-Gen in HCC-Gewebsproben (links). Ausschnitt der DNA-Sequenz des BRG1-Gens in gesundem Lebergewebe und in HCC-Gewebe mit Mutation (rechts). (Endo et al., 2013)

Ein Verlust der DNA-Kopien konnte in ca. einem Viertel der humanen HCC-Proben festgestellt werden. Gleichzeitig fand sich jedoch in ca. zwei Drittel der Proben ein mRNA-Expressionsanstieg von BRG1. Eine signifikante BRG1-Erhöhung auf Proteinebene im HCC-Gewebe verglichen mit dem nicht tumorbefallenen Gewebe gleicher Patienten konnte ebenso gezeigt werden. Die BRG1-Expression in gesundem Lebergewebe, Gewebe mit chronischer Hepatitis oder Zirrhose unterscheidet sich hierbei nicht signifikant. In der Immunhistochemie exprimieren in gesundem Lebergewebe lediglich die Gallengangsepithelien im Kern BRG1, wohingegen Hepatozyten weitgehend negativ für BRG1 sind. Anders verhält es sich im HCC-Gewebe. Hier zeigt die immunhistochemische Untersuchung eine positive Kernfärbung auf BRG1 in den malignen transformierten Hepatozyten. Eine Korrelation der BRG1-Expression mit Geschlecht, Alter, klinischen Parametern oder Langzeitüberleben konnte bisher allerdings nicht festgestellt werden. (Endo et al., 2013)

Insgesamt ist die Datenlage zu BRG1 im HCC noch als gering einzuschätzen.

1.4 Intention und Zielsetzung der Arbeit

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Entwicklung der Mortalität bösartiger Tumore als wichtige Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland ist das Verständnis neuer für die Pathogenese von Malignomen bedeutsamer Zellprozesse und Zellmechanismen die eigentliche Intention dieser Arbeit. Die teils ernüchternden Zahlen der Überlebensrate als auch die steigende Inzidenz des HCCs in den Westlichen Ländern lassen das HCC in seiner Bedeutung als Todesursache stetig wichtiger werden. Um solchen Entwicklungen entgegenzuwirken bzw. neue therapeutische Maßnahmen zu entwickeln, beschäftigt sich die Forschung intensiv mit dem Thema maligner Neoplasien. In der Vergangenheit

konnten bereits viele verschiedene Risikofaktoren, Genmutation und pathologische Signalkaskaden identifiziert werden, die die Grundlage der Pathogenese von Malignomen darlegen. Einer dieser Forschungsschwerpunkte widmet sich seit nicht allzu langer Zeit dem Fachgebiet der Epigenetik, das sich mit einem Mechanismus beschäftigt, der es Zellen ermöglicht die Genexpression übergeordnet zu regulieren (Kapitel 1.3.1.). Ein wichtiges Protein für diesen Prozess ist der SWI/SNF-Komplex mit der katalytischen ATPase Untereinheit BRG1 (Kapitel 1.3.2 und 1.3.3). Aus bereits zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass eine Fehlregulation und Mutation von BRG1 zur Pathogenese eines Malignoms beitragen kann (Kapitel 1.3.3.5 und 1.3.3.6). Diese Arbeit widmet sich genau dieser Fragestellung nach der Rolle von BRG1 in der Hepatokarzinogenese.

Derzeit gibt es hinsichtlich der Rolle von BRG1 während der Hepatokarzinogenese nur sehr wenig Kenntnis. Daher soll zunächst erneut geprüft werden, wie sich die BRG1-Expression im HCC zu nicht tumorbefallenem Gewebe verhält. Dies erfolgt anhand der Analyse von humanen Gewebeproben. Ausgehend davon soll schließlich der Effekt von BRG1 im HCC spezifiziert werden. In erster Linie gilt es zu klären, welche Auswirkungen BRG1 auf die Proliferation und Invasivität hat. Hierzu soll eine artifizielle Suppression von BRG1 in bestimmten Zelllinien mit anschließender prospektiver Analyse des Wachstums und der Invasivität näheren Aufschluss geben. Wie bereits geschildert, hat BRG1 gerade hinsichtlich des Proliferationsverhaltens und der Invasivität eine wichtige Rolle bei einigen Malignomen. Über eine nähere Analyse von Zielgenen, die einer Modulation durch BRG1 unterliegen, sollen mögliche Erklärungsansätze für diese Effekte von BRG1 auf das Zellverhalten entwickelt werden. Hierzu sollen insbesondere Gene, denen bereits ein Zusammenhang zu BRG1 nachgewiesen worden ist oder die bei der Karzinogenese des HCCs eine Rolle spielen, näher untersucht werden. In erster Linie handelt es sich hierbei um Gene, die entweder in den Zellzyklus eingreifen, wie die Cyclin-Familie und solche der Cyclin Dependent Kinase Inhibitoren, oder die Einfluss auf die extrazelluläre Matrix nehmen, wie die Familie der Matrix-Metalloproteasen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

A&D HT-500	A&D Company, Tokio, Japan
Assistent RM5	Assistent, Sondheim v. d. Rhön
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
ComfortNeofrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Heracell 150	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Herasafe	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Heraeus	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Hotplate Stirrer Model-81	A.Hartstein, Würzburg
LightCycler480	Roche, Basel, Schweiz
Microtom Leica RM2255	Leica Biosystems, Wetzlar
Mikroshop Axioskop 40	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Observer.Z1	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	Siemens, München
Mikroskop Leica DME	Leica Biosystems, Wetzlar
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad, München
Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Multiscan Ex	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
NanoDrop2000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Optimax	Protec®, Dorfwiesen
Pipetboy	Integra, Zizers, Schweiz
Standard Power Pack P25	Biometra/Alytik Jena, Göttingen/Jena
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tissuelyser LT	QIAGEN, Hilden
Titramax 100	Heidolph, Schwabach
UP100H	Hielscher, Teltow
Vortex Mixer	Taipei, Taiwan
PCR Gerät	VWR, Darmstadt

2.1.2 Chemikalien

Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
ECL™ Western Blotting Detection Reagenz	GE Healthcare, Freiburg
Ethanol absolut	Otto Fischer, Saarbrücken
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isofluran	CP Pharma, Burgdorf
INTERFERin® siRNA Transfection Reagent	Polyplus-transfection, Illkirch, Frankreich
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako, Hamburg
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Thermo Scientific, Wilmington, USA
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Red Taq® DNA Polymerase	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
RIPA Buffer	Cell Signaling Technology, USA
Roticlears®	Roth Karlsruhe
Rotiphorese® Gel30 30% Acrylamid	Roth, Karlsruhe
LightCycler 480 SYBR® Green I Mix	Roche, Basel, Schweiz
Tris base	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Stain	GIBCO/Thermo Scientific, Wilmington, USA
Trypsin EDTA-Lsg.	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe
VectaMount™ Permanent Mouning Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser DNase, RNase free	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Cellstart® Cell Cultur flask 550mL	Greiner bio one, Frickenhausen
Cellcoat® 6-well plate	Greiner bio one, Frickenhausen
Cell Scraper	Sarstedt, Newton, USA
Cellstar Serological® Pipette 5mL	Greiner bio one, Frickenhausen
Cellstar Serological® Pipette 10mL	Greiner bio one, Frickenhausen
Cellstar Serological® Pipette 25mL	Greiner bio one, Frickenhausen
Cellstar Serological® Pipette 50mL	Greiner bio one, Frickenhausen
Cellstar® Tubes 50 mL	Greiner bio one, Frickenhausen
Cellstar® Tubes 15 mL	Greiner bio one, Frickenhausen
Corning Matrigel Invasion Chambers	Corning, NW, USA
Deckgläser 24x24	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser 24x32	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser 24x40	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm M	Oshkosh, WI, USA
PS-MICROPLATE, 96 WELL	Greiner Bio One, Frickenhausen
Raucotupf	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf
Reaktionsgefäß Eppendorf® 1,5mL	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß Eppendorf® 2mL	Eppendorf, Hamburg
TipOne Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
TC-Schale 100, Standard	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Platte 96 Well, Standard F	Sarstedt, Nümbrecht
Whatmann Protran BA85 membrane	GE Healthcare, Freiburg
96-well PCR microplate	Starlab, Hamburg

Kit Systeme	
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Hilden
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Envision Kit	Dako, Hamburg
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako, Hamburg

Marker	
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.4 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper				
Name	Firma	Verdünnung	Art	Methode
BRG1	Santa Cruz, Kalifornien, USA	1:100	Rabbit	IHC
BRG1	Santa Cruz, Kalifornien, USA	1:2500	Rabbit	Western Blot
Beta-Tubulin	Abcam, Cambridge, UK	1:2000	Rabbit	Western Blot

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper

Sekundäre Antikörper				
Name	Firma	Menge/Verdünnung	Art	Methode
	Promega	1:2000	Anit Rabbit	Western Blot
Dako Envision+ System-HRP Labelled Polymer	Dako, Hamburg	1 Tropfen	Anti Rabbit	IHC

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper

2.1.5 Puffer

10xCitratpuffer:	500mL dest. H ₂ O 21g Citronensäure5M NaOH ad pH 6,0 → 1:10 verdünnt für Anwendung
-------------------------	--

10xTBS:	(1 Liter dest. Wasser)1L dest. H ₂ O (137 mM NaCl)80g NaCl (20 mM Tris Base)24,2g Tris Base (5M HCL ad ph 7.6)5M HCl ad pH 7,6 → 1:10 verdünnt für Anwendung
----------------	--

TBST:	1xTBS + 500µL Tween 20
--------------	------------------------

Running/Transfer Buffer: Stock Solution 10x	1L H ₂ O 30g Tris base 144g Glycin
MLPS Running Buffer:	100 ml 10x Stock Solution 900 ml H ₂ O 10 ml 10%iges SDS
Transfer Buffer:	100 ml 10x Stock Solution 700 ml H ₂ O 200 ml Methanol

RIPA-Buffer Lösung:	500µL 10x RIPA Buffer 4,5mL H ₂ O B/Braun ½ Tablette Proteaseinhibitor ½ Tablette Phosphor Inhibitor
----------------------------	--

2.1.6 Medien und Komponenten für Zellkultur

Dulbecco`s Modified Eagle Medium 4,5% Glucose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dulbecco`s Modified Eagle Medium-low glucose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DMEM: F-12 Medium	ATCC, Manassas, USA
Opti-MEM® I Reduced Serum Media	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fetales Bovine Serum	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Insulin, Transferrin, Selenium (ITS Solution)	ATCC, USA

2.1.7 Oligonukleotid Primer für qRT-PCR

Alle verwendeten Primer wurden bei Metabion bestellt

Zielgene		
Human	<i>Sense (Sequenz: 5'→3')</i>	<i>Antisense (Sequenz: 5'→3')</i>
BRG1	GTGGATGCCGTGATCAAGTA	GAAGACCTCGCTGAGCTGAC
CXCI10	CCACGTGTTGAGATCATTGCT	TGCATCGATTTTGCTCCCCT
CyclinB1	AGGCGAAGATCAACATGGCA	AGCTGTTCTTGGCCTCAGTC
CyclinD1	GAAGTTGCAAAGTCCTGGAGC	ATGGTTTCCACTTCGCAGCA
CyclinE1	CCATCATGCCGAGGGAGC	TAATCCGAGGCTTGCACGTT
HMGA2	CCAAAAGGAGTCACTGAATTGTC	GGACAATTCTCAAGGTGAAA
LKB1	CAACGAAGAGAAGCAGAAAATG	TTTCCTGCATGCCACACA
MMP7	GGAGCTCATGGGGACTCCTA	TCCAGCGTTCATCCTCATCG
cdkn2a	AGGTCATGATGATGGGCAGC	AATCGGGGATGTCTGAGGGA
Cdkn1B	GGCAAGTACGAGTGGCAAGA	CGTGTCTCAGAGTTAGCCG
p21	AGTACCCTCTCAGCTCCAGG	TGTCTGACTCCTTGTCCGC
P53	TGCTCAAGACTGGCGCTAAA	CAGTCTGGCTGCCAATCCA
Pax7	ATGAGCATCTTGGGCAACCC	GGAGAGGCTCACATTTTTGGC
Serpine1	AAGGCACCTCTGAGAACTTCA	CCCAGGACTAGGCAGGTG
Sox9	GTACCCGCACTTGACAAC	TCTCGCTCGTTCAGAAGTC
Maus	<i>Sense (Sequenz: 5'→3')</i>	<i>Antisense (Sequenz: 5'→3')</i>
BRG1	TGGACCAGCATTCTCAAGGT	CCTGAAGATGGGCCACTG
Haushaltsgene:		
Human:	<i>Sense (Sequenz: 5'→3')</i>	<i>Antisense (Sequenz: 5'→3')</i>
HPRT	TTGCTTTCTTGGTCAGGCA	ATCCAACACTTCGTGGGGTC
Maus:	<i>Sense (Sequenz: 5'→3')</i>	<i>Antisense (Sequenz: 5'→3')</i>
Ppib	GGAGCGCAATATGAAGGTGC	CTTATCGTTGGCCACGGAGG

Tabelle 5: Oligonukleotid Primer für qRT-PCR

2.1.8 siRNA

Alle verwendeten siRNAs wurden bei Ambion®/ Thermo Fisher Scientific, USA bestellt.

BRG1 silencerRNA ID	<i>Sense (Sequenz: 5'→3')</i>	<i>Antisense (Sequenz: 5'→3')</i>
Human		
106960	GGUGAUCCACGUGGAGAGUTT	ACUCUCCACGUGGAUCACTT
s13139	GGAAUACCUCAAUAGCAUUTT	AAUGCUAUUGAGGUAAUUCCTG
HSS110005	CCUCCGUGGUGAAGGUGUCUUACAA	UUGUAAGACACCUUCACCACGGAGG
Maus		
s73999	CACCUAACCUCACCAAGAATT	UUCUUGGUGAGGUUAGGUGGG
151770	GCUCAGAUAAUGGCCUACATT	UGUAGGCCAUUAUCUGAGCTC
MSS20195	CCAGCUCCUGAGAAGGUAGAGUAU	AUACUCUACCUUCUCAGGGAGCUGG
Negativkontrolle		
Silencer Cy TM 3 Labeled Negative Control siRNA		

Tabelle 6: Zur Transfektion verwendete siRNAs

Die in den Experimenten verwendeten humanen siRNAs werden in dieser Arbeit wie folgt abgekürzt:

106960 = siRNA A, s13139 = siRNA B, HSS110005 = siRNA C

Computerprogramme	
AxioVicsion Rel 4.8	Zeiss, Oberkochen
LightCycler®480 SW 1.5	Roche, Penzberg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden im Inkubator (Heracell 150) bei 37°Celsius und 5% CO₂ Gehalt kultiviert. Das für die jeweilige Zelllinie verwendete Nährmedium und die weiteren Zusätze sind nachfolgend aufgelistet:

ATCC-Nr, CLS-NR, NIBIOHN-Nr	Zellbezeichnung und Art	Medium	Mediumzusätze
ATCC: HB-8065	HepG2 HCC human	Dulbecco`s Modified Eagle Medium 4,5% Glucose	10% FBS 1%Penicillin/Streptomycin
NIBIOHN: JCRB0403	HuH7 HCC human	Dulbecco`s Modified Eagle Medium 1% Glucose	10% FBS 1%Penicillin/Streptomycin
ATCC: CRL-2254	AML12 Hepatozyten murin	Dulbecco's Modified Eagle medium und Ham's F12 medium (Verhältnis 1:1)	10% FBS 1%Penicillin/Streptomycin Insulin Transferrin Selenium Dexamethason
ATCC: CRL-1830	Hepa1-6 HCC murin	Dulbecco`s Modified Eagle Medium 4,5% Glucose	10% FBS 1%Penicillin/Streptomycin
CLS: 400201	Hep55.1C HCC murin	Dulbecco`s Modified Eagle Medium 4,5% Glucose	10% FBS 1%Penicillin/Streptomycin

Tabelle 7: Zelllinien mit zugehörigem Medium

Bei einer Konfluenz von 90% wurden die verschiedenen Zellreihen passagiert. Hierzu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und für fünf Minuten mit Trypsin inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde anschließend mit frischem Medium gestoppt, die Zellen in entsprechenden Verhältnissen (1:4,1:10, etc.) gesplittet und schließlich mit dem jeweiligen Medium auf Petrischalen/ TC-Schale 100, Standard oder Cellcoat® 6-well Platten neu angesetzt und inkubiert.

2.2.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Für den Nachweis von BRG1 in dem zu untersuchenden Gewebe wurde eine Immunhistochemie durchgeführt. Die verwendeten Materialien stammten aus dem etablierten Envision Kit.

Zunächst wurde das paraffinierte Gewebe mit dem Microtom Leica RM2255 in 2,5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Um die Präparate für die weiteren Schritte empfänglich zu machen, wurden sie drei Mal in Folge mit Roticlear (jeweils drei Minuten) entparaffiniert und mit einer in der Konzentration absteigenden Alkoholreihe (100%-100%-100%-96%-70%-50%, jeweils zwei Minuten) rehydriert. Abschließend wurden die Schnitte in deionisiertem Wasser gespült. Für die Demaskierung der Antigene wurden die Präparate in Citratpuffer in der Mikrowelle für 15min erhitzt und bei RT abgekühlt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS konnte die Peroxidaseaktivität durch ein Bad in 3%iger Wasserstoffperoxid/Methanol-Lsg. in Dunkelheit gehemmt werden. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde eine 0,3%ige Triton X-100/TBS Lösung für 10 min zu den Präparaten gegeben. In einer Nasskammer wurden die Präparate hiernach mit Blockingsolution (Triton X-100/TBS-Lsg. : Ziegen-Serum, Verhältnis 10:1) für 1 Stunde bei RT belassen. Anschließend erfolgte die Zugabe des ersten in Blockingsolution gelösten Antikörpers (BRG1, Santa Cruz), der bei 4° über Nacht in einer Nasskammer inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit TBS konnte der zweite Antikörper (Dako Envision+ System-HRP Labelled Polymer, Anti-Rabbit) für die Dauer von einer Stunde aufgetragen werden. Das Detektieren der Zielstrukturen erfolgte mit DAB (Diaminobenzidin) nach vorherigem erneutem dreimaligem Waschen mit TBS. Die DAB-Reaktion wurde nach einer Minute durch Eintauchen in deionisiertes Wasser gestoppt. Zur Gegenfärbung kam Hämalaun zum Einsatz. Mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (50%-70%-96%-100%-100%-100%, jeweils zwei Minuten) erfolgte schließlich die Dehydratation. Abgeschlossen hat die Immunhistochemie ein weiteres dreimaliges Bad in Roticlear (jeweils 5 Minuten) und die Eindeckelung mit VectaMount™ Permanent Mouning Medium.

2.2.3 Immunreaktiver Score nach Remmele

Für die Bestimmung des Färbegrades eines Schnittes in der Immunhistochemie kam der Immunreaktive Score nach Remmele zum Einsatz. Der Score setzt sich aus der Intensität der Färbung mit der Graduierung von 0-3 und der Prozentzahl der positiv gefärbten Zellen mit der Graduierung 0-4 zusammen.

Immunreaktiver Score nach Remmele	
Intensität der Färbung	Punkte
keine Färbung	0 Punkte
schwache Färbung	1 Punkt
mäßige Färbung	2 Punkte
starke Färbung	3 Punkte
Prozentzahl der positiv gefärbten Zellen	Punkte
0%	0 Punkte
0% bis <10%	1 Punkt
10% bis <50%	2 Punkte
50% bis <80%	3 Punkte
80% bis 100%	4 Punkte

Tabelle 8: Immunreaktiver Score nach Remmele

Die Auszählung der Zellen erfolgte mittels Lichtmikroskop. Dazu wurden pro Schnitt in 5 high power fields/40x jeweils 100 Tumorzellen ausgezählt.

Für den finalen Score werden die ermittelten Punkte aus Intensität und positiv gefärbten Zellen multipliziert, wodurch sich ein Score von 0-12 ergeben kann. Dabei bedeutet ein Score von 12 den höchstmöglichen positiven Färbegrad.

Die so ermittelten Scores konnten zum Vergleich der einzelnen Schnitte untereinander herangezogen werden. Des Weiteren konnte die ermittelte Rangliste der Schnitte mit den aus der qRT-PCR erhaltenen Ergebnissen der jeweiligen Proben in Beziehung gesetzt werden.

2.2.4 Proteinextraktion

Für die Bestimmung der Proteinexpression in den Zellen mittels Western Blot erfolgte zunächst eine Extraktion der Proteine aus den Zellen. Hierzu wurden die Zellen auf einer Cellcoat 6-well Platte angezüchtet. Nach erfolgter 90%iger Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und um die Zellen für die Proteinextraktion zugänglich zu machen mit einer RIPA Buffer Lösung für 10 Minuten auf Eis gestellt. Mit einem Cell Scraper konnten nun die Zellen von der Unterlage gelöst und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5mL gegeben werden. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 4000rpm für 10 Minuten wurde der Überstand abpipettiert und in eine neues Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5mL gegeben. Im Folgenden wurden die Proteine mittels UP100H homogenisiert, anschließend bei 4°C und 13200rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5mL gegeben. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die extrahierten Proteine für die Gelelektrophorese und den anschließenden Western Blot in geeigneter Weise verwenden zu können, muss zuvor eine Messung der Proteinkonzentration stattfinden.

Diese Messung erfolgte mit den Reagenzien und nach dem Protokoll des Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Nach Mischen der Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 wurden hiervon 200µL für jeweils eine Probe auf eine TC-Platte 96 Well, Standard F pipettiert. Hiernach folgte die Zugabe von 5µL Proteinextrakt mit nachfolgender 25 minütiger Inkubation bei 37°C. Die Proteinkonzentration konnte nun mit dem Multiscan Ex bestimmt werden. Nach Berechnung der entsprechend benötigten Mengen an Proteinextrakt und Wasser folgte die Zugabe der Reagenzien NuPAGE® LDS Sample Buffer und NuPAGE® Sample Reducing Agent für ein finales Volumen von insgesamt 40µL mit 26µg Proteinextrakt. Nach zweimaliger Zentrifugation mit zwischenzeitlicher Inkubation bei 70°C für 10 Minuten waren die Proben bereitgestellt für die SDS PAGE.

