Aus der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie am Abdominalzentrum
der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Tobias Goeser

Neighbor of Punc E11 als potentieller Biomarker für das humane hepatozelluläre Karzinom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

vorgelegt von
Senait Mesghenna
geboren in Asmara (Eritrea)

promoviert am 13.03.2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. T. Goeser
2. Berichterstatterin: Frau Privatdozentin Dr. rer. Nat. M. Odenthal

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die als fremde Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistung von Dr. med. Dirk Nierhoff (Projektleiter) erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer/s Promotionsberaters/in in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 02.10.2012

Senait Mesghenna

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. med. Dirk Nierhoff von mir selbst ausgeführt worden. Dabei wurde ich von der medizinisch-technischen Assistentin Gisela Holz unterstützt.

Abkürzungsverzeichnis

- Abb. Abbildung
- AFP Alpha Feto Protein
- AIH autoimmune Hepatitis
- AK Antikörper
- AL Adulte Leber
- AASLD American Association for the Study of Liver Diseases
- AMA Antimitochondrien Antikörper
- ANA Antinucleäre Antikörper
- ANCA Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
- APS Ammoniumperoxidsulfat
- ASMA Antikörper gegen glatte Muskulatur
- BCLC Barcelona Clinic Liver Cancer
- bzw. beziehungsweise
- °C Grad Celsius
- CD95 Cluster of Differentiation 95
- chron. chronisch
- CLIP-Scor Cancer of Liver Italian Program
- CT Computer Tomographie
- Ct-Wert Cycle Theshold
- DaG Donkey anti Goat
- DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DCC Deleted in Colorectal Cancer
- DMEM Dulbecco´s Modified Eagle Medium
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- E-Cadherin Epitheliales Cadherin
- EASL European Association for the Study of Liver
- FDA Food Drug Administration
- g Gramm

- GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- h Stunde
- HBV Hepatitis B Virus
- H2O Wasser
- HCC Hepatozelluläres Karzinom
- HCV Hepatitis C Virus
- HDV Hepatitis-D-Virus
- HFE Hemochromatosis Feder
- HGF Hepatocyte growth factor
- HPRT Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
- IGF2 Insuline-like growth Factors 2
- IGFR1 Insuline-like growth Rezeptor
- IgG Immunglobulin G
- IH Immunhistochemie
- kDa Kilodalton
- LKM-1 Antikörper gegen mikrosomales Antigen
- Min. Minute
- ml Milliliter
- mRNA Messenger-Ribonukleinsäure
- MRT Magnetresonanztomografie
- mtDNA mitochondriale DNA
- NaOH Natriumhydroxid
- NASH Nonalcoholic Steatohepatitis
- NEAA Non-Essential Amino Acid
- nm Nanometer
- NOPE Neighbor of Punc E11 (human)
- Nope Neighbor of Punc E11 (Maus)
- pAK primärer Antikörper
- PAA-Gel Polyacrylamid-Gel
- PBC primär biliäre Zirrhose

- PSC primär sklerosierende Cholangitis
- PUNC putative neuronal cell adhesion molecule
- RKI Robert-Koch-Institut
- RNA Ribonucleic Acid
- ROS reaktive Sauerstoffspezies
- RT Raumtemperatur
- s. siehe
- sAK sekundärer Antikörper
- SDS Natriumdodecylsulfat
- SDS-PAGE Natriumdodecyl-Polyacrylamid Gelelektrophorese
- Sek. Sekunde
- SLA lösliches Leberantigen
- STAT-3 Signal Transduction and Activator of Transcription 3
- TED Tris-EDTA-DTT-Puffer
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
- TNF Tumornekrosefaktor
- TNM Tumor-lymphnode-metastasis
- Tris Tris-hydroxymethyl-aminomethan
- u.a. unter anderem
- UpM Umdrehungszahl pro Minute
- vs. versus
- WHO World Health Organisation
- α Alpha
- µg Mikrogramm
- µl Mikroliter
- µM Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis
1. Einleitung 1

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) 1
1.2 Epidemiologie 1
1.3 Risikofaktoren für das HCC....3
1.3.1 Unbeeinflussbare Risikofaktoren für ein HCC 4
1.3.2 Risikofaktor Leberzirrhose 11
1.3.3 Risikofaktoren für ein HCC in einer nicht-zirrhotischen Leber....11
1.4 Screening des HCC 12
1.5 Diagnostik 13
1.6 Stadieneinteilung des HCC Therapieoptionen des HCC....13
1.7 Aktueller Stellenwert von Biomarkern bei Screening, Diagnose und Prognosedes HCC 17

2. Neighbor of Punc E11 (NOPE) 24

2.1 Vorarbeiten zu Nope 24
2.2 Fragestellung und Arbeitshypothese....25

3. Material und Methoden 27

3.1 Material 27
3.1.1 Medien-und Reagenzien-lösungen 27
3.1.2 Kits....28
3.1.3 Primer und Antikörper 28
3.1.4 Zur Analyse verwendete Geräte 29
3.1.5 Labormaterialien 30
3.2 Methoden....31
3.3 Hepatomazelllinien....31
3.3.1 Zellkultivierung 31
3.3.2 Quantitative Bestimmung der Genexpression von NOPE in humanen Zellen 32
3.3.2.1 RNA-Extraktion mittels Qiagen RNeasy Minikit....33

3.3.2.2 Reverse Transkriptase-cDNA-first Strand Synthese mittels Super-Script TmIII 34
3.3.2.3 Real Time PCR (RT-PCR mit SYBRGreen Master Mix) 36
3.3.3 Proteinbestimmung und Western Blot-Analyse.....38
3.3.3.1 Proteinextraktionen mittels SDS-Lysepuffer.....38
3.3.3.2 Elektrophoretischen Trennungen mittels SDS-PAGE und Immunoblot 39
3.3.3.3 Prinzip und Durchführung der Gel-Elektrophorese 40
3.3.3.4 Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran 41
3.3.3.5 Immundetektion der Proteine.....42
3.3.4 Immunhisto-/zytochemie-Verfahren 43
3.3.4.1 Prinzip und Durchführung der Immunhistochemie 43
3.3.4.2 Prinzip der Immunhisto-/zytochemischen Kofärbung 44

4. Ergebnisse.....45

4.1 Humane Hepatoma-Zelllinien.....45
4.1.1 Quantitative RT-PCR 45
4.1.2 Western Blot 47
4.1.3 Immunzytochemische-Kombinationsfärbung der Hepatom Zelllinie.....49
4.2 Zusammenfassung: Hepatoma-Zelllinien.....52
4.3 HCC-Patientenleberproben.....53
4.3.1 Gesamtüberblick der untersuchten Proben.....53
4.3.2 Quantitative RT-PCR der HCC-Proben.....57
4.3.2.1 NOPE-Expression ausgewählter Proben (linear und logarithmisch) ..60
4.3.3 Klinische Daten der HCC-Patienten mit NOPE-positiven HCC Proben .65
4.3.4 Western Blot der HCC-Proben.....67
4.3.5 Immunhistochemie der HCC-Proben 70
4.4 Zusammenfassung: Humane HCC- Proben.....72

5. Diskussion.....73

6. Zusammenfassung.....85

7. Literaturverzeichnis.....87

8. Anhang.....100

8.1 Publikationen 100
8.2 Poster 100
8.3 Abbildungsverzeichnis 101
8.4 Tabellenverzeichnis 103

9. Lebenslauf 104

1. Einleitung

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das HCC ist ein Tumor mit rascher Progredienz und limitierten Therapiemöglichkeiten. Es stellt weltweit, neben dem Lungen- und dem Kolonkarzinom, eine der häufigsten tumorassoziierten Todesursachen dar[27][74][94][99].

Während das HCC mit einer hohen Mortalitätsrate einhergeht, fehlen nach wie vor geeignete HCC-Tumormarker vor allem zur Erfassung der frühen Stadien. Die Prognose des HCC könnte entscheidend verbessert werden, wenn die Detektion in einem frühen Stadium gelingen würde. Da zurzeit geeignete Biomarker zur Früherkennung eines HCCs fehlen, ist dieses bei Diagnosestellung häufig weit fortgeschritten und somit in mehr als 40% der Fälle nicht mehr kurativ behandelbar. Die aktuell eingesetzten Screeningmethoden, d.h. die Kombination von Sonographie und Messung des AFP-Anstiegs im Serum, weisen nur eine Sensitivität von 65% auf, so dass ca. 35% der HCCs nicht erfasst werden können[36][64].

Daher beschäftigten sich in der Vergangenheit und gegenwärtig viele wissenschaftliche Arbeitsgruppen mit der Erforschung und Etablierung neuer Biomarker. Neuesten Ergebnissen zufolge konnten bis jetzt einige Tumor-, Früherkennungs- und Prognosemarker (s. Abschnitt 1.7) identifiziert werden. Jedoch erfüllt keiner dieser Marker die Eigenschaften eines “idealen Markers”, so dass weitere Forschung nach sensitiven und spezifischen Tumormarkern, die in den frühesten Stadien der HCC-Pathogenese entstehen, notwendig ist.

1.2 Epidemiologie

Das HCC ist weltweit eine der häufigsten Malignome und steht bezüglich der Inzidenz an fünfter Stelle der malignen Tumorerkrankungen. Die HCC-

assoziierten Todesursachen rangieren weltweit sogar an dritter Stelle[32][122]. Obwohl in den letzten Jahren viele neue therapeutische Ansätze entwickelt wurden, stieg die Fünf-Jahres Überlebensrate nur um ca. 5%[91].

Epidemiologischen Studien zufolge wurde in den letzten 25 Jahren in verschiedenen westlichen Ländern (Nordamerika, Europa) eine Zunahme der HCC-Inzidenz und Mortalität beobachtet. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden die HCC-Neuerkrankungen pro Jahr auf 500.000-1.000.000 geschätzt. Es wird prognostiziert, dass sich in den nächsten 10 - 20 Jahren sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität verdoppeln wird[9][27][73][90].

Das HCC weist hinsichtlich der Inzidenz, Prävalenz und der Ätiologie sowie der Geschlechts- und Altersverteilung deutliche geographische Unterschiede auf. Während global gesehen jährlich über 1 Million Neuerkrankungen auftreten, beträgt die Inzidenz in Europa und Nordamerika zwischen 5,8 und 9,8 pro 100 000 Einwohner. Die Prävalenz ist bei Männern bis zu zehnmal höher als bei Frauen. Das HCC zählt weltweit bei Männern zu den fünf häufigsten Karzinomen (6,2% aller Malignome), bei Frauen zu den acht häufigsten bösartigen Tumoren (2,6% aller Malignome).

Ätiologisch ist der Alkoholabusus in den westlichen industrialisierten Ländern Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines HCC. Hierbei stellt die auf dem Boden einer durch Alkoholmissbrauch toxisch geschädigten Leber entstehende Zirrhose den häufigsten Grund für die Entstehung des HCC dar. Nur 15-20% aller HCCs entstehen ohne vorherige Zirrhose[19].

In den so genannten Hochrisikogebieten (Südostasien, Südafrika) erkennt man ein noch höheres Auftreten (bis zu 150/100 000 Einwohner). Im Gegensatz zu den westlichen industrialisierten Ländern steht aber in diesen endemischen Gebieten (Südostasien, Subsahara) hauptsächlich die virale Genese (chronische Hepatitiden B, C und D) im Vordergrund[26][27][32][122]. Dabei betrifft die Hepatitis B-Infektion zwar alle Teile der Welt, die Prävalenz in Asien und Afrika ist jedoch besonders hoch. Nach Angaben der WHO haben ca. 2 Milliarden Menschen eine Hepatitis B Infektion durchgemacht. Dies entspricht 5-7% der gesamten Weltbevölkerung. Während Patienten in Europa mit einer HBV-assoziierten Leberzirrhose ein jährliches Risiko von bis zu 2,2% haben tragen, ein HCC zu entwickeln, beträgt die HBV-assoziierte HCC-Entstehung in

den Entwicklungsländern über 40%[32][64]. Neben der Hepatitis B-Infektion spielt auch die Infektion mit Hepatitis C eine entscheidene Rolle als Ursache für eine Zirrhose. Nach epidemiologischen Angaben des RKI weisen 120 bis 170 Millionen Menschen (ca. 2-3% der Weltbevölkerung) eine HCV-Infektion auf. Den neuesten Daten zufolge wird angenommen, dass ein Anstieg des HCC auch in den westlichen Ländern im Zusammenhang mit der Zunahme der chronischen HCV-Infektionen steht. Im Hinblick auf mögliche Folgeerkrankungen der chronischen Hepatitis C wird angenommen, dass weltweit 27% aller Fälle eine Leberzirrhose entwickeln. 25 % aller HCC-Fälle sind auf HCV-Infektion zurückzuführen[1][9][40][109][122]. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer Leberzirrhose bzw. eines Leberkarzinoms sind die hereditäre Hämochromatose, der insulinresistente Diabetes mellitus, Autoimmun-, Fettleberhepatitis (NASH), sowie andere Stoffwechselerkrankungen (z.B. Morbus Wilson, α_1-Antitrypsinmangel). Darüber hinaus haben statistische Untersuchungen in den USA ergeben, dass bei ¼ der HCC-Patienten keine dieser prädisponierenden Faktoren nachzuweisen sind[42].

Im Bezug auf das Erkrankungsalter sind ebenfalls regionale Unterschiede zu verzeichnen. Der Altersgipfel der HCC-Patienten in den tropischen Regionen liegt zwischen der dritten und vierten, in den Industrieländern durchschnittlich innerhalb der fünften bis siebten Lebensdekade[26][71][99].

1.3 Risikofaktoren für das HCC

Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms können zusammenfassend nach beeinflussbaren (Infektionen, Alkohol, Toxine) und nicht beeinflussbaren (z.B. Geschlecht, Alter, Genetik) Faktoren unterschieden werden.

1.3.1 Unbeeinflussbare Risikofaktoren für ein HCC

Zu den prädisponierenden unbeeinflussbaren Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC werden das Geschlecht und das Alter gezählt. Das HCC zeigt in fast allen Populationen eine deutliche geschlechtsabhängige Verteilung. So erkran-

ken Männer in Europa und Nordamerika drei- bis viermal häufiger als Frauen. Neben dem männlichen Geschlecht ist das auch das Alter ein wichtiger Risikofaktor. Während in Europa meist ältere Menschen unter HCC leiden, sind in Regionen mit hoher Prävalenz (Asien, Afrika) auch schon jüngere Erwachsene betroffen. Es wird daher angenommen, dass ein höheres Lebensalter (Europa, USA) möglicherweise nur Ausdruck einer länger andauernden chronischen Lebererkrankung ist[9][27][28][92][91].

1.3.2 Risikofaktor Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist, unabhängig von der Ätiologie, grundsätzlich der bedeutendste Risikofaktor bei der Entwicklung eines HCC. Ursachen der Leberzirrhose können chronisch virale Infektionen, chronisch einwirkende toxische Noxen, bestimmte metabolische oder autoimmunbedingte Lebererkrankungen sein. Das HCC entwickelt sich bei 60-90% aller Patienten auf dem Boden einer Leberzirrhose[32][40]. Die Zirrhose ist das Resultat ätiologisch verschiedener chronischer Lebererkrankungen, die zur histologischen Zerstörung der Leberarchitektur führen. Diese zeigt sich durch entzündliche Fibrose und Ausbildung bindegewebiger Septen in den periportalen Zonen der Leberläppchen. Bei fortlaufender Progression kommt es zur Ausbildung von Regeneratknoten und zirrhotischem Umbau der Leber.

1.3.2.1 Ätiologien der Leberzirrhose

Hepatitis-B-Virus (HBV)

Der Verlauf einer HBV-Infektion kann zwischen inapparent, chronisch, akut oder fulminant variiert. Im Falle eines chronischen Verlaufes kann bei etwa 15% der Patienten eine HBV-assoziierte Leberzirrhose entstehen[28]. Dadurch steigt auch das Risiko, eine HCC zu entwickeln. HBV ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, das zur Familie der Hepadnaviren gehört. Zudem ist das HB-Virus in der Lage, sich in die DNA des Wirtes zu integrieren. Als Pathomechanismus der HBV-assoziierten Zirrhose wird eine immunreaktive Schädigung angenommen, die durch eine gegen Virusbestandteile gerichtete T-Zell-assoziierte Immunreaktion entsteht[32]. Folgen sind genetische Veränderungen (Insertionsmutationen, Translokationen), die zu chromosomaler Instabilität und Dysfunktion wie

Blockade von Tumor-Suppressor-Genen führen[25]. In einigen Arbeiten wurde die entscheidende Rolle des HBV-Protein X bei der HCC-Entwicklung beschrieben[5][25]. Das Protein X besitzt eine Regulationsfunktion bei der Transkription und hat Einfluss auf die Signaltransduktion (IGF2, IGFR1) der Wirt-Gene. Das HBX-Protein bindet an den p53-Tumorsupressor und hemmt seine Transaktivierung und somit seine Funktion. Dadurch wird die Expression von Genen, die bei DNA-Reparaturmechanismen, Apoptose oder der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, verhindert. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression von Protein X mit Fas und Fas-Liganden besteht. Durch die Veränderung der Oberflächen-Antigene der Leberzellen kann der Mechanismus der Apoptose umgangen werden. Das heißt, es kann zu einer ungehinderten Proliferation der Zellen kommen, was wiederum die Entstehung eines HCCs auslösen kann[5][25][32][120].

Hepatitis-D-Virus (HDV)

Hepatitis D besitzt den gleichen Infektionsweg wie das Hepatitis B Virus. HDV ist ein defektes Virus mit einem viroidähnlichen einsträngigen, zirkulären RNA Genom, an welches das Hepatitis-Delta-Antigen gebunden ist. Das HDV-Genom kann zwar unahbhängig von HBV replizieren, aber für seine Infektiösität benötigt es die Hüllproteine des Hepatitis-B-Virus. Die HDV-Infektion tritt somit nur zusammen mit einer HBV-Infektion als Simultan (HDV/HBV)- oder Superinfektion auf. Das klinische Krankheitsbild und der Krankheitsverlauf sind abhängig von der Art der Infektion. Im Falle einer Superinfektion verläuft diese häufig fulminanter und führt schneller zur Leberzirrhose und/ oder HCC[27][28][85][92].

Hepatitis-C-Virus (HCV)

Eine akute HCV-Infektion ist durch eine sehr hohe Rate der Chronifizierung ausgezeichnet. Liegt eine chronische Hepatitis C vor, entwickelt sich bei ca. einem Drittel der Patienten nach 20–25 Jahren eine Leberzirrhose. Die Leberzirrhose ist ein Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC. Bei 2–5% der Patienten mit einer HCV-assoziierten Leberzirrhose ist jährlich mit der Entwicklung eines HCC zu rechnen. Der Mechanismus der HCV-induzierten Leberzellkarzinogenese ist nicht vollständig bekannt. Jedoch ist ein beschleunigter Verlauf dieser Erkrankung unter bestimmten Bedingungen zu finden. Neben der HCV-Viruslast werden eine Infektion nach dem 40. Lebensjahr und

das männliche Geschlecht genannt[99]. Zudem spielen andere Faktoren, wie z.B. Alkoholabusus, Übergewicht, Vorliegen einer Steatosis hepatis, Diabetes mellitus, Koinfektionen mit HBV und HIV eine wichtige Rolle. Untersuchungen zufolge wird angenommen, dass das HCV bestimmte Onkogene aktiviert bzw. Tumorsupressorgene inaktivieren kann. Bei HCV handelt es sich um ein RNA-Virus, welches im Gegensatz zum HBV nicht in der Lage ist, sich in das humane Wirtsgenom zu integrieren. Es konnte in einigen neueren Studien bewiesen werden, dass das HC-Virus die Expression apoptoseassoziierter Proteine wie z.B. den Fas/Fas-Ligand, CD95 und auch TNF heraufreguliert und dadurch die Hepatozyten-Apoptose induziert wird. Zusätzlich wird die Apoptose der T-Zellen vermittelt, was die Immunabwehr des Organismus schwächt und zur Persistenz der HCV-Infektion führt[7][36][37][85].

Alkohol

Neben der Hepatitis-B- und -C-Infektion ist die äthyltoxische Leberzirrhose der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC. In Deutschland werden über 60% aller chronischen Lebererkrankungen durch Alkohol verursacht und/oder durch Alkohol bedeutend verstärkt[125]. Zu den alkoholinduzierten Leberkrankheiten werden die alkoholische Fettleber (ASH), Alkoholhepatitis und die Leberzirrhose gezählt. Vor der Entstehung einer Leberzirrhose entwickelt sich häufig eine ASH, die bei strikter Alkoholabstinenz regressiv ist. Die alkoholbedingte Leberzirrhose korreliert positiv mit der Entwicklung eines HCC. Die Entstehung des HCC durch Alkohol läuft in mehreren Stadien ab. Studien zufolge scheint pathophysiologisch das Azetaldehyd, der erste Metabolit von Ethanol, eine entscheidende Rolle zu spielen. Azetaldehyd führt zur Aktivierung von Lebermakrophagen (Kupfer-Sternzellen). Dadurch kommt es zur Sekretion von bestimmten Proteinen, die in der Lage sind, andere Zellen (z. B. die Itozellen) so zu verändern, dass diese verstärkt Kollagene bilden. Dies führt zu einer sukzessiven Leberschädigung und zur Entstehung einer Leberzirrhose, die als eine Vorstufe des HCCs gilt. Schreitet diese weiter fort, kann es zu einem Untergang von Lebergewebe mit Entstehung einer Leberzirrhose kommen[68]. Die Verträglichkeit und die Folgeschäden von Alkohol sind individuell unterschiedlich und hängen u.a. von möglichen Vorerkrankungen, genetischen Variationen und vom Geschlecht ab. Die Kombination mehrerer Risikofaktoren

führt zu einer Potenzierung des HCC-Risikos[68]. Einige Studien belegen, dass bei Patienten mit einer vorbestehenden HCV-Infektion der zusätzliche Alkoholkonsum das, durch die Infektion bereits bestehende, Risiko für die Entwicklung eines HCC verdoppelt. Ein solcher synergetischer Effekt wurde ebenfalls bei gleichzeitiger HBV-Infektion, Stoffwechselkrankheiten sowie Übergewicht gezeigt[37][42][71][91].

NASH (Nicht-alkoholische Steatohepatitis)

Auch eine Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) kann zu einer Zirrhose führen, welche, wie bereits erwähnt, einen wichtigen Risikofaktor bei der Entwicklung eines HCC darstellt. Der genaue Entstehungsmechanismus der NASH ist weiterhin ungeklärt. Nach dem derzeitigen Forschungsstand ist die NASH eine chronische, auf immunologischen Faktoren und Stoffwechselstörungen basierende Leberentzündung, die durch eine vermehrte Fetteinlagerung in die Hepatozyten gekennzeichnet ist. Hierbei kann es zu Zellballonierung mit Zelluntergang kommen, was wiederum langsam progredient zu einer Leberfibrose und schließlich zu einer Leberzirrhose führt. Studien aus den USA, Japan und Europa zufolge wird die NASH-Inzidenz auf 10%-25% geschätzt und gehört somit zu den häufigsten Leberpathologien. Es wird erwartet, dass zukünftig das HCC vermehrt auf diese Ursache zurückgeführt werden wird. Zudem muss erwartet werden, dass die gegenwärtige Epidemie der Adipositas in USA und Europa zu einer weiteren Zunahme der Prävalenz der NASH führen wird[13].
Als prädisponierende Ursachen bei der Entwicklung einer NASH werden, neben der bereits erwähnten Adipositas, beispielsweise auch Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie gezählt. Zusätzlich können in seltenen Fällen Nebenwirkungen einiger Medikamente eine ursächliche Rolle spielen. In einem Teil der Fälle geht man davon aus, dass bei genetischer Prädisposition die mitochondriale DNA (mtDNA) vorgeschädigt ist, wodurch die Atmungskette beeinträchtigt wird und infolge dessen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden. ROS können zu einer veränderten zellulären Membranfluidität führen und dadurch die Funktion membranständiger Enzyme z. B. in der Atmungskette stören. Somit führt die Atmungskette zu einer vermehrten ROS-Bildung, wodurch die mtDNA geschädigt wird und Funktionen wie die ß-Oxidation der Fettsäuren und die Zellatmung gehemmt werden. Durch die gehemmte Zellatmung

kommt es zum vermehrten Zelluntergang mit der Folge der Leberfibrose bzw. -zirrhose[38][40][51].

Hämochromatose

Hämochromatose ist eine Stoffwechselkrankheit, bei der die physiologische Eisenregulation gestört ist. Es kommt zu einer starken, nicht dem Bedarf angepassten Erhöhung der interstinalen Eisenresorption. Die Hämochromatose zählt zu den häufigsten genetischen Stoffwechselkrankheiten und wird nach derzeitigem Wissensstand in vier Typen unterschieden. In Deutschland ist jedoch fast nur der Typ 1, welcher dem autosomal-rezessiven Erbgang folgt, von Bedeutung, da die übrigen Typen hinsichtlich der Häufigkeit eine untergeordnete Rolle einnehmen. Die Prävalenz der Erkrankung ist in Nordeuropa häufiger als in Südeuropa. Es wird angenommen, dass ca. 0,5 % der nordeuropäischen Bevölkerung von dieser Erkrankung betroffen sind. Männer erkranken hierbei etwa 10-mal häufiger als Frauen. Als Ursache für die Entstehung dieser Stoffwechselkrankheit sind einige Genmutationen bekannt, wobei die Mutations-Varianten C282Y und H63D des HFE-Gens (Chromosom 6) am häufigsten vorkommen (vor allem bei der nordeuropäischen Bevölkerung). Über 80% der aller Patienten weisen eine C282Y-Mutation des Hämochromatose-Gens auf. Unbehandelt kann die Hämochromatose zur erheblich vermehrten Kumulation von Eisen in den Parenchymzellen der Leber führen mit daraus resultierenden toxischen Schädigungen und Funktionsstörungen der Hepatozyten (Pankreas, Herz, Gonaden u.a.). Mit Fortschreiten der Erkrankung kann dies über die Stadien Siderose, Fibrose und Zirrhose zu einem HCC führen. Dies ist bei ca. 30% der Patienten der Fall. Insgesamt haben Hämochromatose-Patienten gegenüber der Allgemeinbevölkerung ein um mehr als das Hundertfach erhöhte Risiko für die HCC-Entwicklung[29][113][117][124].

Morbus Wilson

Bei M. Wilson handelt sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Speicherkrankheit, die zu einer progredienten Kupferakkumulation und somit zur toxischen Schädigung insbesondere der Leber und des ZNS führt. Die Prävalenz beträgt 3/100.000. Das Wilson-Gen (ATP7B) liegt auf Chromosom 13. Patienten mit M. Wilson weisen eine Mutation in diesem Gen auf (das häufigste defek-

te Gen ist H1069Q). Dieses kodiert ein ATP-abhängiges Kupfertransportprotein im Trans-Golgi-System. Durch diesen Defekt ist das Kupfer-Transportprotein im Golgiapparat von Hepatozyten gestört. Kupfer kann somit nicht mehr aus dem Zytosol in das trans-Golgi-Kompartment, das für die Kopplung an Apo-Coeruloplasmin zuständig ist, gelangen. Infolge dessen tritt eine verminderte Sekretion von Coeruloplasmin und ein gestörter intrazellulärer Transport von Kupfer zur Galle auf. Diese verminderte hepatobiliäre Ausscheidung von Kupfer führt zu einer Kupferakkumulation in den Hepatozyten und somit zur Zellschädigung[34][40].

Autoimmune Lebererkrankungen

Unter dem Begriff “autoimmune Lebererkrankungen” wird eine Gruppe von chronischen Hepatopathien zusammengefasst, die durch Autoimmunität entstehen. Hierzu gehören die autoimmune Hepatitis (AIH), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), die primär biliäre Zirrhose (PBC) sowie das sogenannte Überlappungssyndrom. Die Ursachen und genauen Mechanismen dieser Gruppen sind bisher nicht eindeutig geklärt. Allen gemeinsam ist, dass diese nach Jahren zur Entwicklung einer Leberzirrhose und folglich zum HCC führen können.

Autoimmunhepatitis (AIH)

Eine frühzeitige Diagnosestellung der AIH ist essentiell, da die unbehandelte AIH zu einer Leberzirrhose und zu einem HCC führen kann. AIH ist eine akute oder chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, von der Frauen wesentlich häufiger (3-4-mal) betroffen sind als Männer[23]. Die AIH werden je nach Konstellation der Autoantikörper in eine AIH Typ 1, 2 oder 3 klassifiziert, wobei Typ 1 am häufigsten vertreten ist. Die Erkrankung tritt mit zwei Altersgipfeln auf, welche zwischen dem 20 und 30. sowie dem 50. und 70. Lebensjahr liegen. Die Pathogenese der Erkrankung ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Jedoch konnten Studien zeigen, dass bei den meisten Erkrankten bestimmte Oberflächen-Antigene, wie z.B. HLA-DR-3, DR-4 und HLA-B8, auf den Leukozyten exprimiert werden, welche bei der Pathogenese vermutlich eine Rolle spielen. Zudem wird diskutiert, ob bestimmte bakterielle und virale Antigene, wie z.B. Salmonellen, Hepatitis A, B, C und D oder auch Masern- und Herpesviren als

Induktoren der AIH in Frage kommen. Außerdem wird angenommen, dass Umwelttoxine eine wichtige Rolle spielen[2][23][116].

Primär Biliäre Zirrhose (PBC)

Ätiologisch weiterhin bedeutsam ist die primär biliäre Zirrhose (PBC). Sie betrifft in 90% der Fälle Frauen. Die Prävalenz beträgt 25-42 /100.000 Einwohner. Die PBC ist eine autoimmune Lebererkrankung, die durch eine Entzündung der kleinen und mittelgroßen Gallengänge in der Leber gekennzeichnet ist. Beim Fortschreiten der Erkrankung können die Gallengänge destruktiv verändert werden, so dass daraus schließlich eine Leberzirrhose entsteht. Histologisch zeigt sich eine Gallengangsdestruktion und -fibrose. Unbehandelt geht die PBC innerhalb von ca. 10 Jahren in eine komplette Leberzirrhose über. Bei fortgeschrittener Erkrankung wird eine Lebertransplantation als letzte Therapiemöglichkeit gesehen[23][96][116].

Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die PSC ist eine chronisch-cholestatische Lebererkrankung unbekannter Ätiologie, die im Gegensatz zur PBC in über 70% der Fälle Männer zwischen dem 25. bis 40. Lebensjahr betrifft. Die Prävalenz beträgt ca. 9-13/100.000 Einwohner[23]. Hierbei kommt es zu einer bindegewebigen Ummauerung der extra- und intrahepatischen Gallenwege, wodurch diese obliterieren und zugrunde gehen können. Dabei kann die PSC schubförmig verlaufen und allmählich über eine Fibrose in eine Leberzirrhose übergehen. Das mediane Überleben ab der Diagnosestellung von bereits symptomatischen Patienten beträgt ca. 12 Jahre[123]. Obwohl die Ätiologie weiterhin unklar ist, konnte in einigen Forschungsergebnissen gezeigt werden, dass verschiedene Konstellationen als auslösende Faktoren eine Rolle spielen können. Demnach wird angenommen, dass neben der genetischen Prädisposition und exogenen Toxinen auch bestimmte Endotoxine von Darmbakterien beteiligt sind. Dadurch wird die Produktion von TNF-alpha gesteigert, was wiederrum zur Leberschädigung führt. Zusätzlich wird eine Assoziation mit dem Vorhandensein bestimmter Histokompatibilitätsantigene (HLA-B8, HLA-DR3, HLA-DR52a) diskutiert. Die PSC ist bei über 80% der betroffenen Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmkrankheit assoziiert. Bei Patienten im

Endstadium ist die Lebertransplatation die einzige effektive therapeutische Option[23][96][116][123].

1.3.3 Risikofaktoren für ein HCC in einer nicht-zirrhotischen Leber

HBV

Die chronische HBV-Infektion kann in bis zu 20% der Fälle ohne Zirrhose zum HCC führen. Studien zeigen, dass abhängig von Populationsgruppen, Expositionsalter und Geschlecht die HCC-Entstehung ohne das Vorhandensein einer vorherigen Zirrhose häufiger variiert[87]. Untersuchungen belegen, dass die jährliche Inzidenz von HCC ohne Anwesenheit einer Leberzirrhose, unabhängig von der jeweiligen Aktivität der Erkrankung, in Südostasien häufiger bei jüngeren Patienten (im Alter etwa von 40 Jahre) beobachtet wird. Insbesondere sind hierbei die männlichen Hepatitis-B-Träger gefährdet. Zudem spielen andere Kofaktoren, wie z. B. eine bestehende Aflatoxin-Exposition eine Rolle. Solche Kofaktoren potenzieren die Möglichkeit der Entstehung von HCC[77][80]. Während hepatozelluläre Karzinome in Leberzirrhosen im Rahmen von Screenings häufig früh diagnostiziert werden, bleiben HCC in nichtzirrhotischer Leber lange asymptomatisch und weisen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine erhebliche Größe auf. Deshalb sollten Männer, vor allem aus den Hochrisikogebieten in ein Kontrollprogramm eingeschlossen werden[12][19].

Aflatoxin

Die Vergiftung durch von Aspergillus Pilzen produziertem Aflatoxin (Mykotoxin AFB1) ist besonders in Entwicklungsländern (Zentral- und Südafrika, Südostasien) ein Risikofaktor. Hinsichtlich der geographischen Verteilung besteht in den oben genannten Regionen ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Aflatoxinen über kontaminierte Lebensmittel und dem Auftreten vom primären Leberkarzinom. Die Ursache liegt oft in der Kontamination von Körnern, Erdnüssen, Baumwollbäumen sowie Sonnenblumensamen. Einige Studien an Tiermodellen haben gezeigt, dass Aflatoxin einen stark kanzerogenen Effekt für die Entstehung eines Leberkarzinoms aufweist. AFB1 ruft Veränderungen im Erbgut und Mutationen im p53-Tumorsupressorgen hervor[42][89]. In

Regionen mit hoher Prävalenz von viralen Hepatitiden (vor allem durch HBV-Infektion) ist das Vorkommen von HCC durch AFB1 stark erhöht. Studien zeigen, dass die Aflatoxin-Exposition, verbunden mit einer HBV-Infektion, die Entstehung eines HCC stark beschleunigt[11][33][45].

1.4 Screening des HCC

Das Hauptziel des Screenings ist, ein sich eventuell entwickelndes HCC in einem frühen Stadium zu diagnostizieren, in dem der Tumor noch kurativ behandelt werden kann. Der Unterschied zwischen Screening und Früherkennung liegt darin, dass beim Screening eine große Population asymptomatische Menschen untersucht werden, während sich die Früherkennung ausschließlich auf bestimmte Risikogruppen bezieht. Daher sollte das HCC-Screening sinnvollerweise bei Patienten veranlasst werden, die ein erhöhtes HCC-Risiko haben und sich für eine potentiell kurative Therapie (Resektion, Transplantation) eignen[12][77][101][118]. Entsprechend den Empfehlungen sollen u.a. alle infolge chronischer HBV/HCV-Infektion oder Alkoholabusus zirrhotischen Patienten in engmaschige Screenings eingeschlossen werden[12]. Ein ebenfalls deutlich erhöhtes HCC-Risiko haben Patienten mit chronischer Hepatitis B ohne Leberzirrhose und einer hohen Viruslast. Als Screeningverfahren eignet sich die Lebersonographie. Der Ultraschall hat dabei eine Sensitivität von 50-85 % und ermöglicht eine schnelle und nicht invasive Darstellung des Leberparenchyms, wobei das Ergebnis stark von den Erfahrungen des Untersuchers und der Qualität der zur Verfügung stehenden Geräte abhängt[48]. Mit Hilfe einer randomisierten Studie konnte ein besseres Überleben der Patienten durch 6 vs. 12-monatliche Screeningintervalle gezeigt werden. Daher empfiehlt es sich, bei den oben genannten Risikogruppen alle sechs Monate eine Lebersonographie durchzuführen[48]. Alpha-Fetoprotein (AFP) wird als alleiniger Screeningmarker nicht mehr verwendet[12]. Die Kombination beider Screening-Methoden (Sonographie und AFP) kann die Sensitivität allerdings erhöhen[11][16][57][72].

1.5 Diagnostik

Das HCC ist ein Primärtumor der Leber. Im Anfangsstadium finden sich klinisch meist keine spezifischen Symptome, sondern lediglich die Symptome der meist zugrunde liegenden chronischen Lebererkrankung. In dieser Phase ist mit bildgebenden Methoden (Ultraschall, CT) ein Nachweis kaum möglich. Als Zeichen der Dekompensation können Aszites, Ikterus, Enzephalitis sowie Ösophagus-Varizenblutung auftreten. 40% der Patienten mit HCC zeigen jedoch keine klinischen Auffälligkeiten im Frühstadium, was eine rechtzeitige Diagnose erschwert[11]. Das HCC hat also, wie fast alle malignen Prozesse, ein langes “undetektierbares” Vorstadium. Besteht aber ein begründeter Verdacht auf ein HCC (Raumforderung und/oder AFP-Erhöhung), muss dieser weiter abgeklärt werden. Die primäre HCC-Diagnostik umfasst neben der Anamnese und körperlichen Untersuchung den Child-Pugh-Status, die AFP-Bestimmung und die Sonografie. An den vorgesehenen Therapieoptionen orientierend wird die endgültige Diagnose mit diversen bildgebenden Verfahren ergänzt. Neben der KM-Sonographie, werden kontrastverstärkte Schnittbildverfahren wie CT, 3-Phasen-Spiral-CT und/ oder MRT verwendet. Alle Verfahren können dabei mit leicht unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität fokale Läsionen in der Leber nachweisen. Zudem wird in der Regel eine histologische Sicherung angeschlossen[56]. Auf diese kann allerdings verzichtet werden, wenn z. B. die Befunde der bildgebenden Verfahren eindeutig sind, oder vor geplanter Operation (Resektion, Lebertransplantation) oder bei aussichtsloser Therapieoption[56]. Zur Stadieneinteilung und individuellen Therapieentscheidung werden zudem Röntgenthoraxaufnahme in zwei Ebenen sowie gegebenenfalls ein CT-Thorax und eine Hepatitisserologie durchgeführt. Ist die Diagnose HCC gestellt, erfolgt eine Einstufung und Prognoseevaluation.

1.5.1 Stadieneinteilung des HCC

Die Stadieneinteilung des HCCs erfolgt anhand verschiedener Klassifikationen und dient dazu, eine stadiengerechte Therapie einzuleiten. Hierfür existieren verschiedene Staging-Systeme (TNM-Klassifikation, Child-Pugh-Klassifikation,

OKUDA, CLIP-Score und BCLC-Score)[12][62]. Neben der Größe des Primärtumors und der Histologie werden, eventuell vorhandene Gefäßinvasionen, das Stadium der Leberzirrhose und der damit verbundene Schweregrad der Leberfunktionsstörung berücksichtigt. Zudem werden die Anzahl der Tumorherde als prozentualer Anteil des Leberbefalls beachtet und das Staging und Grading durchgeführt. Auf der Grundlage des UICC-TNM-Systems kann das HCC in Tumorstadien I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IVA, IVB eingeteilt werden. Dabei wird das T-Stadium in der aktualisierten Auflage durch das Fehlen oder Vorliegen einer Gefäßinvasion differenziert[115]. Zudem wird die Multizentrizität des Tumors ergänzt. Beide Faktoren (Gefäßinvasion, Multizentrizität), werden als wesentliche prognostische Parameter angesehen. Demnach weisen T1-Tumore keine Gefäßinvasion auf. Bei T2-Tumoren ist diese (oft nur mikroskopisch) bereits nachweisbar. T3-Tumoren zeigen einen Befall größerer Blutgefäße. Tumore mit Perforation des viszeralen Peritoneums oder direktem Befall von Nachbarorganen werden als T4-Tumoren klassifiziert. Bedingt durch die bestehenden Sreening-Programme und die besseren gegenwärtigen diagnostischen Methoden kann das HCC, heute, in einem frühren Stadium erkannt werden als es in der Vergangenheit möglich war. Aus diesem Grund wurden die Einteilungen optimiert und aktualisiert[98]. Die BCLC-Stadieneinteilung ist das derzeit in den meisten Zentren verwendete Staging-System (durch AASLD und EASL empfohlen). Weitere existierende Scores komplettieren zum Teil die BCLC-Einteilung, während andere Einteilungen wieder verlassen wurden. Diejenigen Scores, welche Ergänzungen zur BCLC-Einteilung bieten, beinhalten neben der genauen Tumorstadien-Einteilung (Früh-, Zwischen- und Spätstadium) und tumorassoziierten Symptomen, zusätzlich das klinische Erscheinungsbild und die Leberfunktion des Patienten. Dadurch werden sowohl die Prognose des Krankheitsverlaufs als auch die Therapieentscheidung maßgeblich beeinflusst. Probleme weist das BCLC-System allerdings bei der Indikationsstellung zur Lebertransplantation sowie zur Resektion beim HCC ohne eine assoziierte Zirrhose auf.

Andere Scores, wie die Child-Pugh-Klassifikation eignen sich gut, um die Leberfunktion und das Zirrhosestadium zu beurteilen. Diese Einteilungen gehen in den CLIP -Score ein. Die Okuda-Klassifikation berücksichtigt die Tumorgröße und stellt eine Beziehung zur Leberfunktion her. Da bei dem Okuda-Score wichtige therapieentscheidende Faktoren (genaue Tumorgröße Gefäßinvasion,

Multifokalität) nicht berücksichtigt werden, wurde diese durch den CLIP-Score weitestgehend abgelöst. Die CLIP-Stadieneinteilung unterscheidet zusätzlich das solitäre vom multilokularen HCC. Ebenfalls berücksichtigt sie den Serum-AFP-Spiegel sowie die Entwicklung einer Pfortaderthrombose. Mehrere Studien konnten nicht nur die prognostische Relevanz der CLIP-Stadieneinteilung belegen, sondern auch ihren Vorteil gegenüber einer Einteilung nach Okuda-Stadien[12][62][98][115].

1.6 Therapieoptionen des HCC

Die Therapieoptionen eines HCC sind häufig eingeschränkt, da bei der Erstdiagnose das Tumorstadium meist weit fortgeschritten ist. Kurative Therapieoptionen (Leberteilresektion oder eine Transplantation) sind dann oft nicht mehr möglich[39][52][64]. Das HCC geht daher nach wie vor mit einer hohen Mortalität einher und hat unbehandelt eine sehr schlechte Prognose. Trotz Entdeckung und Etablierung neuer Therapieansätze konnte die Fünf-Jahres-Überlebensrate des HCC in den letzten Jahren nur leicht (um ca. 5%) verbessert werden[36][91]. Die durchschnittliche Überlebenszeit bei unbehandelten symptomatischen Patienten beträgt je nach Tumorstadium und klinischem Bild 8-29 Monate. Dabei wird bei einem HCC mit Leberbefall unter von 25% mit einer medianen Überlebenszeit von ca. 29 Monaten gerechnet. Bei einer Tumorinvasion von 25-50% der Leber beträgt die Überlebenszeit hingegen nur ca. 8 Monate[9][14][30][64][70].
Es gibt zum jetzigen Zeitpunkt noch keine deutsche Leitlinie zum HCC. Auch die derzeitigen Empfehlungen (EASL und AASLD) stützen sich im Wesentlichen auf Expertenmeinungen. Als Standardbehandlung wird momentan das so genannte Barcelona Clinic Liver Cancer Schema (BCLC) verwendet[12][62]. Bei diesem wird zwischen chirurgischen und nicht-chirurgischen Verfahren bzw. kurativen (Resektion, Lebertransplantation) und palliativen Therapieansätzen unterschieden. Demnach sollte eine Resektion nur in einem sehr frühem Stadium (BCLC (A1), Child-Pugh-Stadium A (Abb. 1.6A) und singulärem (Tumorherd ≤2 cm) durchgeführt werden. Einige klinische Studien zeigen, dass die Resektabilität durch präoperatives „Downstaging“ mit selektiver Chemotherapie oder Chemoembolisation verbessert werden kann[76]. Demzufolge werden gute

Transplantationsergebnisse bei singulärem Vorkommen (>5 cm), bei bis zu drei kleinen Tumorherden (<3 cm) oder in frühen Stadien bzw. BCLC A2-4-Stadium erzielt[12][63]. Die chirurgischen Therapieformen werden je nach Situation des Patienten durch lokal-ablative Therapieverfahren ergänzt. Dazu zählen unter anderem die „Trans-Arterielle perkutane Chemo-Embolisation“ (TACE), Perkutane Enthanolinjektion (PEI) sowie Radiofrequenzablation (RFA), deren Resultate je nach Studienlage unterschiedlich bewertet werden. Ergänzend wird zur Therapieentscheidung die Leberrestfunktion und die individuelle Patientenkrankheitssituation nach ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) herangezogen. Angelehnt an das BCLC-Schema wird ein fortgeschrittenes, nicht operables HCC-Stadium ((BCLC (C), CHILD B, Portalvenengefäßinvasion und Metastasen (M1, N1)) in der Regel mit der TACE behandelt[12][63]. Bei fehlender Resektabilität und Nichtansprechen auf Zytostatika (BCLC (D), Okuda III) ist nur noch eine palliativeTherapie möglich. Hierbei werden neben TACE auch systemisch-medikamentöse Therapieformen verwendet, die nach derzeitigen Erkenntnissen lebensverlängernd wirken. Hierzu zählt z. B. der Multikinaseinhibitor Sorafenib[67]. Zusätzlich werden bereits moderne Therapieperspektiven, die gezielt gegen den Tumor vorgehen, so genannte „Targeted Therapies“, angewandt. Den Ergebnissen zufolge zeigen diese Behandlungsformen zum Teil vielversprechende Resultate. Zu diesen „Targeted Therapies“ zählen Wirkstoffe, die einerseits antiangiogenetisch wirken und andererseits Wachstumsfaktoren (EGF, HGF, IGF, PDGF, VEGF) hemmen. Darüber hinaus zählen zu den „Targeted Therapies“ ebenfalls eine Gruppe von Stoffe, die einen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion des Zellzyklusses ausüben. Auch andere gentherapeutische Ansätze, wie der Einsatz von Tumorsupressorgenen, werden genutzt[46][114].

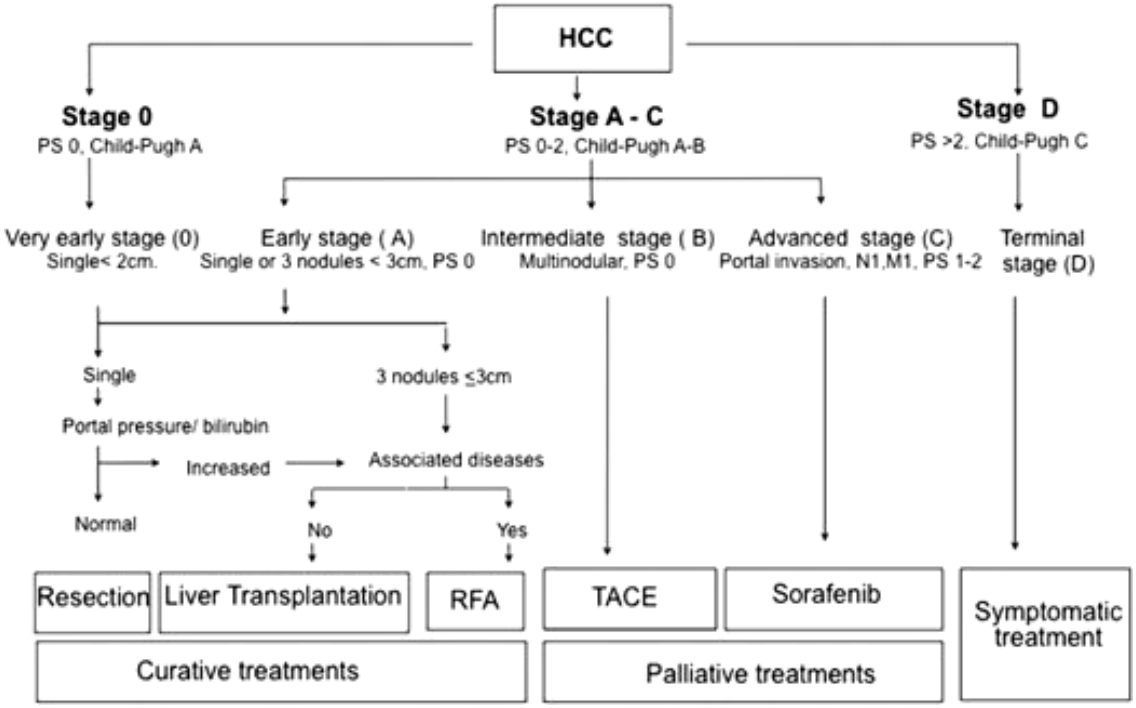


Abbildung 1.6A:Therapiealgorithmus nach der Barcelona Clinic Liver-Cancer-(BCLC)-Klassifikation, modifiziert nach Bruix et al. ,2011[10].

1.7 Aktueller Stellenwert von Biomarkern bei Screening, Diagnose und Prognose des HCC

Einer der wichtigsten Prognosemarker einer malignen Entartung eines Organs ist die Früherkennung. Gerade die Detektion eines HCC in einer sehr frühen Phase spielt eine Schlüsselrolle für die Prognoseverbesserung des HCC. Diese verhindert zwar nicht die Entstehung des Tumors, verbessert aber aufgrund der frühen Diagnosestellung die Möglichkeit, kurativ zu therapieren. Die aktuelle Empfehlung mit Hilfe von Biomarkern die Sensitivität und Spezifität der HCC-Frühdetektion zu verbessern wird widersprüchlich diskutiert. Jedoch besteht eine einheitliche Anschauung, dass Tumormarker (z.B. AFP als alleinige Screeninguntersuchung) nicht für eine solche Detektion verwendet werden sollten (s. Abschnitt 1.4). Bezüglich AFP ist bereits bekannt, dass nicht alle HCCs mit einem erhöhten AFP-Wert (oder andere Tumormarker) einhergehen und so eine falsche Sicherheit entstehen würde[48][56][57][66]. Im Gegensatz dazu können die Werte auch aus anderen, nicht tumorspezifischen Gründen erhöht

sein (s.u.). Um eine Frühdetektion und die damit einhergehende Prognoseverbesserung des HCCs zu erreichen, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Forschungen und klinische Studien zur Etablierung neuer Biomarker durchgeführt. Obwohl neben den bekannten spezifischen Ätiologien viele molekulare Mechanismen der HCC-Pathogenese bekannt sind, wie z.B. eine Dysregulation bestimmter Proteine und Signalübertragungswege (IGF, HGF, Wnt, STAT-3 etc.), ist die Identifikation einer Mutation eines klassischen Onkogens oder eines Tumorsupressorgens bis jetzt nicht gelungen. Vielmehr scheinen bei einem HCC mehrere Mechanismen und molekular-biologische Variationen eine Rolle zu spielen, was die Identifikation eines bestimmten "Frühphasenbiomarkers" erschwert[14][41].

Den neuesten Studienergebnissen zufolge wurden dennoch einige tumorassoziierte Laborparameter bzw. Tumormarker, die als Frühmarker des HCC dienen könnten, entdeckt und zum Teil etabliert, wie z.B. das Golgi-Protein-73, DCP, GPC-3, HSP70, CAP2 sowie Glutamin-Synthetase[100]. Zudem sind AFP-L3, DCP, GPC-3 als Biomarker identifiziert worden[17][57][72][73]. Diese Marker zeigen zwar vielversprechende Ergebnisse, jedoch erfüllt keiner dieser Parameter die Eigenschaften eines "idealen Markers". Ein idealer Biomarker sollte eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzen. Zusätzlich sollte im Idealfall der Tumormarker keine Expression im gesunden Gewebe zeigen und im Serum des Patienten bereits vor der klinischen Manifestation ansteigen. Nützlich wäre es auch, wenn eine direkte Relation zwischen dem Markeranstieg im Serum, der Tumorgröße und dem Verlauf bestehen würde.

AFP ist zurzeit der einzige klinisch etablierte Tumormarker. Dabei handelt es sich um ein onkofetales Glykoprotein, das in der fetalen Leber gebildet und wenige Wochen nach der Geburt supprimiert wird. Die biologische Funktion des AFPs ist bis jetzt noch nicht vollständig erforscht. AFP kommt mit einer komplexen Kohlenhydratkette in drei Isoformen vor (AFP-L1-L3), wobei vor allem AFP-L3 für die HCC Diagnostik (s.u.) an Bedeutung gewonnen hat[57]. Problematisch ist allerdings, dass AFP bei der Detektion eines HCCs zwar eine Spezifität von 84-92%, jedoch nur eine Sensitivität von 41-65% besitzt. Außerdem wird AFP nicht von allen HCC-Patienten (ca. 30% der Patienten mit einem HCC zeigen keine AFP-Erhöhung im Serum) sezerniert[41]. Der positive Vorhersagewert von AFP liegt bei 5-50%[30]. Auch können erhöhte AFP-

Serumwerte bei anderen Tumoren, wie z.B. bei einem Hoden-, Magen-, Pankreas- und Lungenkarzinom sowie in der Schwangerschaft nachgewiesen werden. Zudem kann das AFP bei einer chronisch-entzündlichen Hepatitis bis auf 500ng/ml ansteigen.

Die obengenannte AFP-Variante AFP-L3 hat zusätzliche Kohlenhydratketten (A1-6-Fukoseeinheit) am reduzierten Ende eines N-Acetylglukosamin. Die Fraktionierung der drei AFP-Isoformen (AFP L1-L3) gelang mittels elektrophoretischer Affinität mit dem LCA (Lektin culinaris Agglutinin), wobei AFP-L3 eine hohe Affinität zu LCA zeigte. In Studien konnte gezeigt werden, dass AFP-L3 vermehrt bei HCCs auftritt, die besonders maligne mit frühzeitiger Gefäßinvasion verliefen. In einigen Ländern (z.B. Japan, USA etc.) ist er bereits als Tumor- und Prognosemarker zugelassen[128]. Jedoch wird AFP-L3 nur bei 35% der Patienten mit HCC in der Frühphase (Tumordurchmesser <3 cm), nachgewiesen. Zudem beträgt die Sensitivität ca. 45% bei Tumoren, die kleiner sind als 2 cm und bis zu 90% bei Tumoren mit mehr als 5 cm Durchmesser. In einigen Studien wird diskutiert, ob der Fukosilierungsindex (AFP-L3%=der Anteil an AFP zum Gesamt-AFP) als Einschätzungswert für ein HCC mit undifferenzierter Histologie und frühzeitiger Metastasierungstendenz verwendet werden könnte[14][30][110].

Ein weiterer Marker ist das Des-gamma-Carboxy Prothrombin (DCP), welches eine unreife Form des Koagulationsproteins Prothrombin ist. DCP ist in der Literatur auch als „Protein Induced by Vitamin K absence or Antagonist II“(PIVKA-II) bekannt[73][95]. Die Vorstufe des Prothrombin unterliegt während des normalen Stoffwechsels einer Vitamin K-abhängigen Carboxylierung von 10 Glutaminsäureresten am N-Terminus und wird so zum nativen Prothrombin umgewandelt. Liegt ein HCC vor, ist dieser Reaktionsablauf beeinträchtigt. Pathogenetisch wird z.B. die Veränderung der Prothrombin-Vorstufen, der verstärkte Bedarf an Vitamin K sowie eine reduzierte Carboxylaseaktivität vermutet[121]. Seit 2007 ist DCP sowohl in Japan als auch in den USA durch die FDA als Tumormarker zugelassen. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Serumspiegel bei 50-60% der HCC-Patienten vorkommt. Die Erhöhung ist aber nur bei ca.15-30% aller HCC-Patienten in der Frühphase nachweisbar. Die diagnostische Sensitivität liegt zwischen 48-62%, die Spezifität dagegen bei 81-96%[80][121]. Es wurde gezeigt, dass nicht alle DCP-

produzierenden HCC-Proben auch AFP-Erhöhung zeigten. Dies gilt auch im umgekehrten Fall. Daher wird postuliert, dass die Kombination beider Marker (AFP/DCP) das HCC-Screening verbessern könnte[104]. Im Gegensatz dazu konnte eine neue Studie an 470 HCC-Patienten (Nanashima A et al., 2011)[83] zeigen, dass die Höhe beider Tumormarker (PIVKA-II und AFP) als Prädiktoren für das Überleben vor und nach einer kurativen Therapie nicht herangezogen werden kann, weil keine Korrelation sowohl für die Therapie als auch für die Prognose bestehen würde[83].

Ein ebenfalls neu etablierter HCC-Biomarker ist das Glypican-3 (GLP-3). GLP3 ist ein Membranprotein, das bei benignen Lebererkrankungen und in normalen Hepatozyten nicht vorkommt. Eine Erhöhung im Serum bei Patienten mit HCC kann nachgewiesen werden[17]. Nicht nur im Serum, sondern auch mittels immunhistochemischer Färbung wird eine Überexprimierung im Lebergewebe detektiert[3][108]. GLP-3 ist ein Heparansulfat-Proteoglykan (Glykoprotein), welches an Zellzytoplasma via Glycosyl-Phosphatidylinositol verankert ist. Dabei gehört GLP-3 zu der GRIPS-Familie (glypican-related integral membrane proteoglycan)[35][59]. Einige Studien haben gezeigt, dass diese Gruppe die Fähigkeit besitzt, zahlreiche Zellfunktionen wie die Proliferation, Differenzierung und Migration der Zelle durch Interaktion mit Oberflächenproteinen zu regulieren. Zudem ist diese Gruppe in der Lage, als Tumorsuppressor(gen) die Apoptose zu induzieren[35][108]. Es konnte eine GLP-3-Erhöhung im Serum bei 40-50% aller HCC-Patienten und bei 33% aller AFP- und DCP-negativen Patienten nachgewiesen werden. Die Spezifität beträgt 100%[82]. Des Weiteren wurde bestätigt, dass GLP-3 weder in zirrhotischen noch in chronischen Lebererkrankungen detektiert wird[17][112]. Zum Screening von HCC wird daher eine Bestimmung von AFP in Kombination mit GLP-3 vorgeschlagen, da ein solches Vorgehen die Diagnostik erheblich verbessern würde[17][65]. Weitere Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass in einigen anderen Tumoren, wie z. B. Magenkarzinom, Neuroblastom und Keimzelltumor sowie Pankreaskarzimon eine GLP-3-Expression vorkommt. Im Gegensatz dazu konnte belegt werden, dass die Expression von GLP-3 bei Mesothelium, Brust- und Ovarialkarzinom „downreguliert“ vorliegt[35][43][59][126].

Trotz der Tatsache, dass die genauen molekularen Mechanismen der Frühphase der HCC-Pathogenese nicht vollständig geklärt sind, konnten zusätzlich eini-

ge HCC-Früherkennungsmarker entdeckt werden, die als Ergänzungsmarker vorgeschlagen wurden. Dazu zählen die Hitzeschockproteine (HSP70), Golgi-Protein-73 (GP73), Cyclase-assoziertes Protein (CAP2) sowie Glutamin-Synthase (GS).

Hitzeschockproteine, die im Rahmen eines HCC zur Unterscheidung zwischen der Früh- und Spätphase analysiert wurden, konnten in über 90 unterschiedlichen Genen identifiziert werden. Diese werden vor allem in der Frühphase eines HCCs hochreguliert. In diesem Zusammenhang war die detektierte Expression des HSP-70 Gens am deutlichsten[20][101]. Der Ätiologie folgend war ein deutlicher Anstieg insbesondere bei HBV-assoziertem HCC sichtbar[58]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Expression von Hitzeschockproteinen einschließlich des HSP-70 in vielen anderen Tumorentitäten, wie z.B. Blasen-, Brust-, Nierenkarzinom etc. vorkommt und ihnen ein prognostischer Wert zugesprochen werden kann[55][58].

Ein weiterer Serummarker ist das Golgi-Protein-73 (GP73). GP73 wird bei Patienten mit einer akuten Hepatitis, einer Zirrhose sowie bei HCC-Patienten mit einer viralen Ätiologie (HBV/HCV) hochreguliert[50][53]. Analysen belegten, dass im Serum von HCC-Patienten signifikant höhere GP-73-Werte messbar waren als im Serum von Patienten mit Zirrhose. Die Sensitivität von GP73 beträgt dabei 69%, die Spezifität 75%. Die Sensitivität der HCC-Detektion in der Frühphase liegt bei GP-73 bei 62%, während sie bei AFP nur 25% beträgt[72].

Cyclase-assoziertes Protein (CAP2) ist ein weiteres Protein, das in der Frühphase eines HCC vermehrt exprimiert wird und somit als Frühmarker fungieren kann. CAP2 zeigt Ähnlichkeit mit Adenylatcyclasen und ist Studien zufolge in der Lage, mit dem Zytoskelettbestandteil Aktin zu interagieren. CAP2 wird in normalen Hepatozyten nicht exprimiert. Eine Überexpression von CAP2 auf der mRNA und Proteinebene war in der HCC-Frühphase im Vergleich zu nichtkanzerösem Lebergewebe detektierbar. Zudem stieg der Wert (Überexpression) bei weiterer Progression des HCCs kontinuierlich an. Immunhistochemisch hat man die CAP2-Expression in gesundem, in zirrhotischem und in HCC-befallenem Lebergewebe sowohl in der Früh- als auch in der Spätphase verglichen. Es wurde beobachtet, dass CAP2 in der zirrhotischen Leber nur in geringem Maße messbar ist, während es in der Frühphase eines HCC sehr stark

erhöht war. Daher wird CAP2 als Ergänzungsmarker in der HCC-Frühphase vorgeschlagen[20][101].

