

# Hepatozelluläre Karzinome

Ludwig Wilkens, Brigitte Schlegelberger

Institut für Zell- und Molekular-  
pathologie  
Medizinische Hochschule Hannover

## Zusammenfassung

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) gehören weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren. Als auslösende Faktoren sind Hepatitis B und Hepatitis C-Virusinfektionen, Aflatoxine und Alkoholabusus seit langem bekannt. Durch CGH-Analysen an mittlerweile mehr als 400 HCC konnten Zugewinne in 1q, 6p, 7p, 7q, 8q, 17q und X sowie Verluste in 4q, 6q, 8p, 16p, 16q und 17p als typische chromosomale Imbalancen definiert werden. Die häufigsten molekulargenetischen Veränderungen führen zu Alterationen der Zellzykluskontrolle und der p53-, WNT- und JAK/STAT-Signalwege. Mikroarrayanalysen haben erste Einblicke in das globale Genexpressionsprofil unterschiedlicher Typen von HCC vermittelt und werden in Zukunft zu einem besseren Verständnis der Tumorigenese führen.

## Summary

Hepatocellular carcinomas are among the most frequent malignant tumors worldwide. Hepatitis B and hepatitis C viral infections, aflatoxins and misuse of alcohol have long been known to be inducing factors. By means of CGH-analyses on more than 400 HCC, gains of 1q, 6p, 7p, 7q, 8q, 17q and X as well as losses of 4q, 6q, 8p, 16p, 16q and 17p could be defined as typical chromosomal imbalances. The most frequent molecular changes lead to alterations of the cell cycle control and to alterations of the p53, WNT and JAK/STAT pathways. Microarray analyses have given the first comprehensive insight into the global gene expression profile of different types of HCC and will in future lead to a better understanding of their tumorigenesis.

## Keywords

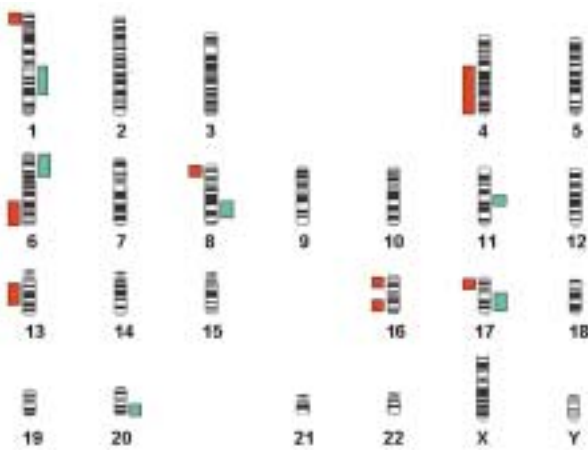
Hepatozelluläre Karzinome – HCC – CGH – LOH – AXIN1 – SOCS-1 – P53 – WNT – Mikroarray

## Einleitung

Weltweit erkranken jedes Jahr circa 1 Millionen Menschen an einem hepatozellulären Karzinom (HCC). Die Inzidenz des HCC schwankt von ca. 3% aller Malignome in Mitteleuropa und bis zu 60% in Teilen Südafrikas. Wesentliche ätiologische Faktoren sind Hepatitis B- und Hepatitis C-Virusinfektionen, Alkohol sowie die Aflatoxine in verdorbenen Nahrungsmitteln (1). Selten werden HCC durch eine Hämochromatose ausgelöst. Ätiologisch wirkt bei allen Faktoren ein lang andauernder entzündlicher Reiz.

Im allgemeinen äußern sich hepatozelluläre Karzinome mit unspezifischen Symptomen. Zumeist werden sie erst in einem späten Stadium erkannt. Die Diagnostik stützt sich zunächst auf die bildgebenden Verfahren der Sonografie und Computertomografie. Die endgültige Diagnose bleibt der histopathologischen Beurteilung von Aspirations- oder Stanzbiopsien der Leber vorbehalten.

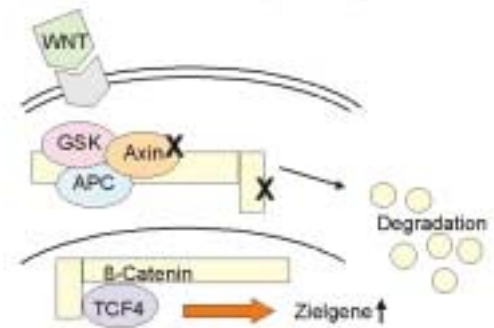
Die Prognose des HCC ist äußerst schlecht. Die 2 Jahres-Überlebensrate liegt bei 5-22%. Die vollständige chirurgische Resektion des Tumorknotens, eventuell mit anschließender Lebertransplantation, ist nur selten möglich. Ein neuer Therapieansatz ist die percutane oder arterielle Applikation von Äthanol in den Tumor. Mit diesem Verfahren konnte allerdings keine Verlängerung des Gesamtüberlebens erreicht werden.



