

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Prof. Dr. H.-J. Schlitt

Expression von ALR im HCC,  
Vergleich mit der ALR-Expression in gesundem und zirrhotischem Lebergewebe  
und Korrelation mit klinischen Daten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Hannah Wagner

2011



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Prof. Dr. H.-J. Schlitt

Expression von ALR im HCC,  
Vergleich mit der ALR-Expression in gesundem und zirrhotischem Lebergewebe  
und Korrelation mit klinischen Daten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Hannah Wagner

2011

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Thomas Weiß

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung:

04.08.2011

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Leber	1
1.2	Das Hepatozelluläre Karzinom	2
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie	2
1.2.2	Klinik und Diagnostik	4
1.2.3	Pathologische Aspekte	6
1.2.4	Therapiemöglichkeiten	10
1.2.5	Karzinogenese	12
1.3	Augmenter of liver regeneration (ALR)	15
1.4	Zielsetzung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Gewebe und klinische Daten	20
2.1.1	Gewebearray: "Tissue-micro-array" (TMA)	20
2.1.2	HTCR-Gewebebank (Human Tissue and Cell Research)	20
2.2	Immunhistochemie	21
2.2.1	Erstellen und Vorbereiten der Schnitte für die immunhistochemische Färbung	22
2.2.2	Durchführung der Immunhistochemie	24
2.2.3	Erstellen von Negativkontrollen	25
2.2.4	Rezepturen für benötigte Puffer und Lösungen	25
2.2.5	Reagenzien, Materialien und Geräte	26
2.3	Auswertung des Färbeergebnisses der Immunhistochemie	27
2.4	Statistische Methoden	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	Lokalisation der ALR-Expression im Lebergewebe	30
3.2	Immunhistochemische Untersuchung der ALR-Expression im Lebergewebe	32
3.2.1	Deskriptive Auswertung	33
3.2.2	Auswertung der ALR-Expression in normalem Lebergewebe, in der Leberzirrhose und im HCC	37

3.2.3	Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zu histopathologischen Daten	41
3.2.4	Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit laborchemischen und klinischen Parametern	43
3.2.5	Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit den Überlebensdaten	47
4.	Diskussion	52
4.1	Nachweis von ALR in normalem Lebergewebe, in der Leberzirrhose und im HCC	52
4.2	Korrelation der ALR-Expression in normalem Lebergewebe, in der Leberzirrhose und im HCC und Vergleich der Ergebnisse mit anderen Biomarkern für das HCC	54
4.3	Korrelation der ALR-Expression im HCC mit histomorphologischen Daten, Überlebensdaten und laborchemischen Daten und Vergleich der Ergebnisse mit anderen Biomarkern für das HCC	56
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literaturverzeichnis	61
7.	Danksagung	70
8.	Lebenslauf	71
9.	Publikationen und Präsentationen	72
9.1	Publikationen	72
9.2	Präsentationen	72

## 1. Einleitung

### 1.1 Leber

Die Leber stellt nicht nur das größte, sondern, aufgrund ihrer außerordentlichen metabolischen Kapazität, auch das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers dar. Zusätzlich ist die Leber die größte exokrine Drüse im Menschen, indem sie Galle bildet, welche über ein spezielles Gangsystem freigesetzt wird. Die Hepatozyten können zudem zahlreiche Substanzen synthetisieren, speichern und freisetzen sowie exogene und endogene Substanzen im Rahmen der Biotransformation metabolisieren und entgiften. Dabei gelangen diese Substanzen über die Pfortader in die Leber und verlassen das Organ über die Portalvenen oder die Gallenwege. Zu den wichtigsten von der Leber synthetisierten Substanzen zählen dabei Plasmaproteine und Galle. Bei den Plasmaproteinen handelt es sich vor allem um Albumin, Transportproteine, Proteine des Komplementsystems sowie Blutgerinnungsfaktoren. Die Galle besteht u.a. aus Gallensäuren und Bilirubin und wird vom Körper über den Darm ausgeschieden.