2.2.6 SDS PAGE

Die Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach standardisierten Protokollen durchgeführt. Die benötigten Sammel- und Trenngele setzten sich wie folgt zusammen:

Sammelgel 6%	2,7 H2O 1,0mL Acrylamid 30% 1,3mL Tris-HCl 1,5M pH8.8 50µL SDS 10% 25µL APS 7,5µL Temed
---------------------	--

Trenngel 4%	1,5mL H2O 375µL Acrylamid 30% 0,65mL Tris-HCl 1,5M pH8.8 25µL SDS 10% 12,5µL APS 5µL Temed
--------------------	---

Zunächst erfolgte das Gießen des Trenngels. Um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erhalten, wurde die Oberkante während des Aushärtens mit Isopropanol bedeckt, welches vor Auftragen des Sammelgels wieder entfernt wurde.

Nach Aushärten der Gele und dem Transfer in das Mini Protean Tetra System wurden die Taschen mit 15 µL je Probe befüllt und eine Spannung von 80 Volt für 1,5 Stunde angelegt.

2.2.7 Western Blot

Mithilfe des Western Blot werden die verschiedenen Proteinbanden nach deren Auftrennung in der Gelelektrophorese visualisiert.

Zunächst wurden die aufgetrennten Proteine unter einer Spannung von 250mA in der sogenannten Semi-Dry-Methode auf eine Whatmann Protran BA85 membrane überführt. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde auf dem AssistentRM5 in einem Cellstar® Tubes 50 mL mit 5% Milchpufferlösung behandelt.

Milchpuffer	1g Milchpuffer 20mL TSBT
--------------------	-----------------------------

Hiernach folgte die Antikörperbindung. Dazu wurde die Membran in einer AK-Milchpulverlösung (1:2500 für BRG1 bzw. 1:2000 für beta-Tubulin) in einem Cellstar® Tubes 50mL über Nacht bei 4°C auf einem AssistentRM5 behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 10 Minuten folgte die Bindung des Zweitantikörpers (Anti-Rabbit). Hierzu wurde die Membran für eine Stunde zusammen mit dem Zweitantikörper, gelöst in 5% Milchpulver, in einem Cellstar® Tubes 50 mL auf dem AssistentRM5 platziert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 10 Minuten wurde das ECL™ Western Blotting Detection Reagenz als Detektionslösung aufgetragen. In der Dunkelkammer erfolgte schließlich die Visualisierung auf einem Amersham Hyperfilm ECL, High Performance Chemiluminescentce Film.

2.2.8 RNA Isolierung aus kultivierten Zellen

Die Isolierung der RNA aus allen hier verwendeten Zellreihen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit. Die Vorgehensweise richtete sich stets nach dem im Kit beigefügten Protokoll.

Zunächst wurden die Zellen auf einer Cellcoat® 6-well Platte angezüchtet. Bei einer Konfluenz ab 50% konnte die RNA Extraktion erfolgen.

Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte eine zweiminütige Einwirkzeit mit 350µL 2-beta-Mercaptoethanol/ Buffer PTL-Lösung pro Well:

2-beta-Mercaptoethanol/ Buffer PTL-Lösung	3,5µL 2-beta-Mercaptoethanol 350µL Buffer PTL
--	--

Mit einem Scratcher wurden die Zellreste und Inhalte gesammelt und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Hiernach folgte die Zugabe von 350µL 70%igem Ethanol mit sorgfältigem Mixen. Anschließend folgte der Transfer auf eine RNeasySpinSäule. Bei RT und 8200rpm wurde die Säule für 30 sec zentrifugiert und mit dem in der Säule zurückgebliebenen Extrakt fortgefahren. Den weiteren Behandlungen mit Buffer RW1 und Buffer RPE schloss sich ebenso eine bereits erwähnte Zentrifugation an. Der zweiten Behandlung mit Buffer RPE folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, diesmal jedoch für zwei Minuten. Als letztes schloss sich das Lösen der RNA aus der Membran mit RNase-free water und letztmaliger Zentrifugation für eine Minute an. Mithilfe des NanoDrop2000 erfolgte die Auswertung und Bestimmung der RNA und deren Qualität. Mit den Ergebnissen konnten schließlich aus den verschiedenen Proben Ansätze mit dem gleichen RNA-Gehalt hergestellt und für die weitere Verarbeitung verwendet werden.

2.2.9 RNA Isolierung aus humanem Gewebe

Die Isolierung der RNA aus humanem Gewebe wurde mit dem RNeasy Mini Kit durchgeführt. Zunächst wurde das Gewebe mit Stickstoff schockgefroren, um eine Degeneration von Gewebe und RNA zu verhindern. Anschließen wurde ein ca. 25 mg schweres Gewebestück mit dem Skalpell abgetrennt und in ein auf Eis gelagertes 2ml Eppendorfgefäß, das mit einer Metallkugel befüllt war, gegeben. Hiernach folgte die Zugabe von 600µL PTL Buffer/1% Mercaptoethanol-Lsg. und die Behandlung mit dem TissueLyser LT für 5 Minuten. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei maximaler Umdrehung mit 13200rpm wurden 400µL des Überstandes mit 400µL 70%igem Ethanol gut gemischt und 700µL dieser Lösung auf eine RNeasySpinSäule gegeben. Die weiteren Schritte richteten sich exakt nach dem Protokoll der RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen.

2.2.10 cDNA Synthese

Für den Einsatz der qRT-PCR muss zunächst die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu diente das QuantiTect Reverse Transcription Kit. Die einzelnen Schritte richteten sich nach dem beigefügten Protokoll.

Für die Genomic DNA Elimination wurde nachstehender Ansatz für zwei Minuten bei 42°C inkubiert:

Genomic DNA Elimination	2µL gDNA Wipeout Buffer 1µg Template RNA auffüllen mit Nuclease Free Water bis 12µL
--------------------------------	---

Während der Inkubation wurde der Reverse Transcription Master Mix angesetzt:

Reverse Transcription Master Mix	1µL Quantiscript Reverse Transcriptase 5µL Quantiscript RT Buffer 1µL RT Primer Mix
---	---

Dieser Master Mix wurde anschließend zur bereits inkubierten Genomic DNA Eliminations Komponente gegeben und für weitere 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Hierauf folgte eine Inkubationsphase für drei Minuten bei 95°C mit darauffolgendem Temperaturabfall auf 4°C. Die Lagerung der neu synthetisierten cDNA fand bei -20°C statt.

2.2.11 qRT-PCR

Die Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine Methode, um die Menge von cDNA quantitativ zu bestimmen. Über die cDNA-Bestimmung kann wiederum auf die Expression an mRNA rückgeschlossen werden und somit das Expressionsniveau bestimmter Gene evaluiert werden.

Ansatz	10µL LightCycler 480 SYBR®Green I Mix 1µL Primer forward 1µL Primer reverse 6µL ddH2O
---------------	--

Dieser Reaktionsansatz wurde nach sorgfältigem Mischen und nach vorgefertigtem Schema auf eine 96-well PCR microplate pipettiert. Nun folgte die Zugabe von 2µL cDNA. Nach kurzer Zentrifugation mit dem Multifuge 3SR+ konnte die qRT-PCR im LightCycler 480 gestartet werden. Das Programm enthielt für alle verwendeten Primerpaare folgende Zyklen:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung	55°C	2min	
Denaturierung	94°C	10min	
Denaturierung	94°C	15sec	45
Kühlung	55°C	15sec	
Elongation	72°C	15sec	
Elongation	72°C	10min	
Schmelzkurve	95 °C	1sec	
	65°C	20sec	
Konservierung	4°C	∞	

Tabelle 9: Programm und Zyklen der qRT-PCR

Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Programm LightCycler®480 SW 1.5.

2.2.12 Transfektion

Mithilfe von siRNA kann die Expression von Genen über eine RNA-Interferenz supprimiert werden. Dabei bindet die verwendete siRNA spezifisch an die jeweilige mRNA und verhindert deren Translation, womit die Proteinexpression abnimmt.

Für den Transfektionsvorgang wurde folgender Ansatz hergestellt:

Ansatz	200µL Opti-MEM® I Reduced Serum Media 10µL Interferin 1µL(20 pmole)siRNA
---------------	--

Nach effizientem Vermengen mittels Vortex Mixer, anschließender Zentrifugation und zehnminütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz auf eine Cellcoat® 6-well Platte, die zuvor mit der gewünschten Zelllinie kultiviert wurde, gegeben. Hierbei lag die Konfluenz der Zellen zwischen 30% und 50%. Nach

24 Stunden konnte der Erfolg der Transfektion durch eine Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Hierfür wurde als Kontrolle eine fluoreszierende siRNA (Silencer CyTM3 Labeled Negative Control siRNA) verwendet. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation (40 Stunden nach Transfektion) folgte die RNA-Extraktion. Der Zeitpunkt für die Proteinextraktion wurde für 70 Stunden nach Transfektion gewählt. Mittels Western Blot und qRT-PCR konnte der Erfolg der Suppression des jeweiligen Proteins verifiziert bzw. falsifiziert werden.

2.2.13 Erstellen einer Wachstumskurve

2.2.13.1 Neubauer Zählkammer

Für eine verlässliche Angabe der Zellzahl im Rahmen der Erstellung von Wachstumskurven wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Dazu erfolgte ein bereits beschriebener Passagievorgang der Zellreihe bis einschließlich zum Stopp der Trypsinreaktion durch Medium. Hiernach schloss sich das sorgfältige Durchmischen von 10µL Trypanblau mit 10µL Suspension, bestehend aus Zellen, Medium und Trypsin, auf einer PS-MICROPLATE, 96 WELL an. Nachfolgend wurde die mit einem Deckglas 24x24mm geschlossene Neubauer Zählkammer mit 10µL der genannten Suspension befüllt. Zur Ermittlung der Zellzahl pro mL wurden alle vier Quadranten ausgezählt und mit der Formel

$$(1.\text{Quadrant} + 2.\text{Quadrant} + 3.\text{Quadrant} + 4.\text{Quadrant}):4*10000*2$$

die entsprechende Zellzahl ermittelt.

2.2.13.2 Wachstumskurven

Um suffiziente Daten für eine Wachstumskurve zu erhalten, ist das Verfahren der Neubauer Zählkammer zur Anwendung gekommen. Die entsprechenden Zellzahlen pro mL wurden anschließend auf das Volumen, das sich im entsprechenden Kultiviergefäß (Petrischale/ 6-well Platte) befand, umgerechnet.

Aus diesem Wert konnte beim Beginn einer Wachstumskurve die Menge in µL berechnet werden, die für eine bestimmte Zellzahl zum Zeitpunkt Null wichtig ist. Des Weiteren konnte mit der ermittelten Zellzahl und der bereits bekannten Angabe der angesetzten Zellzahl auf die Verdopplungszahl zu bestimmten Zeitpunkten rückgeschlossen werden. Ebenso konnte aus der ermittelten Zellmenge das Volumen einer bestimmten Zellzahl errechnet werden, welches für das erneute Ansetzen und Kultivieren einer festgelegten Zellzahl für den Fortlauf der Wachstumskurve von großer Bedeutung war.

2.2.14 Untersuchung der Invasivität

Der Invasion Assay bietet die Möglichkeit die Invasivität von Zellen zu vergleichen. Hierbei wird die Zahl an Zellen ermittelt, die in einem terminierten Zeitraum durch eine mit einer Matrix belegte Membran wandern.

Zunächst wurden die Zellen transfiziert. Dies erfolgte mittels des bereits beschriebenen Protokolls der Transfektion. 24 Stunden danach konnten die Zellen für den Invasion Assay verwendet werden. Die Durchführung des Invasion Assays begann mit einer 30 minütigen Aufwärmphase der Corning Matrigel Invasion Chambers 24-Well Plate 8.0 Micron bei Raumtemperatur. Hiernach folgte eine zweistündige Inkubation bei 37° Celsius, wobei die genutzten Wells mit 600µL bzw. die Kammern mit 500µL serumfreien Medium der entsprechenden Zelllinien befüllt wurden. Während der Inkubationszeit konnten die transfizierten Zellen ausgezählt werden. Nach Beendigung der zweistündigen Inkubationszeit wurde das serumfreie Medium aus den Wells und Kammern entnommen. Anschließend wurden die Kammern mit 500µL 1%igem Medium im Falle der HuH7 Zelllinie bzw. mit 500µL serumfreien Medium im Falle der HepG2 Zelllinie befüllt. In die Wells erfolgte die Gabe von jeweils 600µL 20%igem Medium. Hiernach wurden die Kammern mit 35000 Zellen der Huh7 Zelllinie bzw. mit 40000 Zellen der HepG2 Zelllinie beimpft und für 44 Stunden bei 37° Celsius inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneut abgesaugt und die Zellen auf der oberen Seite der Membran mittels Wattetupfer entfernt. Nach einem zweiminütigen Bad der Membran in Methanol folgte die Färbung mit Kristallviolett für 20 Minuten. Anschließend wurde die Membran mittels Skalpell aus der Kammer gelöst und für weitere 20 Minuten bei 37° Celsius getrocknet. Nach dem Eindeckeln mit VectaMount konnte die Auswertung erfolgen. Hierzu wurden die Zellen unter dem Mikroskop in fünf Gesichtsfeldern pro Membran mit 20facher Vergrößerung ausgezählt.

2.2.15 Statistische Auswertung

Die dargestellten Daten dieser Arbeit zeigen den Mittelwert ($n \geq 3$) mit der Standardabweichung. Der Student T-Test wurde zum Ermitteln des Signifikanzniveaus genutzt. Hierdurch konnte bei statistischer Signifikanz die Nullhypothese falsifiziert bzw. die Alternativhypothese verifiziert werden.

Für die Angabe des Signifikanzniveaus wurde die internationale Standardnorm angewandt:

p-Wert	Kennzeichnung	Signifikanz
$p < 0,05$	*	signifikant
$p < 0,01$	**	sehr signifikant
$p < 0,001$	***	hoch signifikant

Tabelle 10: Angaben zur statistischen Signifikanz

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von BRG1 in der Hepatokarzinogenese genauer zu untersuchen. Hierzu diente folgender Ansatz als Leitstruktur:

1. Eruiieren der BRG1-Expression im HCC und tumorfreien Lebergewebe
2. Explorieren des Effekts einer möglichen BRG1-Überexpression im HCC auf die Zellproliferation
3. Explorieren des Effekts einer möglichen BRG1-Überexpression im HCC auf die Invasivität von Zellen
4. Untersuchung spezieller durch BRG1 regulierter Zielgene für eine Erklärung des möglichen Effekts von BRG1 auf die Zellproliferation und Invasivität

3.1 BRG1-Expression im hepatozellulären Karzinom

3.1.1 mRNA-Expressionsanalyse an humanem Gewebe

Die wichtigste Frage, die es zunächst zu untersuchen und verifizieren galt, lautete:

Ist die BRG1-Expression im HCC-Gewebe gegenüber dem nicht tumorbefallenen Lebergewebe gesteigert?

Erste Daten lieferte die Arbeit von Endo et al., 2013 in der eine erhöhte BRG1-Expression im HCC-Gewebe verglichen mit dem nicht tumorbefallenen Lebergewebe gleicher Patienten in 67% der Fälle gezeigt werden konnte. Neben der Reproduktion dieses Ergebnisses, einer erhöhten BRG1-Expression im HCC-Gewebe, sollte als erstes wichtiges Ziel dieser Arbeit die Analyse des Lebergewebes spezifiziert und ausgeweitet werden, indem auch Lebergewebe von Patienten auf die BRG1-Expression untersucht wurde, die nicht an einem HCC erkrankt sind. Insgesamt konnten 36 Patientenproben analysiert werden, die sich wie folgt zusammensetzten:

Anzahl der Proben	Gewebe
n=13	HCC-Gewebe
n=10	tumorfreie Lebergewebsproben von HCC-Patienten (ausschließlich Proben von Patienten, deren HCC-Gewebsproben in der Analyse der HCC-Gruppe berücksichtigt wurden), überwiegend fibrotisches und zirrhotisches Gewebe
n=13	tumorfreie Lebergewebsproben von Patienten, die nicht an einem HCC erkrankten (Patienten litten an einer Lebermetastase eines extrahepatischen Primärtumors v.a. kolorektales Karzinom), überwiegend normales Leberparenchym, einzelne Proben mit Steatosis hepatis

Tabelle 11: Erläuterung der humanen Gewebeproben zur Ermittlung der BRG1-Expression

Die Proben stammten durchgehend von Patienten, die im Rahmen ihres Tumorleidens chirurgisch versorgt wurden. Im Anschluss an die Operation wurden die Gewebeproben bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der BRG1-Expression der Proben erfolgte mittels quantitativer Analyse des mRNA-Levels. Zunächst wurde hierzu die RNA aus dem jeweiligen Gewebe extrahiert, die anschließende cDNA synthetisiert und schließlich eine qRT-PCR durchgeführt. Zur Ergebnisermittlung wurde die BRG1-Expression im tumorfreien Lebergewebe von Patienten, die eine Lebermetastase im Rahmen eines extrahepatischen Primärtumors entwickelt haben, gleich 100% (=1) gesetzt.

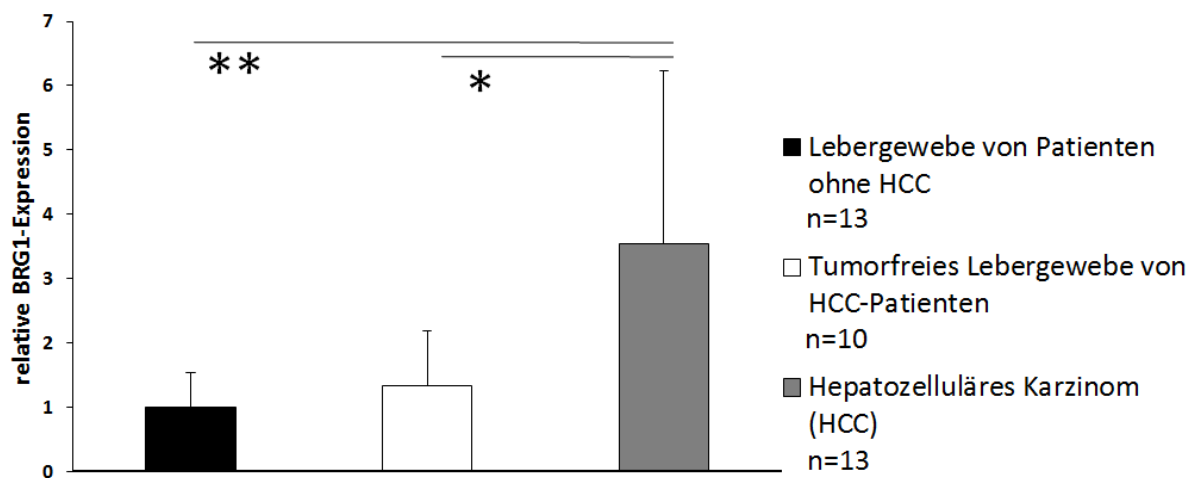


Abbildung 12: BRG1-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR im HCC humaner Proben

Die Grafik zeigt die Expression von BRG1 in Patientenproben. Vergleich des HCC-Gewebes zu tumorfreiem Lebergewebe von HCC-Patienten und zu Lebergewebe von Patienten, die nicht an einem HCC erkrankt sind. Es liegt eine sehr signifikante bzw. signifikante Überexpression von BRG1 im HCC-Gewebe gegenüber dem tumorfreien Lebergewebe von Patienten ohne HCC bzw. dem tumorfreien Lebergewebe von HCC-Patienten vor.

Das Ergebnis (Abbildung 12) bestätigt eine signifikant ($p=0,032$) erhöhte BRG1-Expression im HCC-Gewebe verglichen mit nicht tumorbefallenem Lebergewebe der gleichen Patienten. Weitergehend konnte erstmals eine sehr signifikante ($p=0,004$) Erhöhung der BRG1-Expression zwischen dem HCC-Gewebe und dem nicht tumorbefallenen, überwiegend gesunden Lebergewebe von Patienten, die an einem extrahepatischen Primärtumor mit Lebermetastase erkrankt sind, gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen mit nicht tumorbefallenen Lebergewebsproben konnte nicht festgestellt werden ($p=0,36$). Ebenso zeigten zirrhotisches, fibrotisches als auch verfettetes und gesundes Lebergewebe keine signifikanten BRG1-Expressionsunterschiede.

3.1.2 Expressionsanalyse an humanem Gewebe mittels Immunhistochemie

Eine weitere Analyse der BRG1-Expression im HCC-Gewebe erfolgte auf Proteinebene mittels einer Immunhistochemie (IHC). Hierdurch sollte zum einen geklärt werden, welche Zellen im einzelnen BRG1 exprimieren und wie stark die jeweilige BRG1-Expression ausgeprägt ist. In diesem Punkt bietet erneut die Arbeit von Endo et al., 2013 erste Ergebnisse. In jener Arbeit wurde nachgewiesen, dass BRG1 in normalem Lebergewebe in den Epithelien der Gallengänge exprimiert wird, nicht jedoch in den Hepatozyten und auch nicht in Gewebe mit chronischer Hepatitis oder Zirrhose. Im HCC-Gewebe hingegen konnte eine BRG1-Expression in den maligne transformierten Hepatozyten in 35% der Fälle nachgewiesen werden. Als positiv wurden Proben gewertet, die in mehr als 10% der maligne transformierten Hepatozyten eine BRG1 Färbung gezeigt haben. BRG1 ist dabei nukleär exprimiert. (Endo et al., 2013)

In dieser Arbeit konnten 11 der 13 HCC-Gewebsproben, die für die qRT-PCR-Analyse herangezogen wurden, zur IHC verwendet werden. Für die zwei nicht berücksichtigten HCC-Gewebsproben lagen keine verwertbaren Gewebeschnitte für eine IHC vor.

Die Ergebnisse der IHC dieser Arbeit zeigten weitestgehend keine BRG1-Kernfärbung in den Hepatozyten von gesundem Leberparenchym und zirrhotischem Lebergewebe. Dem gegenüber konnte für die Epithelien der Gallengänge als auch für das HCC-Gewebe eine positive BRG1-Kernfärbung eruiert werden (Abbildung 13). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Arbeit von Endo et al., 2013.