Die Glutamin-Synthase (GS) katalysiert die Synthese von Glutamin, das als Hauptenergiespender für Tumorzellen gilt[88]. Die GS-Akkumulation im HCC wurde erstmals bei Analyse von „ubiquinierten" Proteinen beobachtet. Die Funktion von Ubiquitin ist u.a., die biologischen Eigenschaften der Zelle zu regulieren. Hierzu bindet es kovalent an andere Proteine und verändert somit den Zellzyklus, den Proteinabbau und die Signaltransduktion. Analyseergebnisse konnten immunhistochemisch darstellen, dass die GS-Expression (ubiquitiniertes Zielprotein) in präkanzerösen Prozessen der Leber sowohl in frühen als auch in fortgeschritteneren HCC-Stadien kontinuierlich zunimmt. Es wurde gezeigt, dass sich eine Akkumulation von GS bei 38% der Patienten im fortgeschrittenen HCC-Stadium, in der Frühphase jedoch nur bei 12,9% nachweisen lässt. Auf Proteinebene war dagegen mittels Western Blot eine GS-Akkumulation in 56% aller untersuchten Patienten mit HCC erkennbar. In der Frühphase konnte man die GS nur in 33% der Proben nachweisen. Den Forschungsergebnissen zufolge kennzeichnet die GS möglicherweise eine proteolytische Regulation der ubiquitin-abhängigen Enzymaktivität, wodurch es zu einer Zunahme der GS-Expression bei der Hepatokarzinogenese kommt. Demnach könnte dieser Art der Korrelation eine Schlüsselrolle bei der Evaluation des Metastasierungspotentials eines HCCs zukommen[88].

In der Zusammenschau wird deutlich, dass eine Kombination der oben genannten Biomarker zum HCC-Screening und zur Prognoseevaluation des HCCs verwendet werden können. Jedoch erfüllt keiner dieser Marker die Eigenschaften eines „idealen Markers". Daher sind weitere Forschungen nach sensitiveren und spezifischeren Tumormarkern unabdingbar. Im Fokus sollte die Identifikation von Biomarkern, die sich in den frühesten Stadien der HCC-Pathogenese entwickeln, stehen. Denn ein Frühmarker dient nicht nur der Diagnostik eines HCCs, sondern kann auch zur Verlaufsbeurteilung und prognostischen Einschätzung des HCC beitragen.

Schlussfolgernd ist jedoch grundsätzlich zu diskutieren, ob eine Bestimmung von Biomarkern im Patientenserum zur Screening bzw. Diagnosestellung einer Tumorerkrankung eingesetzt werden sollte. Wie oben bereits gezeigt, weisen

die meisten identifizierten Tumormarker fehlende Spezifität und Sensitivität auf und spiegeln nicht den klinischen Zustand des Patienten wider.

2. Neighbor of Punc E11 (NOPE)

2.1 Vorarbeiten zu Nope

In der Vorarbeit von J.M Salbaum von 1998 wurde Nope (Neighbor of Punc E11) als „Nachbar von Punc“ identifiziert. Punc ist ein Akronym für das “putative neuronal cell adhesion molecule” und wurde von Salbaum als ein Teil der Immuglobulin-Superfamilie und Fibronectine Typ III beschrieben[104]. In einer seiner späteren Arbeiten (Salbaum, 2000) hat er Nope weiter analysiert und seine Eigenschaft näher beschrieben. Nope ist als ein Gen, das in seiner Struktur nicht nur eine große Homologie zu Punc aufweist, sondern auch eine identische genomische Lokalisation wie Neogenin und Punc aufweist, bestätigt. Die Gene aller drei Proteine, d.h. Nope, Punc und Neogenin befinden sich auf dem Chromosom 9 (Abb. 2.1 A). In der Embryonalentwicklung der Maus wurde Punc als ein Protein identifiziert, das ähnliche Proteinstrukturen aufweist wie die Proteine, die in erster Linie bei der Ausbildung und Führung von Axonen (axon guidance) im Nervensystem eine Rolle spielen. Punc zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem Tumorsuppressor DCC (Deleted in Coloretal Cancer), welcher bei Kolon-Carcinomen herunterreguliert wird. Neben dieser Zugehörigkeit zur Immunglobulinsuperfamilie, den Fibronectinen sowie dem DCC, zeigt Nope zusätzlich eine hohe Übereinstimmung mit den Führungsrezeptoren von Neogenin und DCC. In den weiteren Untersuchungen im Mausmodell wurde die Induktion von Nope in den verschiedenen Gewebearten näher betrachtet. Die Ergebnisse der Analysen in der Embryonalentwicklung der Maus haben ergeben, dass Nope in verschiedenen Organen induziert wird. Es wurde gezeigt, dass Nope in Skelettmuskeln, im Rückenmark, der Ventrikelzone des Nervensystems sowie im adulten Gehirn (im Hippocampus) induziert und die Expression dort entsprechend detektiert werden konnte[102][103][104].

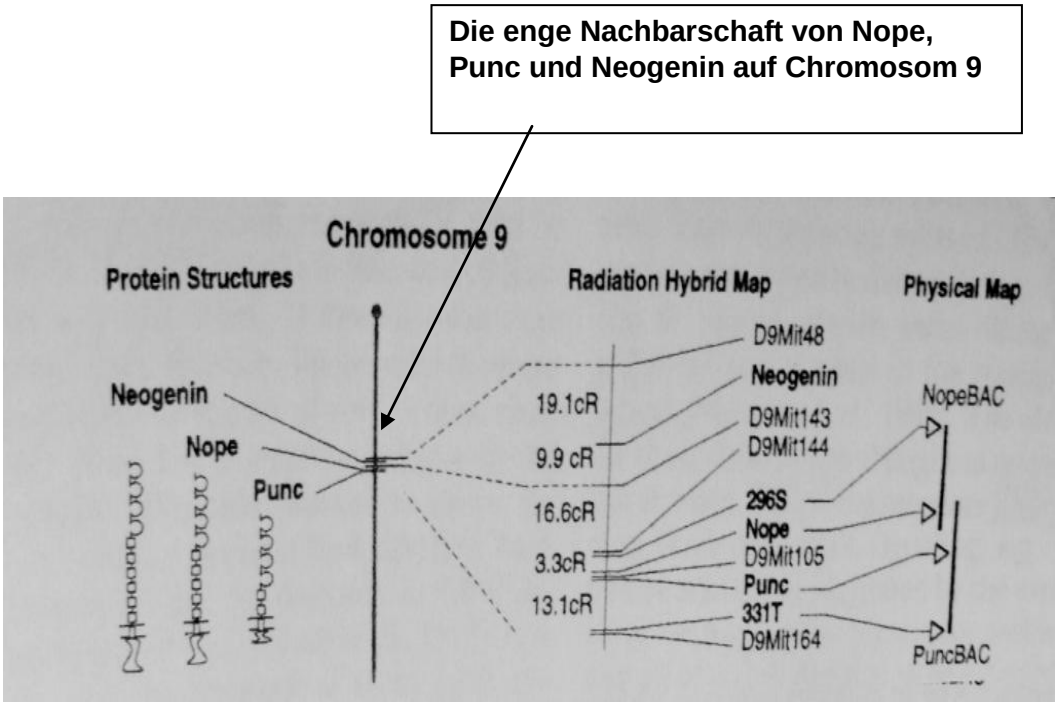


Abbildung 2.1A: Genomische Lokalisation von Nope, modifiziert nach Salbaum, 2000[102]

2.2 Fragestellung und Arbeitshypothese

Die Arbeitshypothese: “NOPE als potenzieller Biomarker für das HCC” basiert auf der Arbeit von Nierhoff von 2007, die zum Ziel hatte, Progenitor/Leberstammzellen zu isolieren. Hier wurde Nope als Oberflächenmarker muriner fetaler Leberstammzellen identifiziert[86]. In einer späteren darauf aufbauenden Arbeit wurde die Expression von Nope bei der Hepatokarzinogenese analysiert. Um nach der Tumorinduktion die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Tumorentstehung untersuchen zu können, wurde ein Mausmodell etabliert. Die Analyse der Tumorentwicklungsstadien erstreckte sich von der Anfangsphase ohne Gewebsstrukturveränderungen über die Hyperplasie und Dysplasie bis hin zur HCC-Entstehung. Die Fortsetzungsarbeit von Nierhoff (2008) hat gezeigt, dass sowohl in der adulten Leber als auch in frühen Vorstadien der Tumorentstehung keine Expression von Nope zu detektieren ist. Nope konnte erst ab der achten Woche nach der Tumorinduktion bzw. nach Tumorentstehung nachgewiesen werden. Somit wurde Nope als muriner onko-fetaler Marker definiert.

Basierend auf diesen Ergebnissen entstand die Arbeitshypothese, NOPE könne als potentieller neuer Biomarker für das humane hepatozelluläre Karzinom eingesetzt werden. Als Parameter sollte die NOPE-Expression in den humanen Untersuchungsproben mit den Methoden quantitativer PCR (mRNA)-, Western Blot (Protein-Ebene) und der Immunhistochemie (Zell- bzw. Gewebsstruktur-Ebene) untersucht werden.

Während Nope in der Maus auf Chromosom 9 lokalisiert ist, befindet sich humanes NOPE auf Chromosom 15. Mit dem etablierten Akronym “NOPE” wird die Lokalisation in humanen Zellen bezeichnet, die Schreibweise “Nope” hingegen wird für das Protein in der Maus gebraucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Alle Materialien, die für diese Arbeit verwendeten wurden sind in Tabelle 3.1A aufgelistet.

3.1.1 Medien-und Reagenzien-lösungen	Firmen und Bestell-nummern
DMEM High Glucose (4.4g/l)	PromoCell Cat NoC-71210
FSB (Fetal Bovine Serum)	Biochrom Ag S0115
Donkey Serum	Sigma D9663
PBS	Biochrom L1825
NEAA (Non essential amino acid 100x)	Biochrom K0243
Glutamin	Biochrom K0282
Na-Pyr (Natrium- Pyruvat) 100mM	Biochrom Ag Cat L0473
NAOH	Fa. Merck
Pen Strep (Penicillin-Streptomycin)	Biochrom Ag A2212
Trypsin	Biochrom Ag L2143
Tris	Fa.Roth Ca No. 48552
Gycerol	Fluka 49767
SDS 10%	Sigma L4509
Proteaseinhibitoren Complete mit EDTA	Fa. Roche No 1697498 Mannheim
BSA- Standard Lösung	Fa. Pierce, Prod. No 23209
10% Dimethy sulfoxide (DMSO)	Fa. Serva Lot.18121
Methanol	Fa. Roth 4627.5
ß Mercaptoethanol (ME)	Fluka 63389
Acetat	Fa. Roth 6776.1
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Fa. Roth
Poysorbat Caelo Tween	Caesar & Loretz Ch. B. 538114206
SDS-Lysisbuffer zu Proteinextraktion	Laemmli- Methode
Blocking-Milch	Zusammensetzung s.u.

BB-Solution	Zusammensetzung s.u.
AB Solution	Zusammensetzung s.u.
PAA-Gel	Bio Rad
ECL-Detections ACL	Amersham RPN 2106
Ladder SDS-PAGE (Lot.20272)	Fa. Fermentas
Nuclease Free Water	Promega P119 C
3.1.2 Kits	
RNeasy Mini Kit	QIAGEN Cat No. 74104
Rnase –Free Dnase Set	QIAGEN Cat No.79254
RLT Lysebuffer	QIAGEN Cat No. 74104
Rneasy Protect Mini Kit RNALater RNA Stabilisation Reagent	QIAGEN Cat. No. 74124
Super ScriptTm III First Strand Synthesis for RT-PCR	Invitrogen Cat. No. 18080-051
iqTmSyber Green Supermix 2x Mix für Real Time PCR	Bio-Rad Laboratories Cat.170-8882
ELISA:photometrische Proteinbestimmung nach BCA-Methode mit “bicinchoinic acid”	Fa. Uptima: BC-Reagenz A Cat No.UP954 24°, Reagenz B. Cat No. UP 954 25 b
Western Blot ECL-Detections Reagents	Amersham RPN 2106
3.1.3 Primer und Antikörper	
Primer	
NOPE (F:14-4210-3/24, R:144210- 4/24)	MWG Biotech AG
AFP (F:144210- 9/24, R:144210- 10/24)	MWG Biotech AG
ALB(F:144210-7/24); R:144210-8/24)	MWG Biotech AG
ß-Actin(F: 14421014/24; R: 1421013/24)	MWG Biotech AG
HPRT(HuF 156, HuR157)	MWG Biotech AG
Nope 56741	R&D Systems
Primäre Antikörper	
NOPE	Abnova Cat No H00057722
Nope	R&D Systems Cat. AF 1394
AFP	LAB Vision RB-365 R7
Albumin	Biogenesis Cat. No 0220-1899
E-Cadherin	Takara Code No. M108

Golgi trans p230	BD Transduction Labara-tories
Golgi gesamt (Rab6)	Santa Cruz Bio-techno-logy
Isotyp Kontrollen	
Goat IgG	Sigma Prod. No. I9140
Mouse IgG	Sigma Prod M5534
Rabbit IgG	Sigma Prod I 8140
Rat IgG	Sigma Prod I8015
Sekundäre Atikörper	
CY 2 (DaG)	Dianova Code No 711-225-152
CY3 (mouse)	Dianova Code No. 715-165-150
CY3 (DaG)	Dianova Code No 705-165-147
CY5	Dianova Code No 713-175-145
Anti-Mouse HPR-Konjugat	Biorad Cat No.170-6516
Anti-Rat	Dianova Cat. No. 112-035-003
Anti-Rabbit	Sigma Prod. No. A6154
Alexa Flour A488 (DaG)	Nanoprobes Cat No.A21222
Alexa Flour A488 (GaM)	Nanoprobes Cat No. 7204
APC	Serva13375
DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol)	Merck No.124653
3.1.4 Zur Analyse verwendete Geräte	
Bio-Rad Icycler IQ real time PCR instrument	Bio-Rad Cat No.
Trans Blot System Semi Dry Electophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Nr. 170-3940
Bio-Rad multicolour Real Time PCR Detection System	Biorad
Precellys 24 PeQLab lysis & homogenization	Bertin Technologies
Elisa Reader (570nm)	Fa.PierceProd. No.23209
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus

Elektrophoresekammer Twin Mini Gel	Biometra
Sterilbank Steril Gard GlassII TypA/B3	Labotech Labor Technik Göttingen
Thermomixer comfort 0,5ml,1,5 ml	Eppendorf
Implen Nano Phtometer	Fa. Implen
OLYMPUS Mikroskop Cell M³ 1x81	OLYMPUS,Tokyo, Japan
3.1.5 Labormaterialien	
T75 Kulturflaschen	DB Falkon Tm137787
Falcon Tubes 15ml, 50 ml	DB Falkon
Zellkultur Testplatten 6	TPP Switzerland 92406
Eppendorf Tubes 0,5ml,1,5ml, 96er Reaktionsplatten	Fa. Eppendorf
Pipetten 1 ml, 5 ml,10ml,20ml,25ml	Fa. Eppendorf
Pipettenspitzen 10µl,20µl,100µl,100oµl	Fa. Eppendorf
96er Reaktionsplatten	Fa. Eppendorf
Sterilfilter Tips	Biozmym
Zellkultur Testplatten 6	Cat. Nr. 92406 TPP, Schweiz
Objektträger	Süsse GmbH
Detektionsfilm	Amersham
Einmal-Injektions-Kanüle 21 G	Fa. Braun

Tabelle 3.1A: Verbrauchsmaterial-Übersicht

3.2 Methoden

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde an verschiedenen humanen Hepatomazelllinien (HuH7, HepG2, Hep 3B) eine NOPE-Expression-Analyse durchgeführt. Diese eingesetzten Zelllinien werden üblicherweise bei solchen Fragestellungen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen erst kultiviert und auf mRNA-, Protein- und Immunhistochemie-Ebene untersucht. Im zweiten Teil wurden HCC-Patientenproben aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Köln analysiert.

3.3 Hepatomazelllinien

3.3.1 Zellkultivierung

Zur Analyse wurden die oben genannten humanen Hepatomazelllinien (HuH7, HepG2, Hep 3B) mit DMEM in 75 cm² Kulturflaschen bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO2 im Brutschrank (Brutschrank Hera Cell 150) kultiviert. DMEM wurde zum Gebrauch durch Zugabe von 10% FBS 1,1% Penicillin-Streptomycin-Lösung, Glutamin 200mM, Natrium-Pyrivat 100mM, Glutamat 200mM und NEAA angereichert und vorbereitet (Ansatz: zu 500ml DMEM 4,5g Glucose, 50ml FSB (10%), 5,5ml Pen/ Strep 100x (=1000µg/ml), 5,5ml Glutamin(200mM), 5,5ml Na-Pyr (100mM) und 5.5ml NEAA (100x)). Die Zelllinien HUH7 und Hep G2 wurden mit der oben genannten Mediumszusammensetzung optimal kultiviert. Eine Mediumzusammensetzung mit 10% FBS und 1.1% Pen/ Strep-Anreicherung war für die Kultivierung der Zelllinie Hep 3B am erfolgreichsten. Im Rahmen der Kultivierung (steril) wurden möglichst optimale Arbeitsbedingungen geschaffen. Dazu wurden alle Reagenzien (DMEM-Medium, Trypsin) auf 37°Celsius aufgewärmt. Im nächsten Schritt wurden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zelllinien aufgetaut, in 10 ml des entsprechenden Mediums (15 ml Falkon-Röhrchen) aufgenommen und die Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 Min. bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit

Medium resuspendiert und in einer T75-er Flasche kultiviert. Der erste Mediumswechsel wurde nach 12 bis 18 h durchgeführt und die weiteren Medienwechsel je nach Bedarf der Zellen angepasst. Nach zweitägigem konfluentem Wachstum wurden die Zellen zur Weiterverarbeitung „gesplittet“ und passagiert. Zum Splitten wurde erst das verbrauchte Medium abpipettiert, mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend abgesaugt. Zur Ablösung der konfluent und adherent gewachsenen Zellen wurden diese mit 3-4 ml (pro T75 Kulturflasche) Trypsin versetzt und für ca. zwei Min. bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe des Mediums gelang es, die Wirkung von Trypsin zu stoppen. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet zügig mit dem Medium resuspendiert und kultiviert.

Für den immunzytochemischen Färbungsnachweis wurden die Zellen in einer mit Deckgläschen bestückten 6-well Testplatte mit einer maximalen Zellzahl $1x10^6$ / ml in je 2 ml Zellsuspension (dazu wurden die Zellen gezählt, ca. 2 ml Zellsuspension in 14 ml Medium aufgenommen) beschichtet kultiviert. Die Zellen wuchsen an den Objektträgern und blieben für die weiteren Schritte haften. Am dritten Tag wurden die Deckgläschen mit eiskaltem PBS gewaschen, von der Kulturplatte entfernt und getrocknet. Zur Weiterbearbeitung wurden die Deckgläschen bei -20°C aufbewahrt. Zum erneuten Einfrieren der Zellen wurde DMSO (zusammengesetzt aus 90% DMSO und 10% FBS) verwendet. DMSO als Einfriermedium verhindert die Zellmembranzerstörung, indem es die Ausbildung von Wasserkristallen während des Einfrierens unterbindet. Alle Einfrierschritte müssen gekühlt und schnell abgearbeitet werden. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Kryostatröhrchen mit maximal $25x10^6$ Zellen / ml aliquotiert und für 48 h bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.2 Quantitative Bestimmung der Genexpression von NOPE in humanen Zellen

Nachdem die Zelllinien wie in 3.3.1 beschrieben kultiviert wurden, wurde die Analyse von NOPE-Expression via Real Time PCR durchgeführt. Dazu wurden erst die mRNAs aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben und an-

schließend mittels PCR selektiv amplifiziert. Die einzelnen Schritte dieses Verfahrens werden nachfolgend beschrieben.

3.3.2.1 RNA-Extraktion mittels Qiagen RNeasy Minikit

Die RNA-Isolation sowohl aus den Zelllinien als auch aus den Leberproben (Kryokonservierung) erfolgte nach der Methode des RNeasy Mini Kits (RNeasy Minikit (50)-Set Qiagen Shredder und RNAse-Free Dnase, QIAGEN Cat No. 74104). Dieses Protokoll ermöglicht es, sehr einfach saubere RNA-Moleküle zu gewinnen. Zur RNA-Extraktion wurde erst Lysepuffer (1 ml RLT Puffer aus dem Kit mit 10µl ß- Mercaptoethanol versetzt) vorbereitet. Der RLT-Lysepuffer enthält Guanidin Thiocyanat (GTC), was die RNAsen inaktiviert und somit die Degradation durch unspezifische katalytische Abbauprozesse verhindert. Im weiteren Isolationsschritt wurden erst 600 µl Lysepuffer und 500 mg Keramik-Kügelchen in die entsprechenden speziellen Precellys-Röhrchen pipettiert und vorbereitet (Precellys 24 PeQLab lysis &homogenization Bertin Technologies, Peqlab Cat. Nr.91- PCS- CK14B). Zur Verarbeitung sind die Proben aus Flüssigstickstoff entnommen und im schockgefrorenen Zustand belassen worden, indem diese auf Trockeneis weitergekühlt wurden. Dieses Vorgehen verhindert die weitere Degradierung der nativen Proben. Zur Isolation wurde ca. 30-50 mg Lebergewebe entnommen und in das zuvor mit Lysepuffer und Keramikkügelchen vorbereitete Röhrchen (50 mg Lebergewebe + 600µl Lysepuffer und ca 500 mg Kügelchen) gegeben. Danach wurden die Proben in das Homogenisatorgerät gestellt, in dem das Gewebe zerkleinert und homogenisiert wurde. Im nächsten Schritt wurden 400 µl Lysat entnommen, durch eine 20 G Kanüle passagiert, homogenisiert und für weitere 5 Min. bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das Lysat auf RNEasy Minikit Säule (QiaShredder) gegeben und für zwei Min. bei maximalen UpM (13000 rpm) zentrifugiert. Das Lysat wurde dann in einem 1,5 ml Röhrchen aufgefangen und für weitere drei Min. bei maximaler UpM zentrifugiert. Dies sichert die vollständige Zerkleinerung und Homogenisierung der großen DNA Fragmente des Gewebes und ermöglicht dadurch der DNAse, im weiteren Schritt besser zuzugreifen (s.u.). Im weiteren Schritt wurde 350 µl Lysatüberstand abpipettiert und zu gleichen Anteilen mit 70% Ethanol gut vermischt. Die Zelllinien wurden entsprechend dem o.g. Protokoll kultiviert, von der Kulturflasche abgelöst und

gezählt. Es wurde $5x10^6$ Zellzahl-Suspension entnommen und zur Isolation für fünf Min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit Lysispuffer mit einer G20 Kanüle homogen resuspediert und ebenfalls zu gleichen Anteilen mit 70% Ethanol versetzt und vorbereitet. Je 700 µl der Suspension wurden auf die Rneasy Minisäulen aufgetragen und entsprechend des RNA-Extraktionsprotokolls weiter bearbeitet. Die Säulen wurden geschlossen, auf 2ml Röhrchen platziert und anschließend für 15 Sek. bei 10000 UpM zentrifugiert. Die RNA Moleküle blieben an die so genannte "silica membrane" der Säulematrix gebunden. Kontaminationen an der Matrix wurden mit 350 µl RW1 Puffer entfernt. Eventuell vorhandene genomische DNA wurde durch einen direkten Verdau an der Säule (on column digestion) entfernt. Dazu wurden pro Säule 10 µl DNAse-Konzentrat mit 70 µl RDD Puffer verdünnt, direkt auf die Säulen gegeben, für 15 Min. bei RT inkubiert und durch Zentrifugation für 15 Sek. bei 10000rpm entfernt. Nach diesem Schritt folgten drei weitere Waschschritte, wobei der erste Waschschritt mit 350 µl RW1 und die zwei weiteren mit dem RPE-Puffer durchgeführt wurden. Hierfür wurden 500 µl RPE-Puffer in die Säulen gegeben und jeweils für 15 Sek. zentrifugiert. Die gesamte RNA haftete dabei in den Säulen. Im letzten Schritt wurde die Säulenmembran erst durch Zentrifugation bei maximaler UpM (13000rpm) für insgesamt 3 Min. getrocknet, die endgültige Elution der isolierten RNA erfolgte mit RNase-freiem Wasser. 50 µl Rnase-freies Wasser wurden auf die Membranen gegeben und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das isolierte RNA-Eluat in einem sauberen Rnase-freien Röhrchen aufgefangen, in dem es für zwei Min. bei 10000 UpM zentrifugiert wurde. Die Konzentration der gewonnenen RNA-Lösung wurde photometrisch (Implen Nano Photometer) bestimmt. Die RNA wurde zur weiteren Analysezwecken in cDNA umgeschrieben bzw. bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.3.2.2 Reverse Transkriptase-cDNA-first Strand Synthese mittels Super-ScriptTmIII

Die nach der Isolation gewonnenen totalen RNAs wurden zur Umschreibung in eine einzelsträngige cDNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) nach dem Protokoll des Herstellers (Super ScriptTm III First Strand Synthesis for RT-

PCR Invitrogen Cat. No. 18080-051) durchgeführt. RT ist ein Enzym, das drei enzymatische Aktivitäten (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine RNA-DNA-hybridabhängige Exoribonuklease (RNase H) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase) aufweist, die die Umschreibung von RNA in DNA über mehrere Schritte katalysiert und eine saubere cDNA liefert. Während die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität das RNA-Template in eine komplementäre DNA (cDNA) transkribiert, baut die RNase-H-Aktivität spezifisch nur RNA-Reste ab, die in RNA-DNA-Hybridmolekülen vorliegen. Durch die RNase-H werden reine RNAs nicht beeinträchtigt. Zur Durchführung wurden pro Ansatz 5µg totale RNAs per 20µl cDNA Reaktion verwendet.

Initial Primer /RNA Mix in 0,5 ml sterile Tubes

5µg RNA	n µl
Oligo (dT) Primer	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
DEPC H20	n µl
	10µl

Das zusammen pipettierte 10 µl Gesamtvolumen wurde im ersten Schritt der Synthese für fünf Min. bei 65°C inkubiert und mindestens eine Minute auf Eis gekühlt. Anschließend wurde 10 µl cDNA Sythese Mix (Pipettierschema s.u.) zugegeben. Die so gewonnene cDNA wurde zur Initiation der Erststrangsynthese mit Oligo Dt Primer angesetzt. Es wurde dabei nach Herstellerangaben vorgegangen.

cDNA Sythese Mix

10x cDNA synthesis buffer	2 µl
MgCl2	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOut (40U/µl)	1µl
Superscript III	1 µl
Synthese Mix	10 µl

Die synthetisierten cDNAs wurden als Ausgangsmaterial für die darauf folgende Zweitstrangsynthese und PCR-Amplifikation verwendet. Zur Amplifikation wurde die Methode IQ5 SYBRGreen Master Mix (Bio Rad) verwendet.

3.3.2.3 Real Time PCR (RT-PCR mit SYBRGreen Master Mix)

Das Prinzip der Real-Time-PCR ist eine Vervielfachungsmethode für Nukleinsäuren, die im Vergleich zu der ursprünglichen Polymerase-Kettenreaktion eine Quantifizierung der Nukleinsäure (cDNA) in Echtzeit ermöglicht. Dieses System basiert auf der Fluoreszenz (SYBRGreen). Dabei wird das neu entstandene DNA-Produkt während der Amplifikation detektiert und quantifiziert. Der Fluoreszensfarbstoff lagert sich mit hoher Affinität an die doppelsträngigen DNA-Produkte und nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, die während eines Zyklus erfasst werden. SYBRGreen zeigt in gebundenem Zustand eine deutlich höhere Fluoreszenz als in ungebundenem Zustand an.

Dies erlaubt, die Zunahme an doppelsträngigem PCR-Produkt während der PCR in Echtzeit zu verfolgen. Je früher ein Fluoreszenzanstieg gemessen wurde, desto höher war die Kopienzahl des Transkriptes eines bestimmten Genes, was bedeutet, dass Genexpression vorhanden ist. Die Zunahme der „Target“-DNA korreliert also mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Schmelzkurve und der sog. Ct–Wert sind im System als Kontrollen für die Spezifität des entstandenen Produktes eingebaut. Nach jeder Durchführung einer qPCR wurde daher eine Schmelzkurve- und Ct-Wertanalyse durchgeführt. Unspezifische PCR-Produkte, wie z.B. Primerdimere besitzen niedrige Schmelzkurven. Der Ct-Wert gibt den Wert an, bei dem der Fluoreszenz-Farbstoff erstmals signifikant über die Hintergrunds-Fluoreszenz ansteigt[61].

Die Durchführung und anschließende Analyse der Proben wurde mit Bio-Rad Icycler IQ5 Real time PCR durchgeführt. Die zur Analyse verwendeten Primer sind den Verbrauchsmateriallisten und der Oligonucleotid-Tabelle (Tabelle 3.1A und 3.3.2.3A) zu entnehmen. Letztere wurden mit der Software des Institutes Whitehead Primer-Designer Programm hergestellt. (www-genom-wi.mit.edu/cgi bin/primer/primer3. cgi). Alle verwendeten Primer wurden vor der endgültigen Anwendung auf ihre Effizienz (mit einer Verdünnungsreihe von cDNA 1, 1:10,

1:100,1:1000) und anschließend die PCR-Produktgröße sowie die Qualität der DNA unter Verwendung von Kontrollgel (8% Agarose-Gel) überprüft.