Die Leber als Speicherorgan enthält hauptsächlich Glykogen, aber auch Lipide. Glykogen wird in der Leber sowohl aus Glucose aufgebaut als auch bei Bedarf wieder freigesetzt. Lipide werden als Triglyceride gespeichert und können zu Lipoproteinen verstoffwechselt und ins Blut abgegeben werden. Im Rahmen der Biotransformation wird der Körper sowohl von körpereigenen, wie z. B. Bilirubin und Gallensäuren, als auch von körperfremden Verbindungen, wie Alkohol und zahlreichen Xenobiotika, entgiftet.

Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen ist ein differenzierter Aufbau des Organs und seiner Zellen von Nöten. Die Gliederung der Leber und ihre Mikromorphologie werden vom Verlauf und der Anordnung der intrahepatischen Gefäße, den Ästen der Pfortader und der A. hepatica propria sowie der Gallengänge bestimmt, die stets gemeinsam verlaufen und eine Trias bilden. Die venösen Gefäße nehmen hingegen einen anderen Verlauf. Durch den Verlauf der Trias erfolgt die Unterteilung der Leber in Lebersegmente. Innerhalb dieser befinden sich wiederum die Leberläppchen, welche die funktionelle architektonische Baueinheit der Leber darstellen. In der Läppchenmitte liegt die V. centralis, die den Anfangsteil des abführenden venösen Blutsystems bildet. Überall dort, wo drei oder mehr Läppchen mit ihren Kanten zusammenstoßen, befindet sich ein periportales Feld. In diesem liegen die

zuführenden Venae (Vv) interlobulares, Arteriae (Aa) interlobulares und die ableitenden Gallengänge (Ductus interlobulares biliferi).

Die Hepatozyten verlaufen radiär zur V. centralis, meist als ein- oder zweireihige Leberzellbalken. Zwischen den Hepatozyten befinden sich die Sinusoide, welche das Pfortadersystem mit dem Netz der Äste der A. hepatica verbinden und welche in die V. centralis münden. Die Zellauskleidung der Sinusoide besteht aus zwei Zelltypen: den gefensterten Endothelzellen und den Kupffer-Zellen, die zum mononukleären Phagozyten-System gehören.

Zwischen den Leberzellen und den Sinusoiden befindet sich der Dissé-Raum. In diesem perikapillären Spaltraum befinden sich die hepatischen Sternzellen (Synonyme: Ito-Zellen, Fettspeicherzellen), welche Fett speichern, eine besondere Rolle im Vitamin-A-Stoffwechsel spielen sowie Fibroblasten ähneln. Zusätzlich wird der Dissé-Raum von einem feinen Geflecht von nichtfibrillären Basalmembrankollagenen vom Typ IV, VI und XIV so strukturiert, dass ein Austausch von Makro- und Mikromolekülen zwischen Hepatozyten und Blut gewährleistet ist (Fleig, 2004).

## **1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom**

Neben zahlreichen unterschiedlichen Erkrankungen wie Leberzirrhose, Hepatitiden und gutartigen Tumoren können auch in der Leber auch maligne Tumore entstehen. Bei diesen muss man die äußerst häufigen sekundären Lebertumore (Metastasen von anderen malignen Tumoren) von den primären Lebertumoren unterscheiden.

Zu den primären Lebertumoren zählen das hepatozelluläre Karzinom (HCC), das cholangiozelluläre Karzinom (CCC), das Hepatoblastom und das fibrolamelläre HCC, welches eine Sonderform des HCC darstellt. Das HCC stellt den häufigsten primären Lebertumor dar und zählt weltweit zu den häufigsten Malignomen.

### **1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit das fünfthäufigste Karzinom und steht an dritter Stelle der weltweiten Krebsmortalität (Parkin et al., 2002). Der Tumor findet sich häufiger in China, Japan, Südostasien und im südlichen Afrika, jedoch zeigt sich auch in den Industrieländern der westlichen Welt eine zunehmende Inzidenz des Tumors (El-Serag, 1999). Ursächlich hierfür scheint die Zunahme der chronischen Infektion mit Hepatitis C oder Hepatitis B in der westlichen Welt zu sein, da

insbesondere virale Hepatitiden einen Risikofaktor für die Entstehung eines HCC darstellen (Abb. 1). Grundsätzlich ist jede Leberzirrhose unabhängig von ihrer Ätiologie als Präkanzerose anzusehen, da 70-90% der hepatozellulären Karzinome in zirrhotischen Lebern entstehen. In Europa werden hepatozelluläre Karzinome häufig sekundär durch Alkoholabusus und chronische HBV- und HCV-Infektion meist über die Zwischenstufe der Leberzirrhose verursacht (Abb. 1 und Abb. 2).