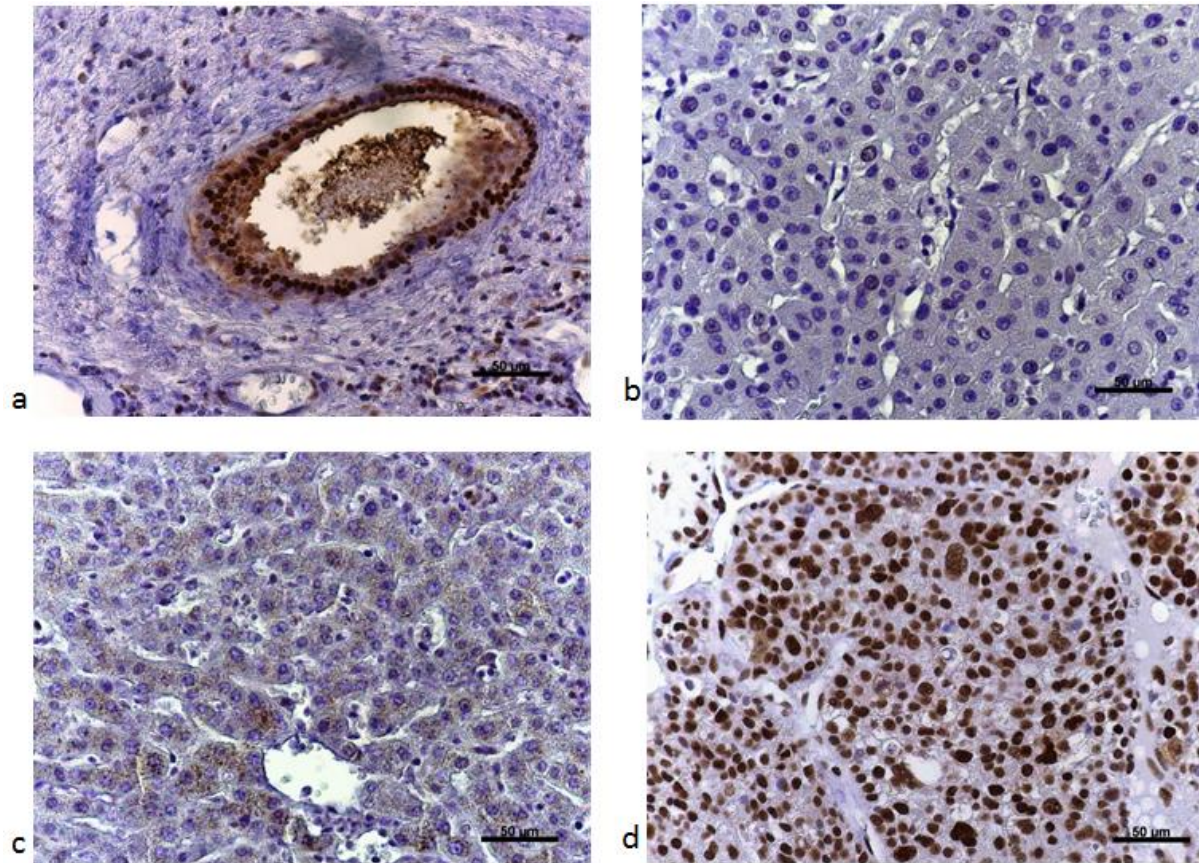


Abbildung 13: Immunhistochemische Untersuchung humaner Proben auf die BRG1-Expression

a Gallengangsepithel **b** Hepatozyten aus gesundem Leberparenchym **c** zirrhotisches Lebergewebe (IHC mit Background) **d** HCC. Die Gallengangsepithelien (**a**) als auch die maligne transformierten Hepatozyten des HCCs (**d**) zeigen eine positive BRG1-Färbung. Gesunde Hepatozyten (**b**) als auch Hepatozyten in zirrhotischem Gewebe (**c**) sind hinsichtlich einer BRG1-Färbung negativ.

Die immunhistochemisch untersuchten Gewebeschnitte wurden von einem spezialisierten Pathologen validiert.

Um die Expression von BRG1 im HCC-Gewebe genauer zu evaluieren, musste zunächst festgelegt werden, unter welchen Rahmenbedingungen eine Probe BRG1 positiv ist. Als Grenze hierfür wurde, wie in der Arbeit von Endo et al., 2013, eine BRG1-Kernfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen als Kriterium gewählt. Auf Grundlage dieses Kriteriums fand sich in der durchgeführten Analyse eine BRG1-Expression in 91% (10 von 11 Proben) der untersuchten HCC-Gewebsproben (Abbildung 14). Dies ist eine deutliche Steigerung im Vergleich zu den Ergebnissen der Arbeit von Endo et al., 2013, in welcher lediglich 35% der HCC-Proben BRG1 positiv waren.

Als nächstes sollte das Ausmaß der BRG1-Expression in den einzelnen HCC-Gewebsproben ermittelt werden. Hierzu wurde der Immunreaktive Score nach Remmele (Remmele & Stegner, 1987), welcher die Intensität und den prozentualen Anteil gefärbter Zellen betrachtet (Abbildung 14), herangezogen. Basierend auf diesem Score gab es erhebliche Unterschiede der BRG1-Expression innerhalb der positiven HCC-Proben (Tabelle 12). Dies war sowohl auf eine unterschiedlich starke Intensität der Färbung als auch auf deutliche Differenzen in der Anzahl gefärbter Zellen zurückzuführen.

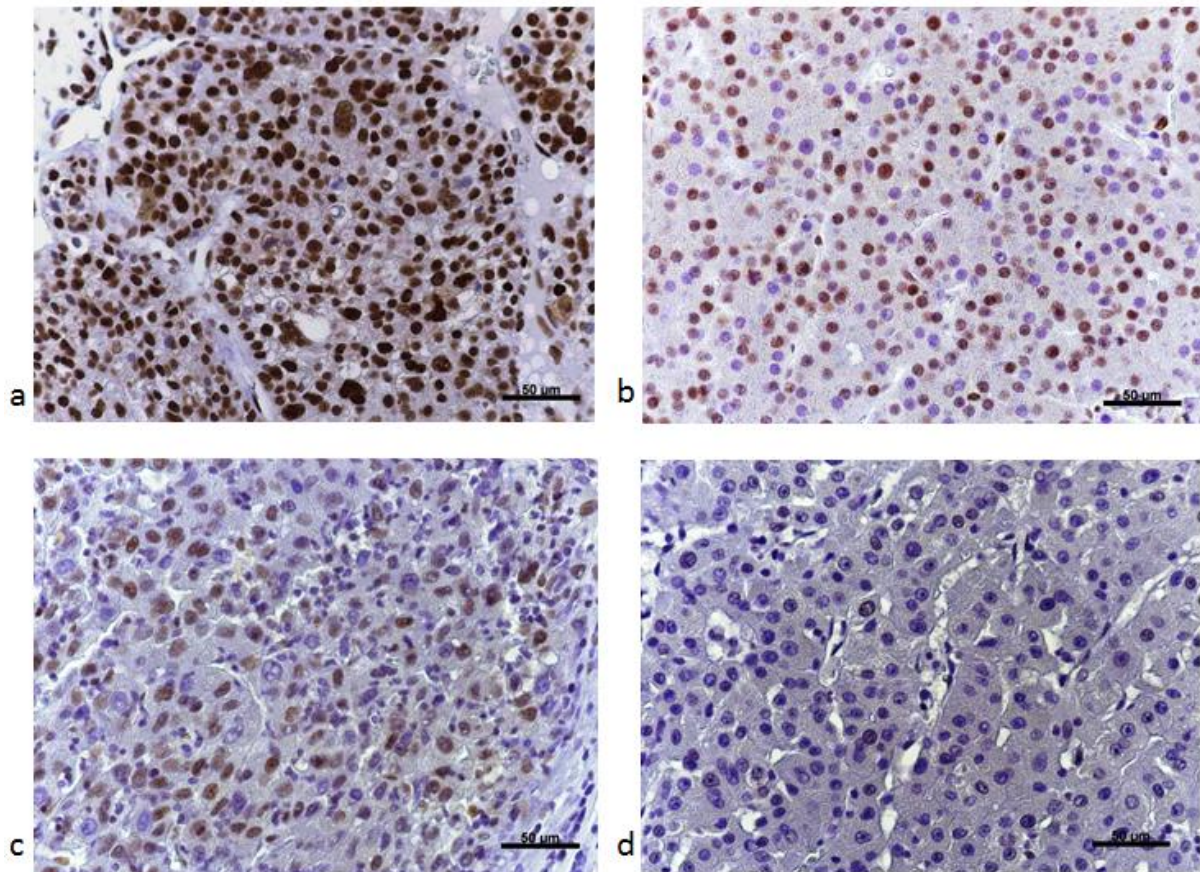


Abbildung 14: Differenzierung der IHC von HCC-Patientengewebe

BRG1 Färbung: **a** HCC-Gewebe mit starker Färbintensität und hoher positiver Zellzahl **b** HCC-Gewebe mit mittlerer Färbintensität und mittlerer positiver Zellzahl **c** HCC-Gewebe mit geringer Färbintensität und geringer positiver Zellzahl **d** Hepatozyten aus gesundem Leberparenchym ohne Anfärbung in der IHC

Anzahl der HCC-Proben	Score nach Remmele
2	12
1	9
1	6
2	4
4	2
1	1

Tabelle 12: Evaluation der IHC für die BRG1-Expression mittels Score nach Remmele

Es zeigt sich eine deutliche Divergenz hinsichtlich der BRG1 positiven HCC-Gewebsproben untereinander.

3.2 Manipulation der BRG1-Expression im hepatozellulären Karzinom

Die Nächste Zielsetzung bestand darin, die in bestimmten Zelllinien nachgewiesene BRG1-Expression zu supprimieren, um Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten und die Invasivität der Zellen sowie ausgewählte Zielgene zu untersuchen. Als Ausgang wurden human HCC-Zelllinien (HepG2, HuH7), die BRG1 suffizient exprimieren, gewählt (Abbildung 15)

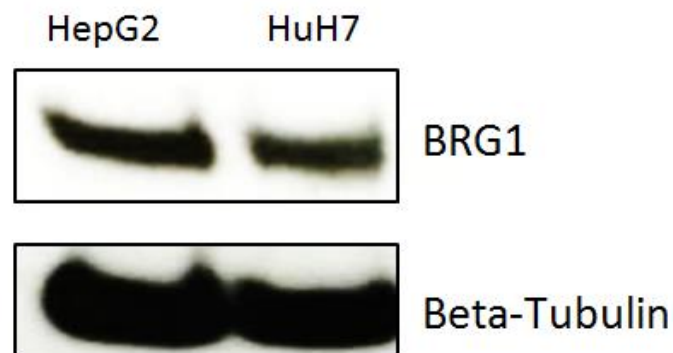


Abbildung 15: BRG1-Expression ermittelt auf Proteinebene

Darstellung der BRG1-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot und Nachweis der BRG1-Expression für die humanen HCC-Zelllinien HepG2 und HuH7, n=3.

Der Knock-down von BRG1 erfolgte mittels siRNA. Hierzu wurden die kultivierten Zellen mit BRG1 spezifischer siRNA transfiziert, wobei drei verschiedene BRG1 spezifische siRNAs (A, B, C) pro Zellreihe angewandt wurden. Um unspezifische Effekte der Transfektion oder der jeweiligen BRG1 spezifischen siRNA zu vermeiden, ist bei den Experimenten stets eine unspezifische siRNA Negativkontrolle als Referenz verwendet worden.

Zunächst galt es zu überprüfen, ob die Transfektion im eigentlichen Sinne, entsprechend die Aufnahme der siRNA in die Zelle, positiv ausfiel. Hierzu diente eine fluoreszierende unspezifische siRNA, die gleichzeitig als Negativkontrolle und damit Referenz der weiteren Experimente angewandt wurde. Nach 24h und einmaligem Waschen der Zellen, um nicht-transfizierte siRNA weitestgehend zu eliminieren, erfolgte eine Überprüfung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Wie in Abbildung 16 zu erkennen, haben ca. 80% der Zellen siRNA aufgenommen. Die siRNA ist spezifisch fast ausschließlich in den zellbedeckten Arealen vorzufinden. Die einzelnen Zellen haben zudem siRNA in ausreichendem Maße für einen erfolgsversprechenden und suffizienten Knock-down aufgenommen. Um einen unspezifischen Fluoreszenzeffekt auszuschließen, wurden Zellen, die einer Transfektion mit

BRG1 spezifischer siRNA unterzogen wurden, als Gegenprobe verwendet. Die Transfektion als solche konnte schließlich positiv bewertet werden.

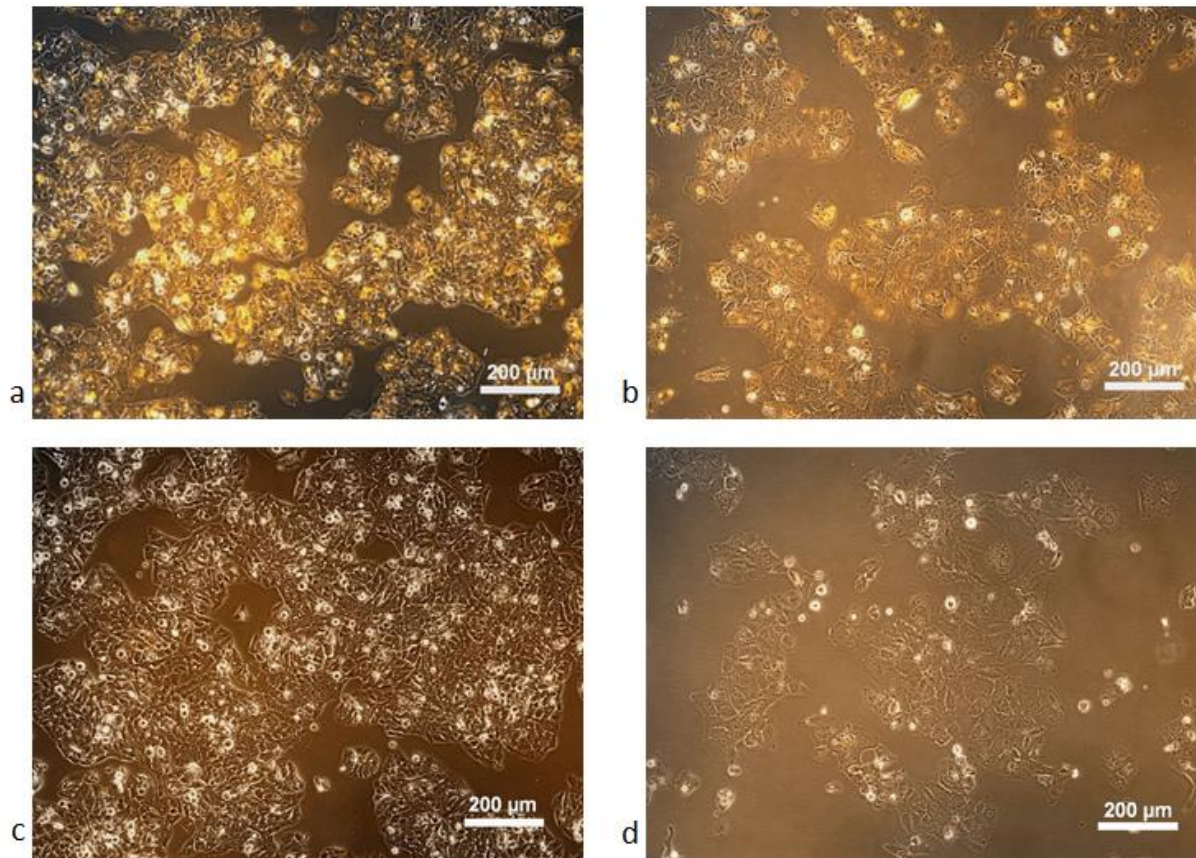


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Transfektion mit siRNA

Die beiden Zelllinien HepG2 und HuH7 wurden für eine Suppression der BRG1-Expression mit BRG1 spezifischer siRNA transfiziert. Um den Erfolg der Transfektion zu eruieren, wurde als Kontrolle eine fluoreszierende siRNA herangezogen. Nach einem Waschvorgang der Zellkultur erfolgte eine Fluoreszenzmikroskopie. In den HepG2 **a** und HuH7 **b** Zellen zeigte sich hiernach ein zellspezifisches Fluoreszenzsignal. HepG2 **c** und HuH7 **d** Zellen, die dem Transfektionsprotokoll unterzogen wurden, jedoch ohne fluoreszierende siRNA sondern mit BRG1 spezifischer siRNA, zeigen kein Fluoreszenzsignal. Das zellspezifische Fluoreszenzsignal, welches nachweislich auf die fluoreszierende siRNA zurückzuführen ist, beweist den Erfolg einer suffizienten Aufnahme von siRNA in die Zelle.

Im nächsten Schritt galt es nun den BRG1 Knock-down zu verifizieren. Dies sollte sowohl auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blot durchgeführt werden.

Für die RNA Extraktion ist der Zeitpunkt 40h nach Transfektion gewählt worden. Die quantitative mRNA-Bestimmung mittels qRT-PCR konnte für diesen Zeitpunkt für die Zellreihe HepG2 eine sehr signifikante BRG1-Suppression für die siRNA A ($p=0,0046$) und siRNA B ($p=0,0013$) bzw. eine hoch signifikante BRG1- Suppression für die siRNA C ($p=0,00016$) nachweisen (Abbildung 17). Für Zellen

der Linie HuH7 ergaben sich für siRNA A ($p=0,0001$), siRNA B ($p=0,000021$) und siRNA C ($p=0,000009$) hoch signifikante BRG1-Suppressionen. Diese Ergebnisse konnten mehrfach repliziert werden.

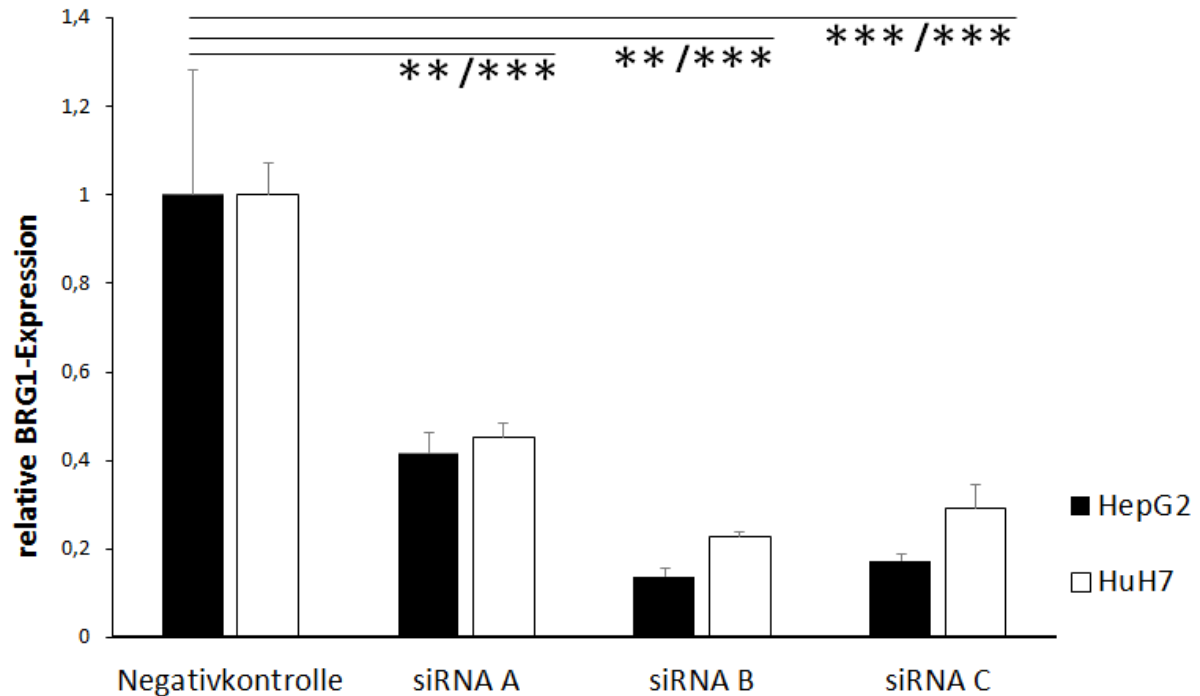


Abbildung 17: BRG1-Expressionsanalyse transfizierter Zelllinien mittels qRT-PCR

Die Analyse der BRG1-Expressionsniveaus in HepG2 und HuH7 Zellen 40 Stunden nach Transfektion mit drei unterschiedlichen BRG1 spezifischen siRNAs (A, B, C) zeigte eine sehr bis hoch signifikante Reduktion der BRG1-Expression. $n=4$ für siRNA B, siRNA C, siRNA Negativkontrolle, $n=3$ für siRNA A

Der Nachweis auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot. Der Zeitpunkt 70h nach Transfektion erwies sich hierbei für den Proteinnachweis am besten geeignet. Wie die Ergebnisse deutlich veranschaulichen, war auch auf Proteinebene ein Knock-down von BRG1 eindeutig zu identifizieren (Abbildung 18). Dies traf, wie schon für den Nachweis mittels qRT-PCR, für alle drei verwendeten siRNAs zu. Passend in das Bild der qRT-PCR-Ergebnisse, konnte auch auf Proteinebene ein noch deutlicherer BRG1-Knock-down für die siRNAs C und insbesondere B eruiert werden, verglichen mit siRNA A (Abbildung 18).

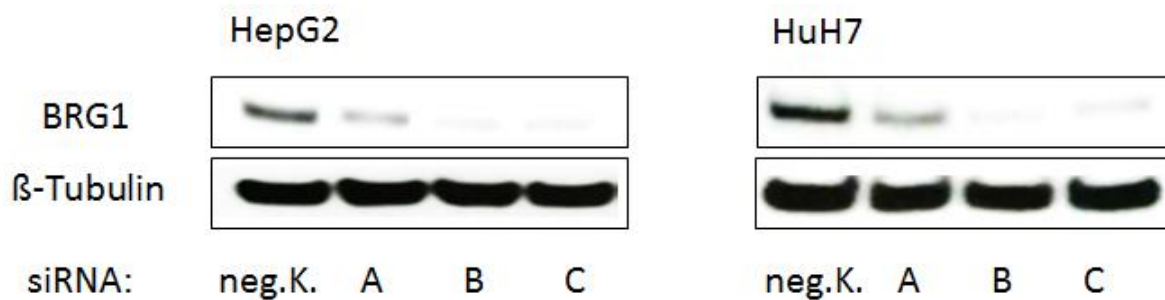


Abbildung 18: BRG1-Expressionsanalyse transfizierter Zelllinien mittels Western Blot

Die Analyse der BRG1-Expressionsniveaus in HepG2 und HuH7 Zellen 70 Stunden nach Transfektion mit drei unterschiedlichen BRG1 spezifischen siRNAs (A, B, C) zeigte eine deutlich Reduktion der BRG1-Expression gegenüber der Negativkontrolle (neg.K.). Als loading control diente β -Tubulin. n=3

Aufgrund von fehlendem, suffizientem BRG1-Knock-down in den murinen Zellreihen (Ergebnisse nicht gezeigt), wurden die Experimente zur Klärung des Effekts von BRG1 in der Hepatokarzinogenese ausschließlich mit humanen Zellreihen fortgesetzt.