A

Gen-Name	Primer Sequenzen	Gen-ID	Basen-paarlänge
NOPE	5´-TGGGCCAAATTCGAAATAAC -3´ (20) 5´-GATGCTTTCAGGGTTTGAGG -3´ (20)	57722	109
Nope	5´-GCCATGGATGCCTTAAGTTC-3´ (20) 5´-AGCCAGGTAAACGAGTGAGC-3´ (20)	56741	103
GPC-3	5´-CTACAGCACCCTGTGGTCTTC -3´ (21) 5´-TCCTCTACTTCATGGCTGGAG -3´ (21)	2719	107
Albumin	5´-CTTGTTGCTGCAAGTCAAGC -3´ (20) 5´-ACAGGGTGTTGGCTTTACAC -3´ (20)	213	147
AFP	5´-AAGGCCAGGAACAGGAAGTC -3´ (20) 5´-CACACCGAATGAAAGACTCG -3, (20)	174	127
GAPDH	5- CAACGACCACTTTGTCAAGC -3 (20) 5- TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC -3 (20)	2597	142
HPRT	5` GACCAGTCAACAGGGGACAT-3`(20) 5`GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG3`(27)	3251	92

Tabelle 3.3.2.3A: Oligonucleotid- Primer Sequenzdarstellung

Zur Durchführung wurde erst der SYBRGreen PCR Master Mix mit allen Komponenten außer Template (cDNA) in einem 1,5 ml sterilen Reaktionsgefäß wie folgt vorbereitet und bis zur Verarbeitung auf Eis gekühlt aufbewahrt:

SYBR Green PCR Master Mix

2 x SYBRGreen PCR Master Mix	10 µl
10 µM Primer Mix	2 µl
40 ng/µl cDNA	4 µl
ddH2O	n µl
	ad. 20 µl

Der Amplifikationsansatz wurde in einer 96-er Testplatte nach dem folgenden Protokoll durchgeführt: 50°C für zwei Min., danach weitere Inkubationen für 10 Min. bei 95°C. Hierbei wird Taq Polymerase aktiviert, wodurch der gleichzeitige Start aller Reaktionsvorgänge garantiert wird.
Die Amplifikation erfolgt anschließend nach folgenden Programm:

Zyklen (40x)			
Denaturierung	15 sec	bei	95 °C
Annealing /Elongation	30 sec	bei	60 °C

Für die Detektion wurde das Bio-Rad Detektionssystems (Fluoreszenzfarbstoff-Detektion mit Multicolour Bio-Rad PCR Detection System) angewendet. Die Quantifizierung der Proben erfolgte durch Dreifachbestimmung (Triplikate), als Referenzgene wurden ß-Actin und HPRT verwendet. Zur Linearisierung und Kontrolle wurde AL verwendet. Die Reinheitskontrolle der Amplifikations-Reagenzien (Kontaminationsfreiheit) wurde mit H2O durchgeführt. Die Auswertung und Quantifizierung der unterschiedlichen Expression der einzelnen Proben wurde mit der Formel bzw. Differenz-Formel; Ratio= ΔΔCt- Werte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) berechnet.

ΔCt = Ct Tumor - Ct OT
ΔΔCt = Zielgen - Ct Referenzgen (ß-Actin und HPRT)
Ratio $2^{-\Delta\Delta}$ Ct
Ausreißer wurden mit der Standardabweichungskurve (SD) ausgeglichen. Bei der Varianz bzw. Signifikanzanalyse der einzelnen Expressions-Unterschiede wurde der statistische P-Wert (α=0.05) berücksichtigt.

3.3.3 Proteinbestimmung und Western Blot-Analyse

3.3.3.1 Proteinextraktion mittels SDS-Lysepuffer

Die Extraktion der Totalproteine erfolgte sowohl aus den Zelllinien als auch aus den Lebergewebeproben mit dem SDS-Lysepuffer. Diese SDS-Lysepuffer (50 ml) wurden wie folgt hergestellt: 2,5 ml SDS 10%, 1,5 ml Tric HCL 0,5 M pH

6,8, 1,25 ml Glycerol sowie Proteinaseinhibitor plus 1 mM EDTA (=1 Tablette Complete Fa. Roche, Mannheim). Die Endkonzentration der Verbrauchslösung entsprach 0,5% SDS 15 mM Tris HCL PH-Wert 6.8, 0.5 M HCL 2,5% Glycerol. Zur Proteinisolation wurden erst die Zelllinien von den Kulturschalen mit Trypsin und Medium abgelöst, zentrifugiert und Zellpellet mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Der vorbereitete SDS-Lysispuffer wurde zugegeben und anschließend 10-mal mit Hilfe einer Kanüle durch mehrmaliges Hochziehen homogenisiert. Das Homogenisat wurde 1 h bei RT stehen gelassen, anschließend für 30 Min. bei maximalen UPM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt das gesamte Protein (Totalprotein). Die untersuchten Lebergewebeproben (ca.150 mg) wurden erst in Stickstoff gefroren, zermahlen und wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Das Prinzip dieser Methode der Proteingewinnung basiert auf der Eigenschaft des SDS. SDS in hoher Konzentration zerstört die nicht-kovalenten Proteinbindungen und somit die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine. Zur Gewinnung der Membranproteine wurde die TED-Reagenz-Methode mit der Zusammensetzung 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl und Proteaseinhibitor verwendet. Die Konzentration der isolierten Proteinmengen wurde nach der sehr sensitiven Bicinchinon-Säure-Methode BCA durchgeführt. Dabei entstehen wasserlösliche Farbumschläge, die mit der Konzentration der vorhandenen Proteinmoleküle korrelieren. Das Produkt wurde anschließend photometrisch bestimmt. Zur photometrischen Bestimmung via Elisa wurde der Pierce ELISA Reader (Fa. Pierce) bei λ = 570 nm gegen eine 2 mg-Albumin-Standard-Lösung-Kurve benutzt. Dabei wurde nach der Herstellerangabe vorgegangen. Die Proteinuntersuchung hat sich auf das Gesamtprotein konzentriert, da die TED-Methode, die selektiv Membran-Proteine isoliert, zu keiner NOPE-Banden-Detektion geführt hat (Abbildung nicht dargestellt).

3.3.3.2 Elektrophoretische Trennung mittels SDS-PAGE und Immunoblot

Zur Trennung der Proteine im elektrophoretischen Feld wurde erst ein PAA-Gel hergestellt. Das PAA-Gel besteht aus Polymerisation der Stoffe Acrylamid und Methylenbisacrylamid, was die Quervernetzung des Polyacrylamids bewirkt. Hierbei wurde die Zusammensetzung des Gels entsprechend den Angaben des Herstellers im Verhältnis 37,5 g:1 verwendet. Zusätzlich wurden APS und

TEMED zugegeben. Während die APS-Lösung (10%) als Sofortstarter der Polymerisierung dient, katalysiert TEMED die Polymerisation des Gels. Die beiden Stoffe wurden erst unmittelbar vor dem Gießen zugegeben. Das Gel setzt sich aus dem niedrig-konzentrierten (5%) Sammelgel und Trenngel (8%) zusammen. Die ideale Konzentration des Trenngels ist abhängig von der Ladung und dem Molekulargewicht (Masse) des zu trennenden Proteins. Vor dem Gießen werden die Glasplatten vorbereitet. Die Glasplatten müssen vor dem Zusammenbau sauber und absolut fettfrei sein. Dazu wurde Ethanol verwendet. Die Hohlräume der Glasplatten wurden durch einen Abstandhalter (Spacer) voneinander getrennt und abgedichtet.
Die Gellösungen wurden erst getrennt in zwei Gefäßen hergestellt und zügig in den Hohlraum der vorbereiteten und abgedichteten Glasplatten gegossen. 15 ml Trenngellösung (ausreichend für zwei Gele) wurden mit 30 µl der 10%-igen APS-Lösung sowie 3 µl TEMED versetzt und zügig mit einer Pasteurpipette in den Hohlraum der beiden Glasplatten bis zur Markierung (für Sammelgel ca. 2 cm) pipettiert. Anschließend wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet, was die Glättung der Geloberflächen bewirkt. Nach ca. 45 Min. bis 1 Stunde polymerisiert das Trenngel. Der Alkohol wurde abgegossen und mit Filterpapier vorsichtig abgetrocknet. Danach wurde die Sammelgellösung (4 ml mit APS und TEMED versetzt) etwa 2 cm hoch über das Trenngel pipettiert. Um die Taschen zum Einfüllen der Proben zu erhalten, wurde ein spezieller Elektrophorese-Kamm eingesteckt. Nach ca. 30 Min. polymerisierte das Sammelgel. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und das Gel in das Elektrophorese-Gerät eingespannt. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde die Methode Mini Twin Gel (Fa. Biometra) verwendet.

3.3.3.3 Prinzip und Durchführung der Gel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Trennung des Proteingemisches wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt[54]. Diese Methode ist dazu geeignet, Proteine nach ihrer Molekülgröße zu trennen. Hierbei wurde erst das Proteingemisch thermisch denaturiert. Das Prinzip dieser Methode der Proteingewinnung ist, dass SDS in hoher Konzentration die Eigenschaft besitzt, nicht-kovalente Proteinbindung zu zerstören und somit die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzulösen. Die Proteine liegen

dann in Primärstruktur vor, wodurch sich SDS anlagern kann. Es ist ein anionisches Detergenz, das in der Lage ist, die Eigenladung der Proteine zu überdecken (1 g Protein bindet 1,4 g SDS). Hierbei weisen die Proteine eine negative Ladung auf und wandern zum positiven Pol (Anode) im elektrischen Feld. Der Zusatz von ß-Mercaptoethanol bewirkt die Zerstörung der Disulfidbrücken durch Reduktion[49]. Dafür wurden die Proteinproben (30 µg pro Tasche) in einem 1,5 ml Eppendorf Hütchen pipettiert und mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. 15 µl Gelloadingbuffer (schwerer negativ geladener Farbstoff, Kontrolle der Laufbanden) wurde auf 95°C für 5 Min. erhitzt, anschließend gekühlt und zentrifugiert. Das in ein Elektrophorese-Gerät (Mini Twin Gel) eingespannte Gel wird mit Elektrophorese Puffer (1x TAE Puffer) gefüllt, in die ausgesparten Taschen wurde die Proben pipettiert und elektrophoretisch in Trans Blot System Bio Rad getrennt. Für das Gel wurden 1 x TAE Puffer und als Laufpuffer 0,5 x TAE Puffer verwendet. Bis zur Überschreitung des Sammelgels wurde die Elektrophorese bei 80 V und anschließend das Trenngel bei 110 V durchgeführt. Die Gesamtlaufzeit betrug ca. 2 bis 3 h.

50 x TAE Puffer 1 Liter wird folgend zusammengesetzt:

242 g	Trisbase 2 M Tris-Base
57,1ml 2 M	Essigsäure
186,1 g EDTA	100 ml 0, 5 (pH 8)
dd H2O	ad. 1000 ml (TAE-Puffer mit NaOH auf pH 8 eingestellt).

3.3.3.4 Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran

Zur Elution der Proteine aus dem PAA Gel wurde das Trans Blot System Semi-Dry-Elektro-phoretic Cell (Bio-Rad) verwendet. Dafür wurde nach erfolgreicher Durchführung der Elektrophorese das Gel einer Nitrocellulosemembran für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert. Zur Durchführung wurden sowohl die Nitrocellulosemembran als auch zwei Whatman Filterpapiere für zwei Min. in 1x Transferpuffer eingeweicht und luftblasenfrei ein Sandwich aus dem Gel, der Nitrocellulosemembran und dem Filterpapier hergestellt und in dem vorbereiteten Trans-Blot-Gerät eingespannt. Der Transfer auf die

Nitrocellulosemembran erfolgte bei einer Stromstärke von 0.02 Ampère für 60 Min. und wurde anschließend mittels spezifischer gegen die gesuchten Proteine gerichteter Antikörper detektiert.

10 x Transferpuffer wird wie folgt zusammengesetzt:

114 g	Glycin
30, 3 g	Tris base
10 g	SDS
ddH2O	ad. 1 L H2O

3.3.3.5 Immundetektion der Proteine

Die mit Hilfe des Western Blots auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. Hierbei bindet ein primärer, gegen das Zielprotein gerichteter, Antikörper an das Protein. Der sekundäre Antikörper bindet an die konstante Region des Primärantikörpers. Zur Detektion wurde ECL Western Blot-Detection-System (Amersham Cat. No. RPN 2106) verwendet**.** Vor der Durchführung der Detektion wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4°C in 5% Milchpulver-PBS-Lösung (0,05 Tween20) geblockt. Die Blockierung dient dazu, die unspezifischen Bindungen des Antikörpers an die Membran und somit unspezifische Signalgebung zu verhindern. Nach der Blockierung wurden die Membranen 2x 5 Min. bei RT mit PBS-Tween (0,5%) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper bei 25°C und leichtem Schütteln für zwei Stunden. Zum Gebrauch wurden die Antikörper je nach Herstellerangaben unterschiedlich verdünnt in Blocking-Milch (0,6 g 10 mM Tris, 5% Trockenmilchpulver (25 g) ,2% BSA(10 g), 0,1%Tween-20 (0,5 ml) ad 500ml H2O, pH 7, 6 mit HCL) verwendet. Nach der ersten Inkubation mit dem ersten AK wurde die Membran 2x 10 Min. in PBS-Tween (0,5%) gewaschen. Danach folgte eine Inkubation für eine Stunde mit dem zweiten peroxidase-konjugierten AK. Nach gründlichem Waschvorgang wurde zur Detektion ECL-Reagenz gegeben. Dabei entsteht durch Oxidation des Luminols eine Enzymreaktion, die in angeregtem Zustand Licht emittiert und bei λ=428 nm gemessen wird. Dadurch werden die Banden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und anschließen detektiert. Um Detek-

tionen anderer Primärantikörper mit demselben Blot durchführen zu können, wurden die Membranen „gestrippt“, was die weitgehende Entfernung von an die Proteine gebundenen Antikörpern bewirkt. Der „Stripp“ wurde mit 0.2 N NaOH für 10 Min. durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind der Tabelle 4.1.1 zu entnehmen.

3.3.4 Immunhisto-/zytochemie-Verfahren

3.3.4.1 Prinzip und Durchführung der Immunhistochemie

Immunhisto-/ Zytochemische Verfahren sind Methoden, die dazu dienen Proteine sichtbar zu machen. Dadurch kann identifiziert werden, in welchem Kompartiment der Zelle das Zielprotein (zytosolisch, plasmamembranös oder zytoplasmatisch) lokalisiert vorliegt. Zur Darstellung wurden primäre Antikörper verwendet, die spezifisch gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet sind. Es kommt zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der sekundäre Antikörper bindet sich spezifisch an den primären Antikörper. An den sekundären Antikörper ist eine Markierung gekoppelt, welche die Detektion im Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Das Prinzip beruht auf einer Affinität der Antikörper zu einer bestimmten Zell- bzw. Gewebeeigenschaft. Dies wird als ein Epitop bezeichnet, womit der erste Antikörper eine spezifische Bindung eingeht. Unspezifische Bindungen und Hintergrundfärbung wurden mit IgG-Isokontrollen validiert. Alle untersuchten Proben waren kryokonserviert, was eine bessere Qualität der Strukturen gewährleistet als andere konventionelle Konservierungen, wie z.B. Paraffin.

Zur Durchführung der Färbung wurden die Proben (Zelllinien und Leberschnitte) mit Aceton für 10 Min. fixiert. Anschließend wurden die Objektträger für ca. 30 Min. luftgetrocknet, beschriftet und ein Bereich darauf mit einem wasserfesten Stift eingegrenzt. Anschließend wurden die Präparate mit 100% PBS für 10 Min. rehydriert und in die vorbereitete feuchte Kammer zur Weiterverarbeitung plaziert. Erst wurde auf die Objektträger mit 50 µl BB-Solution (PBS + 5% Donkey- Serum + 0.05% Tween-20) gegeben und für 1h bei RT inkubiert, wodurch die unspezifischen Proteine geblockt wurden. Anschließend wurde dem Protokoll entsprechend 50 µl verdünnte pAK-Kombination auf dem Objektträger gegeben und für 2h bei RT inkubiert und mit 50 ml PBS/ 0.05% Tween für je 2 x

5 Min. gewaschen. Im weiteren Schritt wurden je 50 µl sAK-Kombination gegeben und für eine weitere Stunde lichtgeschützt inkubiert. Danach sind die Objektträger für je 5 Min. ein Mal mit 50 ml PBS-Tween und ein weiteres Mal mit 50 ml 100% PBS gewaschen worden. Schließlich wurden die Präparate mit Mounting Medium eingedeckt und mikroskopiert.

3.3.4.2 Prinzip der Immunhisto-/zytochemischen Kofärbung

Zur Darstellung und Abgrenzung der jeweiligen Proteine in einem Präparat wurde die immunhistochemische Färbung in Kombination mit unterschiedlichen primären bzw. sekundären AK (pAK: NOPE (NOPE ist ein neuer AK und wurde von der Hersteller-Firma Fa. Abnova durch Rekombinatproteine verifiziert und das Produkt mit Kontrollzellen überprüft), AFP, E-Cadherin, transGolgi, Nope) und sekundären AK (CY2, CY3 (DaG), CY3 (Maus), APC in AB.- Lösung + 1:10000 DAPI (Fluoreszenzfarbstoff zur Zellkerndarstellung) durchgeführt.
Voraussetzung ist, dass sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper in unterschiedlichen Tierspezies generiert sein müssen. Die fluoreszenzmarkierten sekundären AK binden sich spezifisch an die ersten AK und lassen sich entsprechend detektieren. Bei jeder Färbung wurden Isokontrollfärbungen durchgeführt. Zur Beurteilung wurde das OLYMPUS Mikroskop Cell M³ 1x81 verwendet. Die Fluoreszensmarkierungen der sekundären AK fluoreszieren dabei in unterschiedlichen Kanälen, bei unterschiedlichen Wellenlängen zwischen 400-670 nm und erlauben somit die Interpretation der differenzierten Strukturen.

4. Ergebnisse

4.1 Humane Hepatoma-Zelllinien

4.1.1 Quantitative RT-PCR

Die humanen Hepatoma-Zelllinien HepG2, HuH7 und Hep3B wurden mittels qRT-RCR auf die differenzielle Expression von NOPE, AFP und Albumin im Vergleich zur adulten Leber untersucht. Als Referenzgene („Beladungskontrolle“) wurden ß-Actin und HPRT verwendet. Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden sowohl in einer linearen (Abb. 4.1.1A) als auch in einer logarithmischen Skala (log2) (s. Abb. 4.1.1B) graphisch dargestellt.

Alle untersuchten humanen Zelllinien wiesen eine im Vergleich zur adulten Leber höhere NOPE-Expression auf (HepG2 = 4,78-fache, HuH7 = 3,88-fache, Hep3B = 4,77-fache Kopienzahl-Erhöhung). Eine erhöhte Expression von AFP wiesen hingegen nur die Zelllinien HepG2 (6,21-fach) und HuH7 (8,9-fach) auf. Die Expression von Albumin war in allen Zelllinien im Vergleich zur adulten Leber reduziert (HepG2 = -5,5-fache, HuH7 = -4,55-fache, Hep3B = -3,57-fache Kopienzahl-Reduktion).

Die Ergebnisse belegen, dass NOPE sowohl in AFP-positiven als auch in AFP-negativen Hepatoma-Zelllinien auf mRNA-Ebene exprimiert wird. Die Tabelle 4.1.1C fasst die Ergebnisauswertung zusammen.

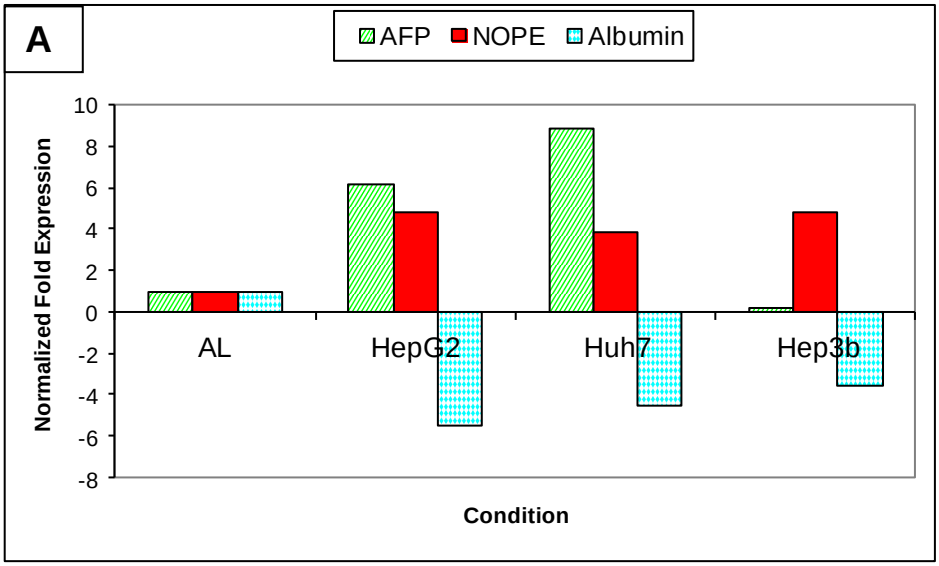


Abbildung 4.1.1A: Lineare Darstellung der Zelllinien

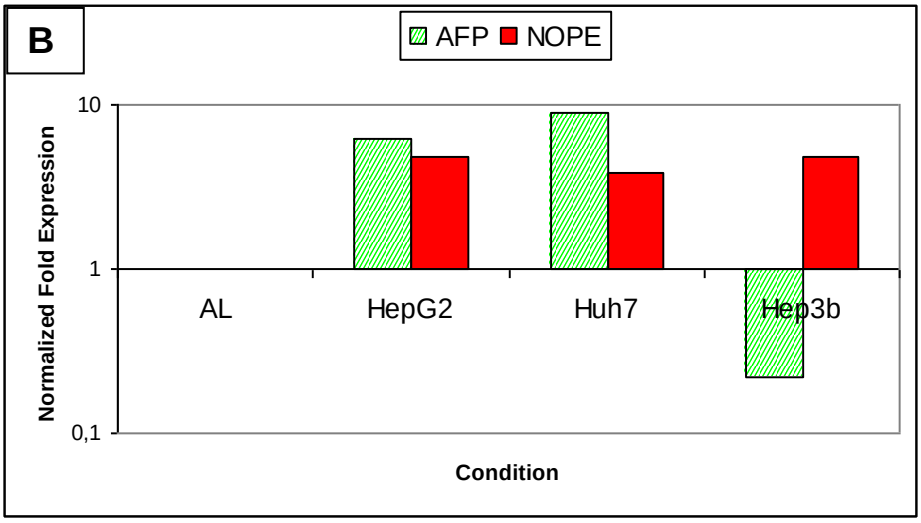


Abbildung 4.1.1B: Logarithmische Darstellung der Zelllinien

Abb. 4.1.1 A und **B** zeigen die quantitativen RT-PCR-Ergebnisse der Expression von NOPE, AFP und Albumin (A) im Vergleich zur adulten Leber (AL) der drei untersuchten Zelllinien (HepG2, HuH7, Hep3B) in linearer (A) und für NOPE und AFP auch in logarithmischer (B) Darstellung.

C

	NOPE	AFP	Albumin
HepG2	+ (+ 4,78x)	+ (+ 6,21x)	- (- 5,5x)
HuH7	+ (+ 3,88x)	+ (+ 8,9x)	- (- 4,55x)
Hep3B	+ (+ 4,77x)	- (- 0,22x)	- (- 3,57x)

Tabelle 4.1.1C: Tabellarische Zusammenfassung der qRT-PCR Ergebnisseder Hepatoma-Zelllinien

Tab. 4.1.1C Zusammenfassung des Vergleichs der Expression von NOPE, AFP, und Albumin in den untersuchten Hepatoma-Zelllinien mit adultem Lebergewebe. Die Zahlen in Klammern zeigen das Vielfache der Expression (Kopienzahl-Erhöhung bzw. -Reduktion) in den jeweiligen Hepatoma-Zelllinien an.

4.1.2 Western Blot

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR wurden anschließend mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Verwendet wurden ein kommerziell erhältlicher monoklonaler anti-humaner NOPE-Antikörper, ein polyklonaler anti-humaner AFP-Antikörper und ß-Actin als Referenzgen.

Der monoklonale NOPE-AK detektierte bei allen Hepatoma-Zelllinien (HepG2, HuH7, Hep3B) den Herstellerangaben entsprechend bei 130 kDa eine isolierte Bande, ergab jedoch keine Bandendetektion bei der adulten Leber als Negativkontrolle (s. Abb. 4.1.2A). Erwartungsgemäß zeigten sich nach Detektion mit dem AFP-Antikörper Banden bei 72 kDa bei HepG2 und HuH7, jedoch keine Bande bei Hep3B oder der adulten Leber als Negativkontrolle (s.

Abb. 4.1.2A). Mit ß-Actin konnte aufgrund einer Bande bei 43 kDa eine gleichmäßige Beladung des Gels bestätigt werden (s. Abb. 4.1.2A).
Der Western Blot bestätigte somit die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR mit einer erhöhten Expression von NOPE in den untersuchten Hepatoma-Zelllinien. Der etablierte Biomarker AFP hingegen war auch auf Proteinebene in einem Drittel der Zelllinien nicht zu detektieren.
Diese Proteinuntersuchungen waren auf Gesamtproteinextrakt beschränkt. Western Blot-Untersuchungen nach selektiver Anreicherung von Membranproteinen ergaben keine Bandendetektion mit dem kommerziellen NOPE-Antikörper (keine Abbildung).

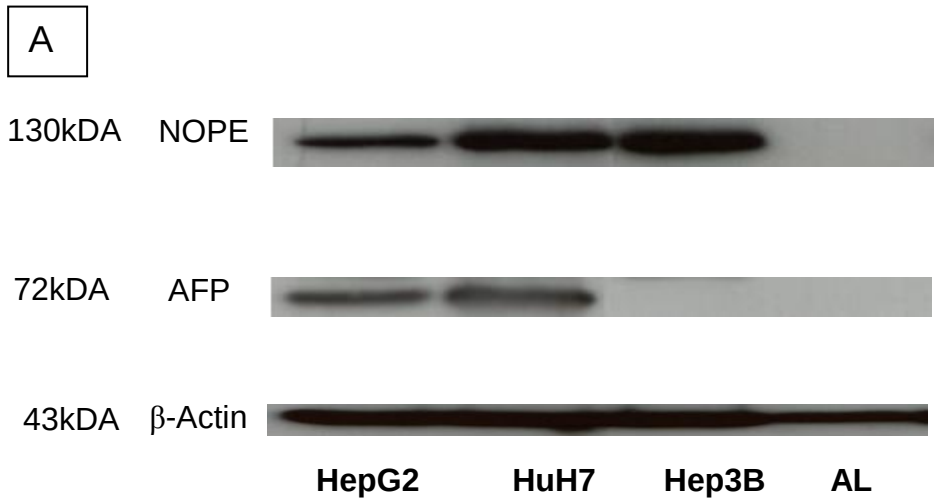


Abbildung 4.1.2A: Western Blot- Ergebnisse der Hepatoma-Zelllinien

Abb. 4.1.2A Alle drei Zelllinen (HepG2, HuH7, Hep3B) weisen eine NOPE-Bande bei 130 kDa auf. Eine AFP-Bande (72 kDa) ist nur bei den Hepatoma-Zelllinien HepG2 und HuH7 zu detektieren, während bei der Zelllinie Hep3B keine Bande nachweisbar ist. Bei der adulten Leber (AL) ist jeweils keine Bande detektierbar. Mit ß-Actin als Referenzgen wurde bei allen Proben bei 43 kDa eine gleichmäßige Proteinbeladung gezeigt.

4.1.3 Immunzytochemische-Kombinationsfärbung der Hepatoma-Zelllinien

Um die Ergebnisse von quantitativer RT-PCR und Western Blot zu überprüfen, wurden die Zelllinien auf einem Objektträger zu Kolonien gezüchtet und anschließend immunzytochemisch angefärbt. Die Färbung erfolgte mit dem monoklonalen anti-humanen NOPE-AK in Kombination mit Färbungen für zytosolisch lokalisiertes AFP und dem epithel-spezifischen E-Cadherin zur Anfärbung der Zellmembran. DAPI diente zur Darstellung des Zellkerns.

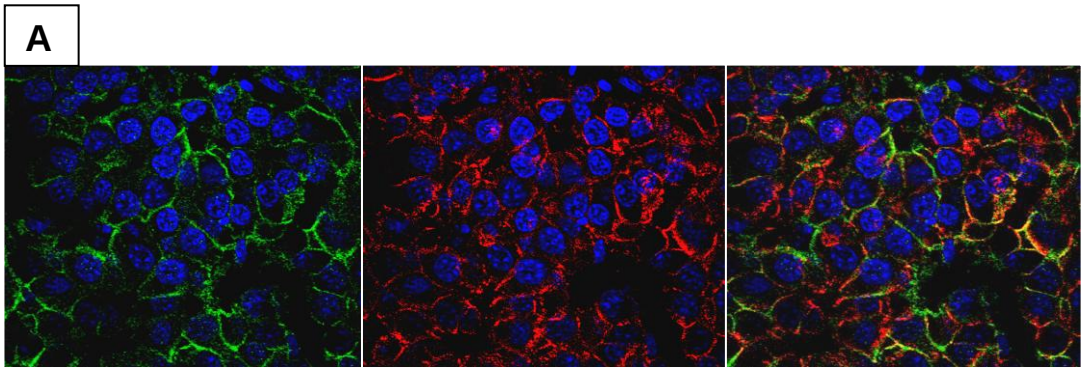
Mit dem monoklonalen anti-humanen NOPE-AK gelang trotz verschiedener Fixierungstechniken aller drei Zelllinien keine spezifische immunzytochemische Färbung oberhalb der mit Isotypen bereits vorhandenen Hintergrundintensität.

Daraufhin erfolgte eine Kombinationsfärbung mit dem im Mausmodell bereits etablierten polyklonalen Nope-AK.

Während die Kofärbungen im Mausmodell mit diesem polyklonalen Nope-AK und dem epithel-spezifischen E-Cadherin-AK ein membranöses Protein zeigte (s. Abb. 4.1.3A), ergab sich bei allen humanen Zelllinien (HepG2, HuH7, Hep3B) mit diesem Antikörper eine perinukleär lokalisierte Färbung (s. Abb. 4.1.3B). Dieses war bei der humanen Zelllinie HuH7 am stärksten nachweisbar. Färbungen mit AFP sowohl im Mausmodell (s. Abb. 4.1.3A) als auch in humanen Zelllinien ergaben erwartungsgemäß eine zytosolische Detektion (s. Abb. 4.1.3B). E-Cadherin färbte jeweils die Zellmembran an. Kontrollen mit Isoantikörpern ergaben keine signifikante Färbung.

Um die genaue Lokalisation dieser Nope-Färbung in den Zellorganellen der Hepatozyten zu evaluieren, wurden Kofärbungen des polyklonalen Nope-Ak mit einem transGolgi-AK (monoklonaler anti-humaner transGolgi-AK) durchgeführt. Diese ergaben, dass das mit dem polyklonalen Nope-AK dargestellte Protein im Golgi-Apparat lokalisiert ist (s. Abb. 4.1.3C).

Als Negativkontrolle wurden daraufhin Kryoschnitte adulter humaner Leber mit dem polyklonalen Nope-Antikörper angefärbt. Die perinukleäre Färbung war auch in der adulten Leber zu detektieren, so dass es sich bei dieser Färbereaktion am ehesten um eine unspezifische Färbung bzw. eine Kreuzreaktion mit einem anderen Antigen handelt.



A Nope/ DAPI **B** E. Caherin/ DAPI **C** Überlagerung Nope/ E.- Cadherin/ DAPI

Abbildung 4.1.3A: Immunhistochemische Darstellung von Nope in Maus-HCC-Zellen

Abb. 4.1.3A: Immunhistochemische Darstellung von Nope in Maus-HCC-Zellen. Mit dem polyklonalen anti-Maus Nope-AK wird in Mauszellen ein membranöses Protein detektiert **(A)**. Eine Kofärbung mit E-Cadherin **(B)** zeigt, dass Nope-positive HCC-Mauszellen epithelialen Ursprungs sind. In der Abbildung **(C)** wird die Überlagerung der Nope/ E-Cadherin- Bilder gezeigt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen.