**Abb 1** Typische chromosomale Imbalancen hepatozellulärer Karzinome

Grüne Balken rechts neben den Chromosomen zeigen Regionen, in denen gehäuft Zugewinne, rote Balken links neben den Chromosomen zeigen Regionen, in denen gehäuft Verluste beschrieben sind

Alterations of the WNT-pathway in HCC



**Abb 2** Schema des WNT-Signalwegs

In hepatozellulären Karzinomen treten gehäuft Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen *CTNNB1* und im *AXIN1*-Gen auf, die die Degradation von  $\beta$ -Catenin verhindern und zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und konstitutiven Aktivierung der TCF4-Zielgene führen. (nach H. Clevers, Nature Genet. 24:207, 2000)

### Fragestellung

Bisher beruht die Diagnose des Hepatozellulären Karzinoms fast ausschließlich auf der Morphologie. Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen haben einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese Hepatozellulärer Karzinome geleistet. Es stellt sich die Frage, ob diese Erkenntnisse für eine genetische Subtypisierung und eine prognostische Beurteilung der HCC genutzt werden können, und inwieweit sich aus diesen Erkenntnissen neue gentherapeutische Behandlungsstrategien ableiten lassen.

### Zytogenetische Veränderungen

Aufgrund der geringen Proliferationsrate der Tumorzellen in vitro ist eine Karyotypisierung beim HCC kaum möglich. In den letzten 10 Jahren wurden weniger als 20 karyotypisierte primäre HCC oder HCC-Zelllinien beschrieben. Dabei waren wiederkehrend die Chromosomenregionen 1q, 4q, 6q, 8p, 8q, 16p, 17p und 17q von Aberrationen betroffen (2). Durch LOH-Analysen wurde der wiederkehrende Verlust der Regionen 1p36, 4q28, 6q, 8p11-21, 8q21-24, 16p11, 17p13 und 17q11 bestätigt (3).

Mit der Einführung der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) wurde die Darstellung genetischer Imbalancen auch ohne die Anzüchtung von Tumorzellen möglich. Mittlerweile wurden CGH-Untersuchungen in mehr als 400 HCC beschrieben. Als häufigste Aberrationen zeigten sich Zugewinne in 1q, 6p, 7p, 7q, 8q, 17q

und X sowie Verluste in 4q, 6q, 8p, 16p, 16q und 17p (Abbildung 1) (4).

Durch genomische Mikroarray-Analysen an einem kommerziell erhältlichen cDNA-CHIP mit 57 Onkogenen identifizierten Takeo et al. (5) Amplifikationen der *CCND1*-, *FGF3/4*-, *SAS/CDK4*-, *TERC*-, *MET*- und *MYC*-Gene. Die parallel durchgeführte CGH zeigte einen Zugewinn der entsprechenden Chromosomenregionen. Innerhalb dieser Regionen ließ sich durch die Mikroarray-Analyse eine unterschiedlich starke Amplifikation einzelner Gene, z.B. von *CCND1* und *FGF3/4* in 11q13, nachweisen. Dies unterstreicht das höhere Auflösungsvermögen genomischer Microarrays im Vergleich zur CGH.

### Molekulargenetische Veränderungen

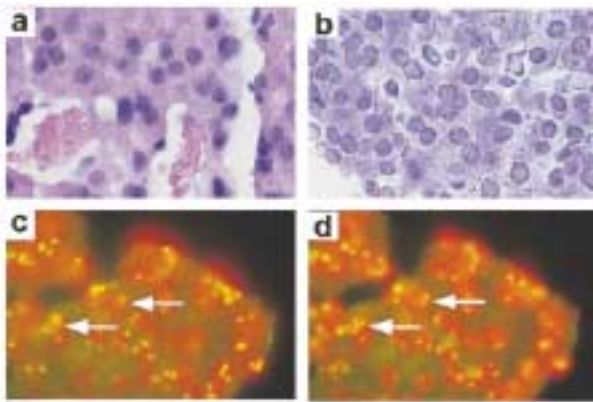
#### P53

Durch Aflatoxine induzierte HCC zeigen gehäuft Punktmutationen im Codon 249 des *P53*-Gens (1). *P53* bewirkt u.a. eine Hemmung der Cyclin D1-induzierten Zellzyklusprogression am Übergang von der G1 in die S-Phase. Auch andere Komponenten dieses Signalwegs zeigen gehäuft Veränderungen in HCC. *p16*, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase *CDK4*, wird in HCC durch Punktmutationen, eine aberrante Methylierung oder durch Deletionen inaktiviert. Cyclin D1 wird in primären HCC und HCC-Zelllinien häufig überexprimiert. Im transgenen Mausmodell konnte die Bedeutung der Cyclin D1-Überexpression für die Karzinogenese des HCC bestätigt werden.