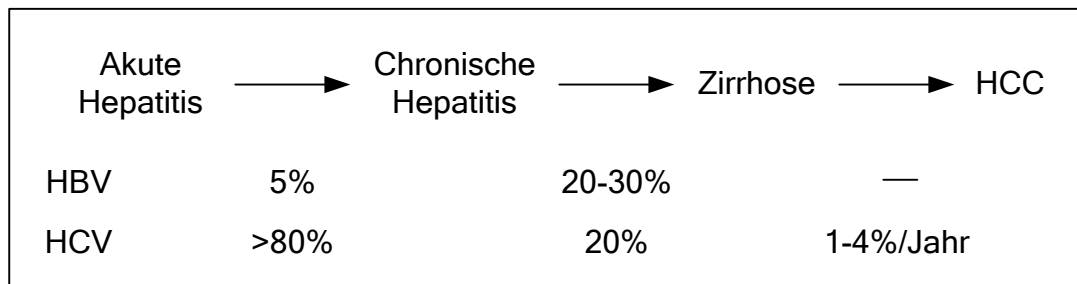


Abb. 1: Natürlicher Verlauf der Hepatitis B und C (nach „Das Hepatozelluläre Karzinom“, Hans-Peter Allgaier)

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC sind Aflatoxine, insbesondere in asiatischen und afrikanischen Ländern, Industrietoxine wie Toluol und Dimethylnitrosamin und angeborene Stoffwechselerkrankungen wie beispielsweise die hereditäre Hämochromatose, der alpha-1-Antitrypsinmangel und der M. Wilson (Kleber G, 2000) (Abb. 2).

Die Geschlechtsverteilung ist eindeutig zu Ungunsten der Männer verschoben, mit etwa 70% zu 30% (Parkin, 2004). Der Erkrankungsgipfel liegt in der westlichen Welt zumeist jenseits des 6. Lebensjahrzehnts.