3.3 Effekt von BRG1 auf die Zellproliferation

Nachdem die Suppression von BRG1 suffizient in replizierten Versuchen gezeigt werden konnte, galt es nun deren Effekt zu untersuchen. Hierzu wurde sowohl die Auswirkung auf das Proliferationsverhalten und die Invasivität der Zellen als auch der Effekt auf ausgewählte Zielgene untersucht.

Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt wurde, hat BRG1 einen Einfluss auf die Proliferation. BRG1 wird sowohl eine proliferative und migrationsfördernde (Bai et al., 2012; Bai et al., 2013; Watanabe et al., 2011; Lin et al., 2010) als auch antiproliferative Wirkung (Hendricks et al., 2004; Dunaief et al., 1994; Karnezis et al., 2015) in bestimmten Malignomen zugesprochen. Selbst innerhalb einer Malignomentität sind konträre Effekte von BRG1 beschrieben bspw. dem Prostatakarzinom (Wong et al., 2000; Sun et al., 2007), dem Mammakarzinom (Wu et al., 2015; Wong et al., 2000) und dem Melanom (Becker et al., 2009; Lin, Wong, Martinka, & Li, 2010).

Die bereits dargelegten Ergebnisse in dieser Arbeit, einschließlich der Daten von Endo et al., 2013, die beide eine erhöhte BRG1-Expression im HCC beweisen konnten, führen zu der Hypothese, dass BRG1 im HCC-Gewebe einen proliferationsfördernden Einfluss besitzt.

Um diesen angedachten Effekt von BRG1 auf die Proliferation des HCCs zu untersuchen, wurden Wachstumskurven der HCC-Zelllinien HepG2 und HuH7 über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen erhoben. Hierzu wurden pro Zellreihe 4 Wachstumskurven erstellt, die sich wie folgt zusammensetzten:

Wachstumskurve von Zellen, die keiner Transfektion unterzogen wurden

Wachstumskurve von Zellen, die mit einer Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden

Wachstumskurve von Zellen, die mit der BRG1 spezifischen siRNA A transfiziert wurden

Wachstumskurve von Zellen, die mit der BRG1 spezifischen siRNA B transfiziert wurden

Bei einer Konfluenz von ca. 80-90% wurden die Zellen mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt und anschließend jeweils in gleicher Anzahl neu angesetzt. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte begleitend eine RNA-Extraktion mit anschließender qRT-PCR, um die BRG1-Expression zu ermitteln. Zur Umsetzung dieses Experiments wurden die vier unterschiedlich behandelten Zellkolonien (s.o.) jeder Zelllinie jeweils nach einem Teilungsvorgang doppelt angesetzt. Hierdurch konnte mit der einen Kolonie die Wachstumskurve weitergeführt werden, während mit der anderen, gleich behandelten Kolonie zu definierten Zeitpunkten eine Analyse der mRNA-Expression vollzogen werden konnte.

In den signifikant BRG1 supprimierten Zellen konnte, wie in den Wachstumskurven sichtbar ist (Abbildungen 19a+20a), eine signifikante Reduktion des Wachstums gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verschiedenen BRG1 spezifischen siRNAs A und B bzw. zwischen der Negativkontroll-siRNA und den nicht-transfizierten Zellen konnte dabei nicht festgestellt werden. Die größte Differenz in der Proliferationsrate war in der ersten Woche nach Transfektion zu verzeichnen. Anschließend glichen sich die Proliferationsraten erwartungsgemäß an. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der Analyse des BRG1-Expressionsniveaus (Abbildungen 19b+20b). Zunächst herrschte eine sehr signifikante bis hoch signifikante Suppression der BRG1-Expression vor, welche nach 216h bzw. 9 Tagen stark nachließ und in den folgenden Expressionsanalysen nahezu gleiche Expressionsniveaus erreichte wie die Zellen, die keiner Transfektion unterzogen wurden.

Nachdem die Proliferationsrate und die mRNA-Expression von BRG1 in den mit BRG1 spezifischer siRNA transfizierten Zellen auf einem stabilen Niveau, welches etwa der BRG1-Expression der Negativkontrolle entsprach, gelangt waren, folgte die Beendigung der Wachstumskurven.

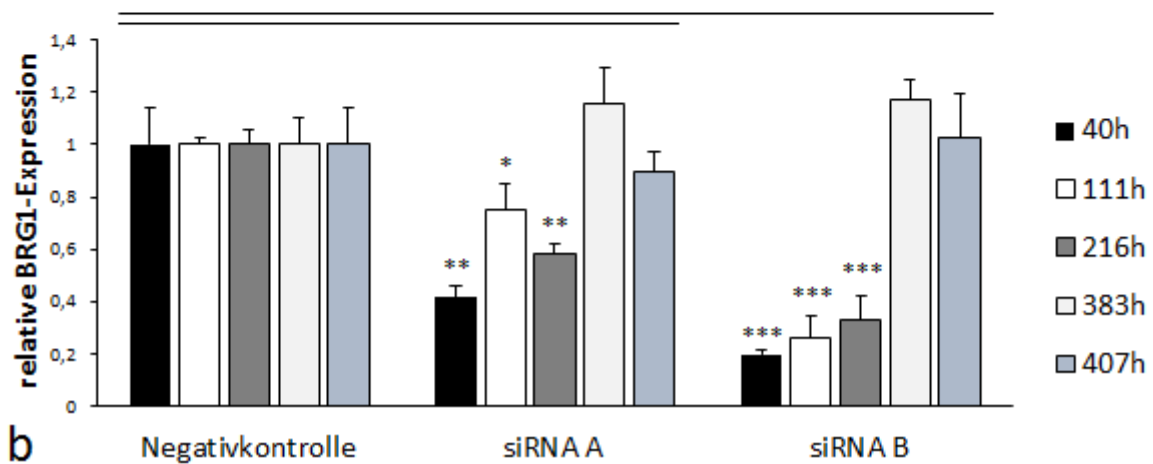
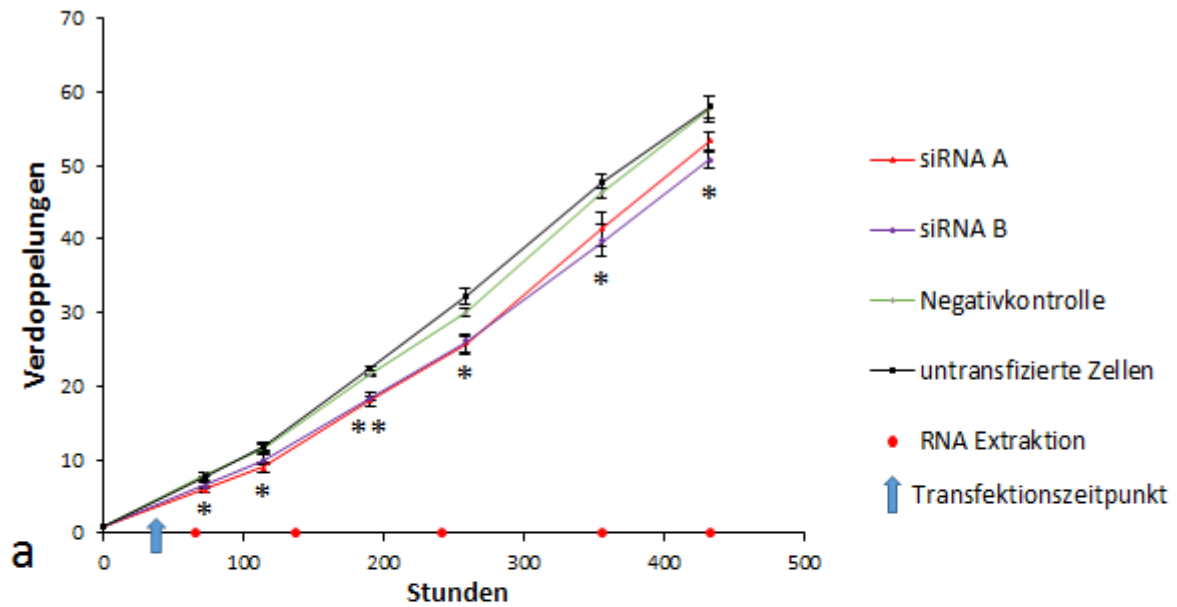


Abbildung 19: Wachstumskurven von HepG2 Zellen begleitend mit BRG1-Expressionsniveau

a Die Wachstumskurven zeigen einen signifikanten Proliferationsunterschied zwischen den mit BRG1 spezifischer siRNA transfizierten Zellen und der Negativkontrolle bzw den untransfizierten Zellen. n=3.

b Begleitend zur Auswertung des Proliferationsverhalten der Zellen erfolgte die Analyse des mRNA-Expressionsniveaus von BRG1. Hierbei zeigte sich nach zunächst signifikanter BRG1-Suppression ein weitestgehend progredienter Anstieg der BRG1-Expression begleitend zur erneut zunehmenden Proliferationsrate der Zellen. n=3

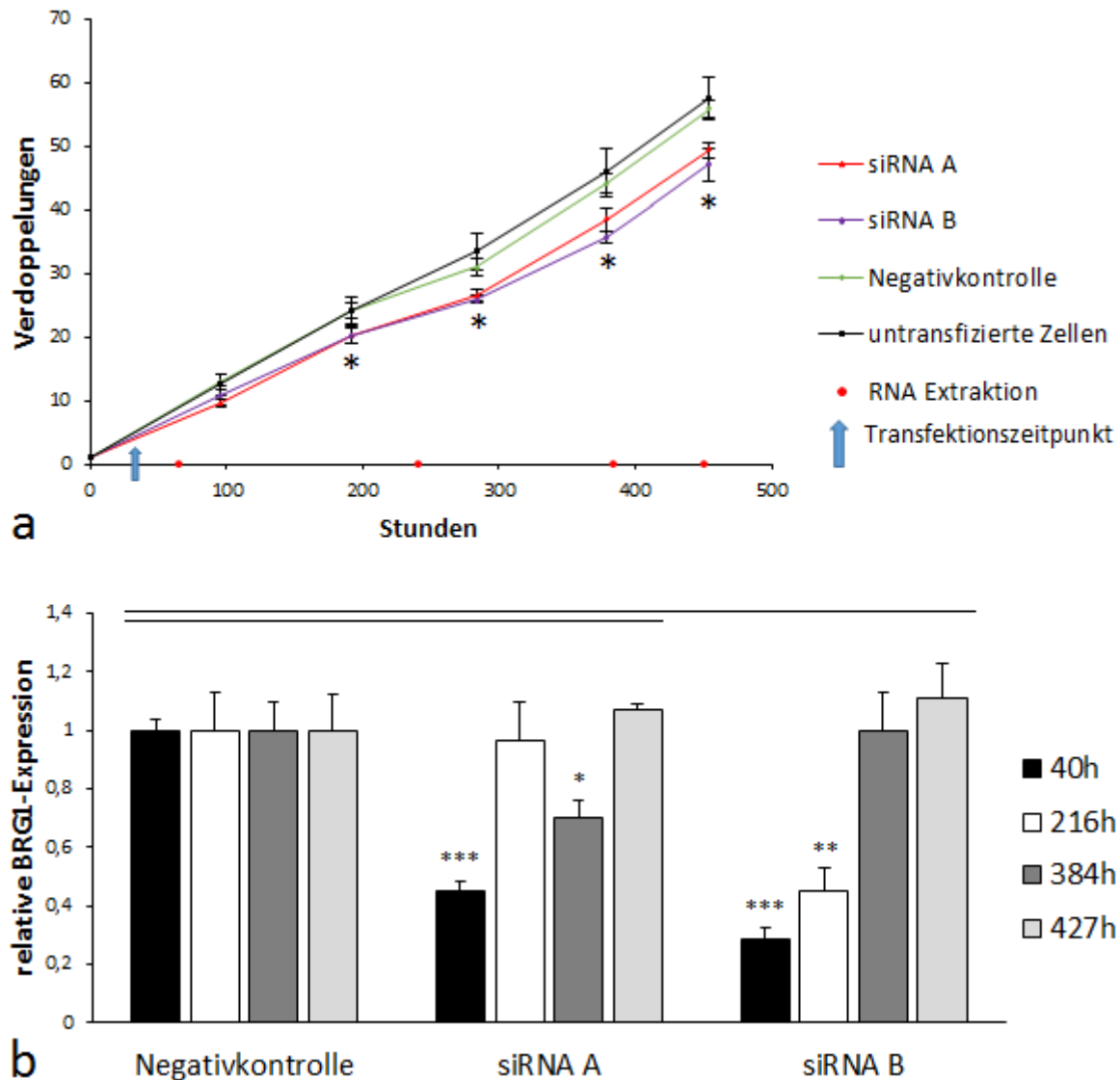


Abbildung 20: Wachstumskurven von HuH7 Zellen begleitend mit BRG1-Expressionniveau

a Die Wachstumskurven zeigen einen signifikanten Proliferationsunterschied zwischen den mit BRG1 spezifischer siRNA transfizierten Zellen und der Negativkontrolle bzw. den untransfizierten Zellen. n=3.

b Begleitend zur Auswertung des Proliferationsverhaltens der Zellen erfolgte die Analyse des mRNA-Expressionsniveaus von BRG1. Hierbei zeigte sich wie bei der Versuchsdurchführung der HepG2 Zellreihe nach zunächst signifikanter BRG1-Suppression ein weitestgehend progredienter Anstieg der BRG1-Expression begleitend zur erneut zunehmenden Proliferationsrate der Zellen. n=3

Aus den abgebildeten Wachstumskurven lässt sich schließlich folgern:

- wird die BRG1-Exression supprimiert, verlangsamt sich die Proliferationsrate der Zellen
- steigt nach Suppression die BRG1-Expression im Verlauf auf Normalniveau an, nimmt die Proliferationsrate der Zelle wieder zu

Diese Ergebnisse untermauern die Eingangs aufgestellte These einer proliferativen Wirkung von BRG1 im Rahmen der Hepatokarzinogenese.

3.4 Effekt von BRG1 auf die Zellinvasivität

Nachdem für die Zellproliferation ein Einfluss von BRG1 nachgewiesen werden konnte, folgte die genauere Analyse der Rolle von BRG1 hinsichtlich der Invasivität von HCC-Zellen. Ein Effekt von BRG1 auf die Invasivität von malignen Zellen ist für bestimmte nicht hepatische Zelllinien in der Literatur bereits beschrieben worden. So zeigten Sun et al., 2007 für Prostatakarzinomzellen, Saladi et al., 2010 für Melanomzellen, Bai et al., 2013 für Brustkrebszellen und Bai et al., 2012 für Gliomzellen eine positive Korrelation zwischen der BRG1-Expression und der Invasivität der jeweiligen Zellen.

Um den Effekt von BRG1 auf die Invasivität in humanen HCC-Zelllinien genauer zu untersuchen, folgte die Analyse mittels des verbreitet zur Anwendung kommenden Invasion Assays. Mit dieser Untersuchungsmethode kann durch eine spezielle Matrixbeschichtung der Membran die Invasivität der Zellen bestimmt werden. Zur Versuchsdurchführung wurden jeweils Triplikate der Negativkontroll-siRNA und den drei BRG1 spezifischen siRNAs (siRNA A, siRNA B und siRNA C) mit gleicher Zellzahl für die Zelllinien HepG2 und HuH7 angesetzt. Nach 44 Stunden Inkubationszeit folgte die Färbung und Auswertung der durch die Membran gewanderten Zellen mittels Mikroskop.

Wie in den Abbildungen 21 und 22 deutlich sichtbar, ist die Zahl der durch die Membran gewanderten Zellen in den mittels siRNA A, B und C transfizierten Proben gegenüber der Negativkontrolle in beiden Zelllinien signifikant reduziert. Dies ist sowohl durch die jeweils repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen als auch durch die numerische Auswertung der Zellen auf der jeweiligen Membran zu erkennen. Die Reduktion der Zellen, welche durch die Membran wanderten, liegt hierbei zwischen 50 und 60 Prozent. Ein signifikanter Unterschied zwischen den BRG1 spezifischen siRNAs konnte nicht festgestellt werden.

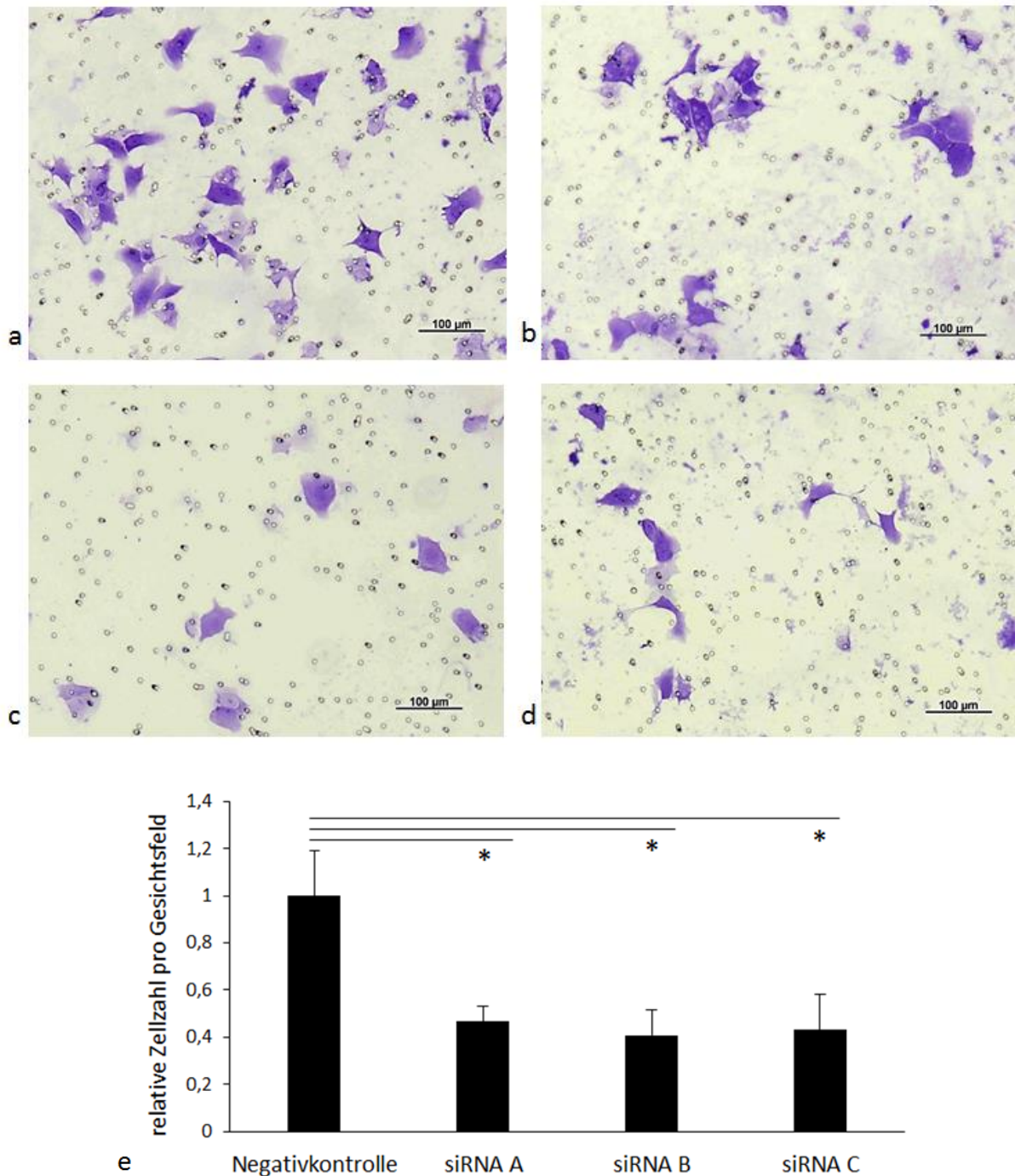


Abbildung 21: Invasivitätsanalyse der HuH7 Zelllinie mittels Invasion Assay

Die mikroskopischen Aufnahmen **a** Negativkontrolle, **b** siRNA A, **c** siRNA B und **d** siRNA C des Invasion Assays zeigen einen sichtbaren Unterschied in der Invasivität der Zellen zwischen der Negativkontrolle und den mit BRG1 spezifischer siRNA behandelten Zellen. **e** Die Auszählung der Zellen zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion der Invasivität der Zellen nach BRG1 Suppression. Zur Auswertung wurde die Zellzahl der Negativkontrolle auf 100% (=1) standardisiert. Die Zellzahlen der mit BRG1 spezifischer siRNA behandelten Zellen wurden in Relation hierzu angegeben.