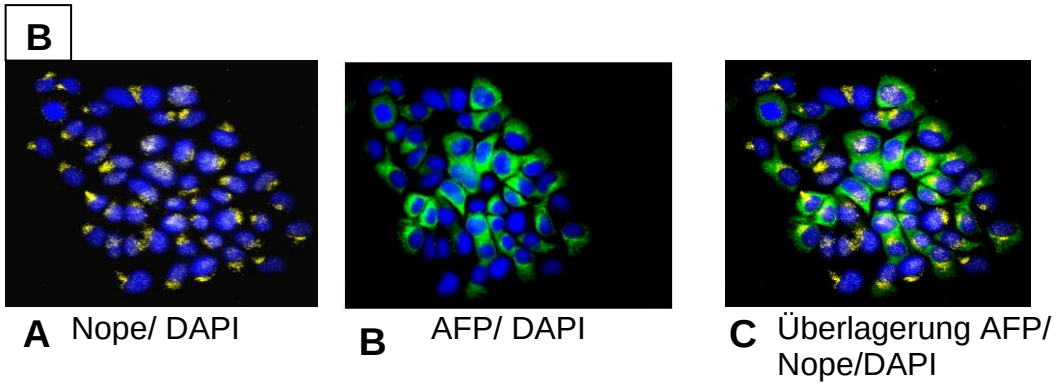


Abbildung 4.1.3B: HuH7 Immunhistochemische Lokalisation von Nope und AFP

Abb. 4.1.3B Immunzytochemische-Lokalisation von Nope (perinukleär) am Beispiel der Hepatomazelllinie HuH7 mit Hilfe des polyklonalen Nope-AK **(A)**. Zytosolische Lokalisation von AFP mit dem polyklonalen AFP-AK **(B)**. Mit DAPI wird der Kern dargestellt. Die Überlagerung der Bilder ist in der Abbildung **(C)** gezeigt.

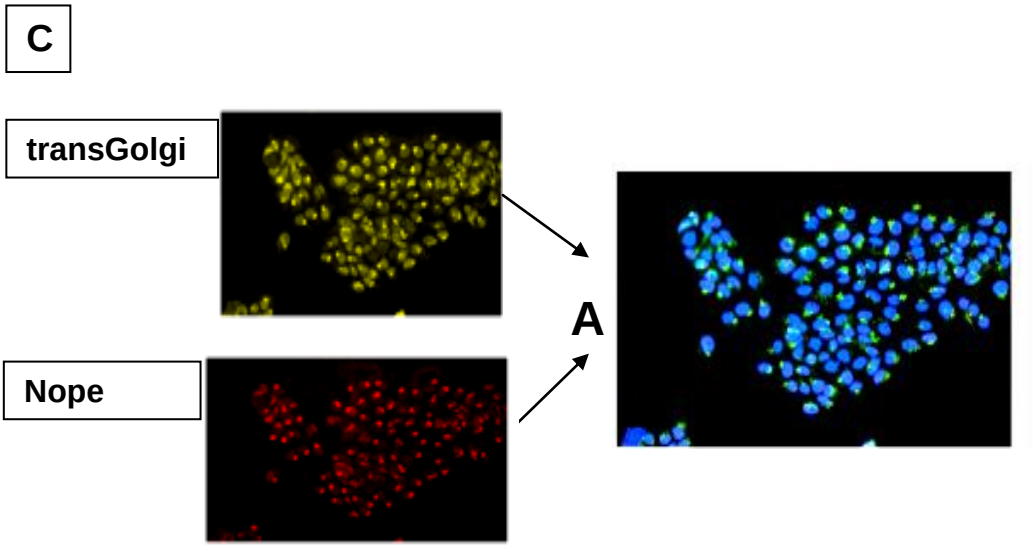


Abbildung 4.1.3C: HuH7 Koexpression Nope und trans Golgi

Abb. 4.1.3C Immunhistochemische Kombinationsfärbung mit Nope-, und transGolgi-AK. Die Lokalisation von Nope und transGolgi ist identisch, somit Nope in Golgi-Apparat lokalisiert. Die Überlagerung der Bilder (Nope/ transGolgi) ist in der Abbildung **A**. gezeigt.

4.2 Zusammenfassung: Hepatoma-Zelllinien

Mittels quantitativer RT-PCR, Western Blot und Immunzytochemie wurde die NOPE-Expression in verschiedenen Hepatoma-Zelllinien (HepG2, HuH7, Hep3B) im Vergleich zur adulten Leber analysiert.

Es konnte auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR und auf Protein-Ebene im Western Blot gezeigt werden, dass alle untersuchten humanen Hepatoma-Zelllinien eine im Vergleich zur adulten Leber hohe NOPE-Expression aufweisen. Der etablierte Tumormarker AFP hingegen war nur in den Zellinien HepG2 und HuH7 exprimiert. Die Albumin-Expression war in allen Zelllinien im Vergleich zur adulten Leber reduziert.

Eine immunzytochemische Färbung mit dem monoklonalen anti-humanen NOPE-AK gelang jedoch nicht. Die immunzytochemische Färbung mit dem polyklonalen Nope-AK (90% Homologie zu humanen Zellen) ergab eine perinukleär-lokalisierte Detektion. Weitere Kombinationsfärbungen bestätigten eine Lokalisation im transGolgi-Netzwerk. Dieser polyklonale Antikörper zeigte diese Färbung jedoch auch in der normalen adulten Leber und wurde daher als unspezifisch gedeutet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass NOPE nicht nur in AFP-positiven, sondern auch in AFP-negativen humanen Hepatoma-Zellinien mittels qRT-PCR und Western Blot detektiert werden kann. Eine Immunzyto-/-histochemische Darstellung gelingt mit den verfügbaren kommerziellen Antikörpern jedoch nicht.

Diese Ergebnisse sollen im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit an HCC-Patientenproben evaluiert werden.

4.3 HCC-Patientenleberproben

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Zelllinien auf HCC-Proben zu überprüfen, wurden Patientenproben (aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Köln, Direktor Prof. Dr. Dienes) untersucht. Insgesamt wurden 24 kryokonservierte Lebergewebeschnitte sowie zwei Gewebeschnitte mit Lebermetastasen von einem Pankreas- und einem Kolonkarzinom auf eine NOPE-Expression hin analysiert. Alle Tumore wurden sowohl auf mRNA- (quantitative-RT-PCR) als auch auf Proteinebene (Western Blot, Immunhistochemie) untersucht.

4.3.1 Gesamtüberblick der untersuchten Proben

Die Einteilung der ausgewählten HCC-Proben erfolgte zunächst nach der Ätiologie der zugrundeliegenden Lebererkrankung, dem Vorhandensein einer Fibrose bzw. Zirrhose und dem Differenzierungsgrad des Tumors.

Die ätiologische Einteilung der HCC-Proben stellte sich wie folgt dar: Über die Hälfte der HCCs entstanden auf dem Boden einer Virushepatitis (chron. HBV-Infektionen 30% und chron. HCV-Infektionen 25%). Ein HCC auf dem Boden einer hereditär-metabolischen Stoffwechselstörung oder auf Grund toxischer Ursachen betraf jeweils 8% der untersuchten Patientenproben. Bei 29% der Proben war die zugrundeliegende Lebererkrankung unbekannt (s. Abb.4.3.1A). Nur bei 33% der Patienten war gemäß histologischem Befund eine Leberzirrhose nachweisbar, bei 8% der Proben war die Auswertung bezüglich einer Zirrhose nicht möglich.

Der Differenzierungsgrad des Tumors wurde wie in Tabelle 4.3.1A dargestellt eingestuft. Hierbei machte der Differenzierungsgrad II mit 58% den größten Anteil der HCC-Proben aus.

A

HCC-Proben	Verteilung in Prozent	Differenzierungsgrad des Tumors
Grad I	4%	Gut differenziert, hohe Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe
Grad II	58%	Mäßig differenziertes bösartiges Gewebe
Grad II-III	13%	Mittelmäßig bis schlecht differenziertes Gewebe
Grad III	21%	Schlecht differenziertes malignes Gewebe
Grad IV	4%	Undifferenziertes malignes Gewebe, immun-histochemisch dem Ausgangsgewebe kaum noch zuzuordnen

Tabelle 4.3.1A: Differenzierungsgrad des Tumors der untersuchten Proben

71% der Patienten waren männlichen Geschlechts (s. Abb. 4.3.1B). 16% der Patienten hatten einen Migrationshintergrund (Abbildung nicht dargestellt).
Von den 24 untersuchten Proben konnten bei 17 Patienten weitere Informationen über den klinischen Verlauf und die Behandlung der jeweiligen Patienten eingeholt werden. Demnach war der etablierte Tumormarker AFP im Serum bei 17,6% (= 3 Patienten) der Patienten erhöht, bei 58,8% (= 10 Patienten) im Normbereich (≤ 5,8 kU/l). Bei den restlichen 23,5% (= 4 Patienten) der Patienten war kein AFP-Wert zu eruieren. 29,4% der Patienten hatte in der Zwischenzeit eine Lebertransplantation erhalten. Alle HCC-Patienten mit der Ätiologie HCV zeigten eine Reinfektion des Transplantats.

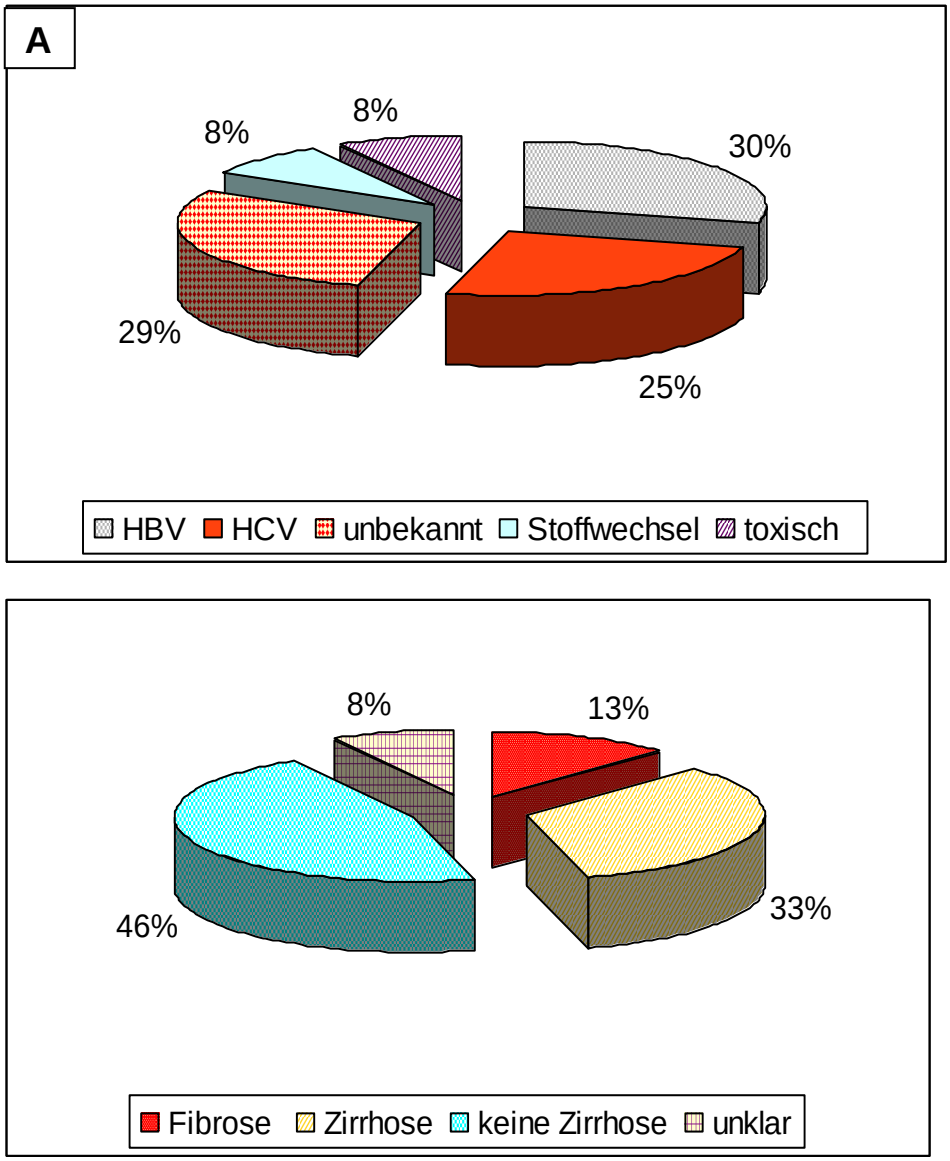


Abbildung 4.3.1A: Ätiologische Einteilung und Verteilung nach Zirrhose

Abb. 4.3.1A Darstellung der prozentualen Verteilung nach Ätiologie (oben): virale Ursachen (HBV und HCV) 55%, eine unklare Ätiologie liegt bei 29% der Proben vor, Stoffwechsel und toxische Ursachen machen jeweils 8% der Proben aus. Bei 46% der Proben ist keine Zirrhose vorhanden, bei 33% der Leberproben ist eine Zirrhose nachweisbar. 13% der HCC-Proben zeigen eine Fibrose. Bei 8% der Proben ist bezüglich einer Fibrose bzw. Zirrhose keine klare Abgrenzung möglich.

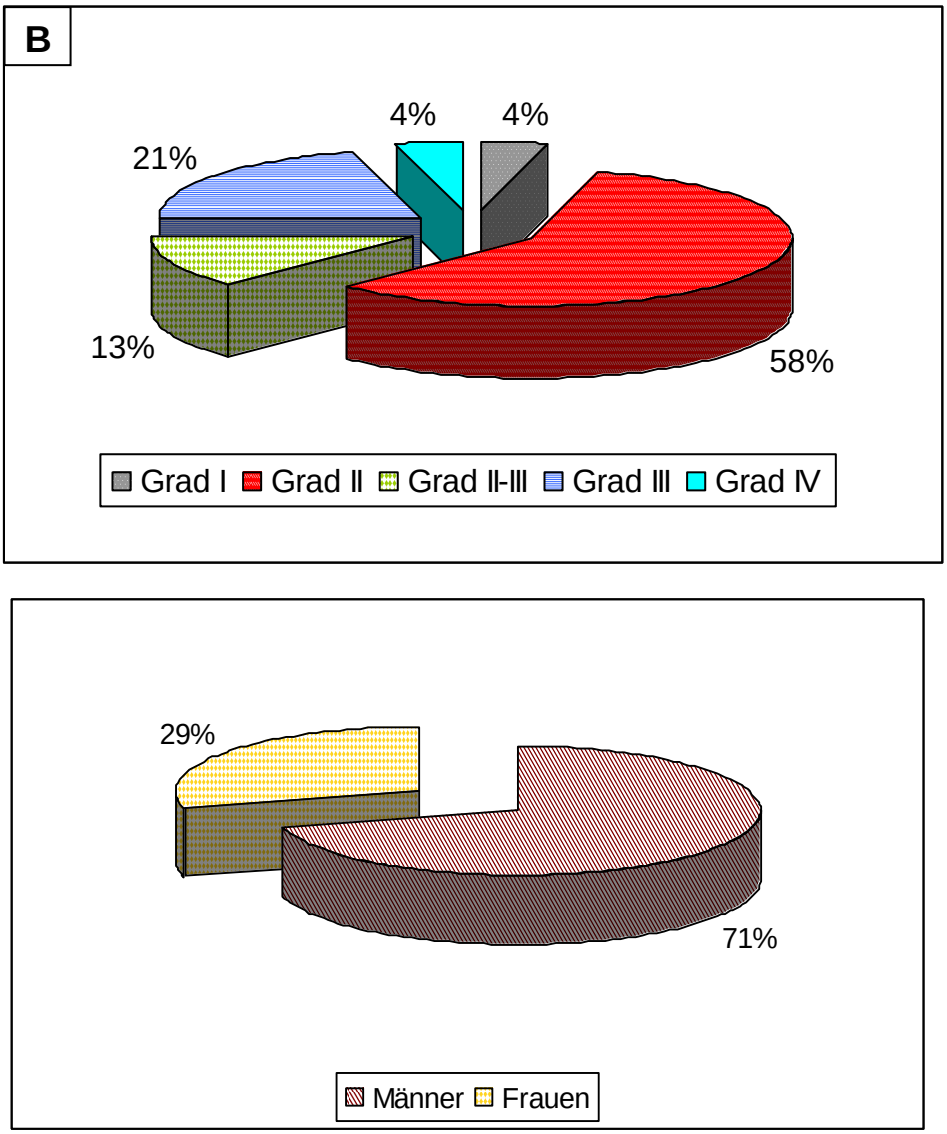


Abbildung 4. 3.1B: Einteilung nach Differenzierungsgrad und Geschlecht

Abb. 4.3.1B In der Abbildung wird die Einteilung nach Differenzierungsgrad I-IV (oben) des Tumors sowie Verteilung nach Geschlecht der untersuchten HCC-Proben gezeigt. Der Differenzierungsgrad II macht mit 58% den größten Anteil der HCC-Proben aus. 71% der untersuchten Leberproben stammen von Männern.

4.3.2 Quantitative RT-PCR der HCC-Proben

Zur Quantifizierung der NOPE-Expression auf mRNA-Ebene wurde bei jeder HCC-Probe das Tumorgewebe (T) mit dem tumorfreien umgebenden Lebergewebe (OT) und mit einer humanen, nicht pathologisch veränderten adulten Leber (AL) verglichen. Anschließend wurden alle Tumore (T) und alle tumorfreien Gewebe (OT) gegen die AL-Kontrolle linearisiert. Als Referenzgene wurden ß-Actin und HPRT verwendet. Die Auswertung der quantitativen RT-PCR mit den beiden Referenzgenen war nicht signifikant different.
Für die Bewertung einer HCC-Probe (T) als „NOPE-positiv“ mussten alle folgenden Kriterien erfüllt sein:

1. Detektionslimit waren max. 32 Zyklen bis zum Erreichen des Threshold
2. Mind. 2,5-fach höhere NOPE-Expression im Vergleich zu AL
3. Höhere NOPE-Expression im Vergleich zur OT-Probe

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analysen zeigten, dass einige Tumore im Vergleich zu adultem Lebergewebe und dem tumorfreiem Gewebe derselben Leber (OT) eine deutliche NOPE-Expression aufwiesen. Insgesamt erfüllten 33,3% der Proben alle der oben genannten Kriterien und waren somit NOPE-positiv (Abb. 4.3.2A).
Bei allen NOPE-positiven Ergebnissen wurde weiter bezüglich der NOPE-Expressionsintensität zwischen starker, mittlerer und schwacher Expression unterschieden (PCR-Zykluszahl von 23 – 31,5 Zyklen):

- starke Expression: 26,4 - 170,5 -fach erhöhte Kopienanzahl vs. AL
- mittlere Expression: 8,7 - 26,4 – fach erhöhte Kopienanzahl vs. AL
- schwache Expression: 2,7 - 8,7 -fach erhöhte Kopienanzahl vs. AL

Entsprechend dem Vorgehen bei der NOPE-Expression wurde bei AFP ebenfalls ein “cut-off” bei 2,5 PCR-Zyklen im Vergleich zu AL gesetzt und nur eine höhere Expression als im zu vergleichenden OT-Gewebe als AFP-positiv gewertet. Die AFP-Expression der Proben war auf mRNA-Ebene sehr

variabel und bewegte sich zwischen 22 - 28 Zyklen bis zum Erreichen des Threshold. Nur 29,2% der Proben waren unter Berücksichtigung der obengenannten Kriterien AFP-positiv.

Eine Expression von NOPE (33,3%) und/ oder AFP (29,2%) ergab sich demnach bei 50% der HCC-Proben, wobei nur 12,5% eine Koexpression für NOPE und AFP aufwiesen. Von den NOPE-positiven HCC-Proben sind 37,5% AFP- und NOPE-positiv, 62,5% der NOPE-positiven HCC-Proben hingegen sind AFP-negativ. Von den NOPE-negativen Proben waren nur 16,6% AFP-positiv. Von den AFP-positiven Proben waren 12,5% gleichzeitig NOPE-positiv und 20,8% der AFP-negativen Proben waren NOPE-positiv. (s. Tabelle 4.3.3.2B)

Bei 50% der untersuchten HCC-Proben wurde nach den oben genannten Kriterien auf mRNA-Ebene keiner der Marker (AFP und/ oder NOPE) detektiert.

Es wurde zudem festgestellt, dass einige tumorfreie Lebergewebe (OT) eine erhöhte AFP-und NOPE-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zur AL zeigten. Insgesamt wurde eine erhöhte NOPE-Expression bei 12,5 % der OT-Proben sowie eine erhöhte AFP-Expression bei 16,6% der OT-Proben nachgewiesen (s. Abb. 4.3.2 B).

Zusätzlich wurde eine deutliche NOPE-Expression bei der Lebermetastase eines Kolonkarzinoms festgestellt. Das Gewebe mit der Metastase eines neuroendokrinen Pankreaskarzinoms zeigte keine NOPE-Expression (s. Abb. 4.3.3.1G und H).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die quantitativen RT-PCR-Analysen der HCC-Proben zu 33,3% NOPE-positiv waren. 20,8% der AFP-negativen HCC-Proben waren NOPE-positiv. Von den NOPE-negativen Proben waren 16,6% AFP-positiv.

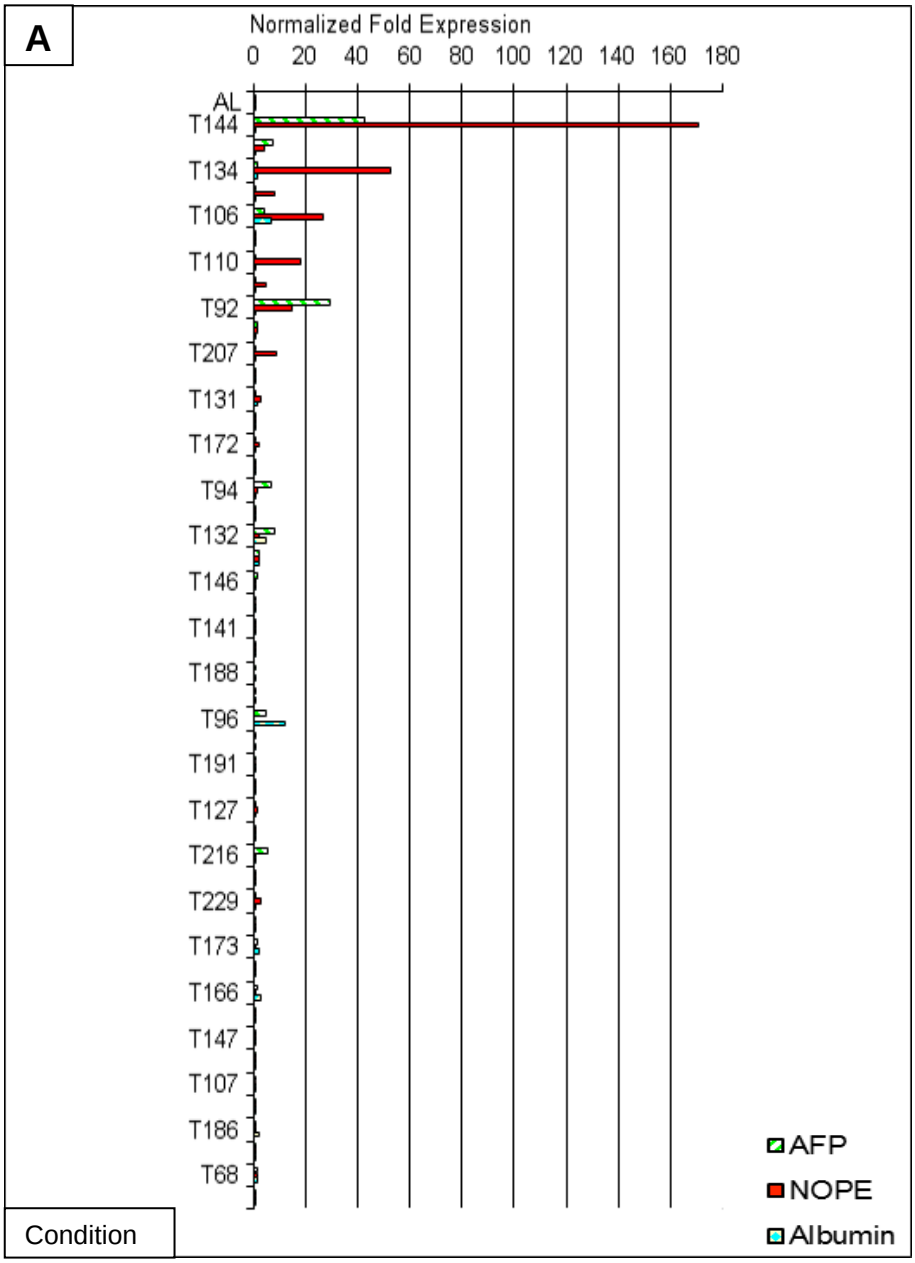


Abbildung 4.3.2A: Übersicht qPCR humane HCCs; nur Tumorgewebe (T)

Abb. 4.3.2A stellt eine Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse (AFP, NOPE und Albumin-Expression auf mRNA-Ebene) aller untersuchten HCC-Proben vs. AL dar. Hierbei wird festgestellt, dass 33,3% der HCC- Proben eine hohe NOPE-Expression zeigen. Eine erhöhte AFP-Expression weisen 29,2% der Proben auf.

4.3.2.1 NOPE-Expression ausgewählter Proben (linear und logarithmisch)

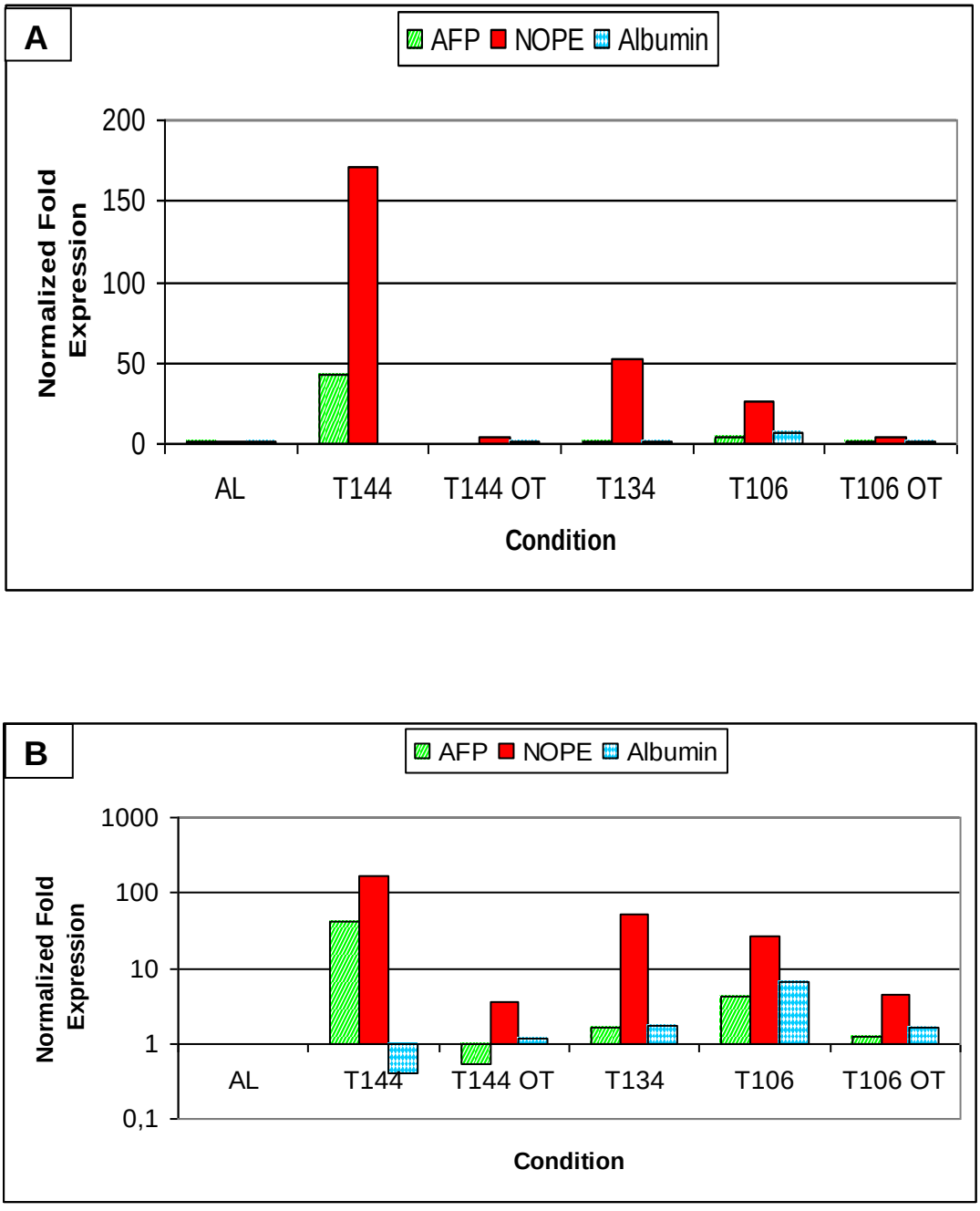


Abbildung 4.3.3.1B: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit starker NOPE-Expression (logarithmisch)

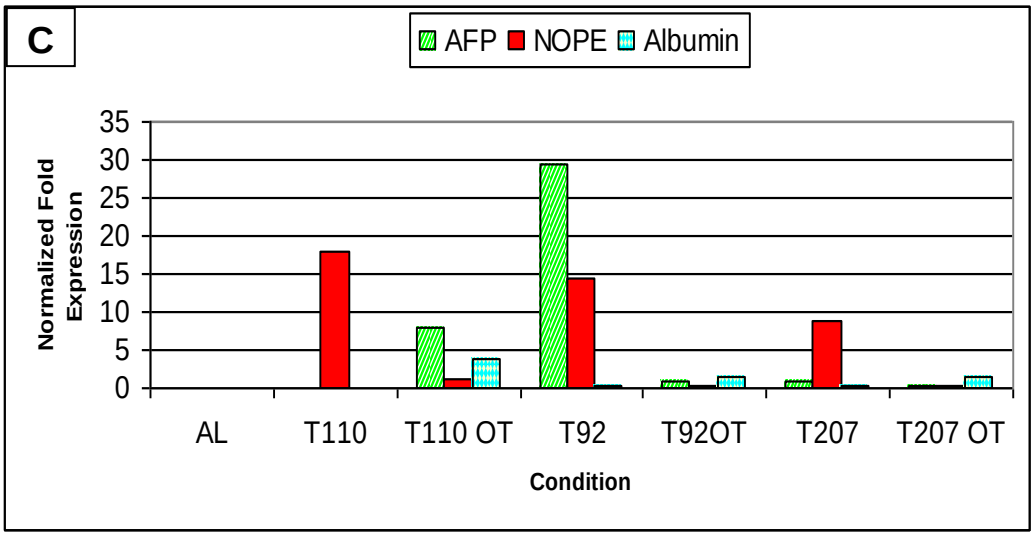


Abbildung 4.3.31C: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit mittlerer NOPE-Expression (linear)