In der Chromosomenregion 17p13, in der das *P53*-Gen lokalisiert ist, treten gehäuft chromosomale Verluste auf. Es ist jedoch nicht geklärt, ob diese chromosomalen Verluste regelmäßig zu einer Inaktivierung des *P53*-Gens führen. Als ein weiteres, in 17p13 lokalisiertes Tumorsuppressorgen wurde vor kurzem das *HCCS1*-Gen beschrieben (6). Es wird in HCC biallelisch, durch sog. Loss of heterozygosity auf dem einen Allel und durch Punktmutationen bzw. Methylierung auf dem anderen Allel, inaktiviert.

### WNT-Signalweg

In ca 80% der HCC lässt sich immunphänotypisch eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin nachweisen. Mutationen im für  $\beta$ -Catenin kodierenden *CTNNB1*-Gen treten deutlich seltener, in ca. 20% der HCC, auf.  $\beta$ -Catenin ist eine zentrale Komponente des WNT-Signalwegs, der in der Embryogenese physiologischerweise an der Ausrichtung der Körperachse beteiligt ist: Nach Bindung des Wnt/ Wingless Liganden an den membranständigen Frizzled Rezeptor wird die Degradation von  $\beta$ -Catenin unterbunden, es transloziert in den Kern und verwandelt den transkriptionellen Repressor TCF4 in einen transkriptionellen Aktivator (Abb. 2). Die Degradation von  $\beta$ -Catenin wird durch einen Komplex aus APC, Axin und GSK vermittelt. Mutationen von *CTNNB1* treten bevorzugt an Stellen auf, die für die Degradation wichtig sind. Die Überexpression von  $\beta$ -Catenin kann in HCC auch durch inaktivierende Mutationen von *AXIN1* hervorgerufen werden. Nach adenoviralem Gentransfer von Wild-



**Abb 3**  
**Histologisches Bild eines HCC in einer Leberbiopsie**

In der HE-Färbung (a) eine geringe Unregelmäßigkeit der Zellkerne und eine leichte Verschiebung der Kern-Plasma-Relation. In der Versilberung (b) eine beginnende Auflösung des Retikulinfasernetzes. Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung mit einer Zentromer-spezifischen Sonde für das Chromosom 8 zeigt in den meisten Zellen zusätzliche Signale. Durch Drehen am Feintrieb (c und d) sind die Signale in verschiedenen Fokussierebenen sichtbar.

typ *AXIN1* wird das Tumorwachstum gehemmt und die Apoptose der Tumorzellen ausgelöst.

#### **JAK-STAT-Signalweg**

SOCS-1 (alternativ JAB, SSI-1) ist ein negativer Regulator des JAK/STAT-Signalwegs und unterbricht die durch Zytokine vermittelte Signalweitergabe. In 65% der untersuchten primären HCC ließ sich eine aberrante Methylierung von *SOCS-1* identifizieren (8). Sie führt zu einer konstitutiven Aktivierung von JAK2. Nach Transfektion von Wildtyp *SOCS-1* und durch den chemischen JAK2-Inhibitor AG490 wurde in HCC-Zelllinien das Tumorstromwachstum gehemmt und die Apoptose induziert.

#### **Diagnostische Bedeutung zytogenetischer und molekular-genetischer Veränderungen**

Obwohl die dargestellten zytogenetischen Veränderungen mit hoher Regelmäßigkeit beim HCC auftreten, sind sie nicht spezifisch für diese Tumorart. Vielmehr finden sich diese chromosomalen Imbalancen in wechselnder Kombinationen auch in zahlreichen anderen Tumoren. Unabhängig davon können sie jedoch diagnostisch genutzt werden: Durch die in situ-Hybridisierung an histologischen Schnitten oder an zytologischen Präparaten lassen sich mehrere klonale numerische Chromosomenaberrationen in HCC eindeutig nachweisen und schließen ein Adenom weitgehend aus (Abbildung 3). Besonders hilfreich ist die in situ-Hybridisierung bei der histologisch oft schwierigen Abgrenzung des gut differenzierten

HCC von benignen Neoplasien wie dem hepatocellulären Adenom und reaktiven Läsionen (9).