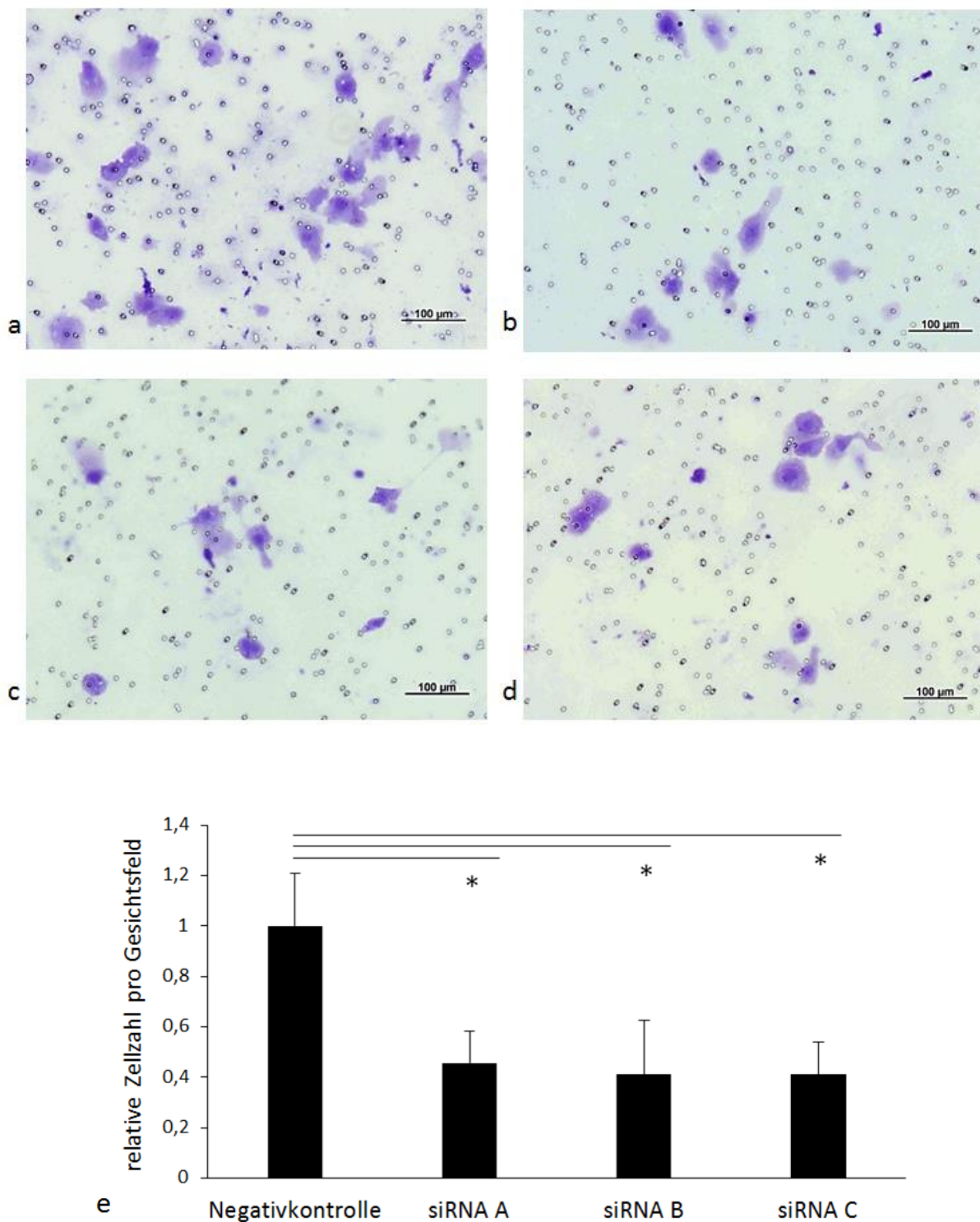


Abbildung 22: Invasivitätsanalyse der HepG2 Zelllinie mittels Invasion Assay

Die mikroskopischen Aufnahmen **a** Negativkontrolle, **b** siRNA A, **c** siRNA B und **d** siRNA C des Invasion Assays zeigen einen sichtbaren Unterschied in der Invasivität der Zellen zwischen der Negativkontrolle und den mit BRG1 spezifischer siRNA behandelten Zellen. **e** Die Auszählung der Zellen zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion der Invasivität der Zellen nach BRG1 Suppression. Zur Auswertung wurde die Zellzahl der Negativkontrolle auf 100% (=1) standardisiert. Die Zellzahlen der mit BRG1 spezifischer siRNA behandelten Zellen wurden in Relation hierzu angegeben.

3.5 Der Einfluss von BRG1 auf die Genregulation

Für mögliche Erklärungsansätze, die die proliferative und die Invasivität steigernde Wirkung von BRG1 begründen, wurden die Effekte von BRG1 nach erfolgreicher Suppression auf ausgewählte Zielgene untersucht. Die Analyse der quantitativen Bestimmung des mRNA Niveaus der verschiedenen Zielgene wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. In der Literatur sind bereits einige Zielgene von BRG1 beschrieben worden. Hierbei sind Zielgene bekannt, die sowohl die Proliferation im Zusammenspiel mit BRG1 hemmen als auch fördern (Kapitel 1.3.3).

Das Ziel dieses Telexperiments der Arbeit war, Zielgene speziell im HCC zu identifizieren, die den proliferationsfördernden und die Invasivität steigernden Effekt von BRG1 begründen. Somit sollte ein möglicher Ansatz für den in den Wachstumskurven und Invasion Assays eruierten Effekt gefunden werden. Wie bereits in „Molekulare Grundlagen der Pathogenese“ (Kapitel 1.2.7) und „Signalwege und Interaktion von BRG1“ (Kapitel 1.3.3.4) beschrieben, gibt es eine Vielzahl von möglichen Zielgenen, die u.a. moduliert durch BRG1, Einfluss auf die Proliferation und Invasivität nehmen. Die hiervon relevantesten, potentiell aussagekräftigsten Zielgene und weitere nach Literaturrecherche interessante Gene, die beispielweise die Prognose limitieren, wurden mittels qRT-PCR auf die quantitative Expression ihrer mRNA-Levels untersucht. Hierzu wurden die Zellreihen HepG2 und HuH7 zu teils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion mit BRG1 spezifischen siRNAs auf ihr jeweiliges Expressionsmuster analysiert. Es wurden folgende Gene (Tabelle 13) bei beiden Zelllinien analysiert.

Cycline	CyclinB1 CyclinD1 CyclinE1
Cyclin-dependent Kinase Inhibitoren	Cdkn1b/p27 Cdkn2a/p16 p21
Weitere Zielgene	MMP7 CXCL10 HMGA2 LKB1 p53 PAX7 Serpine1 SOX9

Tabelle 13: Analyierte Zielgene

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen das jeweilige mRNA-Expressionsmuster von Zielgenen, ermittelt durch qRT-PCR, für die ein regulatorischer Effekt durch BRG1 gezeigt werden konnte.

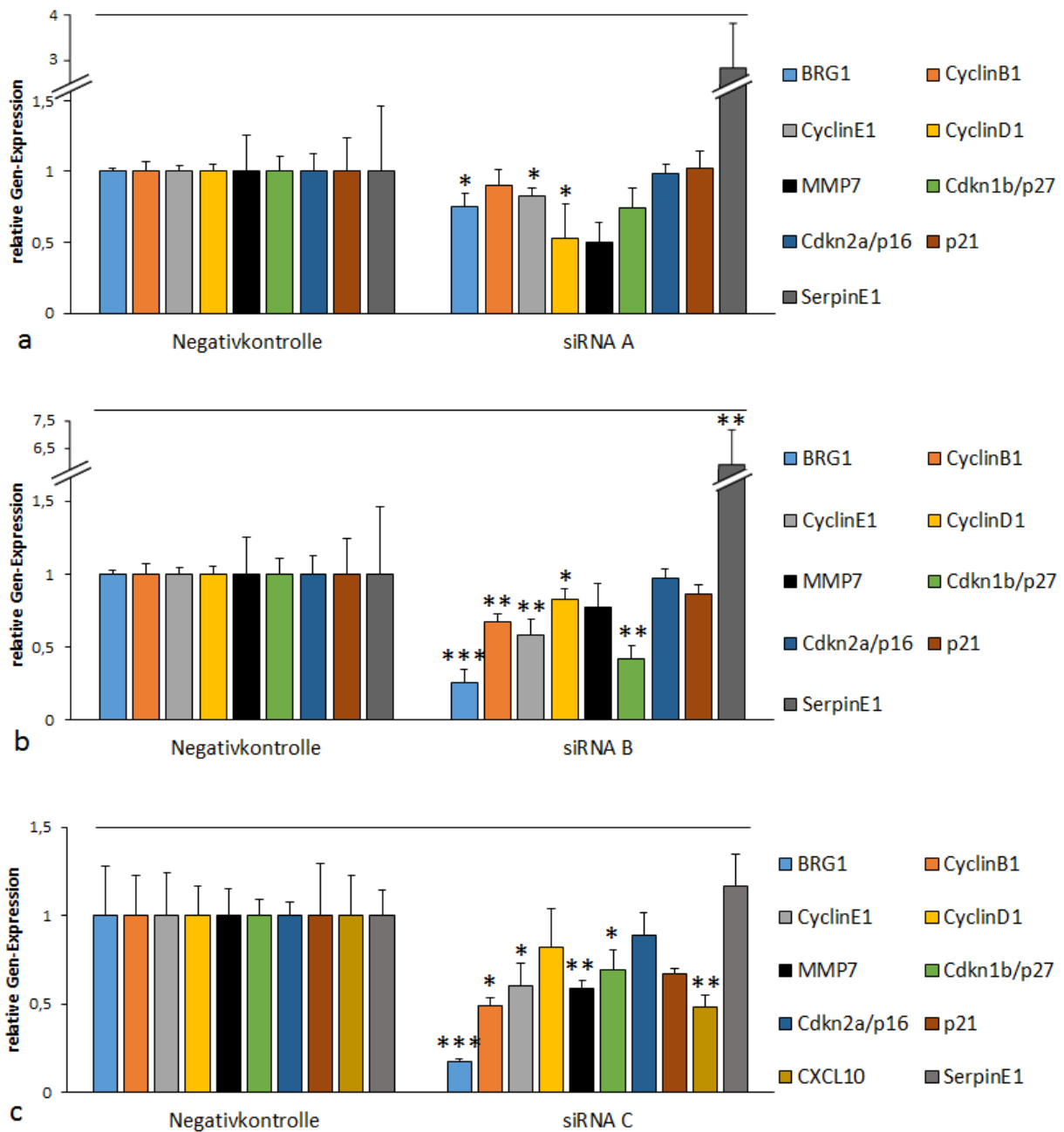


Abbildung 23: Gen-Expressionsanalyse BRG1 regulierter Zielgene in HepG2 Zellen

Nach Transfektion mit BRG1 spezifischer siRNA wurden die HepG2-Zellen hinsichtlich ihrer Genexpression auf mRNA-Niveau mittels qRT-PCR zu definierten Zeitpunkten analysiert. Dargestellt sind für die HepG2 Zellreihe die mRNA-Expressionsniveaus von BRG1/ Brahma related gene 1 und Zielgenen, die einer Modulation durch BRG1 in mindestens einer der beiden Zellreihen (HepG2, HuH7) unterliegen: CyclinB1, CyclinE1, CyclinD1, MMP7/Matrix Metalloproteinase 7, Cdkn1b/p27/Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1b (p27), Cdkn2a/p16/Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2a (p16), p21, SerpinE1/Serin protease inhibitor E1, CXCL10/Interferon Gamma inducible protein 10. Die mRNA-Expression wurde für die Negativkontrolle auf 100% (=1) standardisiert. Die mRNA-Expression der Zielgene wurde in Relation hierzu angegeben.

a 111h nach Transfektion, n=3, **b** 111h nach Transfektion, n=3, **c** 40h nach Transfektion, n=4

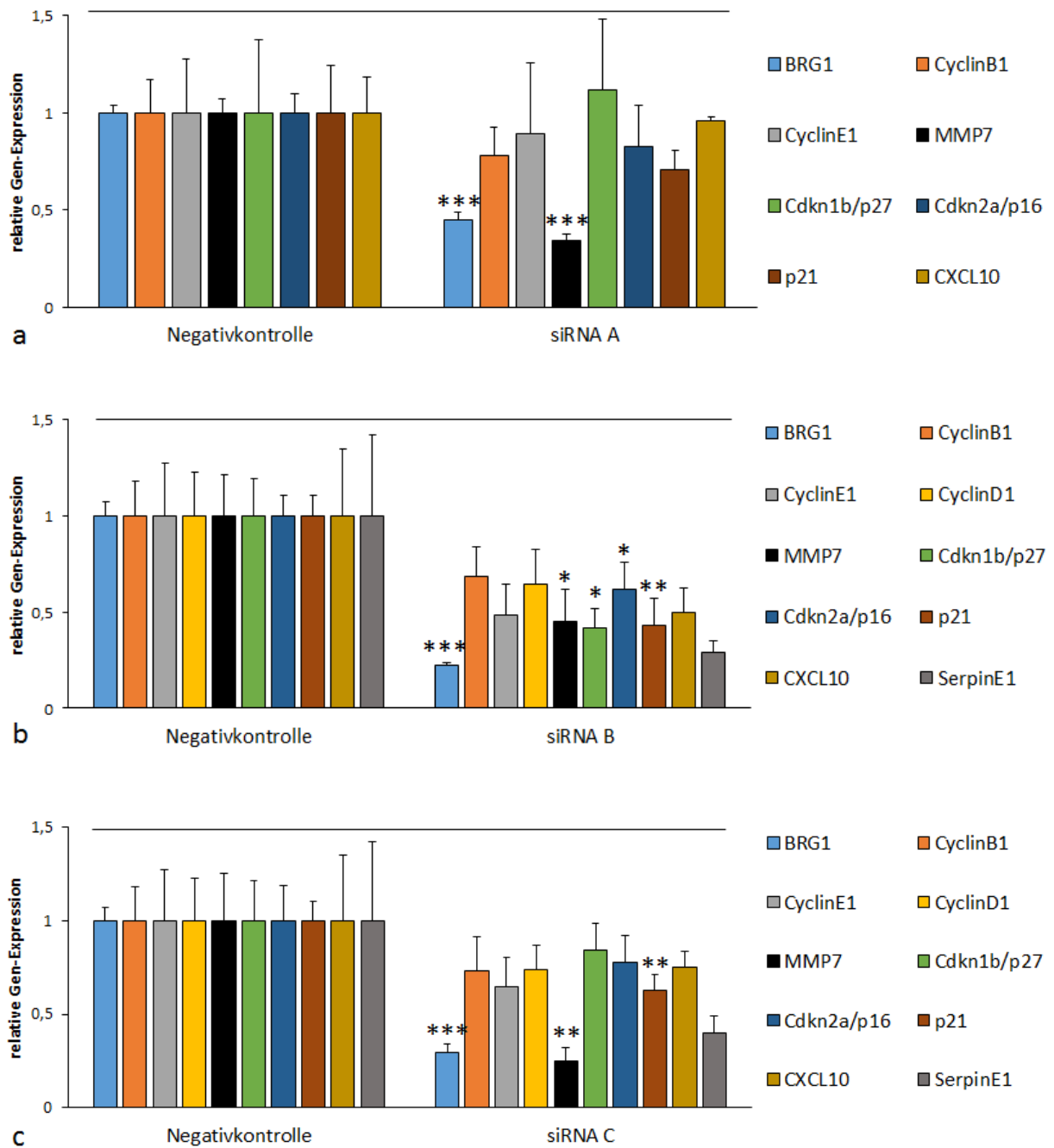


Abbildung 24: Gen-Expressionsanalyse BRG1 regulierter Zielgene in HuH7 Zellen

Nach Transfektion mit BRG1 spezifischer siRNA wurden die HuH7-Zellen hinsichtlich ihrer Genexpression auf mRNA-Niveau mittels qRT-PCR zum Zeitpunkt 40h nach Transfektion analysiert. Dargestellt sind für die HuH7 Zellreihe die mRNA-Expressionsniveaus von BRG1/ Brahma related gene 1 und Zielgenen, die einer Modulation durch BRG1 in mindestens einer der beiden Zellreihen (HepG2, HuH7) unterliegen: CyclinB1, CyclinE1, CyclinD1, MMP7/Matrix Metalloproteinase 7, Cdkn1b/p27/Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1b (p27), Cdkn2a/p16/Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2a (p16), p21, CXCL10/Interferon Gamma inducible protein 10, SerpinE1/Serin protease inhibitor E1. Die mRNA-Expression wurde für die Negativkontrolle auf 100% (=1) standardisiert. Die mRNA-Expression der Zielgene wurde in Relation hierzu angegeben.

a 40h nach Transfektion, n=3, **b** 40h nach Transfektion, n=4, **c** 40h nach Transfektion, n=4

Wie in den Abbildungen 23 und 24 deutlich zu erkennen, ergibt sich eine Reihe von Zielgenen, die dem Einfluss von BRG1 unterliegen. Mit Ausnahme eines Genes zeigen alle durch BRG1 modulierten Gene eine positive Korrelation, lediglich SerpinE1 scheint einem inversen Mechanismus zu unterliegen. Eine wenigstens signifikante Suppression in mindestens einer der beiden Zellreihen bzw. einer angewandten siRNA, entweder A, B oder C konnte für CyclinB1, CyclinE1, CyclinD1, Cdkn1B/p27, Cdkn2A/p16, MMP7, p21 und CXL10 nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, fand sich für SerpinE1 ein signifikanter Anstieg der Expression in der HepG2-Zellreihe.

Untersucht wurden verschiedene Zeitpunkte nach Transfektion. Dies sollte insbesondere näheren Aufschluss über die anhaltende supprimierte Proliferation über mehrere Tage nach BRG1-Suppression in den Versuchen zum Proliferationsverhalten mittels Wachstumskurven geben (Kapitel 3.3). Hierzu wurden die Gen-Expressionsanalysen für die siRNAs A und B, welche in den Wachstumskurven angewandt wurden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen. Die Analyse für die HuH7-Zellreihe erfolgte zum Zeitpunkt 40h nach Transfektion, wohingegen die Analyse der HepG2-Zellreihe zum Zeitpunkt 111h nach Transfektion erfolgte. Die Expressionsanalyse für die siRNA C wurde für beide Zellreihen zum Zeitpunkt 40h nach Transfektion durchgeführt, da sie ausschließlich im Versuch zur Invasivität von BRG1 (Kapitel 3.4) eingesetzt wurde. Dieser umfasste eine Zeitspanne, die nicht über 48h hinausging.

Die Abbildungen 23 und 24 machen einen signifikant regulierenden Effekt auf die entsprechenden Zielgene zu den verschiedenen Zeitpunkten deutlich. Die Zielgene, insbesondere die Familie der Cycline, welche durch ihren Einfluss in den Zellzyklus eine wichtige Rolle bezüglich Proliferation spielt, sind überwiegend sowohl zum frühen Zeitpunkt, 40h nach Transfektion, als auch zu einem deutlich späteren Zeitpunkt, 111h nach Transfektion, einem regulierenden Effekt durch BRG1 in positiver Weise unterlegen.

Die Versuchsdurchführung erfolgte für die HepG2 und HuH7 Zelllinie getrennt und unabhängig voneinander. Des Weiteren wurden innerhalb der jeweiligen Zellreihe wiederum zwei unabhängig voneinander durchgeführte Analysen vorgenommen. So ist für die HepG2 Zelllinie die Versuchsdurchführung für die siRNAs A und B gemeinsam erfolgt, während die Analyse mittels der siRNA C in einem unabhängigen Versuch durchgeführt wurde. Für die HuH7 Zelllinie sind die siRNAs B und C gemeinsam analysiert worden, wohingegen siRNA A in einem weiteren Versuch unabhängig angewandt wurde. Hierdurch konnten möglich Fehlerquellen in der Versuchsdurchführung durch Unabhängigkeit minimiert werden und die Ergebnisse für durch BRG1 regulierte Zielgene mittels unterschiedlicher siRNAs repliziert werden.

Die Abbildung 25 zeigt das jeweilige mRNA-Expressionsmuster von Zielgenen, ermittelt durch qRT-PCR, für die keine Modulation durch BRG1 nachgewiesen werden konnte.

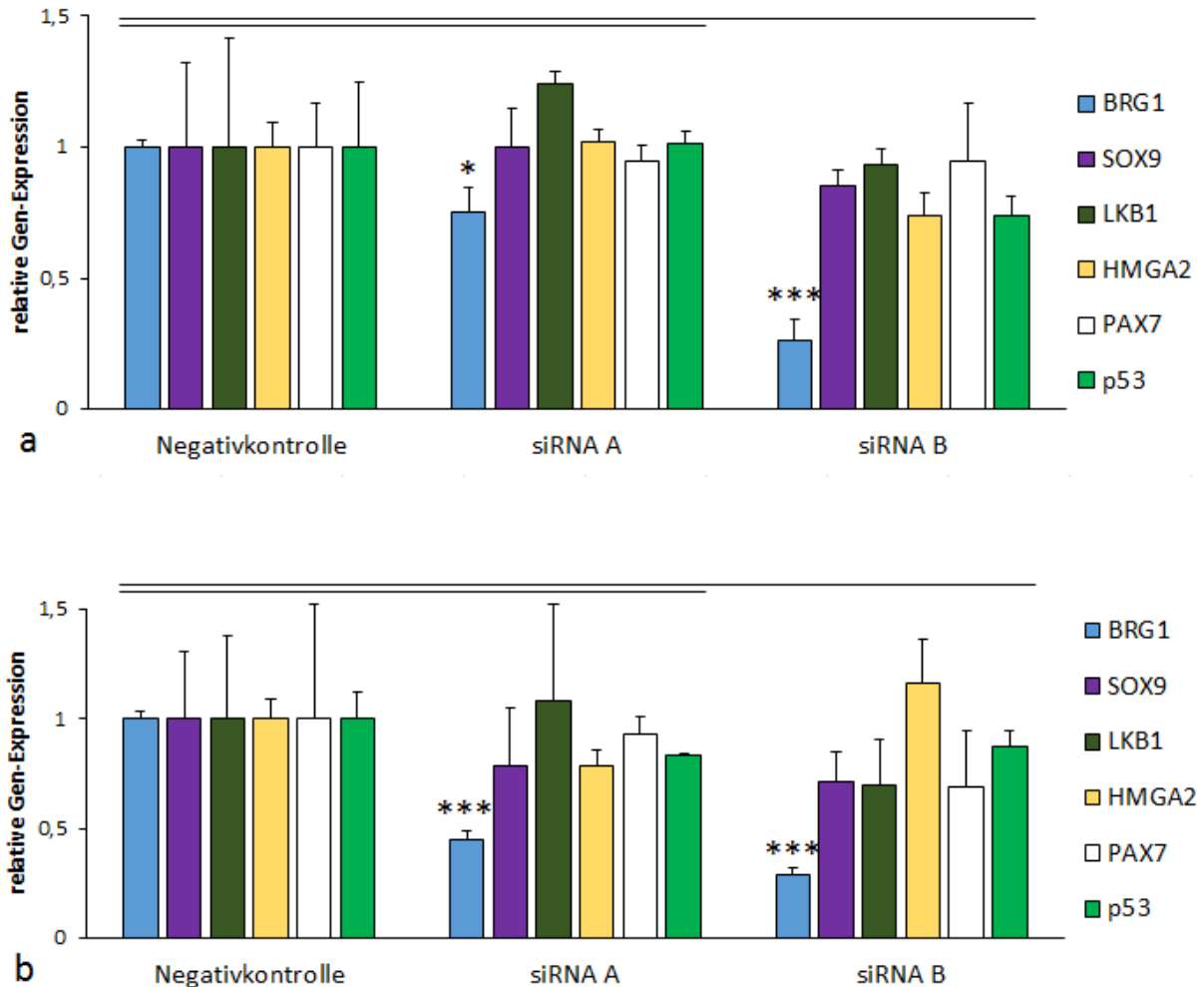


Abbildung 25: Gen-Expressionsanalyse weiterer Zielgene in HepG2 und HuH7 Zellen

Dargestellt sind Zielgene für die keine Effekte nach Transfektion mit BRG1 spezifischer siRNA in einer der beiden Zelllinien, HepG2 oder HuH7, nachgewiesen werden konnten. Es handelt sich hierbei um SOX9/ Transkription Faktor Sry-related, LKB1/Liver kinase B1, HMGA2/High mobility group AT-hook 2, PAX7/ Paired box 7 und p53.

a HepG2 Zelllinie 111h nach Transfektion, n=3, **b** HuH7 Zelllinie 40h nach Transfektion, n=3

Für die Gene HMGA2, p53, PAX7, SOX9 und LKB1 sind keine signifikanten Modulationen durch BRG1 ermittelt worden. Weder in der HepG2 noch in der HuH7 Zelllinie konnte ein regulierender Effekt von BRG1 auf diese Zielgene analysiert werden. Auch für die unterschiedlichen Zeitpunkte der Gen-Expressionsanalyse, 40h und 111h nach Transfektion, sind keine differenten Effekte nachgewiesen worden.