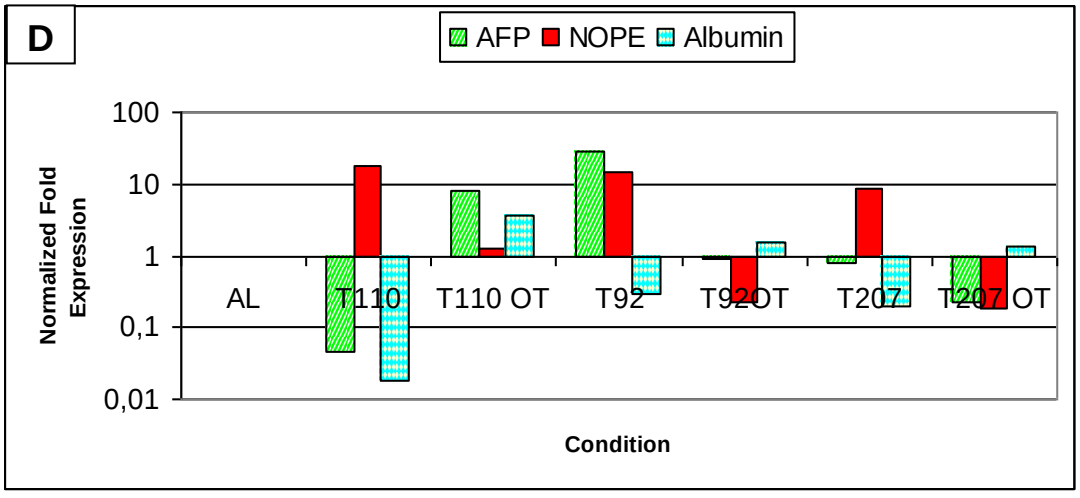


Abbildung 4.3.3.1D: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit mittlerer NOPE-Expression (logarithmisch)

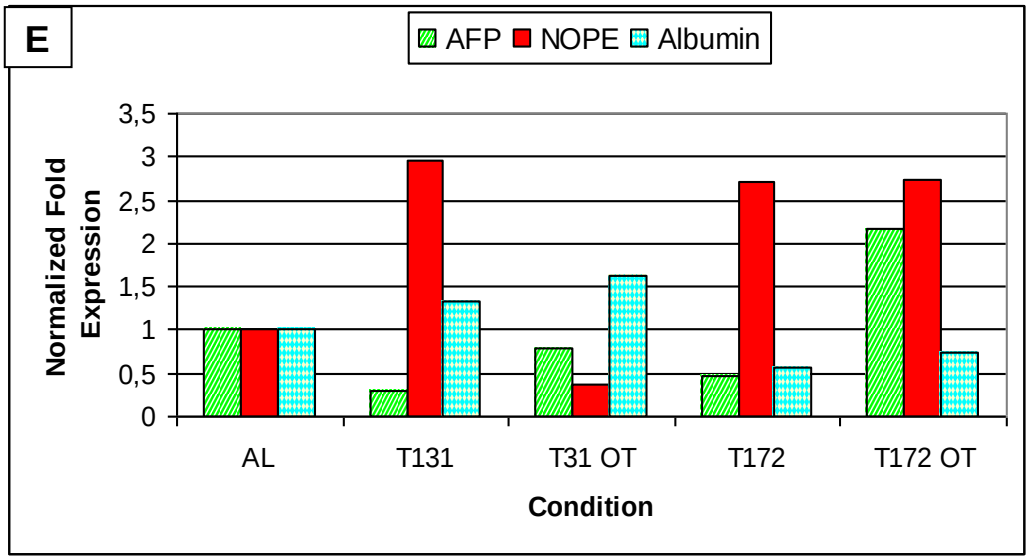


Abbildung 4.3.3.1E: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit schwacher NOPE-Expression (linear)

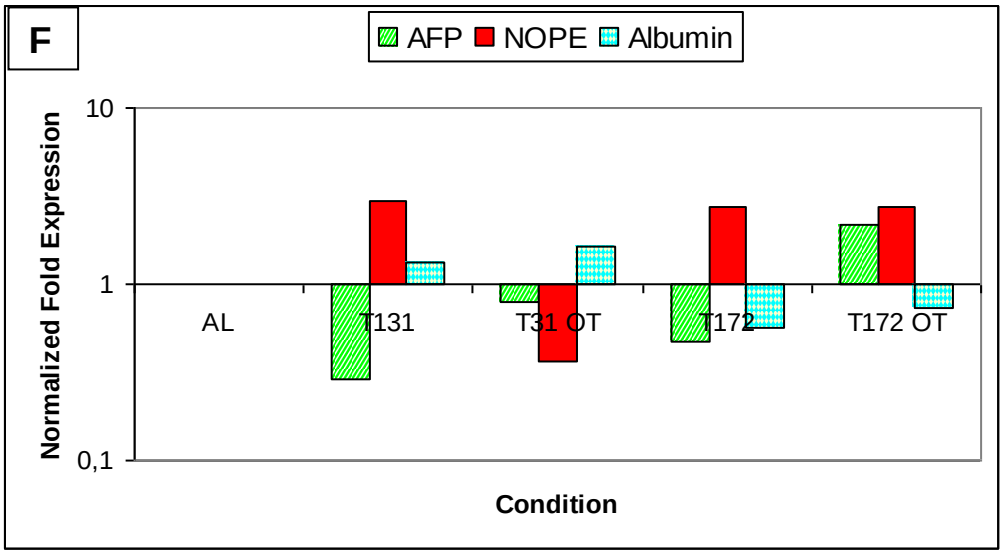


Abbildung 4.3.3.1F: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit schwacher NOPE-Expression (logarithmisch)

Abb.4.3.3.1A-F stellen qRT-PCR-Ergebnisse Tumor vs. tumorfreies Lebergewebe (OT) mit starker (linear (**A**) und logarithmisch (**B**)), mittlerer (linear (**C**) und logarithmisch (**D**)) oder schwacher NOPE-Expression: linear (**E**) und logarithmisch (**F**) dar.

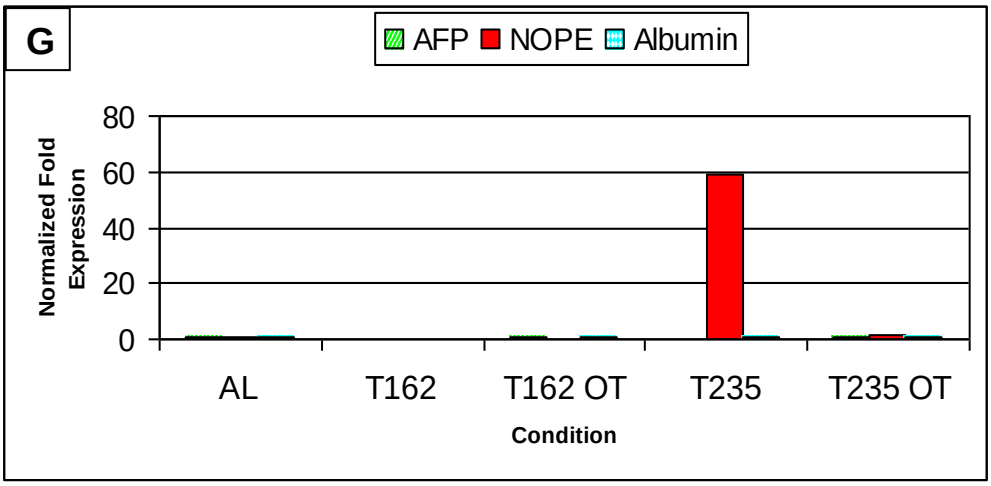


Abbildung 4.3.3.1G: Lebermetastasen T vs. OT (linear)

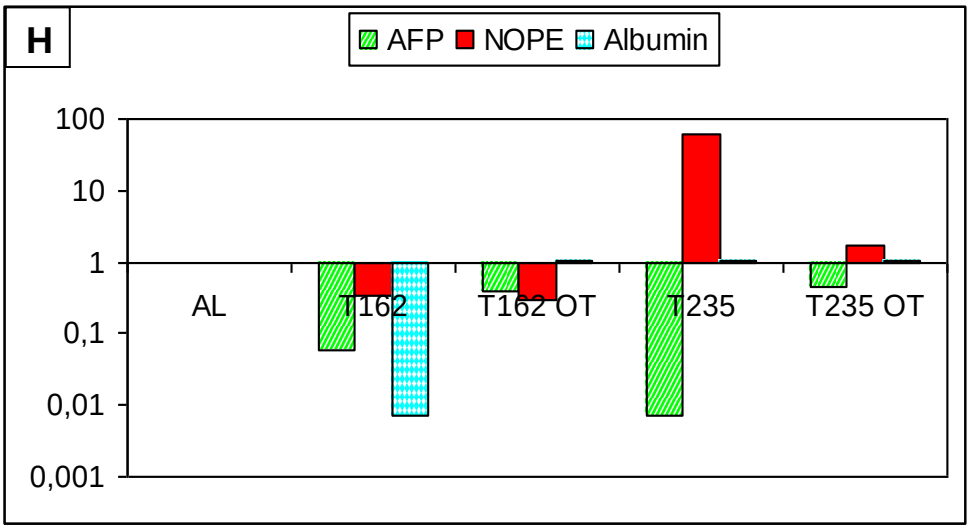


Abbildung 4.3.3.1H: Lebermetastasen T vs. OT (logarithmisch)

Abb.4.3.3.1 G und H Darstellung der NOPE-Expression in den untersuchten Lebermetastasen (T vs OT). Das neuroendokrine Pankreaskarzinom (T162) zeigt keine, das Kolonkarzinom (T235) eine starke NOPE-Expression. Abbildung **G** NOPE-Expression in linearer, **H** in logarithmischer Form präsentiert.

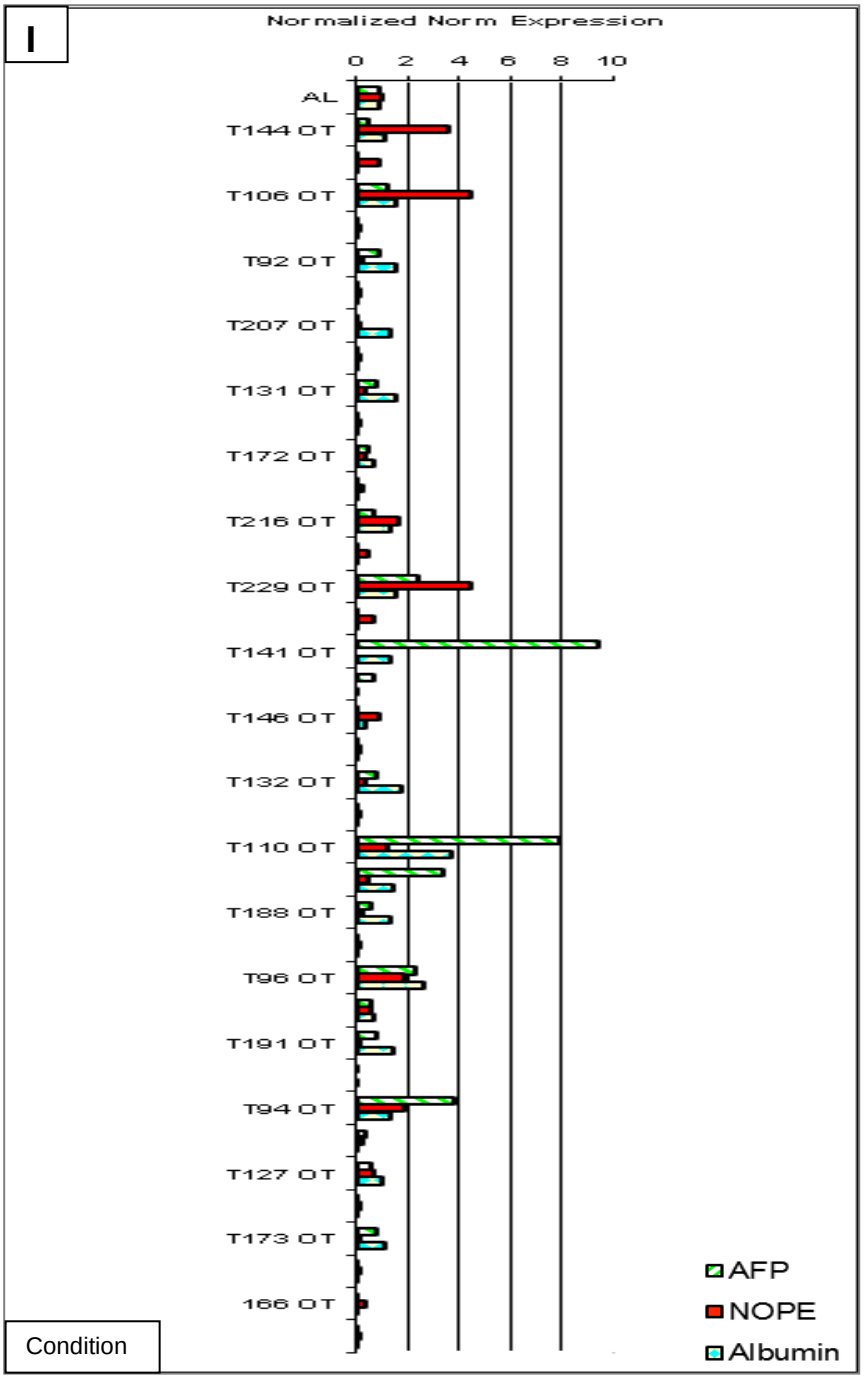


Abbildung 4.3.3.1I: Übersicht qRT-PCR mit "tumorfreien" OT-Proben

Abb. 4.3.3.1I zeigt die qRT-PCR-Ergebnisse des untersuchten "tumorfreien" umgebenden Lebergewebes (OT) von Patienten mit HCC im Vergleich zur AL. Dabei zeigen 12,5% der OT-Proben eine erhöhte NOPE- und 16,6% eine erhöhte AFP-Expression.

4.3.3 Klinische Daten der HCC-Patienten mit NOPE-positiven HCC-Proben

Innerhalb der NOPE-positiven Proben wurde zusätzlich nach Grunderkrankung, Vorhandensein bzw. Fehlen einer Zirrhose und dem histopathologischen Grading differenziert.

Die höchste NOPE-Expression wurde bei HCC-Proben mit zugrundeliegender HBV-Infektion (37,5%) und mit unklarer Ätiologie (37,5%) nachgewiesen. Eine eindeutige NOPE-Expression wurde vor allem bei HCCs ohne vorbeschriebene Zirrhose (75%) nachgewiesen (s. Tabelle 4.3.3 2A). Im Vergleich dazu stammen NOPE-negative HCC-Proben hauptsächlich von zirrhotischen bzw. fibrotischen Lebern mit der Ätiologie einer chronischen HCV-Infektion (31,3%).

Zusammenfassend ergab die Evaluation der NOPE-positiven HCC-Proben folgende Ergebnisse: Eine eindeutige NOPE-Expression auf mRNA-Ebene ist hauptsächlich bei HCC-Proben mit der Ätiologie HBV-Infektion ohne vorangegangene Zirrhose zu detektieren. Im Gegensatz dazu waren diejenigen HCC-Proben mit der Ätiologie einer chronischen HCV-Infektion bei vorbekannter Zirrhose hauptsächlich NOPE-negativ.

Tabelle 4. 3.3.2 A: Zusammenfassung aller NOPE-positiven HCC-Proben

A

Proben-nummer	NOPE-positiv (+) negativ (-)	AFP-positiv (+) negativ (-)	Zir-rhose	Grunder-krankung	Grading
T/OT 144	**+++** (=170,5)	**+++** (=42,5)	Nein	HBV	HCCG2; pT1NxMx
T/OT 134	**+++** (= 52,3)	**-** (=1,6)	Nein	HBV	HCCpT3N0 MxG2
T/OT 106	**++** (= 26,4)	**+** (=4,3)	Ja	HBV	HCCpT3Nx G3
T/OT 110	**++** (= 17,9)	**-** (=0,04)	Nein	Genese unklar	HCCpT3G3
T/OT 92	**++** (=14,4)	**++** (=29,3)	Nein	Genese unklar	HCCpT3NM xG3
T/OT 207	**++** (= 8,7)	**-** (=0,8)	Nein	Genese unklar	HCCpT1pN xpMxG2
T/OT 131	**+** (=2,95)	**-** (=0,47)	Nein	nutritiv-toxischer Genese mit fokaler Verfettung	HCCpT3Nx MxG2
T/OT 172	**+** (=2,7)	**-** (=0,28)	Ja	HCV	HCCpT3Nx G2-3

Tab.:4.3.3.2A Tabellarische Zusammenfassung aller auf mRNA-Ebene NOPE-positiven vs. AFP-positiven HCC-Proben in Abhängigkeit von Grunderkrankung, Vorhandensein einer Zirrhose und Grading. Die NOPE-Expression in den einzelnen Proben ist von oben nach unten in absteigender Reihenfolge dargestellt. Die Zahl in Klammern zeigt die qPCR-Ergebnisse der NOPE und AFP-Expressionsstärke (=x-fache Kopienzahlerhöhung).

4.3.4 Western Blot der HCC-Proben

Alle HCC-Proben wurden mittels Western Blot auf eine NOPE-Expression analysiert. Verwendet wurde der monoklonale anti-humane NOPE-Antikörper sowie B-Actin als Referenzgen.

Alle untersuchten HCC-Proben zeigten isolierte Banden bei 130 kDa, der erwarteten Bandengröße für NOPE (s. Hepatoma-Zellinien). In der Negativkontrolle mit adulter Leber wurde trotz wiederholter (> 3-facher) Überprüfung mit jeweils anderem Lebergewebe niemals eine Bande detektiert (s. Abb. 4.3.4A-B).

Eine AFP-Bande bei 72 kDa wurde bei 62,5% der untersuchten Tumorproben detektiert (s. Abb. 4.3.4A-B). Dabei korrelierte die AFP-Expression auf Protein-Ebene nicht mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene. So zeigten 4 auf mRNA-Ebene AFP-negative HCCs eine AFP-Bande im Western Blot (T147, T172, T188, T110). Zwei auf mRNA-Ebene AFP-positive Tumorproben zeigten im Western Blot keine AFP-Banden (T106, T132). AL war jeweils AFP-negativ.

Allerdings konnte auch in allen tumorfreien OT-Proben mit NOPE eine eindeutige Bande bei 130 kDa detektiert werden. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen war die NOPE-Expression auf mRNA-Ebene dagegen nur bei 12,5 % der OT-Proben nachweisbar (s. Abschnitt 4.2.3). Auch AFP-Banden waren in 20,8% der OT-Proben detektierbar (s. Abb. 4.3.4 C und D), in der qRT-PCR lediglich bei 16,6%. Die beispielhaft gezeigten tumorfreien Proben zeigten keine AFP-Expression auf mRNA-Ebene (T172, T188).

Insgesamt kann damit auf Proteinebene mittels NOPE-Expression zwischen normaler adulter Leber und HCC, nicht jedoch zwischen tumorfreier, aber pathologisch veränderter Leber und benachbartem HCC differenziert werden. Im gewählten Kollektiv war jedoch auch AFP kein verlässlicher Parameter aufgrund hoher Inkonsistenz im Vergleich mit den qPCR-Ergebnissen und immerhin 20,8% AFP-positiven tumorfreien OT-Proben.

4.3.4 A-B: Abbildungen Western Blot Ergebnisse der Lebergeweben

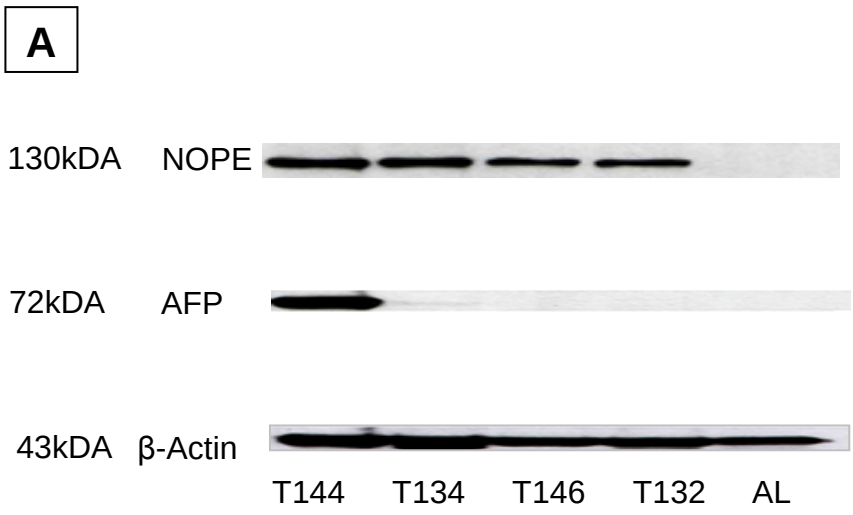


Abbildung 4.3.4A: Western Blot Lebergewebe

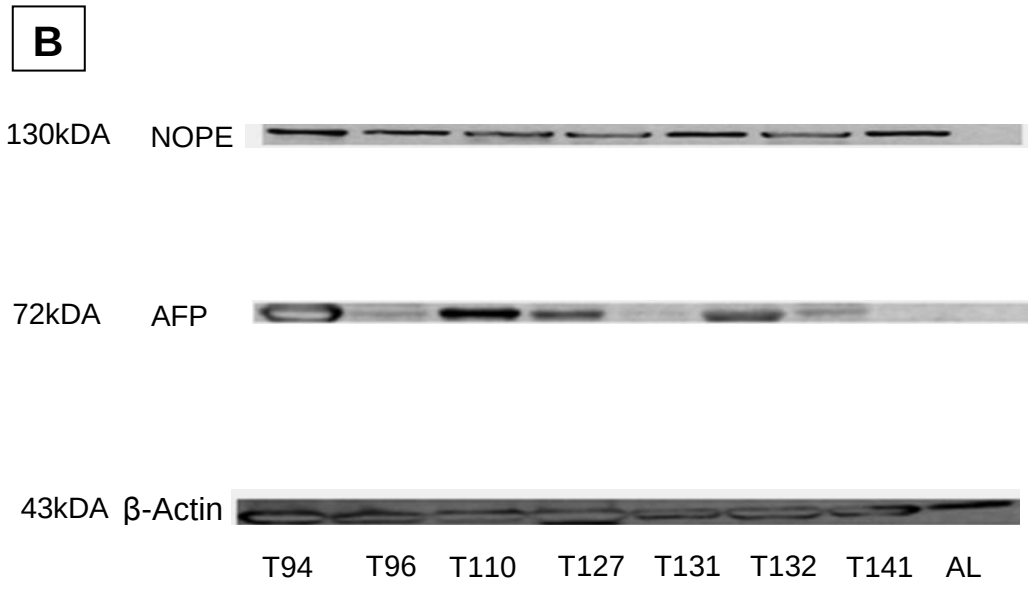


Abbildung 4.3.4B: Western Blot Lebergewebe

Abb.4.3.4A-B Hierbei wird NOPE-Expression auf Protein-Ebene via Western Blot gezeigt.

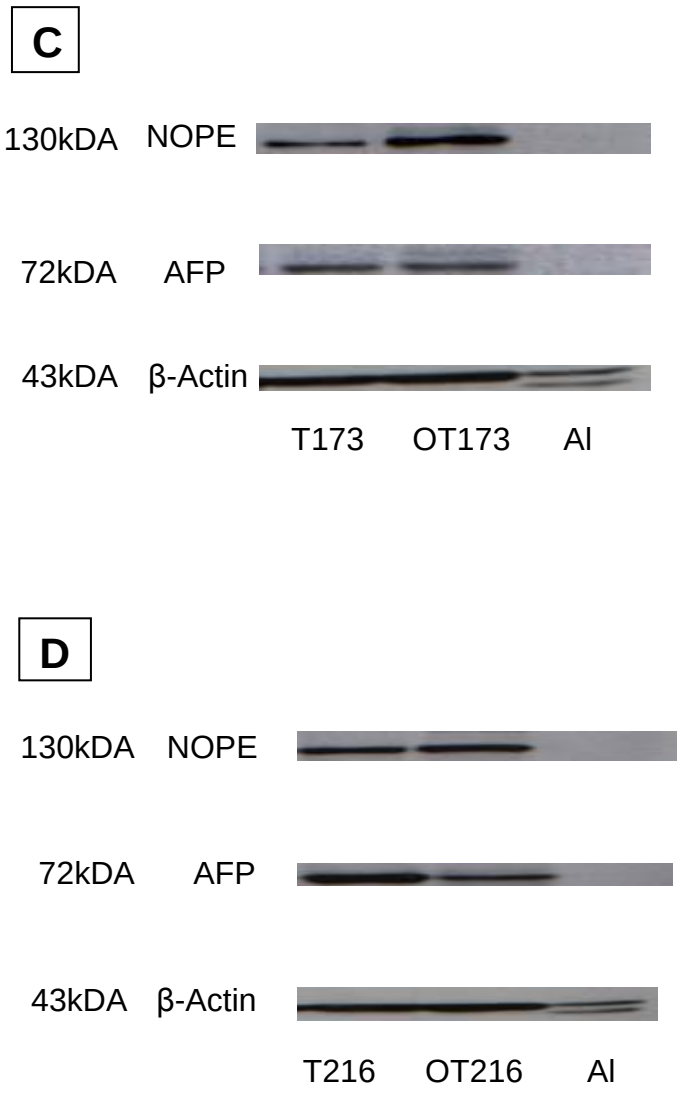


Abbildung 4.3.4 C und D: Western Blot Lebergewebe T vs. OT

Abb. 4.3.4 C und D Beide Abbildungen stellen exemplarisch jeweils NOPE und AFP-positive Ergebnisse auf Protein-Ebene sowohl im Tumor (T) als auch im tumorfreien Gewebe (OT) dar. Im Vergleich sind die Ergebnisse auf mRNA- vs. Protein-Ebene diskrepant. T173 **(C)** ist auf mRNA-Ebene AFP-und NOPE-Expression-negativ, auf Protein-Ebene jedoch exprimiert. Im Gegensatz dazu ist auf mRNA-Ebene bei T216 **(D)** die AFP-Expression positiv und die NOPE-Expression negativ, während auf Protein-Ebene sich beide Marker positiv präsentieren.

4.3.5 Immunhistochemie der HCC-Proben

Eine immunzytochemische Färbung mit dem monoklonalen anti-humanen NOPE-AK gelang bei den Hepatoma-Zellinien nicht. Der polyklonale Nope-AK ergab eine perinukleär-lokalisierte Färbung auch in der für die Negativkontrolle gewählten adulten Leber (s. Abb. 4.3.5A) und war daher in humanen Geweben nicht zu verwenden.

Wir konnten allein bei der HCC-Probe mit maximaler NOPE-Expression in der qRT-PCR (T144) mit dem monoklonalen anti-humanen NOPE-AK ein a.e. zytosolisch lokalisiertes Protein nachweisen. Kofärbungen zeigten eine zytosolische Lokalisation von AFP und die E-Cadherin-positive Zellmemban (s. Abb. 4.3.5B). Die adulte Leber zeigte reproduzierbar keine spezifische Färbung mit dem monoklonalen NOPE-Antikörper.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass der polyklonale Nope-AK im humanen Gewebe nicht spezifisch ist und somit nicht verwendet werden kann, während der monoklonale anti-humane NOPE-AK eine spezifische, aber wenig sensitive Färbung von NOPE im Zytosol erzielte. Die Ergebnisse sind den Abbildungen 4.3.5A und B zu entnehmen.

A

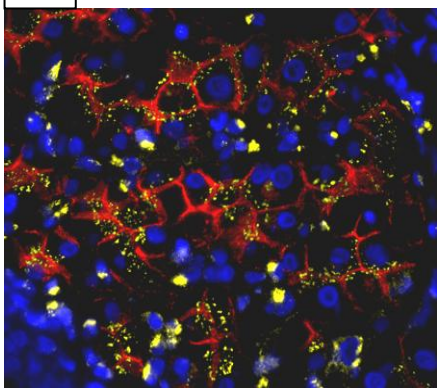
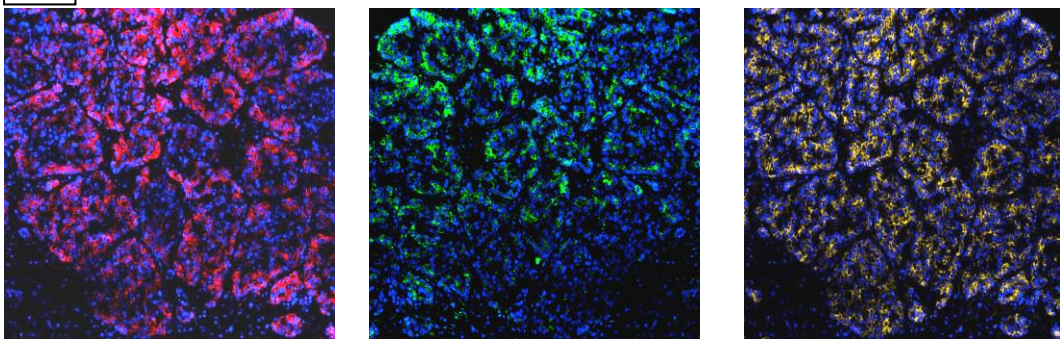


Abb. 4.3.5A Analog zu den Zelllinien, zeigt die Immunhistochemie mit dem polyklonalen Nope-AK eine perinukleäre Lokalisation von Nope im HCC-Gewebe (exemplarisch T144). E-Cadherin färbt die Zellmembran an. In der AL-Kontrolle lässt sich ebenfalls ein perinukleär lokalisiertes Protein darstellen (in dieser Abb. nicht gezeigt).

Abbildung 4.3.5A: T 144 Nope- AK (perinukleär), E.-Cadherin

B



NOPE-DAPI **AFP-DAPI** **E.-Cadherin-DAPI**

Abbildung 4.3.5B: T144 nach Färbung mit monoklonlaem NOPE-AK

Abb. 4.3.5B Immunhistochemische Kofärbung von NOPE in HCC (exemplarisch T144). Nach der Färbung mit dem monoklonalen NOPE-AK zeigt sich die NOPE- Struktur als ein zytosolisch lokalisiertes Protein. Kofärbung mit AFP und E-Cadherin.

4.4 Zusammenfassung: Humane HCC- Proben

Von den 24 HCC-Patientenproben waren 33,3% der Proben auf mRNA-Ebene NOPE-positiv mit bis zu 170-facher Expression im Vergleich zu adulter Leber, während alle untersuchten normalen AL-Gewebe auf allen Ebenen (mRNA, Proteine, IH) reproduzierbar negativ blieben. 20,8% der AFP-negativen HCC-Proben waren NOPE-positiv. Von den NOPE-negativen Proben waren 16,6% AFP-positiv.