#### **Prognostische Bedeutung zytogenetischer und molekular-genetischer Veränderungen**

Bisher gibt es keine gesicherten Erkenntnisse über die prognostische Bedeutung zytogenetischer oder molekular-genetischer Veränderungen beim HCC. Weder für das histologische Grading noch für die Subtypisierung in die pseudoglanduläre, trabekuläre, scirröse und fibrolamelläre Variante ließen sich genetische Marker identifizieren. Allerdings zeigen HCC in nicht-zirrhatischen Lebern eine höhere Zahl chromosomaler Imbalancen als HCC in Zirrhoselebern (1). Zugewinne in 6p, 11q, 20q und X sollen mit der Tumorgroße, Verluste von 13q und Zugewinne von 8q mit einer schlechten, Amplifikationen von 8q21 mit einer guten Differenzierung assoziiert sein. Sowohl Überexpressionen von  $\beta$ -Catenin als auch Mutationen des *CTNNB1*-Gens deuten auf einen ungünstigen klinischen Verlauf hin. Diese Daten stammen aus retrospektiven Analysen und müssen im Rahmen prospektiver multizentrischer Studien überprüft werden.

#### **Diskussion und Ausblick**

Zytogenetische und molekular-genetische Untersuchungen sind heute nur selten integraler Bestandteil der Diagnostik des HCC. Lediglich die in situ-Hybridisierung zum Nachweis klonaler Chromosomenaberrationen

wird in schwierig abgrenzbaren Fällen zur Differentialdiagnostik zwischen hepatocellulären Adenomen und Karzinomen herangezogen. In der letzten Zeit wurden Tumorsuppressorgene, die bei der Entwicklung von HCC eine Rolle spielen, entdeckt und Alterationen des G1/S-Checkpoints, des WNT- und des JAK/STAT-Signalwegs als typische molekulare Veränderungen des HCC identifiziert. Es gibt erste Hinweise, dass diesen molekularen Veränderungen prognostische Bedeutung zukommt.

Mithilfe der Microarray-Technik, die es ermöglicht, in einem Untersuchungsansatz die Expression tausender von Genen zu analysieren, wurden mittlerweile viral und nicht-viral induzierte HCC untersucht. Gene für den leberspezifischen Stoffwechsel und die Leberzell-Differenzierung, für die Apoptose und die Zellzyklusregulation waren in ihrem Expressionsniveau verändert. Interessanterweise unterscheiden sich durch Hepatitis B- und durch Hepatitis C-Virus induzierte HCC in ihrem Expressionsprofil (10). Die transkriptionell veränderten Gene sind in Chromosomenregionen lokalisiert, die in HCC häufig amplifiziert oder deletiert sind, so dass Chromosomenaberrationen die veränderte Genexpression erklären könnten. Mikroarray- und Proteomanalysen werden in nächster Zukunft einen neuen, umfassenden Einblick in die Karzinogenese der HCC geben. Es bleibt abzuwarten, ob neue gentherapeutische Behandlungskonzepte, z.B. die adenovirale Transfektion von Axin1, oder die Gabe des JAK2-Inhi-

bitors AG490 klinische Anwendung finden werden.

#### Korrespondenzadresse

PD Dr. med. Ludwig Wilkens  
 Prof. Dr. med. Brigitte Schlegelberger  
 Institut für Zell- und Molekularpathologie  
 Medizinische Hochschule Hannover  
 Carl-Neuberg-Strasse 1  
 30625 Hannover, Germany  
 Tel. +49-511-532-4517  
 Fax +49-511-532-4521  
 wilkens.ludwig@mh-hannover.de

#### Literatur

1. Ozturk M: p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 338:1356-1359, 1991
2. Bardi G, Johansson B, Pandis N, Heim S, Mandahl N, Andren SA, Hagerstrand I, Mitelman F: Cytogenetic findings in three primary hepatocellular carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 58:191-195, 1992
3. Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Capron F, Schmitz A, Olschwang S, Thomas G: Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer Res* 57:1986-1990, 1997
4. Wilkens L, Bredt M, Flemming P, Kubicka S, Klempnauer J, Kreipe H: Cytogenetic aberrations in primary and recurrent fibrolamellar hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Am J Clin Pathol* 114:867-874, 2000
5. Takeo S, Arai H, Kusano N, Harada T, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Hirano T, Yoshida T, Okita K, Sasaki K: Examination of oncogene amplification by genomic DNA microarray in hepatocellular carcinomas: comparison with comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 130:127-132, 2001
6. Zhao X, Li J, He Y, Lan F, Fu L, Guo J, Zhao R, Ye Y, He M, Chong W, Chen J, Zhang L, Yang N, Xu B, Wu M, Wan D, Gu J: A novel growth suppressor gene on chromosome 17p13.3 with a high frequency of mutation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61:7383-7387, 2001
7. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y: AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature Genet* 24:245-250, 2000
8. Yoshikawa H, Matsubara K, Quian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris C, Herman JG: SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth suppression activity. *Nature Genet* 28:29-35, 2001
9. Wilkens L, Bredt M, Flemming P, Schwarze Y, Becker T, Klempnauer J, Kreipe H: Diagnostic impact of fluorescence in situ hybridisation in the differentiation of hepatocellular adenoma and well differentiated hepatocellular carcinoma. *J Mol Diagn* 3:68-73, 2001
10. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y: Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 61:2129-2137, 2001