Insgesamt ist durch die Versuchsdurchführung eine positive Korrelation von BRG1 auf die Cycline B1, D1 und E1 und MMP7 gezeigt worden. Diese Ergebnisse können den in den Wachstumskurven gezeigten proliferativen Effekt als auch die Steigerung der Invasivität durch BRG1 erklären. Darüber hinaus kann die positive Korrelation zwischen BRG1 und CXCL10 näheren Aufschluss über die schlechte Prognose des HCCs geben.

Die positive Korrelation der Cyclin-dependent Kinase Inhibitoren 1b/p27, 2a/p16 und p21 sowie die inverse Beziehung von BRG1 und SerpinE1 ist hingegen nicht richtungsweisend für mögliche Erklärungsansätze der proliferativen und die Invasivität fördernden Wirkung von BRG1 im HCC.

4 Diskussion

BRG1 ist bis zum heutigen Zeitpunkt in einer Reihe von Malignomen und Krebszellen untersucht worden. Dabei konnten unterschiedliche Mutationen und Expressionsniveaus von BRG1 eruiert werden (Endo et al., 2013; Sentani et al., 2001; Medina & Sanchez-Cespedes, 2008; Wu et al., 2015; Torkamandi et al., 2014; Bai et al., 2012; Karnezis et al., 2015). Gezeigt werden konnte, dass BRG1 sowohl als Tumorsuppressor wie auch als proliferationsfördernde Kraft fungiert (Wong et al., 2000; Sun et al., 2007; Wu et al., 2015; Bai et al., 2013). Die Gründe für dieses ambivalente Verhalten sind nicht abschließend geklärt worden, vielmehr steht die Forschung hinsichtlich dieser Frage am Anfang. Ebenso sind die molekularen Signalwege mit den letztlich effektiven Zielgenen gerade im Zusammenhang mit Malignomen noch weitestgehend unverstanden.

Die vorgestellten Daten dieser Arbeit sind die ersten, die den Effekt von BRG1 im HCC darstellen und näher untersuchen.

4.1 Überexpression von BRG1 im HCC-Gewebe

Die in dieser Arbeit gezeigte BRG1-Überexpression im HCC-Gewebe verglichen mit dem tumorfreien Gewebe der Leber, vornehmlich fibrotisches und zirrhisches Gewebe, ist bereits von Endo et al., 2013 beschrieben worden. Neu konnte jedoch gezeigt werden, dass BRG1 im HCC signifikant erhöht ist verglichen mit tumorfreiem, überwiegend gesundem Lebergewebe von Patienten, die an einem in die Leber metastasierten extrahepatischen Primärtumor erkrankt sind. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der beiden tumorfreien Gewebegruppen lag hierbei nicht vor. Dies weist erneut auf den spezifischen Zusammenhang von BRG1-Expression und dem HCC hin und scheint die Rolle von BRG1 für ein späteres Stadium der Zirrhose-Karzinom Sequenz in der Pathogenese des HCCs zu definieren. Für eine funktionelle Rolle von BRG1 in einem früheren Stadium der Zirrhose-Karzinom Sequenz wäre bereits mit einem signifikanten Unterschied des BRG1-Expressionsniveaus zwischen gesundem Lebergewebe und Zirrhosegewebe zu rechnen gewesen. Auffällig ist weiter der in dieser Arbeit hohe Anteil an BRG1 positiven HCCs (91%) in der IHC gegenüber lediglich 35% beschrieben durch Endo et al., 2013. Eine Ursache ist womöglich der Gebrauch verschiedener BRG1-Antikörper in der jeweiligen Arbeit (Anti-BRG1 mouse antibody Santa Cruz, CA, USA in Endo et al., 2013 bzw. Anti-BRG1 rabbit antibody Santa Cruz, CA, USA in dieser Arbeit). Eine weitere mögliche Erklärung liegt in den untersuchten HCC-Gewebsproben selbst. Bisher gibt es noch keine verlässlichen Daten zur BRG1-Expression in den unterschiedlichen histopathologischen Formen des HCCs. Evtl. ist die Expression von BRG1 innerhalb dieser Subtypen des HCCs nicht einheitlich. Aufgrund fehlender bzw. nicht

erfasster Angaben zu den histopathologischen und zytologischen Formen des HCCs in der Arbeit von Endo et al., 2013 als auch dieser Arbeit und der fehlenden Datenlage insgesamt, kann dieser Aspekt nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die Graduierung der BRG1-Expression mittels IHC im HCC ist die erste ihrer Art. Dies sind somit die ersten Daten, die die BRG1-Expression speziell im HCC graduiert darstellen. Welche Faktoren für eine unterschiedliche BRG1-Expression verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Evtl. bringen, wie bereits beschrieben, die histopathologischen Unterformen mit jeweils differenter BRG1-Expression darüber näheren Aufschluss. Hierzu müssten jedoch genauere Untersuchungen mit einer erhöhten Fallzahl an Proben der jeweiligen histopathologischen Unterformen des HCCs durchgeführt werden. Eine unterschiedliche Expression oder Alteration von BRG1 für verschiedene Unterformen von bestimmten Malignomen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, u.a. dem Ovarialkarzinom und dem Bronchialkarzinom (Karnezis et al., 2015; Medina et al., 2008). Für die Expression von BRG1 im Mammakarzinom konnte ein IHC-Grading nach Remmele ebenfalls eine Variabilität der BRG1-Expression zeigen. Hierbei fand jedoch keine genauere Spezifizierung des Mammakarzinoms hinsichtlich histopathologischer Formen statt. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass eine höhere BRG1-Expression mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate einhergeht (Bai et al., 2013). Nach Endo et al., 2013 ist diese Korrelation für das HCC jedoch nicht nachzuweisen.

4.2 Erfolgreiche BRG1-Suppression in humanen HCC-Zelllinien

Der Knock-down von BRG1 in den humanen Zellen konnte als effiziente Suppression identifiziert werden. Hierbei ist die Suppression von BRG1 jedoch nicht bei allen verwendeten siRNAs gleich ausgeprägt. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in den Nukleotidsequenzen der jeweiligen siRNA und folglich unterschiedlichen Angriffspunkten an der mRNA von BRG1. Eben diese Nukleotidsequenzen bzw. das richtige Design der für ein bestimmtes Zielgen spezifischen siRNA spielen für die erfolgreiche Suppression einer Transfektion eine entscheidende Rolle (Kilroy et al., 2009).

Der mangelnden BRG1-Suppression der murinen Zelllinien liegen verschiedene Ursachen zu Grunde. Für die Hepatozyten-Zelllinien ist bekannt, dass sie erheblich schwerer zu transfizieren sind als Hepatoma-Zellen (Böttger et al., 2015). Dies erklärt den fehlenden Transfektionserfolg der in dieser Arbeit verwendeten murinen Zelllinie AML12. Weiter zeigte sich bei den Versuchsdurchführungen in dieser Arbeit eine höhere Empfindlichkeit einzelner muriner HCC-Zelllinien gegenüber dem Transfektionsagens Interferin im Vergleich zu den human HCC Zelllinien. Evtl. lag somit ein Selektionsvorteil von Zellen vor, die weniger dem Effekt von Interferin unterlagen und folglich geringere Mengen an siRNA aufnehmen konnten. Die Wirksamkeit der für die murinen Zelllinien

designierten BRG1 spezifischen siRNAs ist ebenfalls ein möglicher Unsicherheitsfaktor (Kilroy et al., 2009). Zwar konnte, wie für die humanen Zellen dargestellt, die Aufnahme der siRNA in die murinen HCC-Zelllinien mittels Fluoreszenzmikroskopie teils nachgewiesen werden. Der Knock-down, überprüft mittels qRT-PCR und WB, fiel jedoch marginal aus (Daten nicht gezeigt).

Empirisch nicht gesicherten Berichten zufolge gibt es weitere Hinweise, dass murine Zelllinien im Hinblick auf eine Transfektion mit siRNA generell von einer geringeren Effektivität gekennzeichnet sind als es bei humanen Zellen der Fall ist.

4.3 BRG1 wirkt proliferationsfördernd in HCC-Zelllinien

Die hier gezeigten Daten sind die ersten, die die Auswirkungen von BRG1 auf die Proliferation des HCCs zeigen. Es konnte hierbei ein signifikanter proliferativer Effekt von BRG1 im HCC nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt sich mit den zuvor gezeigten Daten dieser Arbeit und den Daten von Endo et al., 2013, einer erhöhten Expression von BRG1 im HCC, in Einklang bringen. Schlussfolgern lässt sich schließlich aus diesen Daten:

Eine erhöhte BRG1-Expression im HCC fördert die Proliferation der Krebszellen.

Ein solch proliferativer Effekt konnte bereits für mehrere Malignome gezeigt werden. U.a. für das kolorektale Karzinom, Gliom, Melanom als auch den Brustkrebs konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Watanabe et al., 2011; Bai et al., 2013; Bai et al., 2012; Lin et al., 2010). Bei diesen Versuchsdurchführungen zur Bestimmung der Proliferation führte in malignen Krebszellen des kolorektalen Karzinoms, Glioms, Brustkrebs und Melanoms ein BRG1-Knock-down zu einer antiproliferativen Wirkung mit Wachstumsverlangsamung. In Zellen des Ösophaguskarzinoms, indem ebenso eine erhöhte Expression an BRG1 bekannt ist, scheint eine Suppression von BRG1 eine Hemmung von Migration und Invasivität hervorzurufen. Dies konnte experimentell jedoch noch nicht verifiziert werden (Torkamandi et al., 2014).

Genau gegenteilige Effekte sind allerdings für die Prostatakarzinom-Zellreihe TSU-Pr1, die Brustkrebszellreihe ALAB und die SW13 Zelllinie des Nebennierenkarzinoms sowie die Krebszellen des Ovars gezeigt worden. Hier führte eine Reinduktion von BRG1, welches in diesen Krebszellen vermindert exprimiert wird, zu eben genanntem antiproliferativem Effekt des Wachstums (Hendricks et al., 2004; Dunaief et al., 1994; Karnezis et al., 2015).

Interessanterweise wurde für das Prostatakarzinom sowohl ein proliferativer bzw. die Invasion fördernder als auch ein antiproliferativer Effekt gezeigt (Wong et al., 2000; Sun et al., 2007). Auf der einen Seite konnte eine Reinduktion von BRG1 in homozygot mutierten Zellen (TSU-Pr1 α) die Proliferation hemmen (Wong et al., 2000). Auf der anderen Seite ist eine höhere BRG1-Expression

mit einem höheren Tumolvolumen und höherer Invasivität des Prostatakarzinoms assoziiert (Sun et al., 2007). Für Brustkrebs wird ähnliches berichtet. So führte ein BRG1 Knock-down in den Zellreihen MDA-MB-231, BT-549 und MDA-MB-468 zu einer Proliferationsminderung (Bai et al., 2013; Wu et al., 2015), wohingegen eine Reinduktion in BRG1 negativen ALAB-Zellen den gleichen antiproliferativen Effekt zeigt (Wong et al., 2000). Im Lungenkarzinom, welches in ca. 25% (v.a. NSCLC mit 35%) der Fälle eine BRG1 Inaktivierung trägt (Medina & Sanchez-Cespedes, 2008), konnte gezeigt werden, dass ein BRG1 Verlust die Aggressivität des NSCLC fördert (Orvis et al., 2014) und eine Reinduktion von BRG1 ein normales Gen-Expressionsmuster wiederherstellen kann (Romero, et al., 2012). Jedoch scheint BRG1 nicht nur eine protektive Funktion im Lungenkarzinom zu besitzen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass ein BRG1 Knock-down in MAX (MYC-associated factor X)-defizienten Zellen im SCLC (small cell lung cancer) das Wachstum hemmt (Romero et al., 2014).

Wie in der hier zitierten Literatur deutlich wird, ist die abschließende Wirkungsweise von BRG1 auf die Zellproliferation von Malignomen noch längst nicht geklärt. Zum einen lässt sich das in dieser Arbeit dargelegte Verständnis von BRG1 und die wachstumsfördernde Wirkung gut in das Bild einiger Studien mit gleichem Ergebnisses einfügen. Jedoch ist zum anderen in einer ähnlich relevanten Gruppe von Studien die gegenteilige Wirkung beschrieben. Eine Arbeit, die beide Verhaltensweisen beleuchtet und versucht diese zu erklären, wurde am Pankreaskarzinom durchgeführt. In dieser konnte gezeigt werden, dass BRG1 kontextabhängig völlig konträre Wirkungen zu haben scheint. Mögliche Erklärungsansätze sind bspw. in der unterschiedlichen Herkunft von Vorläuferzellen differenter histopathologischer Formen und unterschiedlichen zeitlichen Komponenten zu finden (von Figura et al., 2014; Roy et al., 2015). In diesen Ansätzen liegt eine wichtige Erkenntnis für weitere Forschungen, welche womöglich die gegenteiligen Effekte von BRG1 innerhalb einer Tumorentität entschlüsseln kann.

Aufgrund möglicher Störfaktoren bei dieser Versuchsdurchführung, soll sie genauer beleuchtet werden. Die wahrscheinlich wichtigste Frage nach einer effektiven BRG1-Suppression in den transfizierten Zellen kann anhand der Ergebnisse der qRT-PCR zu definierten Zeitpunkten (Abb. 19, Abb.20) verifiziert werden und als Fehlerquelle weitestgehend ausgeschlossen werden. Durch paralleles Auszählen der einzelnen Zellkolonien mit möglichst exakt gleichen Bedingungen, bspw. der Trypsinierungsdauer u.v.m., ist eine zeitliche Komponente, verantwortlich für unterschiedlich lange Kultivierungszeiten, nahezu ausgeschlossen. Mögliche natürliche, zufällige Unterschiede in der Proliferationsrate sind durch eine statistische Signifikanz mit $n=3$ unwahrscheinlich. Auffallend ist, v.a. zu Beginn der Wachstumskurven, der nahezu gleiche Effekt beider zur Anwendung gekommenen siRNAs (A und B), obwohl wie in Kapitel 3.2 und der parallel durchgeführten mRNA-Expressionsmessung gezeigt, ein Unterschied in der Wirkung der jeweiligen siRNA auf die Suppression von BRG1 festzustellen ist. Wie jedoch in den Abbildungen 23 und 24 zu erkennen,

besitzt die bzgl. dem Knock-down weniger effektivere siRNA A einen ebenso signifikanten Effekt auf die Zielgene CyclinE1, CyclinD1 und MMP7 und teils ähnlich starken, aber nicht signifikanten Effekt auf CyclinB1. Exakt diese Gene bieten aber mögliche Erklärungsansätze des dargestellten Verhaltens der Zellproliferation nach BRG1 Knock-down. Auf dieser Grundlage ist die annähernd gleiche Proliferationsrate beider BRG1 supprimierter Wachstumskurven zu erklären. Erst im letzten Drittel des Wachstumsverlaufs sind leichte, nicht signifikante Unterschiede zugunsten der effektiveren siRNA B zu vernehmen. Insgesamt muss weiter berücksichtigt werden, dass die BRG1-Suppression mittels siRNA ein transienter Vorgang ist, der temporären Schwankungen und einer zeitlich abnehmenden Effektivität unterliegt. Durch Zellteilungen verringert sich die siRNA-Konzentration im Laufe der Versuchsdurchführung erheblich und die siRNA verliert merklich an Effektivität. Je nachdem welche Zellen, ob stark transfizierte oder weniger transfizierte, sich gerade in Teilung befinden, können kurzfristige Schwankungen im zeitlichen Verlauf bzgl. der Suppression von BRG1 ebenso eruiert werden.

4.4 BRG1 steigert die Invasivität von HCC-Zelllinien

Diese Arbeit liefert erste Ergebnisse, die die Rolle von BRG1 im Hinblick auf Invasivität im HCC näher beleuchten. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die BRG1-Expression positiv mit der Invasivität von humanen HCC-Zellen korreliert. Eine solche Korrelation zwischen BRG1-Expression und Invasivität haben Sun et al., 2007, Saladi et al., 2010, Bai et al., 2013 und Bai et al., 2012 für Prostatakarzinomzellen, Melanomzellen, Brustkrebszellen und Gliomzellen bereits nachweisen können. Die in dieser Arbeit gewonnen Daten fügen sich somit in das derzeit vorhandene Wissen hinsichtlich der Rolle von BRG1 auf die Invasivität von Malignomen.

Der molekulare Signalweg, welcher den Effekt von BRG1 auf die Invasivität erklärt, erfolgt über eine Regulation der Familie der Matrix-Metalloproteasen durch BRG1. Dies konnte in dieser Arbeit durch die Analyse des Expressionsniveaus der Matrix-Metalloprotease MMP7 gezeigt werden. Wird die BRG1-Expression supprimiert folgt eine Suppression der MMP7 Expression mit einer anschließenden signifikanten Reduktion der Invasivität von HCC-Zellen. Eine Korrelation zwischen BRG1 und MMP2 konnte in der Arbeit von Bai et al., 2012, Bai et al., 2013 und Saladi et al., 2010 ebenso nachgewiesen werden und den dortigen kausalen Zusammenhang zwischen BRG1 und der Invasivität erklären. Insgesamt konnte bereits mehreren MMP Familienmitgliedern eine positive Korrelation zu BRG1 zugeschrieben werden. Hierbei handelt es sich um MMP7, MMP2, MMP9, MMP10 und MMP14. Die beschriebene inverse Korrelation zwischen BRG1 und MMP1 sowie MMP16 scheint in diesem Zusammenhang keinen relevanten Einfluss auf die Invasivität zu haben. (Orvis et al., 2014; Bai et al., 2013; Bai et al., 2012; Ma et al., 2004; Torkamandi et al., 2014; Saladi et al., 2010)

Der nahezu gleich starke sowie signifikante Effekt der drei verschiedenen BRG1 spezifischen siRNAs (siRNA A, siRNA B, siRNA C) auf die Invasivität ist trotz der etwas geringeren BRG1 Suppression der siRNA A (Kapitel 3.2) durch den Effekt auf MMP7 begründet (Kapitel 3.5). Dieser ist, wie der Effekt auf die Cycline, trotz einer etwas geringeren BRG1 Suppression der siRNA A ähnlich ausgeprägt wie bei den suffizienteren siRNAs B und C. Somit lässt sich die ähnlich starke Reduktion der Invasivität in den drei Gruppen mit unterschiedlicher BRG1 spezifischer siRNA schlüssig erklären. Die Durchführung der Versuche mittels Triplikaten für jede Probe und die statistische Signifikanz nach Auswertung der Daten machen zufällige Variationen zugunsten der BRG1 spezifischen siRNAs unwahrscheinlich.

Insgesamt kann nach Auswertung der Daten BRG1 im HCC eine die Invasivität steigernde Rolle zugesprochen werden.

4.5 BRG1 reguliert onkogene und tumorsuppressive Zielgene im HCC

Die Regulation von Zielstrukturen durch BRG1 ist bereits in einigen Arbeiten gezeigt worden. Dabei handelt es sich um ein sehr großes Spektrum an Zielgenen, die im Verdacht stehen durch BRG1 beeinflusst zu werden. Sowohl proliferationsfördernde als auch proliferationshemmende Zielgene scheinen dieser Regulation zu unterliegen (Kapitel 3.5). Die Korrelation dieser Gene kann hierbei sowohl positiv als auch invers zur BRG1-Expression vorliegen (Orvis et al., 2014). Wann die proliferationshemmende bzw. die wachstumsfördernde Komponente überwiegt, konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden.

Vor der Analyse der einzelnen Zielgene hinsichtlich einer Korrelation zu BRG1 und der hieraus resultierenden Effekte auf das Zellverhalten gilt es zunächst das Augenmerk auf die unterschiedlichen Zeitpunkte der Gen-Expressionsanalyse zu legen. Hierbei konnte für beide Zeitpunkte, 40h und 111h nach Transfektion, ein anhaltender supprimierender Effekt von BRG1 gezeigt werden. Diese temporär anhaltende Suppression von BRG1 wirkt sich auch zum späteren Zeitpunkt der Gen-Expressionsanalyse auf die Zielgene aus und zeigt somit die enge Korrelation von BRG1 und den hierdurch modulierten Zielgenen. Dies ist insbesondere von Interesse, da in vielen beschriebenen Experimenten und Datenanalysen bekannter Literatur die Gen-Expressionsanalysen meist spätestens 48h nach Transfektion mittels siRNA durchgeführt werden. Der in dieser Arbeit über die 48h nach Transfektion prolongierte Effekt der BRG1 spezifischen siRNA und die auch nachweislich weiterhin bestehende Modulation andere Zielgene gilt es deshalb besonders hervorzuheben.