Eine eindeutige NOPE-Expression konnte vor allem bei HCCs in nicht-zirrhotischer Leber nachgewiesen werden. Die höchste NOPE-Expression zeigten HCC-Proben auf dem Boden einer HBV-Infektion (37,5%). Allerdings zeigten auch einige der tumorfreien (OT) Gewebeproben eine erhöhte Expression von NOPE (12,5%) und/oder AFP (16,6%).

Auf Protein-Ebene konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden: Während der monoklonale Antikörper im WB nicht in der adulten Leber, aber in allen Tumor- und Ohne-Tumor-Proben Nope detektierte (geringe bzw. keine Spezifität für HCC) und in der Immunhistochemie lediglich eine geringe Sensitivität für Nope aufwies, führte der polyklonale Antikörper selbst in der normalen adulten Leber zu einer unspezifischen Färbung (Kreuzreaktivität). Zusammengefasst kann damit auf Proteinebene mittels NOPE-Expression zwischen normaler adulter Leber und HCC, nicht jedoch zwischen tumorfreier, pathologisch veränderter Leber und benachbartem HCC differenziert werden.

Im gewählten Kollektiv war jedoch auch AFP kein verlässlicher Parameter aufgrund hoher Inkonsistenz im Vergleich mit den qPCR-Ergebnissen und immerhin 20,8% AFP-positiven tumorfreien OT-Proben.

5. Diskussion

Im Rahmen der vorgestellten Arbeit mit der Fragestellung, “NOPE als potenzieller Biomarker für das HCC”, konnte Neighbor of Punc E11 (NOPE) erstmalig als neuer Biomarker an unterschiedlichen humanen Hepatoma-Zelllinien und auch an HCC-Patientenproben untersucht werden.

Als Grundlage dieser Studie dienten Nope-Analysen im Mausmodell. Nachdem Nope dort als Oberflächenmarker muriner fetaler Leberstammzellen identifiziert worden war[86], erfolgte eine Analyse der Nope-Expression im Laufe der murinen Hepatokarzinogenese. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass keine Nope-Expression in den frühen Stadien der Tumorentstehung (Hyperplasie, Dysplasie) und in der adulten Leber (AL) stattfindet, während nach der Entstehung von HCC eine signifikant erhöhte Expression von Nope nachweisbar war. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass Nope als potenter muriner onko-fetaler Marker eingesetzt werden kann[69].

Die Eigenschaften eines idealen Markers berücksichtigend (s.u.), wurden in dieser Arbeit zur NOPE-Identifikation als Tumormarker unterschiedliche Auswertungs-kriterien der Analysenergebnisse (mRNA-, Protein-und Immunhistochemie-Ebene) verwendet.

Die Auswertung der im ersten Teil der Arbeit untersuchten Hepatoma-Zelllinien (HuH7, HepG2, Hep3B) und der HCC-Patientenproben auf den oben genannten Ebenen haben gezeigt, dass NOPE sowohl in AFP-positiven als auch AFP-negativen Proben detektiert wird. Dabei ergab die Analyse an den Hepatoma-Zelllinien, dass NOPE in einem Drittel der AFP-negativen Proben zusätzlich nachweisbar war (s. Abschnitt 4.1.1). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Resultaten des “Laboratory of Experimental Carcinogenesis (LEC)” Maryland/USA für Hepatoma-Zelllinien und HCC-Proben größerer Kollektive[69].

Die Übertragbarkeit der Hepatoma-Zelllinien-Resultate auf HCC-Patientenproben wurde im zweiten Teil dieser Arbeit demonstriert (s. Abschnitt 4.4). Mit dem Ziel, sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität von NOPE optimal darzulegen, wurde strengen Auswertungskriterien gefolgt. Dabei wurden als eindeutig NOPE-positiv nur HCC-Proben definiert, die zum einen auf mRNA-Ebene in Dreifachbestimmung mindestens eine 2,5-fach höhere NOPE-Expression im Vergleich zu

AL-Gewebe und zum anderen eine höhere NOPE-Expression verglichen mit ihrem eigenen tumorfreien Gewebe (OT-Proben) aufwiesen. Zudem wurden als Detektionslimit max. 32 Zyklen bis zum Erreichen des Thresholds bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2).

Es konnte gezeigt werden, dass auf mRNA-Ebene in 33,3% der untersuchten HCC-Proben eine erhöhte NOPE-Expression im Vergleich zur adulten Leber und OT vorliegt. Dabei waren 75% der NOPE-positiven HCC-Gewebeproben ohne vorangegangene Leberzirrhose entstanden. Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass mehr als 70% aller HCCs auf dem Boden einer Leberzirrhose entstehen und nur ca. 20% aller HCCs ohne Zirrhose vorkommen[19]. Während HCC-Proben auf dem Boden einer HCV-Infektion mit vorangegangener Zirrhose in dieser Arbeit hauptsächlich NOPE-negativ waren (s. Abschnitt 4.3.3), ergab die Evaluation aller NOPE-positiven Ergebnisse auf mRNA-Ebene, dass die HCC-Proben mit der Ätiologie HBV-Infektion (37,5%) die stärkste NOPE-Expression zeigten (s. Tabelle 4.3.3.2A). Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass bei Entwicklung eines HCC ohne Zirrhose (75%) eine Korrelation zwischen der hohen NOPE-Expression und der Ätiologie einer HBV-Infektion bestehen könnte. NOPE könnte somit eine ätiologische Selektivität anzeigen. Daraus resultiert, dass ein eventueller Zusammenhang zwischen der Induktion von NOPE bei HCCs auf dem Boden einer HBV, die auch ohne Zirrhose entstehen, bestehen könnte. Wie im Abschnitt 1.3.2 dargestellt, zeigten einige Forschungsergebnisse[5] die sehr komplexen molekularen Mechanismen einer HBV-Infektion bei der Hepatopathogenese. Ein Beispiel hierfür ist die zentrale Rolle von Protein X (HBX-Protein) und dessen Interaktion bei der Regulation während der Transkription und der Signalübertragung. Das Protein X bindet unter anderem das p53 Tumorsuppressorgen. Es deaktiviert und hemmt so den DNA-Reparaturmechanismus und die Apoptose der Zelle[5][25][120]. Elmore et al. (1997) konnten in einer in-vitro-Studie zeigen, dass durch die Bindung des Protein X an das C-Terminus des humanen Tumorsuppressor P53-Gen die aktive Apoptose verhindert wird. Demnach spielt dieser Mechanismus in einer sehr frühen Phase der Hepatokarzinogenese eine Rolle. Es ist vorstellbar, dass bei der NOPE-Induktion ähnliche Vorgänge ablaufen. Solche Mechanismen wurden schon bei anderen HCC-Tumormarkern bzw. Prognosefaktoren (s. Abb.

1.7), wie z. B. bei dem HSP-70 beschrieben. HSP-70 (welches schon in anderen Forschungsergebnissen als Prognosefaktor vorgeschlagen wurde) war vor allem bei HBV-assoziiertem HCC hochreguliert[58].

Es wurde weiterhin festgestellt, dass der größte Anteil der auf mRNA-Ebene NOPE-positiven HCC-Proben (75%) keine zirrhotischen Veränderungen zeigte. Neben den HCC-Proben mit der Ätiologie HBV ist zudem auffällig, dass eine NOPE-Expression bei den HCC-Proben mit einer unklaren Genese ebenfalls in nicht-zirrhotischen HCCs detektiert wurde. Außerdem wurden die NOPE-positiven Proben auf mRNA-Ebene der AFP-Expression gegenübergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Proben mit starker NOPE-Expression eine tendenziell niedrige bzw. negative AFP-Expression aufwiesen (s. Tabelle 4.3.3A), vor allem in HCCs ohne Zirrhose (75%). 62,5% der NOPE-positiven HCC-Proben waren AFP-negativ, 37,5% der Proben waren dagegen sowohl NOPE- als auch AFP-positiv.

Es ist bekannt, dass nur circa ein Drittel aller HCCs ohne Zirrhose vorkommen[19]. Diese Tatsache berücksichtigend, ist hier vorstellbar, dass mit NOPE als Tumormarker eine diagnostische “Lücke” (d.h. Detektion von HCCs, die einhergehende ohne Zirrhose entstehen) gefüllt werden könnte.

Bei der Auswertung entsprechend der für NOPE verwendeten Kriterien zeigte die Analyse der AFP-Expression, dass nur 29,2% der untersuchten HCC-Proben auf mRNA-Ebene positiv waren, wobei eine ätiologische Subgruppierung nicht feststellbar war. Sowohl AFP- als auch NOPE-positiv waren 12,5% der untersuchten Proben. 20,8% der AFP-negativen HCC-Proben waren NOPE-positiv. Von den NOPE-negativen Proben waren 16,6% AFP-positiv. Zum Screening auf ein HCC kann daher AFP nicht durch NOPE ersetzt werden, jedoch könnte NOPE als potentieller zusätzlicher Detektionsmarker das AFP ergänzen.

Zusammenfassend ergeben sich daher für die NOPE-Analyse auf mRNA-Ebene folgende Interpretationsansätze:

1. Eine hohe NOPE-Expression auf mRNA-Ebene geht mit einer niedrigen AFP-Expression und folglich einem niedrigen AFP-Serumwert einher.

2. Durch NOPE kann, ähnlich wie für GLP-3, HSP-70 und DCP beschrieben, nur eine bestimmte HCC-Subgruppe detektiert werden.

Wenn man die oben genannten Resultate auf mRNA-Ebene zusammenfasst, ist festzustellen, dass in dieser Phase der NOPE-Analyse eine Subgruppierung in HCCs nach HBV-Infektion ohne Zirrhose und in HCCs mit niedriger AFP-Expression naheliegend ist. NOPE könnte somit auf mRNA-Ebene als potentieller zusätzlicher HCC-Detektionsmarker hauptsächlich bei HCCs ohne Zirrhose im HCC-Gewebe eingesetzt werden. Ähnlich verhält es sich bei dem neu etablierten Tumormarker GLP-3 (s. Abschnitt 1.7). Bei 40-50% aller HCC-Patienten konnte ein Anstieg von GLP-3 im Serum detektiert werden, während GLP-3 weder in zirrhotischem, noch in chronisch krankem Lebergewebe nachweisbar war[17][82][112]. Zudem wurde eine GLP-3-Erhöhung im Serum bei 33% der AFP- und DCP-negativen Patienten nachgewiesen[35][82][108]. Vergleichbar verhält sich auch der HCC-Tumormarker DCP. Hierbei zeigen, wie im Abschnitt 1.7 beschrieben, nicht alle DCP-produzierenden HCC-Proben auch eine AFP-Erhöhung im Serum und umgekehrt. Daher wurde bereits vorgeschlagen, dass die Kombination beider Marker das HCC-Screening verbessern kann[104]. Somit lassen die oben genannten Analysen in dieser Arbeit die Schlussfolgerung zu, dass NOPE in Kombination mit AFP die Erfassung von AFP-negativen HCC-Proben verbesseren könnte. Hierfür sind jedoch weitere NOPE-Analyse in humanen Zellen notwendig.

Weiterhin haben unsere Analysen gezeigt, dass in insgesamt 12,5% der untersuchten Proben im tumorfreien Lebergewebe (OT) eine erhöhte NOPE-Expressionen auf mRNA-Ebene nachweisbar waren (s. Abbildung 4.3.3.1l). Diese Tatsache wurde ebenfalls bei dem einzigen bisher klinisch eingesetzten Tumormarker AFP nachgewiesen. Hier war bei 16,6% der OT-Proben eine AFP-Expression detektierbar. Die Erklärung dafür liegt vermutlich darin, dass die Tumorresektion makro- und mikroskopisch zwar vollständig war, aber die Resektion aller bereits auf molekularer Ebene infiltrativ-wachsender maligner Tumorzellen nicht vollständig gelang.

Zusätzlich wurde bei den untersuchten Lebermetastasen (Kolon- und Pankreaskarzinom) eine hohe NOPE-Expression bei der Metastase eines Kolonkarzinoms detektiert. Bei einem neuroendokrinen Pankreaskarzinom hingegen war keine Erhöhung nachweisbar. Es ist erwiesen, dass bei der Genese eines Kolonkarzinoms zahlreiche Gene (Erbin, gp96, KLF5, 12SrRNA, TCLF5, DUSP11) hochreguliert werden[21]. In diesem Zusammenhang lässt sich die

NOPE-Expression in einer Lebermetastase des Kolonkarzinoms am wahrscheinlichsten mit der chromosomalen Lokalisation und starken Homologie von Nope und Punc erklären. Nope weist hierbei neben einer hohen Homologie zu Punc und Neogenin, eine große Übereinstimmung mit dem Tumorsuppressorgen DCC auf (s. Abb. 2.1A). Bei DCC (Deleted in Colorectal Cancer) handelt es sich um einen Tumormarker, welcher bei einem Kolonkarzinom herunterreguliert bzw. “verloren geht”. Nope ist bei den Führungsrezeptoren von DCC (“guidance receptors”) beteiligt und weist eine hohe Verwandtschaft zu DCC auf[103][104]. Diese „enge Nachbarschaft“ und die gleiche chromosomale Lage wirft die Frage auf, ob NOPE in Kolonkarzinomen ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegt wie sie in der Leber vorkommen. Daraus kann gefolgert werden, dass eine Erforschung der NOPE-Expression bei Kolonkarzinomen in einem größeren Kollektiv unabdingbar ist.

Nach der Analyse der NOPE-Expression auf mRNA-Ebene folgte die Untersuchung der NOPE-Expression auf Protein-Ebene. Wie im Abschnitt 4.1.3 beschrieben, gab es zur immunhistochemischen Färbedarstellung des gesuchten Proteins mit dem NOPE-AK gegen humane Zellen keinerlei Vorerfahrungen. Bei der im ersten Teil dieser Analyse durchgeführten Färbung von Hepatoma-Zelllinien mit dem bereits etablierten polyklonalen Nope-AK (s. Abb. 4.3.5A) wurde ein perinukleär-lokalisiertes Protein mit einer hohen Signaldeckung mit dem transGolgi-Apparat gezeigt. Als Kontrolle unspezifischer Ergebnisse wurden Färbungen mit IgG-Isoantikörpern durchgeführt. Trotz hoher Homologie von Nope-AK zu humanen Zellen (mehr als 90%) reagiert dieser Antikörper in humanem HCC-Gewebe unspezifisch, da auch in der normalen adulten Leber eine Färbung detektiert wurde. Es kann angenommen werden, dass durch den polyklonalen Nope-AK in humane HCC-Proben auch „NOPE-ähnliche“ Strukturen gefärbt werden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine Kreuzreaktivität des polyklonalen Nope-AKs mit ähnlichen Epitopen in der Leber. Eine Kreuzreaktion bezeichnet die Bindung eines Antikörpers an verschiedene Antigene, die gleiche oder ähnlich strukturierte Epitope haben[49].

Daraufhin wurden die immunhistochemischen Färbetechniken (s. Abschnitt 4.3.5) mit dem gegen humane Zellen gerichteten monoklonalen NOPE-AK erneut optimiert und das gesuchte Protein im HCC-Gewebe gefärbt. Wie immunhistochemisch bestätigt, liegt NOPE in humanen Zellen nicht membranös

vor, sondern lässt sich wie AFP als zytosolisch-lokalisiertes Protein darstellen (s. Abb. 4.3.5). Dieses steht im Gegensatz zu der membranösen Lokalisation im murinen Gewebe des Leberkarzinoms[69] (s. Abb. 4.1.3A). Allerdings ist dies nur bei einer HCC-Probe (T144) deutlich detektierbar. Diese Probe weist auf mRNA-Ebene die stärkste (170-fache) NOPE-Expression auf (s. Abb. 4.3.3.1A). Die zytosolische Lokalisation von NOPE in HCCs korreliert somit mit den Ergebnissen des Western Blots der TED-Methode, die der selektiven Membranprotein-Isolation dient (s. Abschnitt 4.2.4). Hierbei konnten keine NOPE-Banden detektiert werden. Es wurde daher gefolgert, dass der monoklonale anti-humane NOPE-AK als immunhistochemische Bestätigung zwar hohe Spezifität aufweist, jedoch keine gute Sensitivität besitzt. Das erklärt, warum die Färbung der Zelllinien im ersten Abschnitt der Arbeit nicht aussagekräftig war.

Parallel dazu wurde die Darstellung der NOPE-Expression auf Protein-Ebene durch den monoklonalen anti-humanen NOPE-AK im Westen Blot durchgeführt (s. Abschnitt 4.3.4). Die Untersuchung der Gesamtproteine ergab, dass NOPE-AK alle HCC-Proben unabhängig von ihrer Ätiologie erfasst. Die adulte Kontroll-Leber blieb reproduzierbar negativ (s. Abb. 4.3.4 A/B). Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene wurde NOPE nicht nur im Bereich des Tumors, sondern auch im tumorfreien Gewebe der HCC-Leberproben detektiert. Anhand dieser Tatsache ist auf Proteinebene eine Unterscheidung zwischen gesunder (AL) und kranker Leber (HCC jeglicher Ätiologie) möglich. Eine Differenzierung des Tumorbereiches von tumorfreiem aber pathologischem Lebergewebe des HCCs durch z.B. eine Feinnadelpunktion (zur Histologiegewinnung HCC-verdächtiger Herdbildungen) würde hierbei nicht zum Ziel der Selektion des Tumorbereiches führen.

In Bezug auf die NOPE-Genexpression gibt es somit eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen auf mRNA- und auf Protein-Ebene. Eine vergleichbare Abweichung auf diesen beiden Ebenen wurde für den Tumormarker AFP ebenfalls nachgewiesen. Hierbei wurde, wie im Abschnitt 4.3.4 dargestellt, hinsichtlich der AFP-Expression auf Proteinebene bei 62,5% der untersuchten Proben eine Bande in der erwarteten Größe detektiert, während auf mRNA-Ebene nur 29,2% positiv waren (s. Abschnitt 4.3.2). Dabei korrelierte die AFP-Expression auf Protein-Ebene nicht immer mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene. Einige auf mRNA-

Ebene AFP-negative HCC-Proben zeigten eine AFP-Bande im Western Blot (T147, T172, T188, T110), und umgekehrt wurden bei auf mRNA-Ebene AFP-positiven Tumorproben im Western Blot keine AFP-Banden (T106, T132) detektiert. Diese Diskrepanz im Bezug auf die NOPE-Expression gründet mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Tatsache, dass sich die Phasen der NOPE-Erfassung im Zellzyklus von der Transkription im Zellkern bis zur Translation im Cytoplasma unterscheiden. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten, die im Folgenden vorgestellt werden.

Nach Transkription und Translation findet eine posttranslationale Proteinmodifikation statt. Dies bedeutet, dass die Proteine nach der Translation verändert bzw. gekennzeichnet werden[93].

Der Ablauf des Zellzyklus wird von einigen wichtigen Regulationsproteinen gesteuert, z.B. durch Cycline, Cyclin dependete kinases (CdK):

Zellzyklus-Schema

	Zellkern		Cytoplasma	
DNA	⟶	RNA	⟶	Protein
	Transkription		Translation	

Diese Mechanismen, d.h. Transkription, Translation und postranslationale Modifikation, sind bei der Tumorgenese gestört und laufen unkontrolliert ab. Somit können in der Tumorgenese zahlreiche typische Mutationen nachgewiesen werden[93]. Forschungsergebnissen zufolge konnte andererseits gezeigt werden, dass viele identifizierte Mutationsgene nicht unbedingt an der Tumorgenese kausal beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um einfache Mutationen, die bei einem normalen Zellzyklus vorkommen und ohne Konsequenz bleiben[44][111]. Andere neuere Forschungsergebnisse demonstrieren dagegen, dass das veränderte Gen-Expressionsmuster auf der mRNA-Ebene nicht zwingend auf die Protein-Ebene der Tumorzellen übertragbar ist. Demnach sind Diskrepanzen zwischen mRNA-und Protein-Ebene eindeutig auf posttranskriptionelle und posttranslationale Modifikationen der Proteine zurückzuführen (z.B. durch Phosphorylierung entstandene verschiedene Isoformen eines einzigen Proteins[106]).

Wie bei der eingangs vorgestellten „Vorarbeit am Mausmodell“ von Nierhoff (2008) gezeigt, wird Nope bei der Hepatogenese hochreguliert und in

unterschiedlichen Zellzyklusstadien detektiert. Hierbei konnte Nope erst ab der achten Woche nach der Tumorinduktion bzw. Tumorentstehung nachgewiesen werden, während in der adulten Leber und auch in frühen Stadien der Tumorentstehung keine Expression von Nope zu detektieren war.

Nach dieser Analyse ist davon auszugehen, dass die genetische Information auf mRNA-Ebene im Tumorgewebe vs. „tumorfreiem"-Gewebe direkt nach der Transkription im aktiven Zustand quantitativ dargestellt wird. Nach der Translation und der vorangegangenen Synthese der Proteine bleiben diese in Hepatozyten gespeichert. Es wurde ein Gesamtprotein sowohl bei den Hepatozyten direkt nach der Transkription gemessen als auch zu einem späteren Zeitpunkt der Gesamtproteingehalt der Hepatozyten, die das Protein in gespeicherter Form enthielten. Mit NOPE-AK wurde somit das Protein in unterschiedlichen Zellzyklen als absoluter Wert präsentiert. Man kann folglich annehmen, dass NOPE von Beginn an bei Umbauprozessen und Veränderungen im Rahmen der Leberpathogenese entsteht. Diese Annahme wird durch Forschungen an „Nope-verwandten" Proteinen in Mauszellen unterstützt. Dort wurde gezeigt, dass Nope in fibrotischen Zellen hochreguliert wird, wobei bei einer Fibrose Grad IV Nope am stärksten exprimiert wird und eventuell als Fibrose- bzw. Zirrhosemarker in der Maus verwendet werden könnte (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe Nierhoff (2009)). Eine eventuelle Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf humane Zellen ist folglich differenziert zu untersuchen. Demgegenüber stehen, wie oben dargestellt, die qRT-PCR-Ergebnisse der HCC-Proben, bei denen auf mRNA-Ebene NOPE überwiegend in nicht-zirrhotischem Gewebe detektiert wurde. Daher ist es zwingend notwendig, Untersuchungen eines größeren Kollektives an HCC unterschiedlicher Ätiologien (alkoholtoxisch, HBV, HCV, Speicher- und Stoffwechselkrankheiten, u.a.) auf NOPE-Expression anzuschließen. Um dem gerecht zu werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich weitere 40 HCC-Proben aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Köln in erster Linie nach HBV-und HCV-Infektion untersucht. Diese Proben waren bereits mit Paraffin fixiert, was die Qualität der mRNA und der Proteine sehr beeinträchtigte. Insbesondere die mRNA war sehr degradiert, so dass die umschriebene cDNAs keine brauchbaren Ergebnisse lieferten. Die Konsequenz für nachfolgende Untersuchungen ist, dass für die Analysen der Lebergewebeproben diese direkt

nach Resektion oder Biopsie zu verarbeiten bzw. schonendere Konservierungsmethoden (z.B. Kryo-Konservierung) zu verwenden sind.

Nach wie vor ist eines der wichtigsten Ziele der HCC-Forschung, den Tumor so früh wie möglich und möglichst nicht-invasiv zu diagnostizieren. Dies ist ausschlaggebend für den Erfolg kurativer Therapien und führt zu einer Verbesserung der Überlebensrate[44][100]. Invasive Nachweismethoden, wie z. B. eine Biopsie, erhöhen das Risiko einer Stichkanalmetastasierung erheblich. Studien belegen, dass das Risiko für eine Tumorstreuung im Stichkanal bei 2-3% liegt[107]. Zudem ermöglicht eine nicht-invasive Früherkennungs-Diagnostik, im Patientenserum leicht und schnell an das Untersuchungsmaterial zu gelangen, ohne den Patienten zu belasten. Diese Tatsachen rechtfertigen einen Einsatz von geeigneten Biomarkern. Die Effizienz der etablierten Nachweismethoden hinsichtlich einer verlässlicheren frühzeitigen Diagnosestellung mit Tumormarkern ist allerdings nur sehr eingeschränkt. Zur Identifizierung von HCC-Biomarkern sind bisher unterschiedliche Wege beschritten worden. Keiner der in den letzten Jahren entdeckten Tumor- bzw. Prognosemarker (HSP70, CAP2, Glutamin Synthetase AFP-L3, Golgi-Protein-73, DCP sowie GPC-3)[17][57][72][73] oder derzeit klinisch angewandten onkologischen Marker weist die Anforderungen idealer Markereigenschaften auf. Wie im Abschnitt 1.7.bereits dargestellt, sollte ein optimaler Biomarker neben hoher Sensitivität und Spezifität keine Expression im gesunden Gewebe zeigen. Zusätzlich sollte der Tumormarker idealerweise im Serum des Patienten vor einer klinischen Manifestation ansteigen und es sollte eine direkte Relation zwischen dem Anstieg des Markers im Serum und der Tumorgröße bestehen. Zur Erfassung eines HCC ist AFP derzeit der einzige routinemäßig eingesetzte Tumormarker. Er wird jedoch bei circa einem Drittel aller Patienten nicht sezerniert. In unserer Studie waren ebenfalls nur 29,2% auf mRNA-Ebene AFP positiv. Auf der Proteinebene waren dagegen 62,5% der Proben AFP positiv (s. Abschnitt 4.3.4). Daher sind weitere Untersuchungen unabdingbar.

Fasst man alle genannten Analysen in dieser Studie zusammen, ist festzustellen, dass in dieser Phase der NOPE-Analyse eine Subgruppierung in HCCs nach HBV-Infektion ohne Zirrhose und in HCCs mit niedriger AFP-Expression naheliegend ist. Daher erscheint ein Einsatz von NOPE als Biomarker beim humanen HCC auf RNA-Ebene aus Biopsiematerial möglich. Folglich könnte NOPE auf mRNA-Ebene als potentieller zusätzlicher HCC-Detektionsmarker

hauptsächlich bei HCCs ohne Zirrhose im HCC-Gewebe eingesetzt werden. Allerdings ist NOPE auf mRNA-Ebene nur bei 20,8 % AFP-negativer, vor allem in nicht-zirrhotischen Lebern entstehenden HCCs im Vergleich zum umgebenden tumorfreien Lebergewebe überexprimiert nachweisbar. Die Analyse auf Protein-Ebene mittels Western Blot dagegen erlaubt eine Differenzierung zwischen normaler Leber und HCC. Eine Differenzierung zwischen HCC und zugrundeliegender Lebererkrankung ist jedoch nicht möglich. Eine immunhistochemische Darstellung gelingt nur bei maximaler NOPE-Expression. Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität wurde daher auf nicht-invasiven NOPE-Nachweis verzichtet, d.h. im Patientenserum erscheint aufgrund der Ergebnisse und ungünstigen Analysekriterien auch wenig sinnvoll. Außerdem ist davon auszugehen, dass die NOPE-Expression nicht auf die Leber beschränkt existiert.

Die Schlussfolgerung unserer Studie ist daher, dass eine NOPE-Verwendung zum Screening von HCC nicht möglich ist. Jedoch könnte NOPE-Einsatz in Kombination mit anderen Faktoren als prognostischer Marker wertvoll sein. Eine prognostische Bedeutung von NOPE beim humanen HCC kann in der aktuellen Arbeit allein aufgrund der zu niedrigen Fallzahlen nicht endgültig beurteilt werden. Unter Berücksichtigung aller oben dargestellten und diskutierten Ergebnisse der erstmaligen Analyse von NOPE als potenziellem HCC-Biomarker wurde mit dieser Arbeit ein erster Grundstein gelegt, welcher weiterer Analysen bedarf.

Ausblick und Fortsetzung der Arbeit

Nach den erstmals hier dargestellten Forschungsergebnissen zu NOPE als Tumormarker für das HCC sollte eine Anschlussarbeit das Ziel verfolgen, die hier gezeigten Ergebnisse der NOPE-Expression in HCC an einem größeren Patienten-HCC-Kollektiv mit unterschiedlichen Ätiologien und Subgruppierungen zu erforschen und zu verifizieren. Aus den oben genannten Gründen sollte hierbei auf eine Paraffin-Fixierung der HCC-Proben verzichtet werden. Zudem sollte, um die Frage der „NOPE-Expression eventuell auch in Kolonkarzinomen“ zu klären, ebenfalls ein Kollektiv von Kolonkarzinom-Patienten untersucht werden.

Zudem sollte zur weiteren Verifizierung von NOPE-AK zur Erfassung eines HCCs eine Spezifitätsanalyse von NOPE auf molekularbiologischer Ebene erfolgen. Für

die Spezifitätsprüfung der NOPE-Genexpression können zwei unterschiedliche Methoden verwendet werden, die nachstehend vorgestellt werden: Die Überexpression des Zielgens oder das sogenannte „Silencing“ (siRNA). Die Überexpressionsmethode beschreibt die Klonierung von Zellen, die ursprünglich keine NOPE-Expression zeigen. Hierfür könnte man z. B. adultes gesundes Lebergewebe verwenden und durch einen Träger (Vektor) die genetische Information einschleusen, um die Zelle anschließend auf eine Überexpression von NOPE zu untersuchen.

„Silencing“ (Genabschaltung) durch RNA-Interferenz ist eine anspruchsvollere und genauere Methode. Dabei wird ein Gen „ausgeschaltet“ indem siRNA (kleine doppelsträngige RNA-Moleküle von 20-23 Basenpaaren Länge) mit Nuklease- und Helikase-Molekülen einen RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) bilden (s. Abbildung 5.1A). Dies bewirkt eine Stilllegung des betreffenden Gens[18][24][47][75][93]. In diesem Fall würden beide Methoden (Überexpression und “Silencing”) den Beleg liefern, dass es sich um NOPE handelt, welches bei der Hepatogenese exprimiert wird. Des Weiteren würden diese Methoden zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen von NOPE bei der Tumorgenese dienen und die durchgeführte Analysen als eventueller Tumor- bzw. Verlaufsmarker oder Prognosemarker optimieren und vervollständigen.