4.5.1 Onkogene und die Prognose limitierende Zielgene

Cycline

Die Analyse der Zielgene, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigt ähnliche Ergebnisse wie bereits in vorgängiger Literatur beschrieben. Auf der einen Seite konnten Gene, die moduliert durch BRG1 einen proliferationsfördernden Effekt auf das Wachstum einer Zelle haben, identifiziert werden. Insbesondere der Einfluss auf die Familie der Cycline, in dieser Arbeit gezeigt für CyclinB1, D1, E1 scheint hierbei von großer Bedeutung. Gleiche Effekte einer positiven Korrelation von BRG1 zur Cyclin-Familie konnten bereits in einer Reihe von Untersuchungen eruiert werden (Bai et al., 2012; Bai et al., 2013; Lin et al., 2010). Cycline sind wesentliche Bestandteile der Regulation des Zellzyklus einer Zelle und wirken aktiv fördernd auf die Proliferation. Die Familie der Cycline umfasst mehrere Unterformen, vornehmlich CyclinA, CyclinB, CyclinD und CyclinE. Sie sind jeweils essentiell für bestimmte Phasen (G1-Phase, S-Phase, G2-Phase und Mitose) des Zellzyklus. Während CyclinD und CyclinE vor allem zu Beginn des Zellzyklus von Bedeutung sind, spielen Cyclin A und CyclinB im weiteren Verlauf eine wichtige Rolle. Eine zentrale Funktion unter den Cyclinen nimmt CyclinD ein. Es ist wichtig während der G1-Phase und unterliegt einer Reihe von extrazellulären Signalen (Coqueret, 2002; Evans et al., 1983). Durch eine positive Korrelation dieser Gen-Familie mit BRG1 kann nun bei ansteigender BRG1-Expression in bestimmten Malignomen (u.a. kolorektales Karzinom, Melanom, Brustkrebs, Gliom, HCC) (Watanabe et al., 2011; Lin et al., 2010; Bai et al., 2012; Bai et al., 2013; diese Arbeit) die wachstumsfördernde Komponente erklärt werden.

MMP7

Eine weitere wichtige positive Korrelation zu BRG1 konnte für MMP7 in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Eine Regulierung der MMP-Familie in gleicher positiver Korrelation und der damit verbundenen Abnahme der Invasivität nach artifizierlicher Suppression von BRG1 in einigen Experimenten wurde bereits mehrfach gezeigt (Bai et al., 2012; Bai et al., 2013; Ma et al., 2004; Saladi et al., 2010). Durch proteolytische Prozesse nimmt die Familie der MMPs Einfluss auf Invasivität und Angiogenese (Ma et al., 2004). Über diese aktive Beeinflussung der extrazellulären Matrix kann der Effekt von BRG1 auf die Invasivität der Zellen in den hierzu durchgeführten Versuchen dieser Arbeit erklärt werden. Womöglich liegt hierin auch die Ursache für die hohe Invasivität des HCCs.

SerpinE1

Das Zielgen mit der einzigen in dieser Arbeit festgestellten inversen Korrelation zu BRG1 ist SerpinE1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1, serpin peptidase inhibitor, Typ1). SerpinE1 ist in verschiedenen Malignomen, u.a. dem HCC, erhöht und geht mit einer schlechteren Prognose einher (Duffy et al., 1999). Für das HCC ist eine Erhöhung an SerpinE1 insbesondere für Patienten mit einer Hepatitis B/C Co-Infektion nachgewiesen (Divella et al., 2012). Die Erkenntnis einer schlecht einhergehenden Prognose würde bedeuten, dass eine erhöhte BRG1-Expression im HCC die SerpinE1-Konzentration senkt und somit die Überlebensrate steigern würde. Dieser Überlebensvorteil einer erhöhten BRG1-Expression konnte jedoch für das HCC bisher nicht ermittelt werden (Endo et al., 2013). Das gezeigte Ergebnis widerspricht weiter ersten bekannten Resultaten aus der Literatur. So zeigten Orvis et al., 2014 eine positive Korrelation von SerpinE, allerdings für das Zielgen SerpinE2, zu BRG1 im NSCLC. Hier stellt sich wiederum die Frage der Kontextabhängigkeit. Es sind nicht nur unterschiedliche Zelllinien unterschiedlicher Malignome untersucht worden, BRG1 scheint auch in beiden Malignomen gegenteilige Effekte zu besitzen. Während eine BRG1-Überexpression im HCC die Proliferation fördert (diese Arbeit, Endo et al., 2013), kommt es im NSCLC bei Verlust der BRG1-Expression zu einem pathologischen Genexpressionsmuster mit erhöhter Aggressivität der Zellen (Medina et al., 2008; Romero et al., 2012; Orvis et al., 2014). Die genaue Analyse zeigt jedoch auch in dieser Arbeit die konträre Wirkung von BRG1 für SerpinE1. Zwar ist die inverse Korrelation von SerpinE1 zu BRG1 in der Zelllinie HepG2 signifikant, jedoch kommt es in der Zelllinie HuH7 zu einer nicht signifikanten, aber dennoch ersichtlichen Suppression von SerpinE1 in den mit BRG1 spezifischer siRNA behandelten Zellen. Mögliche Erklärungsansätze bleiben derzeit nur spekulativ.

CXCL10

Ein weiteres untersuchtes Zielgen ist CXCL10 (IP 10, Interferon Gamma inducible protein 10), welches zum einen eine tumorprotektive Funktion ausüben kann (Pertl et al., 2001), zum anderen jedoch in einigen Malignomen bei vorhandener Überexpression mit einer schlechteren Prognose einhergeht. In dieser Arbeit konnte eine positive Korrelation von CXCL10 zu BRG1 eruiert werden.

Eine schlechtere Prognose bei einer Überexpression von CXCL10 ist für das Mammakarzinom, vermutlich durch Einfluss auf die Signalwege von Survivin, β -Catenin, MKP-1 (MAP Kinase Phosphatase-1) und MMP1 (Ejaeidi et al., 2015), das kolorektale Karzinom (Ming et al., 2016) und das klarzellige Nierenzellkarzinom (Liu et al., 2016) gezeigt worden.

In bekannter Literatur konnte für CXCL17, einem weiteren Mitglied der CXCL-Familie, bereits ebenfalls eine positive Korrelation zu BRG1 nachgewiesen werden (von Figura et al., 2014). Eine

damit verbundene Wirkung auf das Zellverhalten bzw. ein Effekt auf Prognose und Malignität sind bisher nicht bekannt.

Ein tumorprotektiver Effekt von CXCL10 (Pertl et al., 2001) ist für das Zervixkarzinom, vermutlich durch einen antagonistischen Effekt auf die Angiogenese, (Sato et al., 2007) als auch für das Melanom, in diesem Fall durch einen antiproliferativen und die Invasivität verhindernden Effekt, (Antonicelli et al. 2011) nachgewiesen worden.

Insgesamt lässt sich somit die in dieser Arbeit festgestellte Beziehung zwischen BRG1 und CXCL10 weitestgehend in vorhandene Literatur einordnen und erklärt möglicherweise die schlechten Überlebensraten des HCCs.

4.5.2 Tumorsuppressive Zielgene

Cyclin-dependent Kinase Inhibitoren

Auf der anderen Seite ist für BRG1 eine Modulation von Zielgenen bekannt, die einer proliferativen Funktionsweise von BRG1 widersprechen. Vielmehr unterstützen sie den tumorsuppressiven Aspekt und wachstumshemmenden Effekt von BRG1. Eine wichtige Klasse dieser Zielgene sind die Cyclin-dependent Kinase Inhibitoren. Sie hemmen über eine Interaktion mit den Cyclinen den Fortgang der Zellproliferation (Russo et al., 1996). In dieser Arbeit untersuchte Zielgene aus dieser Gen-Familie sind Cdkn2a/p16, Cdkn1b/p27 und p21. Die Analyse der Expressionsniveaus ergab für alle drei genannten Zielgene eine positive Korrelation zur BRG1-Expression. Durch den hemmenden Einfluss der CDK-Inhibitoren auf die Cyclin-Familie resultiert folglich ein wachstumshemmender Eingriff in den Zellzyklus. Dies jedoch steht in Widerspruch zum beobachteten Proliferationsrückgang in den Wachstumskurven dieser Arbeit. In der Literatur konnten für Cdkn2a/p16 (Kia et al., 2008) und p21 (Kang et al., 2004; Hendricks et al., 2004) aber u.a. gleiche Ergebnisse eruiert werden. So beschreiben Kia et al., 2008, Kang et al., 2004 und Hendricks et al., 2004 eine ebenfalls positive Korrelation beider Zielgene zu BRG1. Nach einer Arbeit von Li et al., 2013 ist jedoch ebenso eine inverse Beziehung zwischen BRG1 und p21 eruiert worden. Laut Bai et al., 2013 und Xiong et al., 2013 ist die für Cdkn1b/p27 bekannte Interaktion zu BRG1 gleichfalls von inverser Natur. Diese Datenlage widerspricht somit den in dieser Arbeit gezeigten Analysen von Cdkn1b/p27 im Kontext der BRG1-Regulation. Über den Einfluss, welchem diese unterschiedlichen Ergebnisse zugrunde liegen, kann nur spekuliert werden. Zunächst muss berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Zelllinien von teils sehr unterschiedlichen Geweben für die Analysen herangezogen wurden (HCC-Zelllinien, Mamma-Ca Zelllinien und human hair follicle bluge cells). Entscheidend ist auch der Zeitpunkt, an welchem die Expression gemessen wurde. Ist in dieser Arbeit eine Expressions-Analyse nach 40h und 111h durchgeführt worden, wählten Bai et al., 2013 und Xiong et al., 2013 für ihre Experimente den

Zeitpunkt 48h nach Transfektion. Die somit zu vergleichenden Zeitpunkte 40h und 48h nach Transfektion präsentieren wahrscheinlich, veranlasst durch die zeitlichen Nähe, keinen Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der Cdkn1b/p27 Korrelation mit BRG1 und lassen die konträren Ergebnisse weiter ungeklärt.

Die in dieser Arbeit gezeigten positiven Korrelationen von Cdkn2a/p16, Cdkn1B/p27 und p21 mit BRG1 können somit insgesamt nur teilweise in bereits bekannte Literatur eingeordnet werden.

4.6 Ausblick

Die Analyse molekularer Mechanismen in der Onkologie hat in den letzten Jahren äußerst stark an Bedeutung gewonnen. Insbesondere im Hinblick auf personalisierte Therapieoptionen birgt dieses Forschungsfeld immenses Potential für neue effektive Therapien bestimmter maligner Krankheiten.

Ein Effekt von BRG1 konnte bereits in diversen Malignomen gezeigt werden. Die bisherigen Daten liefern derzeit jedoch ein heterogenes Ergebnis und lassen keinen klaren Rückschluss auf die Wirkungsmechanismen und deren Auswirkung zu. Eine entscheidende Frage für zukünftige Forschungen wird sein, genau diese Wirkungsmechanismen von BRG1 zu entschlüsseln und zu klären, wann speziell ein proliferationsfördernder bzw. wann ein antiproliferativer Effekt von BRG1 in Malignomen zum Tragen kommt. Eine Antwort auf diese Frage würde das Verständnis der Pathogenese diverser Malignome verbessern. Neue Therapieoptionen würden sich eröffnen und könnten für unterschiedlichste Malignome von großer Bedeutung sein. Im HCC weist die Datenlage derzeit auf einen proliferationsfördernden Effekt von BRG1 hin. Wichtig wird sein, in zukünftigen Experimenten, welche den in vivo Verhältnissen näher stehen, die Ergebnisse der proliferationsfördernden und die Invasivität steigernden Wirkung durch BRG1 zu verifizieren. Hierzu sollten v.a. Experimente genutzt werden, welche mit einer dauerhaften und suffizienten BRG1-Suppression arbeiten. Hierdurch lassen sich die in dieser Arbeit gezeigten Schwankungen des Expressionsniveaus von BRG1 und den damit verbundenen wechselnden Effekten auf bestimmte Zielgene unterbinden. Dieser Recherche nach den wichtigen Zielstrukturen und Genen von BRG1, dem möglichen Schlüssel für Proliferation und Antiproliferation, kommt womöglich die bedeutendste Rolle zu. Interessant wird auch die Frage sein, welche Ursache einem BRG1-Expressionsanstieg zugrunde liegt und wann speziell sie zum Tragen kommt.

Insbesondere das große Spektrum an molekularen Mechanismen, in welche BRG1 involviert ist, birgt ein großes Potential für zukünftige Forschung. V.a. die scheinbar konträren Verhaltensweisen, sowohl proliferativ als auch antiproliferativ, gilt es genauer zu untersuchen. Lässt sich die Rolle von BRG1 im HCC zweifelsfrei eruieren, wird es wichtig sein, die gewonnen Erkenntnisse mit bereits

vorhandenen Daten in Kontext zu setzen. Gerade die bereits gut erfassten und bekannten Risikofaktoren für die Pathogenese eines HCCs könnten bei evtl. Korrelationen zur BRG1-Expression neue wichtige Erkenntnisse für die Entstehung und Aufrechterhaltung von BRG1-Expressionsveränderungen bzw. Mutationen liefern.

Möglicherweise kann zukünftig aus den gewonnenen Erkenntnissen zu BRG1 eine direkte klinische Umsetzung in Form einer medikamentösen Therapie des HCCs erfolgen.

5 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom ist ein weltweit häufig vorkommender bösartiger Tumor mit einer bis heute schlechten Überlebensrate. In der überwiegenden Mehrheit der Fälle entwickelt sich das HCC auf der Grundlage einer Leberzirrhose, die durch die Hauptrisikofaktoren einer Hepatitis-B und -C Infektion sowie übermäßigen Alkoholkonsum entsteht. Die molekularen Pathomechanismen der Hepatokarzinogenese unterliegen derzeit intensiver Forschung. Für BRG1, einer Untereinheit des Chromatin Remodeling Komplexes SWI/SNF, konnte eine Überexpression im HCC gegenüber dem tumorfreien Lebergewebe gezeigt werden. Mögliche resultierende Effekte dieser Überexpression und deren zugrunde liegenden Signalwege sind bisher jedoch nicht genauer beleuchtet worden.

Diese Arbeit liefert einen ersten Einblick in die Wirkungsweise von BRG1 im HCC und bietet darüber hinaus Erklärungsansätze für dessen Effekte. Zunächst konnte zum einen die bereits in der Literatur beschriebene erhöhte BRG1-Expression im HCC verglichen mit dem tumorfreien, überwiegend zirrhotischen Lebergewebe gleicher Patienten repliziert werden. Zum anderen folgte eine Ausweitung dieser Erkenntnis auf tumorfreies, vornehmlich gesundes Lebergewebe, welches von Patienten, die an einem extrahepatischen Primärtumor leiden, gewonnen wurde. Resultierend aus diesen Daten erfolgte eine IHC-Analyse. In dieser konnte ebenso eine deutliche Überexpression von BRG1 mit erheblicher Variation des BRG1-Expressionsniveaus in HCC-Zellen gezeigt werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse folgte schließlich die tiefergehende Analyse der Rolle von BRG1 im HCC. In diesen Experimenten konnte ein proliferationsfördernder und die Invasivität steigernder Effekt von BRG1, unabhängig in zwei verschiedenen humanen HCC-Zelllinien, für das HCC nachgewiesen werden. Auf der Suche nach möglichen Erklärungsansätzen für diese Erkenntnisse wurden verschiedene Zielgene untersucht. Die Analyse dieser Experimente zeigte eine Modulation durch BRG1 für zahlreiche Zielgene. Die Korrelation von BRG1 zu den untersuchten Genen war im Allgemeinen von positiver Natur. Aus all den untersuchten Genen konnten sowohl Genkorrelationen, die die Proliferation fördern, als auch solche, die dieser entgegenwirken, eruiert werden. Ein besonderes Augenmerk gilt hierbei den proliferationsfördernden Genen der Cyclin-Familie. In dieser Arbeit speziell untersucht wurden CyclinB1, D1 und E1. Ein weiterer Fokus liegt auf der Familie der Matrix-Metalloproteasen, welche in dieser Arbeit hinsichtlich MMP7 näher untersucht wurde. Diese Zielgene liefern einen möglichen Ansatz für das Verständnis von BRG1 als proliferationsfördernde und die Invasivität steigernde Kraft im HCC und können die verminderte Proliferationsrate und Invasivität der Zellen nach Suppression von BRG1 erklären. Vice versa begründet dieser Ansatz einen möglichen malignen Einfluss einer erhöhten BRG1-Expression im HCC. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eines proliferationsfördernden und die Invasivität steigernden Effekts als auch der positiven Korrelation zwischen BRG1 und der Cyclin-Familie sowie der MMP-Familie fügen sich in

bereits bekannte Daten bzgl. BRG1 ein, die in anderen Geweben, wie beispielsweise dem Pankreas, gewonnen wurden. Für zukünftige weitere Forschungsprojekte gilt es, die hier gewonnenen Erkenntnisse in den in vivo Experimenten zu verifizieren. Möglicherweise kann hierdurch langfristig eine medikamentöse Therapie des HCCs etabliert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Misih, S. R., Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90(4), S. 643-653
- Akerberg, B. N., Sarangam, M. L., Stankunas, K., (2015). Endocardial Brg1 disruption illustrates the developmental origins of semilunar valve disease. *Dev Biol*, 407(1), S. 158-172
- Antonicelli, F., Lorin, J., Kurdykowski, S., Gangloff, S. C., Le Naour, R., Sallenave, J. M., Hornebeck, W., Grange, F., Bernard, P. (2011) CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasiveness in vitro and in vivo. *Br J Dermatol* 164(4), S.720-728.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzinger, L. J., Zilch, H.-G. (2010). *Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Bai, J., Mei, P. J., Liu, H., Li, C., Li, W., Wu, Y. P., Yu, Z. Q., Zheng, J. N. (2012). BRG1 expression is increased in human glioma and controls glioma cell proliferation, migration and invasion in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138(6), S. 991-998.
- Bai, J., Mei, P., Zhang, C., Chen, F., Li, C., Pan, Z., Liu, H., Zheng, J. (2013). BRG1 is a prognostic marker and potential therapeutic target in human breast cancer. *PLoS One*, 8(3), e59772.
- Becker, T. M., Haferkamp, S., Dijkstra, M. K., Scurr, L. L., Frausto, M., Diefenbach, E., Scolyer, R. A., Reisman, D. N., Mann, G. J., Kefford, R. F., Rizos, H. (2009). The chromatin remodelling factor BRG1 is a novel binding partner of the tumor suppressor p16INK4a. *Mol Cancer*, 8(4), DOI: 10.1186/1476-4598-8-4.
- Bellissimo, F., Pinzone, M. R., Cacopardo, B., Nunnari, G. (2015). Diagnostic and therapeutic management of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 21(42), S. 12003-12021.
- Bilodeau, S., Vallette-Kasic, S., Gauthier, Y., Figarella-Branger, D., Brue, T., Berthelet, F., Lacroix, A., Batista, D., Stratakis, C., Hanson, J., Meij, B., Drouin, J. (2006). Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev*, 20(20), S. 2871-2886.
- Bismuth, H. (1982). Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J Surg*, 6(1), S. 3-9
- Bochar, D. A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W. S., Wang, W., Kashanchi, F., Shiekhattar, R. (2000). BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*, 102(2), S. 257-265.
- Böttger, J., Arnold, K., Thiel, C., Rennert, C., Aleithe, S., Hofmann, U., Vlaic, S., Sales, S., Shevchenko, A., Matz-Soja, M. (2015). RNAi in murine hepatocytes: the agony of choice--a study of the influence of lipid-based transfection reagents on hepatocyte metabolism. *Arch Toxicol*, 89(9), S. 1579-1588.
- Bourgo, R. J., Siddiqui, H., Fox, S., Solomon, D., Sansam, C. G., Yaniv, M., Muchardt, C., Metzger, D., Chambon, P., Roberts, C. W., Knudsen, E. S. (2009). SWI/SNF deficiency results in aberrant chromatin organization, mitotic failure, and diminished proliferative capacity. *Mol Biol Cell*, 20(14), S. 3192-3199.