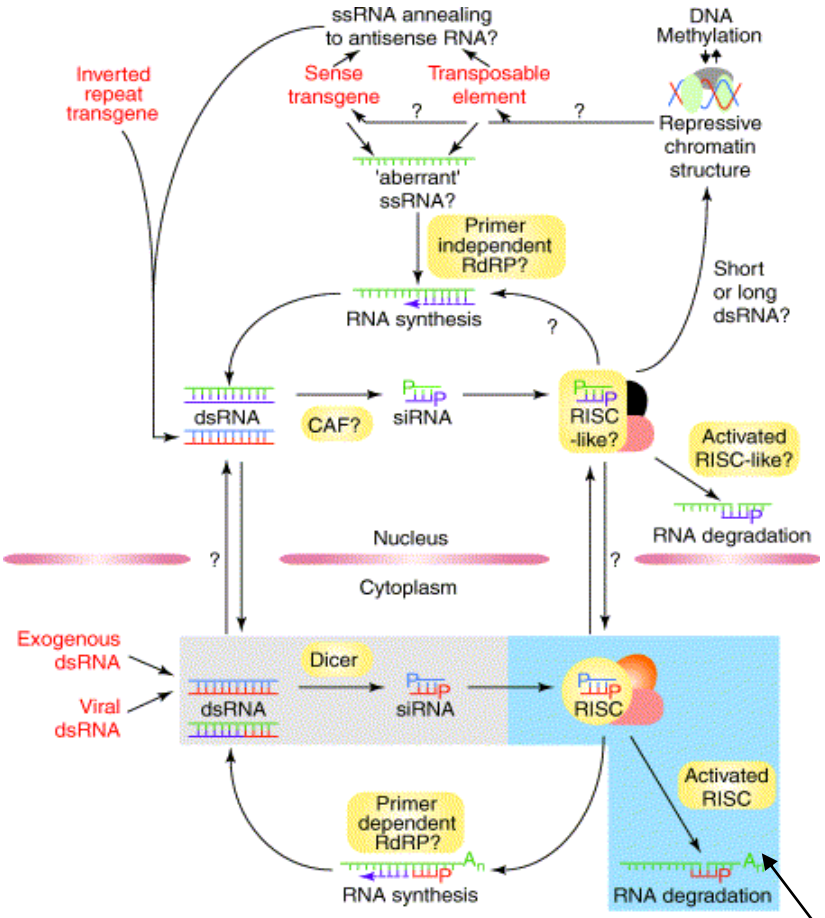


Abbildung 5.1A: Silencinschema, modifiziert nach Cerrutti[18]

Abb.5.1A Nach der RNA-induzierten Aktivierung des Silencing-Komplex (RISC) wird die mRNA degradiert und somit die genetische Information in der Zelle (z.B. HuH7) ausgeschaltet. Das Ergebnis der qPCR nach erneuter mRNA-Isolation würde keine genetische Information für z.B. NOPE enthalten.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung von Neighbor of Punc E11 (NOPE) als Tumormarker für das humane hepatozelluläre Karzinom (HCC) zu analysieren. Hierbei dienten die Vorarbeiten von Nope-Analysen im Mausmodell als Grundlage. Nope wurde ursprünglich als Oberflächenmarker muriner fetaler Leberstammzellen identifiziert, und anschließend die Nope-Expression im Laufe der murinen Hepatokarzinogenese analysiert[86]. Die Analyse ergab, dass keine Nope-Expression in AL und in den frühen Tumorstadien stattfindet, nach einer HCC-Manifestation jedoch eine signifikant erhöhte Nope-Expression nachweisbar war. Es wurde somit gezeigt, dass Nope als potenter muriner onko-fetaler Marker eingesetzt werden kann[69]. Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurden in der vorliegenden Arbeit die Analysen an verschiedenen humanen Hepatoma-Zelllinien (1.Teil) und an HCC-Patientenproben (2.Teil) durchgeführt. Dabei sind die Expression von NOPE im Vergleich zu AFP- und Albumin-Expression mittels qRT-PCR sowie die Proteinexpression mittels Western Blot im Vergleich zur adulten Leber quantifiziert worden. NOPE war in allen untersuchten Hepatoma-Zelllinien hoch exprimiert und erfasste sowohl die AFP-positiven als auch AFP-negativen Hepatoma-Zelllinien. Die Untersuchung aller HCC-Patientenproben ergab, dass 33,3% der Proben auf mRNA-Ebene eine deutliche NOPE-Expression in unterschiedlicher Stärke aufweisen. Die AL blieb auf allen Ebenen (mRNA, Proteine, IH) reproduzierbar negativ. Die stärksten NOPE-Expressionen wurde bei HCCs nach HBV-Infektion (37,5%) überwiegend ohne Zirrhose (75%), nachgewiesen. Die Proteinanalyse (WB) ergab, dass NOPE-Expression auch in zirrhotischen Lebern nachweisbar ist. Folglich ist auf Proteinebene eine Differenzierung mittels NOPE-Expression zwischen normaler adulter Leber und HCC, allerdings nicht zwischen tumorfreier, pathologisch veränderter Leber und benachbartem HCC möglich. Mittels immunhistochemischer Darstellung in HCC-Gewebe konnte NOPE eine zytosolische Lokalisation aufweisen, wobei die Sensitivität der Färbung niedrig war.

Schlussfolgerung: NOPE-Einsatz als Biomarker scheint bei humanen HCCs nach HBV-Infektion, die ohne Zirrhose einhergehen und niedrige AFP-Expression aufweisen, auf RNA-Ebene aus Biopsiematerial möglich. Jedoch ist NOPE auf mRNA-Ebene nur bei 20,8 % AFP-negativer Proben, vor allem in HCCs nicht-zirrhotischer Leber im Vergleich zum umgebenden Lebergewebe überexprimiert nachweisbar. Die Proteinanalyse weist somit eine geringe Spezifität auf. Es ist zwar eine Differenzierung zwischen normaler adulter Leber und HCC, aber nicht zwischen tumorfreier, jedoch bereits pathologisch veränderter Leber und benachbartem HCC möglich. Zudem zeigt die Immunhistochemie eine geringe Sensitivität, weil ein Nachweis nur bei Proben mit maximaler (170-fache) NOPE-Expression gelingt. Aufgrund der niedrigen Sensitivität und Spezifität und ungünstigen Testbedingungen ist ein NOPE-Nachweis im Patientenserum daher kaum sinnvoll. Außerdem ist davon auszugehen, dass die Expression von NOPE nicht alleine auf die Leber beschränkt ist. Folglich ist eine Verwendung zum Screening nicht möglich, sondern könnte allenfalls in Kombination mit anderen Markern als prognostischer Marker sinnvoll sein. Ob eine prognostische Wertigkeit von NOPE beim humanen HCC besteht, kann in der aktuellen Arbeit jedoch aufgrund der zu niedrigen Fallzahlen nicht abschließend beurteilt werden.

7. Literaturverzeichnis

[1] Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. J Clin Oncol 2009; 27:1485-91

[2] Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Burroughs AK, Cancado EL, and Chapman RW, International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999; 31:929-938

[3] Anatelli F, Chuang ST, Yang XJ, Wang HL Value of glypican 3 immunostaining in the diagnosis of hepatocellular carcinoma on needle biopsy Am J Clin Pathol. 2008 Aug; 130(2): 219-23

[4] Aoyagi Y, Isokawa O, Suda T, Watanabe M, Suzuki Y, Asakura H. The fucosylation index of alpha-fetoprotein as a possible prognostic indicator for patients with hepatocellular carcinoma Cancer. 1998 Nov 15; 83(10):2076-82

[5] Arbuthnot, P., A. Capovilla, and M. Kew. 2000. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. J. Gastroenterol. Hepatol. 15:357-368

[6] Asare GA, Bronz M, Naidoo V, and Kew MC Synergistic interaction between excess hepatic iron and alcohol ingestion in hepatic mutagenesis, Texicology 2008 Dec 5; 254(1-2):11-8. Epub 2008 Sep 21

[7] Bassiouny, E. I. El-Bassiouni NE, Nosseir MM,Zoheiry MM, EL- Ahwany EG, Salah F, Oman ZS, Ibrahim RA , Circulating and hepatic Fas expression in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Medscape J Med. 2008; 10(6): 130.

[8] Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. Gastroenterology 2002; 122: 1609-1619

[9] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. Gastroenterology 2004; 127: S5-S16

[10] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. Hepatol, Vol. 53, No. 3, 2011

[11] Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. J Hepatol. 2001; 35:421–430

[12] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellularcarcinoma. Hepatology 2005; 42: 1208–1236

[13] Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. Clin Liver Dis 2007; 11: 191-207

[14] Caillot F, Derambure C, Bioulac-Sage P, Francois A, Scotte M, Goria O, Hiron M, Daveau M, Salier JP. Transient and etiology-related transcription regulation in cirrhosis prior to hepatocellular carcinoma occurrence World J Gastroenterol. 2009 Jan 21; 15(3): 300-9.

[15] Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM: Obesity and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2004; 127: S97–103

[16] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J.Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma.Gastroenterology 2003; 125:89-97

[17] Capurro, M., Wanless, I. R., Sherman, M., Deboer, G., Shi, W., Miyoshi, E., and Filmus, J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 125: 89-97, 2003.

[18] Cerutti H.RNA interference: travelling in the cell and gaining functions? Trends Genet. 19, 39-46, 2009

[19] Chang CH, Chau GY, Lui WY (2004) Long-term results of hepatic resection for hepatocellular carcinoma originating from the noncirrhotic liver. Arch Surg 139: 320–325

[20] Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S. Expression profi ling in multistage hepatocarcinogenesis:identifi cation

of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. Hepatology 2003; 37:198–207

[21] Dardousis K, Voolstra C., Roengvorapho M., Sekandarzad A, Mesghenna S., Winkler J., Ko Y., Hescheler J., Sachinidis A.:“Identification of Differentially expressed genes involved in Formation of Multicellulat tumor spheroids by HT-29 Colon Carcinoma Cells“Molecular Therapy (2007) 15, 94–102.

[22] Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. Gastroenterology 2004; 127: 1372-1380

[23] Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten Leitlinie "Therapie der autoimmunen Hepatitis, primär biliären Zirrhose und primär sklerosierenden Cholangitis" Z Gastroenterol 1997; 35: 1041–1049

[24] Elbashir S. M, Harborth J., Lendeckel W. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411:494-498, 2001

[25] Elmore L, Hancock Amy R., Chang Shau-Feng, Wang Xin W., Chang Seung, Callahan Christiana P., Geller David A., Will Hans, and. Harris Curtis C, Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 December 23; 94(26): 14707-14712.

[26] El-Serag HB, Tran T, Everhart JE (2004) Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 126: 460–468

[27] El-Serag, H. B. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. Gastroenterology, 127: S27-34, 2004.

[28] Epidemiologisches Bulletin: Virushepatitis B, C und D im Jahr 2010 29/2011

[29] Ezzikouri S, El Feydi AE, El Kihal L, Afifi R, Benazzouz M, Hassar M, Chafik A, Pineau P, Benjelloun S. Prevalence of common HFE and SERPINA1 mutations in patients with hepatocellular carcinoma in a Moroccan population. Arch Med Res. 2008 Feb; 39(2): 236-41.

[30] Farinati F, Marino D, De Giorgio M, Baldan A, Cantarini M, Cursaro C, Rapaccini G, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegnù L, Zoli M, Borzio F, Bernardi M, Trevisani F Diagnostic and prognostic role of alphafetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? Am J Gastroenterol 2006; 101(3): 524-532

[31] Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, (2000) How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. Cancer 89: 2266–2273

[32] Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., and Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. Gastroenterology, 127: S35-50, 2004

[33] Ferlay J, Parkin DM, Pisani P. Globocan Graphical Package 1: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Vol. 79. Lyon: IARC Press; 1998

[34] Ferenci P, Członkowska A, Merle U, Ferenc S, Gromadzka G, Yurdaydin C, Vogel W, Bruha R, Schmidt HT, Stremmel W : Late-onset Wilson's disease.Gastroenterology. 2007 Apr; 132(4):1294-8

[35] Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. J Clin Invest 2001; 108:497–501.

[36] Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. World J Gastroenterol. 2007; 13:4865–4872.

[37] Fong TL, Kanel GC, Conrad A, Valinluck B, Charboneau F, Adkins RH. Clinical significance of concomitant hepatitis C infection in patients with alcoholic liver disease. Hepatology 1994; 19: 554-557

[38] Fromenty B., Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH Diabetes & Metabolism, Volume 30, Issue 2, April 2004, Pages 121-138

[39] Ganne-Carrié, N.; Trinchet, JC.Systemic treatment of hepatocellular carcinoma European Journal of Gastroenterology & Hepatology: March 2004 - Volume 16 - Issue 3 - pp 275-281

[40] Ganten, D. und Ruckpaul, K.: Molkularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen ISBN 10: 3-540-41577-7: Springer-Verlag GmbH 2002

[41] Gary L. Davis, MD ,Jane Dempster, RN, James D. Meler, MD, Douglas W. Orr, MD, Mark W. Walberg, MD, Brian Brown, APRN, Brian D. Berger, MD, John K. O'Connor, MD, and Robert M. Goldstein, MD Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem Proc (Bayl Univ Med Cent). 2008 July; 21(3): 266–280

[42] Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepato cellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R World J Gastroenterol 2008 July 21; 14(27): 4300-4308

[43] Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, Song H, Testa JR, Penn LZ, Filmus J. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. J Cell Biol 1998; 141: 1407-1414

[44] Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes, Nature. 2007 Mar 8; 446(7132): 153-8.

[45] Groopman JD, Scholl P, Wang JS. Epidemiology of human aflatoxin exposures and their relationship to liver cancer. Prog Clin Biol Res. 1996; 395: 211–222.

[46] Habib N, Salama H, Abd El Latif Abu Median A, Isac Anis I, Abd Al Aziz RA, Sarraf C, Mitry R, Havlik R, Seth P, Hartwigsen J, Bhushan R, Nicholls J, Jensen S. (2002) Clinical trial of E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for hepatocellular carcinoma. Cancer Gene Ther 9: 254–259

[47] Hannon GJ. RNA interference, Nature 418:241-251, 2002

[48] Hock-Foong Lui, Screening for Hepatocellular Carcinoma Int J Hepatol. 2011; 2011: 363151.

[49] http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php

[50] Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, Schmitt-Gräff A, Gusmirovic I, Solomon H, Luxon BA, Bacon BR, Fimmel CJ. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. Am J Gastroenterol 2004; 99: 1087-1095

[51] James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. Lancet 1999;353: 1634–6

[52] Jansen MC, van Hillegersberg R, Chamuleau RA, van Delden OM, Gouma DJ, van Gulik TM. Autcome of regional and local ablative therapies for hepatocellular carcinoma: a collective review European Journal of Surgical Oncology, Volume 31, Issue 4, Pages 331-347

[53] Kladney RD Kladney RD, Cui X, Bulla GA, Brunt EM, Fimmel CJ. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. Hepatology 2002; 35: 1431-1440

[54] Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685, (1970)

[55] Lebret T, Watson RW, Molinie V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. Cancer 2003; 98: 970-977

[56] Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zur Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Caselmann,W. H., Blum, H. E., Fleig, W. E., Huppert,P.E., Ramadori, G.,Schirmacher, P. und Sauerbruch, T. Gastroenterol 1999; 37: 353–365

[57] Li, D., Mallory, T., and Satomura, S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. Clin Chim Acta, 313: 15-9, 2001.

[58] Lim So, Park SG, Yoo JH, Park YM, Kim HJ, Jang KT, Cho JW, Yoo BC, Jung GH, Park CK.Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules World J Gastroenterol 2005 April 14; 11(14): 2072-9

[59] Lin H, Huber R, Schlessinger D, Morin PJ. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. Cancer Res 1999; 59:807-10

[60] Liu JH, Chen PW, Asch SM, Busuttil RW, Ko CY. Surgery for hepatocellular carcinoma: does it improve survival? Ann Surg Oncol 2004; 11: 298-303

[61] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C (T)) Method. Methods 2001; 25: 402-8

[62] Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. Semin Liver Dis 1999; 19: 329–38.

[63] Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. Hepatology 2008; 48:1312–1327.

[64] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet 2003; 362: 1907-17

[65] Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, Thung SN, Khitrov G, Zhang W, Villanueva A, Battiston C, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Friedman SL A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis Gastroenterology. 2006 Dec; 131(6):1758-67

[66] Llovet JM, Fuster J, Bruix J. (2004) The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. Liver Transpl 10: S115–120

[67] Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 2005; 40: 225-35

[68] Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic Hepatitis, New England Journal of Medicine (2009) vol. 360(26), S.2758-2769

[69] Marquardt, JU; Quasdorff, M; Varnholt, H; Curth, HM; Mesghenna, S, Protzer, U; Goeser, T; Nierhoff, D Neighbor of Punc E11, a novel onco-fetal marker for hepatocellular carcinoma, International Journal of Cancer 23 JUL 2010

[70] Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. Hepatology 2005; 41:707-716

[71] Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2005; 42: 218-224

[72] Marrero, J. A., Romano, P. R., Nikolaeva, O., Steel, L., Mehta, A., Fimmel, C. J., Comunale, M. A., D'Amelio, A., Lok, A. S., and Block, T. M. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. J Hepatol, 43: 1007-12, 2005

[73] Marrero, J. A., Su, G. L., Wei, W., Emick, D., Conjeevaram, H. S., Fontana, R. J., and Lok, A. S. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. Hepatology, 37: 1114-21, 2003

[74] McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF Jr International trends and patterns of primary liver cancer. Int J Cancer, 2001. 94(2): p. 290-6

[75] McManus M.T., Sharp PA.Gene Silencing in mammals by small interfering RNAs, Nature Rev. Genet.3:737-747,2002

[76] Meric F, Patt YZ, Curley SA: Surgery after downstaging of unresectable hepatic tumors with intra- arterial chemotherapy. Ann Surg Oncol 2000; 7: 490–495

[77] Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, Shao Y, Wu Z, Liu G, Wang X, Sun Z. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor

role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. Hepatology 2002; 36: 1214-1220

[78] Mohamed MM, Osman AM, Fathy E, Al-Badry KS, Al-Kady N, Esmat GE, Al-Sherbiny MM. T cells are depleted in HCV-Induced hepatocellular carcinoma patie14.Ibrahim SAnts: possible roleAbdelwahab SF of apoptosis and p53.Egypt J Immunol2006;13(2): 11-22

[79] Morgan, S. Mandayam, M. Jamal. Alcohol and hepatocellular carcinoma Gastroenterology, 2004 Nov; 127: S87-96.PMID: 15508108 Volume 127, Issue 5, Pages S87-S96T

[80] Nakagawa T, Seki T, Shiro T, Wakabayashi M, Imamura M, Itoh T, Tamai T, Nishimura A, Yamashiki N, Matsuzaki K, Sakaida N, Inoue K, Okamura A. Clinicopathologic significance of protein induced vitamin K absence or antagonist II and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. Int J Oncol 1999; 14: 281-286

[81] Nakakura, E. K., and Choti, M. A. Management of hepatocellular carcinoma. Oncology (Williston Park), 14: 1085-98; discussion 1098-102, 2000.

[82] Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. Biochem Biophys Res Commun 2003; 306: 16-25

[83] Nanashima A, Taura N, Abo T, Ichikawa T, Sakamoto I, Nagayasu T, Nakao K. “Tumor marker levels before and after curative treatment of hepatocellular carcinoma as predictors of patient survival” Dig Dis Sci. 2011 Oct;56(10):3086-100. Epub 2011 Jun 25

[84] Narumi S, Robert JP, Emond JC, Lake J, Ascher NL Liver transplantation for sclerosing cholangitis. Hepatology; 1995; 22: 451- 457

[85] Nierhoff D and Goeser T. Diagnostik und natürlicher Verlauf der Hepatitis A-E.Der Gastroenterologe, Juni 2006, Volume 1, Number 2, 101–108

[86] Nierhoff D, Levoci L, Schulte S, Goeser T, Rogler LE, Shafritz DA.New cell surface markers for murine fetal hepatic stem cells identified through high

density complementary DNA microarrays Hepatology. 2007 Aug; 46(2): 535-47. PMID: 17508344

[87] Okuda K, Ohtsuki T, Obata H. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Cancer 1995; 56: 918-928

[88] Osada T, Sakamoto M, Nagawa H, Yamamoto J, Matsuno Y, Iwamatsu A, Acquisition of glutamine synthetase expression in human hepatocarcinogenesis: relation to disease recurrence and possible regulation by ubiquitin-dependent proteolysis. Cancer (Phila) 1999; 85(4): 819–31

[89] Paget Vincent; Sichel François; Garon David; Lechevrel Mathilde. Aflatoxin B1-induced TP53 mutational pattern in normal human cells using the FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast). Mutation research 2008; 656(1-2): 55-61

[90] Parikh S, Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. Am J Med. 2007; 120: 194–202

[91] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001;94: 153-156

[92] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55: 74–108

[93] Passarge Eberhard, Thieme Taschenatlas der Genetik (ISBN3-13-759502-9) 2004 George Thieme Verlag, Stuttgart

[94] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP: The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. J Hepatol 2006;45:529-538

[95] Piotr Stefaniuk, Janusz Cianciara, Alicja Wiercinska-Drapalo. Review: Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma World J Gastroenterol 2010 January 28; 16(4): 418-424

[96] Poupon R, Chrétien Y, Poupon RE, Ballet F, Calmus Y, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? Lancet. 1987 Apr 11;1(8537):834–836

[97] Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. Lancet 1997; 349:825–832 (III)

[98] Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie/ ISBN: 3-540-21914-5 hrsg. v. JR. Siewert 2.Aufl. Berlin: Springer, 2006

[99] Robert- Koch- Institute Epidemiologie zur Infektionskrankheiten Hepatitis B, C und D, 2005

[100] Sakamoto M. Early HCC: diagnosis and molecular markers. J Gastroenterol 2009 44(Suppl-19): 108–11

[101] Sakamoto M. Early HCC: diagnosis and molecular markers.J Gastroenterol. 2009; 44 Suppl 19:108-11. Epub 2009 Jan 16

[102] Salbaum JM, Kappen C. Cloning and expression of nope, a new mouse gene of the immunoglobulin superfamily related to guidance receptors. Genomics 2000; 64: 15-23

[103] Salbaum JM. Genomic structure and chromosomal localization of the mouse gene Punc.Mamm Genome. 1999 Feb; 10(2):107-11.PMID: 9922388

[104] Salbaum JM. Punc, a novel mouse gene of the immunoglobulin superfamily, is expressed predominantly in the developing nervous system.Mech Dev. 1998 Feb;71(1-2):201-4.PMID: 9507132

[105] Sassa T, Kumada T, Nakano S, Uematsu T. Clinical utility of simultaneous measurement of serum high-sensitivity des-gamma-carboxy prothrombin and Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in patients with small hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999; 11: 1387-139

[106] Seike, M., Kondo, T., Fujii, K., Yamada, T., Gemma, A., Kudoh, S. & Hirohashi, S. (2004) Proteomic signature of human cancer cells. Proteomics 4, 2776-2788

[107] Silva MA, Hegab B, Hyde C, Guo B, Buckels JA, Mirza DF.Needle track seeding following biopsy of liver lesions in thediagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. Gut 2008; 57: 1592-1596

[108] Song HH, Shi W, Filmus J. OCI-5/rat glypican-3 binds to fibroblast growth factor- 2 but not to insulin-like growth factor-2. J Biol Chem 1997;272:7574-7

[109] Song, B. C., Chung, Y. H., Kim, J. A., Choi, W. B., Suh, D. D., Pyo, S. I., Shin, J. W., Lee, H. C., Lee, Y. S., and Suh, D. J. Transforming growth factor-beta1 as a useful serologic marker of small hepatocellular carcinoma. Cancer, 94: 175-80, 2002

[110] Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, Sherman M, Venook AP, Reddy KR, Satomura S, Schwartz ME. Clinical utility of AFP-L3% measurement in North American patients with HCV-related cirrhosis Am J Gastroenterol. 2007 Oct;102(10):2196-205

[111] Stratton MR., Campbell PJ. , Futreal PA. The cancer genome. Nature. 2009 Apr 9; 458(7239):719-24

[112] Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 2003; 94: 259-262

[113] Swinkels DW, Janssen MCH, Bergmans J, Marx JJM. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. Clin. Chem. 2006; 52, 950-968

[114] Thomas MB, Abbruzzese JL (2005) Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol 23: 8093–8108

[115] UICC (2010) TNM classification of malignant tumours 7th ed. Onkologe 2010 Wittekind C, Meyer HJ (deutsche Übersetzung), Springer-Verlag 201016:175–180

[116] Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. J Hepatol 2004;41:677-683

[117] Wallace DF, Subramaniam VN. Co-factors in liver disease: the role of HFE-related hereditary hemochromatosis and iron. Biochim Biophys Acta. 2009 Jul; 1790(7):663-70. Epub 2008 Sep 20. Review. PMID: 18848602

[118] Wands JR. Prevention of hepatocellular carcinoma. New Engl J Med 2004; 351: 1567-70

[119] Wang HL, Anatelli F, Zhai QJ, Adley B, Chuang ST, Yang XJ Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions Arch Pathol Lab Med. 2008 Nov; 132(11):1723-8

[120] Wang XZ, Chen XC, Chen YX, Zhang LJ, Li D, Chen FL, Chen ZX, Chen HY, Tao QM. Overexpression of HBxAg in hepatocellular carcinoma and its relationship with Fas/FasL system. World J Gastroenterol. 2003 Dec;9(12):2671-5

[121] Weitz IC, Liebman HA. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review. Hepatology 1993; 18; 990-997

[122] World Health Organization. Mortality database (://www.who.int/ whosis/en)

[123] Worthington, Joy, Chapman, Roger Primary sclerosing cholangitis World J Gastroenterology. 2008 Jan 21; 14(3):331-7

[124] www.hepatitis-abc.de

[125] http://www.lebertransplantation.eu/

[126] Xiang YY, Ladeda V, Filmus J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. Oncogene 2001; 20:7408-12.

[127] Zhang, B. H., Yang, B. H., and Tang, Z. Y. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol, 130: 417-22, 2004

[128] Zhou L, Liu J, Luo F: Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 12 (8): 1175-81, 2006

8. Anhang

8.1 Publikationen

07/2010 Marquardt, Jens Uwe; Quasdorff, Maria; Varnholt, Heike; Curth, Harald-Morten, **Mesghenna, Senait**, Protzer, Ulrike; Goeser, Tobias; Nierhoff, Dirk **"Neighbour of Punc E11, a novel onco-fetal marker for hepatocellular carcinoma"**, International Journal of Cancer 2010

08/2007 Dardousis Kleomenis; Voolstra Chris; Roengvoraphoj Monic; Sekandarzad Asieb; **Mesghenna Senait** Winkler Johannes; Ko Yon; Hescheler Jürgen; Sachinidis Agapios **"Identification of differentially expressed genes involved in the formation of multicellular tumor spheroids by HT-29 colon carcinoma cells"** Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 2007; 15(1):94-102.

8.2 Poster

03/2009 Jens U. Marquardt, **Senait Mesghenna**, Maria Quasdorff, Harald M. Curth, Heike Varnholt, Margarete Odenthal, Ulrike Protzer,Tobias Goeser, Dirk Nierhoff **"Neighbor of Punc E11 (Nope), A Novel Marker for Murine and Human Hepatocellular Carcinoma"** OP-181 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease Washington, DC USA

01/2009 **Mesghenna S**., Marquardt J., Quasdorff M., Curth H., Odenthal M., Goeser T. und Nierhoff D. **"NOPE (Neighbor of Punc E11)**

als neuer Marker hepatozellulärer Karzinome" GASL 2009, Heidelberg (Poster)

01/2009 David Lopez, Falko Schulze, Melanie Scheffler, **Senait Mesghenna**, Katharina Wendland, Ulrich Töx, Uta Drebber, Dirk Nierhoff, Hans Peter Dienes and Margarete Odenthal **"The neuronal guidance cue and survival factor, Netrin-1, in liver fibrogenesis"**. GASL 2009 Heidelberg (Poster)

01/2008 **Mesghenna S**., Marquardt J., Quasdorff M., Holz G., Odenthal M., Goeser T., Nierhoff D. "NOPE (Neighbor of Punc E11) als Biomarker humaner hepatozellulärer Karzinome" GASL Januar 2008 Frankfurt (Poster) (P2.19)

01/2008 Marquardt J., Quasdorff M., Gonzalez-Carmona M. A., Holz G., **Mesghenna S**., Protzer U., Goeser T., Nierhoff D."Neighbor of Punc E11 (Nope): Ein neuer Biomarker für hepatozelluläre Karzinome der Maus" Z Gastroenterol 2008; 46:85-158, GASL Januar 2008, Frankfurt (Poster) (P2.18)

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.6A Therapiealgorithmus nach der Barcelona Clinic Liver-Cancer (BCLC)-Klassifikation, modifiziert nach Bruix J, 2003 17
Abbildung 2.1A: Genomische Lokalisation von Nope, modifiziert nach Salbaum, 2000 25
Abbildung 4.1.1A: Lineare Darstellung der Zelllinien 46
Abbildung 4.1.1B:Logarithmische Darstellung der Zelllinien 46
Abbildung 4.1.2A: Western Blot- Ergebnisse der Hepatoma-Zelllinien 48
Abbildung 4.1.3A: Immunhistohemische Darstellung von Nope in Maus HCC Zellen 50
Abbildung 4.1.3B:HuH7 Immunhistochemische Lokalisation von Nope und AFP. 51
Abbildung 4.1.3C: Koexpression Nope und trans Golgi 51
Abbildung 4.3.1A: Ätiologische Einteilung und Verteilung nach Zirrhose 55
Abbildung 4.3.1B:Einteilung nach Differenzierungsgrad und Geschlecht. 56
Abbildung 4.3.2A:Übersicht qPCR humane HCCs, nur Tumorgewebe (T). 59
Abbildung 4 3.3.1A: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit starker NOPE-Expression (linear). 60
Abbildung 4.3.3.1B:qPCR T vs.OT in HCC-Proben mit starker NOPE-Expression (logarithmisch) 60
Abbildung 4.3.3.1C: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit mittlerer NOPE-Expression (linear). 61
Abbildung 4.3.3.1D: qPCR T vs.OT in HCC-Proben mit mittlerer NOPE-Expression (logarithmisch). 61
Abbildung 4.3.3.1E: qRT-PCR T vs. OT in HCC-Proben mit schwacher NOPE-Expression (linear). 62
Abbildung 4.3.3.1F: qPCR T vs.OT in HCC-Proben mit schwacher NOPE-Expression (logarithmisch).. 62
Abbildung 4.3.3.1G:Lebermetastasen T vs. OT (linear). 63
Abbildung 4.3.3.1H:Lebermetastasen T vs. OT (logarithmisch). 63
Abbildung 4.3.3.1I: Übersicht qRT-PCR mit “tumorfreien” OT-Proben 64
Abbildung 4.3.4A: Western Blot Lebergewebe 68

Abbildung 4.3.4B: Western Blot Lebergewebe 68
Abbildung 4.3.4C und D: Western Blot Lebergewebe T vs OT 69
Abbildung 4. 3. 5A: T 144 Nope- AK (perinukleär), E.-Cadherin 71
Abbildung 4.3.5B: T144 nach Färbung mit monoklonlaem NOPE-AK..... 71
Abbildung 5.1: Silencinschema, modifiziert nach Cerutti..... 84

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1A: Verbrauchsmaterial-Übersicht 27
Tabelle 3.3.2.3A: Oligonucleotid- Primer Sequenzdarstellung 37
Tabelle 4.1.1C: Tabellarische Zusammenfassung der qRT-PCR Ergebnisse der Hepatoma-Zelllinien 47
Tabelle 4.3.1A: Differenzierungsgrad des Tumors der untersuchten Proben..... 54
Tabelle 4.3.3.2A: Zusammenfassung aller NOPE-positiven HCC-Proben 66