- Braun, F., Becker, T., Bröring, D., Heller, M. (2012). Leber. In D. H. Bruns, *Cirurgie* (S. 460-461). 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Bruix, J., Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update (American Association for the Study of Liver Diseases). *Hepatology*, 53(3), S. 1020-1022
- Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G., Magnuson, T. (2000). A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, 6(6), S. 1287-1295.
- Bultman, S. J., Gebuhr, T. C., Magnuson, T., (2005). A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in beta-globin expression and erythroid development. *Genes Dev*, 19(23), S. 2849-2861
- Chen, J. G., Parkin, D. M., Chen, Q. G., Lu, J. H., Shen, Q. J., Zhang, B. C., Zhu, Y. R. (2003). Screening for liver cancer: results of a randomised controlled trial in Qidong, China. *J Med Screen*, 10(4), S. 204-210.
- Cheng, P., Li, Y., Yang, L., Wen, Y., Shi, W., Mao, Y., Chen, P., Lv, H., Tang, Q., Wei, Y. (2009). Hepatitis B virus X protein (HBx) induces G2/M arrest and apoptosis through sustained activation of cyclin B1-CDK1 kinase. *Oncol Rep*, 22(5), S. 1101-1107.
- Chi, T. H., Wan, M., Lee, P. P., Akashi, K., Metzger, D., Chambon, P., Wilson, C. B., Crabtree, G.R., (2003). Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity*, 19(2), S. 169-182
- Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, 299,(1-2), S. 35-55
- Cruickshank, V. A., Sroczynska, P., Sankar, A., Miyagi, S., Rundsten, C. F., Johansen, J. V. (2015). SWI/SNF Subunits SMARCA4, SMARCD2 and DPF2 Collaborate in MLL-Rearranged Leukaemia Maintenance. *PLoS One*, 10(11), e0142806.
- de'Angelis, N., Landi, F., Carra, M. C., Azoulay, D. (2015). Managements of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A systematic review. *World J Gastroenterol*, 21(39), S. 11185-11198
- Divella, R., Mazzocca, A., Gadaleta, C., Simone, G., Paradiso, A., Quaranta, M., Daniele, A. (2012). Influence of plasminogen activator inhibitor-1 (SERPINE1) 4G/5G polymorphism on circulating SERPINE-1 antigen expression in HCC associated with viral infection. *Cancer Genomics Proteomics*, 9(4), S. 193-198.
- Drebber, U., Dienes, H. P. (2006). Diagnose und Differenzialdiagnose des hepatozellären Karzinoms. *Der Pathologe*, 27(4), S. 294-299.
- Duffy, M. J., Maguire, T. M., McDermott, E. W., O'Higgins, N. (1999). Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol*, 71(2), S. 130-135
- Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., Goff, S. P. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*, 79(1), S. 119-130.
- Ejaeidi, A. A., Craft, B. S., Punecky, L. V., Lewis, R. E., Cruse, J., M. (2015) Hormone receptor-independent CXCL10 production is associated with the regulation of cellular factors linked to breast cancer progression and metastasis *Exp Mol Pathol*, 99(1), S. 163-172

- El-Serag, H. B. (2002). Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology*, 36(5), S. 74-83
- El-Serag, H. B., Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), S. 2557-2576.
- Endo, M., Yasui, K., Zen, Y., Gen, Y., Zen, K., Tsuji, K., Dohi, O., Mitsuyoshi, H., Tanaka, S., Taniwaki, M., Nakanuma, Y., Arii, S., Yoshikawa, T. (2013). Alterations of the SWI/SNF chromatin remodelling subunit-BRG1 and BRM in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 33(1), S. 105-117.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. (1983). Cyclin: protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), S. 389-396.
- Flores, A., Marrero, J. A. (2014). Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics. *Clin Med Insights Oncol*, 8, S. 71-76
- Fryer, C. J., Archer, T. K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, 393(6680), S. 88-91.
- Galun, D., Basaric, D., Zuvela, M., Bulajic, P., Bogdanovic, A., Bidzic, N., Milicevic, M. (2015). Hepatocellular carcinoma: From clinical practice to evidence-based treatment protocols. *World J Hepatol*, 7(20), S. 2274-2291.
- Geng, M., Xin, X., Bi, L. Q., Zhou, L. T., Liu, X. H. (2015). Molecular mechanism of hepatitis B virus X protein function in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 21(38), S. 10732-10738.
- Griffin, C. T., Brennan, J., Magnuson, T., (2008). The chromatin-remodeling enzyme BRG plays an essential role in primitive erythropoiesis and vascular development. *Development*, 135(3), S.493-500
- Hadem, J., Manns, M. P., Caselitz, M. (2010). Leber und intrahepatische Gallenwege. In H. Greten, F. Rinninger, T. Greten, *Innere Medizin*. 13. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hartmann, D., Srivastava, U., Thaler, M., Kleinhans, K. N., N'kontchou, G., Scheffold, A., Bauer, K., Kratzer, R. F., Kloos, N., Katz, S. F., Song, Z., Begus-Nahrman, Y., Kleger, A., von Figura, G., Strnad, P., Lechel, A., Günes, C., Potthoff, A., Deterding, K., Wedemeyer, H., Ju, Z., Song, G., Xiao, F., Gillen, S., Schrezenmeier, H., Mertens, T., Ziol, M., Friess, H., Jarek, M., Manns, M.P., Beaugrand, M., Rudolph, K.L. (2011). Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation. *Hepatology*, 53(5), S. 1608-1617.
- Hendricks, K. B., Shanahan, F., Lees, E. (2004). Role for BRG1 in cell cycle control and tumor suppression. *Mol Cell Biol*, 24(1), S. 362-376.
- Hergeth, S. P., Schneider, R. (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep*, 16(11), S. 1439-1453.
- Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, 95(5), S. 717-728.
- Horn, P. J., Peterson, C. L. (2006). Heterochromatin assembly: a new twist on an old model. *Chromosome Res*, 14(1), S. 83-94.

Hugo gene nomenclature committee

http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:11098. Von Hugo gene nomenclature committee abgerufen

IARC: International Agency for Research on Cancer, 2012, Liver Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2), S. 69–90.

Kadoch, C., Hargreaves, D. C., Hodges, C., Elias, L., Ho, L., Ranish, J., Crabtree, G. R. (2013). Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet*, 45(6), S. 592-601.

Kang, H., Cui, K., Zhao, K. (2004). BRG1 controls the activity of the retinoblastoma protein via regulation of p21CIP1/WAF1/SDI. *Mol Cell Biol*, 24(3), S. 1188-1199.

Kao, W. Y., Chao, Y., Chang, C. C., Li, C. P., Su, C. W., Huo, T. I., Huang, Y. H., Chang, Y. J., Lin, H. C., Wu, J. C. (2015). Prognosis of Early-Stage Hepatocellular Carcinoma: The Clinical Implications of Substages of Barcelona Clinic Liver Cancer System Based on a Cohort of 1265 Patients. *Medicine (Baltimore)*, 94(43), e1929.

Karanian-Philippe, M., Velasco, V., Longy, M., Floquet, A., Arnould, L., Coindre, J. M., Le Naoures-Méar, C., Averous, G., Guyon, F., MacGrogan, G., Croce, S. (2015). SMARCA4 (BRG1) loss of expression is a useful marker for the diagnosis of ovarian small cell carcinoma of the hypercalcemic type (ovarian rhabdoid tumor): a comprehensive analysis of 116 rare gynecologic tumors, 9 softtissue tumors, and 9 melanomas. *Am J Surg Pathol*, 39(9), S. 1197-1205.

Karnezis, A. N., Wang, Y., Ramos, P., Hendricks, W. P., Oliva, E., D'Angelo, E., Prat, J., Nucci, M. R., Nielsen, T. O., Chow, C., Leung, S., Kommoss, F., Kommoss, S., Silva, A., Ronnett, B. M., Rabban, J. T., Bowtell, D. D., Weissman, B. E., Trent, J. M., Gilks, C. B., Huntsman, D. G. (10. Sep 2015). Dual loss of the SWI/SNF complex ATPases SMARCA4/BRG1 and SMARCA2/BRM is highly sensitive and specific for small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type. *J Pathol*, doi: 10.1002/path.4633.

Kew, M. C. (2011). Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 26(1), S. 144-152

Khavari, P. A., Peterson, C. L., Tamkun, J. W., Mendel, D. B., & Crabtree, G. C. (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*, 366(6451), S. 170-174.

Kia, S. K., Gorski, M. M., Giannakopoulos, S., Verrijzer, C. (2008). SWI/SNF mediates polycomb eviction and epigenetic reprogramming of the INK4b-ARF-INK4a locus. *Mol Cell Biol*, 28(10), S. 3457-3464.

Kilroy, G., Burk, D. H., Floyd, Z. E. (11. Sep 2009). High efficiency lipid-based siRNA transfection of adipocytes in suspension. *PLoS One*, 4(9), e6940.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K.R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193), S.2011-2015

- Kleger, A., Mahaddalkar, P. U., Katz, S., Leche, A., Joo, J. Y., Loyall, K., Lin, Q., Hartmann, D., Liebau, S., Kraus, J. M., Cantz, T., Kestler, H. A., Zaehres, H., Schöler, H., Rudolph, K. L. (2012). Increased reprogramming capacity of mouse liver progenitor cells, Compared with differentiated liver cells, requires the BAF complex. *Gastroenterology*, 142(4), S. 907-917.
- Kornberg, R. D., Thomas, J. O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, 184(4139), S. 865-868.
- Lee, J.-S. (2015). The mutational landscape of hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol*, 21(3), S. 220-229
- Lemon, S., McGivern, D. R. (2012). Is hepatitis C virus carcinogenic? *Gastroenterology*, 142(6), S. 1274-1278
- Li, Y., Yang, X. H., Fang, S. J., Qin, C. F., Sun, R. L., Liu, Z. Y., Jiang, B. Y., Wu, X., Li, G. (2015). HOXA7 stimulates human hepatocellular carcinoma proliferation through cyclin E1/CDK2. *Oncol Rep*, 33(2), S. 990-996.
- Li, W., Xiong, Y., Shang, C., Twu, K. Y., Hang, C. T., Yang, J., Han, P., Lin, C. Y., Lin, C. J., Tsai, F. C., Stankunas, K., Meyer, T., Bernstein, D., Pan, M., Chang, C. P., (2013). Brg1 governs distinct pathways to direct multiple aspects of mammalian neural crest cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(5), S. 1738–1743
- Lin, H., Wong, R. P., Martinka, M., Li, G. (2010). BRG1 expression is increased in human cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 163(3), S. 502-510.
- Liu, W., Liu, Y., Fu, Q., Zhou, L, Chang, Y., Xu, L., Zhang, W., Xu, J., (2016). Elevated expression of IFN-inducible CXCR3 ligands predicts poor prognosis in patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*, Feb 17. doi: 10.18632/oncotarget.7468
- Llovet, J. M., Burroughs, A., Bruix, J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362(9399), S. 1907-1917
- Lüllmann-Rauch, R., Asan, E. (2015). *Histologie*. 5. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Ma, Z., Chang, M. J., Shah, R., Adamski, J., Zhao, X., Benveniste, E. N. (2004). Brg-1 is required for maximal transcription of the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem*, 279(44), S. 46326-46334.
- McKenna, E. S., Roberts, W. C. (2009). Epigenetics and cancer without genomic instability. *Cell Cycle*, 8(1), S. 23-26.
- Medina, P. P., Romero, O.A., Kohno, T., Montuenga, L.M., Pio, R., Yokota, J., Sanchez Cespedes M. (2008). Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 29(5), S.617-622
- Medina, P. P., Sanchez-Cespedes, M. (2008). Involvement of the chromatin-remodeling factor BRG1/SMARCA4 in human cancer. *Epigenetics*, 3(2), S. 64-68
- Mehta, G., Kumarasamy, S., Wu, J., Walsh, A., Liu, L., Williams, K., Joe, B., de la Serna, I. L. (2015). MITF interacts with the SWI/SNF subunit, BRG1, to promote GATA4 expression in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 88, S. 101-110.

- Ming, B., Xi., Yi, B., (2016). CXCL10/CXCR3 overexpression as a biomarker of poor prognosis in patients with stage II colorectal cancer. *Mol Clin Oncol*, 4(1), S. 23-30.
- Mohrmann, L., Verrijzer, C. P., (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1681(2-3), S. 59-73
- Muchardt, C., Yaniv, M. (2001). When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene*, 20(24), S. 3067-3075
- Murphy, D. J., Hardy, S., Engel, D. A. (1999). Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol Cell Biol*, 19(4), S. 2724-2733.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), S. 703-716.
- Orvis, T., Hepperla, A., Walter, V., Song, S., Simon, J., Parker, J., Wilkerson, M. D; Desai, N., Major, M. B., Hayes, D. N., Davis, J. J., Weissman, B. (2014). BRG1/SMARCA4 inactivation promotes non-small cell lung cancer aggressiveness by altering chromatin organization. *Cancer Res*, 74(22), S. 6486-6498.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2), S. 74-108
- Pertl, U, Luster A. D., Varki, N. M., Homann, D., Gaedicke, G., Reisfeld, R. A., Lode H. N. (2001). IFN-gamma-Inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol*, 166(11), S. 6944-6951.
- Peterson, C. W., Tamkun, J. W. (1995). The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci*, 20(4), S. 143-146.
- Phelan, M. L., Sif, S., Narlikar, G. J., Kingston, R. E. (1999). Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell*, 3(2), S. 247-253.
- Piper, W. (2013). *Innere Medizin*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Pons, F., Varela, M., Llovet, J. M. (2005). Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, 7(1), S. 35-41.
- Remmele, W., Stegner, H. E. (1987). Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogenreceptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*, 8(3), S. 138-140.
- Riede, U. N., Freudenberg, N., Werner, M. (2009). *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Romero, O. A., Setien, F., John, S., Gimenez-Xavier, P., Gómez-López, G., Pisano, D., Condom, E., Villanueva, A., Hager, G. L., Sanchez-Cespedes, M. (2012). The tumour suppressor and chromatin-remodelling factor BRG1 antagonizes Myc activity and promotes cell differentiation in human cancer. *EMBO Mol Med*, 4(7), S. 603-616.

- Romero, O. A., Torres-Diz, M., Pros, E., Savola, S., Gomez, A., Moran, S., Saez, C., Iwakawa, R., Villanueva, A., Montuenga, L. M., Kohno, T., Yokota, J., Sanchez-Cespedes, M. (2014). MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov*, 4(3), S. 292-303.
- Roy, N., Malik, S., Villanueva, E., Urano, A., Xinyuan, L., Von Figura, G., Scott Seeley, E., Dawson, D. W., Collisson, E. A., Hebrok, M. (2015). Brg1 promotes both tumor-suppressive and oncogenic activities at distinct stages of pancreatic cancer formation. *Genes Dev*, 29(6), S. 658–671.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, 382(6589), S. 325-331
- Saladi, S. V., Keenen, B., Marathe, H. G., Qi, H., Chin, K. V., de la Serna, I. L. (2010). Modulation of extracellular matrix/adhesion molecule expression by BRG1 is associated with increased melanoma invasiveness. *mol Cancer*, 9, S. 280.
- Sato, E., Fujimoto, J., Toyoki, H., Sakaguchi, H., Alam, S. M., Jahan, I., Tamaya, T. (2007). Expression of IP-10 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Br J Cancer*. 96(11), 1735–1739.
- Sastre, J., Díaz-Beveridge, R., García-Foncillas, J., Guardado, R., López, C., Pazo, R., Rodriguez-Salas, N., Salgado, M., Salud, A., Feliu, J. (2015). Clinical guideline SEOM: hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Oncol*, 17(12), S. 988-995
- Schmidt, R. F., Lang, F., Heckmann, M. (2010). *Physiologie des Menschen*. 31. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Markus Voll, K. W. (2009). *Prometheus LernAtlas der Anatomie*. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Sentani, K., Oue, N., Kondo, H., Kuraoka, K., Motoshita, J., Ito, R., Yokozaki, H., Yasui, W. (2001). Increased expression but not genetic alteration of BRG1, a component of the SWI/SNF complex, is associated with the advanced stage of human gastric carcinomas. *Pathobiology*, 69(6), S. 315-320.
- Sgarra, R., Rustighi, A., Tessari, M.A., Di Bernardo, J., Altamura, S., Fusco, A., Manfioletti, G., Giancotti V. (2004). Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS LETT*, 574(1-3): 1-8
- Shanahan, F., Seghezzi, W., Parry, D., Mahony, D., Lees, E. (2013). Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *PLoS One*, 8(3), e59772.
- Shi, J., Whyte, W. A., Zepeda-Mendoza, C. J., Milazzo, J. P., Shen, C., Roe, J. S., Minder, J. L., Mercan, F., Wang, E., Eckersley-Maslin, M. A., Campbell, A. E., Kawaoka, S., Shareef, S., Zhu, Z., Kendall, J., Muhar, M., Haslinger, C., Yu, M., Vakoc, C. R. (2013). Role of SWI/SNF in acute leukemia maintenance and enhancer-mediated Myc regulation. *Genes Dev*, 27(4), S. 2648-2662 weitere Autoren eintragen.
- Siegel, A. B., Zhu, A. X. (2009). Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link. *Cancer*, 115(24), S. 5651-5661

- Singal, A. G., Conjeevaram, H. S., Volk, M. L., Fu, S., Fontana, R. J., Askari, F., Su, G. L., Lok, A. S., Marrero, J. A. (2012). Effectiveness of hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(5), S. 793-7999.
- Singal, A., Volk, M. L., Waljee, A., Salgia, R., Higgins, P., Rogers, M. A., Marrero, J. A. (2009). Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 30(1), S. 37-47
- Smith, C. L., Horowitz-Scherer, R., Flanagan, J. F., Woodcock, C. L., Peterson, C. L. (2003). Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat Struct Biol*, 10(2), S. 141-145.
- Smith-Roe, S. L., Nakamura, J., Holley, D., Chastain, P. D., Rosson, G. B., Simpson, D. A., Ridpath, J. R., Kaufman, D. G., Kaufmann, W. K., Bultman, S. J. (2015). SWI/SNF complexes are required for full activation of the DNA-damage response. *Oncotarget*, 6(2), S. 732-745.
- Stankunas, K., Hang, C. T., Tsun, Z. Y., Chen, H., Lee, N. V., Wu, J. I., Shang, C., Bayle, J. H., Shou, W., Ireuela-Arispe, M. L., Chang, C. P., (2009). Endocardial Brg1 represses ADAMTS1 to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis. *Dev Cell*, 14(2), S. 298-311
- Stotz, M., Gerger, A., Haybaeck, J., Kiesslich, T., Bullock, M. D., Pichler, M. (2015). Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma: Past, Present and Future. *Anticancer Res*, 35(11), S. 5737-5744
- Sun, A., Tawfik, O., Gayed, B., Thrasher, J. B., Hoestje, S., Li, C., Li, B. (2007). Aberrant expression of SWI/SNF catalytic subunits BRG1/BRM is associated with tumor development and increased invasiveness in prostate cancers. *Prostate*, 67(2), S. 203-213.
- Sutherland, F., Harris, J. (2002). Claude Couinaud: a passion for the liver. *Arch Surg*, 137(11), S. 1305-1310
- Tabrizian, P., Roayaie, S., Schwartz, M. E. (2014). Current management of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 20(30), S. 10223-10237.
- Torkamandi, S., Moghbeli, M., Farshchian, M., Rad, A., Abbaszadegan, M. R. (2014). Role of Brg1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Iran J Basic Med Sci*, 17(11), S. 912-917.
- Totoki, Y., Tatsuno, K, Covington, K. R., Ueda, H., Creighton, C. J., Kato, M., Tsuji, S., Donehower, L. A., Slagle, B. L., Nakamura, H., Yamamoto, S., Shinbrot, E., Hama, N., Lehmkuhl, M., Hosoda, F, Arai, Y., Walker, K., Dahdouli, M., Gotoh, K., Nagae, G., Gingras, M. C., Muzny, D. M., Ojima H., Shimada, K., Midorikawa, Y., Goss, J. A., Cotton, R., Hayashi, A., Shibahara, J., Ishikawa, S., Guiteau, J., Tanaka, M., Urushidate, T., Ohashi, S., Okada, N., Doddapaneni, H., Wang, M., Zhu, Y., Dinh, H., Okusaka, T., Kokudo, N., Kosuge, T., Takayama, T., Fukayama, M., Gibbs, R. A., Wheeler, D. A., Aburatani, H., Shibata, T. (2014). Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 46(12), S. 1267-1273.
- Trotter, K. W., Archer, T. K. (1. Februar 2008). The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal*, 6:e004. doi: 10.1621/nrs.06004.
- Tu, Z., Zhuang, X., Yao, Y. G., Zhang, R. (2013). BRG1 is required for formation of senescence-associated heterochromatin foci induced by oncogenic RAS or BRCA1 loss. *Mol Cell Biol*, 33(9), S. 1819-1829.

- von Figura, G., Fukuda, A., Roy, N., Liku, M. E., Morris, I. J., Kim, G. E., Russ, H. A., Firpo, M. A., Mulvihill, S. J., Dawson, D. W., Ferrer, J., Mueller, W. F., Busch, A., Hertel, K. J., Hebrok, M. (2014). The chromatin regulator Brg1 suppresses formation of intraductal papillary mucinous neoplasm and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cell Biol*, *16*(3), S. 255-267.
- Wagener, C., Müller, O. (2010). *Molekulare Onkologie*. 3. Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
- Waidely, E., Al-Yuobi, A. R., Bashammakh, A. S., El-Shahawi, M. S., Leblanc, R. M. (2016). Serum protein biomarkers relevant to hepatocellular carcinoma and their detection. *Analytist*, *141*(1), S. 36-44
- Wang, W., Côté, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P. A., Biggar, S. R., Muchardt, C., Kalpana, G. V., Goff, S. P., Yaniv, M., Workman, J. L., Crabtree, G. R. (1996). Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J*, *15*(19), S. 5370-5382.
- Watanabe, T., Semba, S., & Yokozak, i. H. (2011). Regulation of PTEN expression by the SWI/SNF chromatin-remodelling protein BRG1 in human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer*, *104*(1), S. 146-154.
- Wilson, B. G., Roberts, C. W. (2011). SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev*, *11*(7), S. 481-492.
- Wilsker, D., Probst, L., Wain, H. M., Maltais, L., Tucker, P. W., Moran, E. (2005). Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics*, *86*(2), S. 242-251
- Wong, A. K., Shanahan, F., Chen, Y., Lian, L., Ha, P., Hendricks, K., Ghaffari, S., Iliev, D., Penn, B., Woodland, A. M., Smith, R., Salada, G., Carillo, A., Laity, K., Gupte, J., Swedlund, B., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., Lees, E. (2000). BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res*, *60*(21), S. 6171-6177.
- Wu, Q., Madany, P., Akech, J., Dobson, J. R., Douthwright, S., Browne, G., Colby, J. L., Winter, G. E., Bradner, J. E., Pratap, J., Sluder, G., Bhargava, R., Chiosea, S. I., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., Lian, J. B., Nickerson, J. A., Imbalzano, A. N. (2015). The SWI/SNF ATPases Are Required for Triple Negative Breast Cancer Cell Proliferation. *J Cell Physiol*. *230*(11), S. 2683-26894.
- Xiong, Y., Li, W., Shang, C., Chen, R. M., Han, P., Yang, J., Stankunas, K., Wu, B., Pan, M., Zhou, B., Longaker, M. T., Chang, C. P. (2013). Brg1 governs a positive feedback circuit in the hair follicle for tissue regeneration and repair. *Dev Cell*, *25*(2), S. 169-181.
- Yan, Z., Cui, K., Murray, D. M., Ling, C., Xue, Y., Gerstein, A., Parsons, R., Zhao, K., Wang, W. (2005). PBAF chromatin-remodeling complex requires a novel specificity subunit, BAF200, to regulate expression of selective interferon-responsive genes. *Genes Dev*. *19*(14). S. 1662-1667
- Yu, M. W., Lien, J. P., Chiu, Y. H., Santella, R. M., Liaw, Y. F., Chen, C. J. (1997). Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *J Hepatol*, *27*(2), S. 320-330.
- Zhang, B., Chambers, K. J., Faller, D. V., Wang, S. (2007). Reprogramming of the SWI/SNF complex for co-activation or co-repression in prohibitin-mediated estrogen receptor regulation. *Oncogene*, *26*(50), S. 7153-7157.

Zhang, B., Zhang, H., Wang, D., Han, S., Wang, K., Yao, A., Li, X. (2014). Never in mitosis gene A-related kinase 6 promotes cell proliferation of hepatocellular carcinoma via cyclin B modulation. *Oncol Lett*, 8(3), S. 1163-1168.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kaufmann B, Wang B, Zhong S, Laschinger M, Patil P, Lu M, Assfalg V, Cheng Z, Friess H, Hüser N, von Figura G, Hartmann D, (2017) BRG1 Promotes Hepatocarcinogenesis by Regulating Proliferation and Invasiveness, PLoS One, 12(7):e0180225