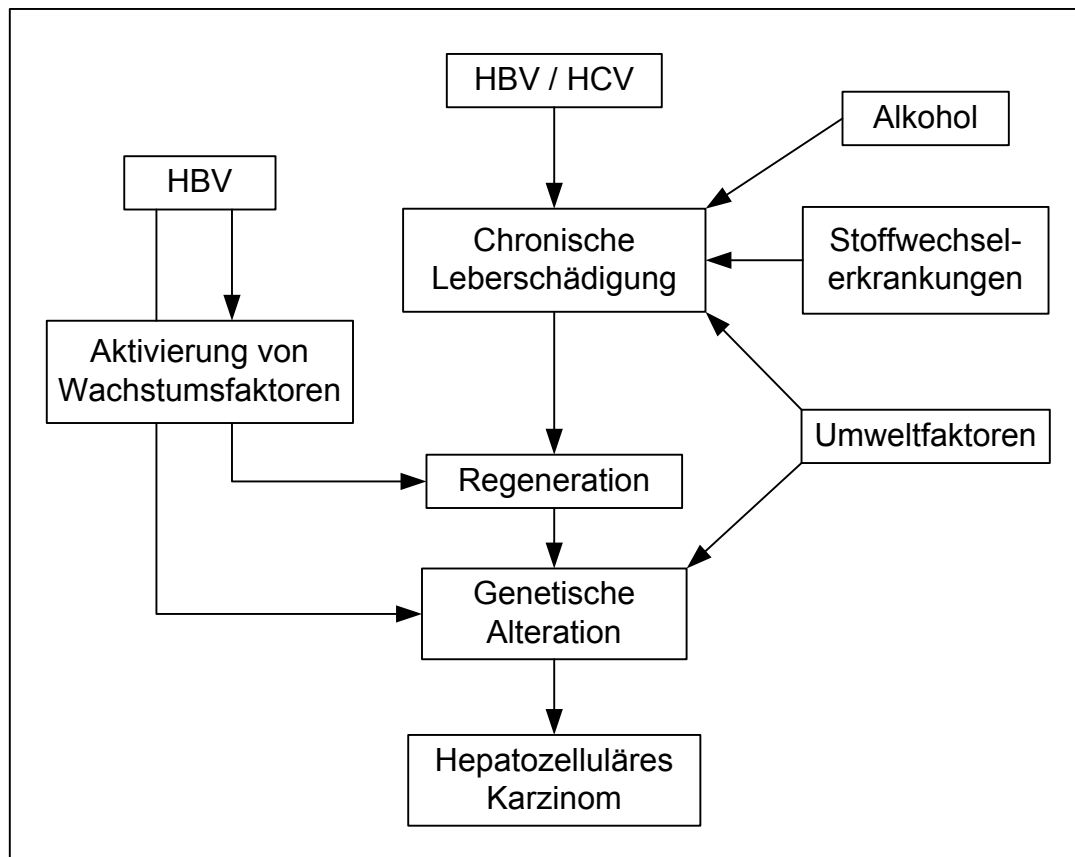


Abb. 2: An der Pathogenese des HCC beteiligte Faktoren (aus „Das Hepatozelluläre Karzinom“, Hans-Peter Allgaier)

### 1.2.2 Klinik und Diagnostik

Die Klinik des HCC ist leider sehr unspezifisch, weshalb die Diagnose häufig erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird. Da sich das HCC bei dem überwiegenden Teil der Patienten auf dem Boden einer bereits bestehenden Leberzirrhose entwickelt, welche teilweise erst zum Zeitpunkt der HCC-Diagnose erkannt wird, imponieren nicht selten vordergründig bei Diagnosestellung folgende Zeichen der Leberzirrhose: rechtsseitige Oberbauchbeschwerden, Gewichtsverlust oder auch Zeichen einer dekompensierten Zirrhose. Äußerst selten wird ein palpabler Oberbauchtumor gefunden. Bei Verdacht auf ein HCC gehören zur Diagnostik obligat die Sonographie sowie die CT, fakultativ die Angiographie, MRT und PET-CT.

Zahlreiche Serumtumormarker sind in der Literatur für das HCC beschrieben. Der klinisch bedeutendste Tumormarker ist das alpha-Fetoprotein (AFP), umfassendere Untersuchungen liegen auch zum Des-Gamma-Carboxyprothrombin (DCP, Synonym PIVKA-II) vor.

AFP ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa und wird während der Schwangerschaft im Dottersack und während der Fetalzeit im Gastrointestinaltrakt und in der Leber synthetisiert. Pränatal dient es als Marker für Neuralrohrdefekte. Postnatal fällt die AFP-Plasmakonzentration innerhalb der ersten zehn Lebensmonate auf den für Erwachsene normalen Referenzwert von 0-10 ng/ml ab. AFP ist nicht spezifisch für das HCC, sondern kommt auch bei Keimzelltumoren in hoher Konzentration vor. Bei HCC-Patienten finden sich zu 70% erhöhte AFP-Serumkonzentrationen (Johnson, 1999). Allerdings können auch erhöhte AFP-Werte bei gastrointestinalen Tumoren, in der Schwangerschaft, bei akuter oder chronischer Hepatitis und bei der Leberzirrhose auftreten. Da Patienten mit Leberzirrhose als Hochrisikogruppe für die Entstehung eines HCC gelten, soll AFP als Screeningparameter die Entstehung eines solchen bei diesen Patienten anzeigen. Allerdings können auch moderat erhöhte AFP-Serumspiegel bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen ohne maligne Transformation auftreten. Deshalb stellen moderat erhöhte Serumspiegel (<500 ng/ml) von AFP eine Grauzone zwischen benignen und malignen Lebertumoren dar. Serum-AFP-Werte >500 ng/ml gelten jedoch als hochverdächtig für das Vorliegen eines HCC. Weiterhin gilt ein AFP-Wert >400 ng/ml gemeinsam mit einem positiven radiologischen Befund ebenfalls als gesichertes HCC, so dass auf eine Biopsie verzichtet werden kann.

AFP ist jedoch nicht bei allen HCC-Patienten erhöht. Die Sensitivität von AFP für europäische HCC-Patienten liegt lediglich zwischen 55-70%, die Spezifität zwischen 83-92% (Trojan, 1998). Auch sind kleinere Karzinome häufig noch nicht positiv für AFP, wodurch die Sensitivität unter 50% sinkt.

Des-Gamma-Carboxyprothrombin (DCP) auch als "protein induced by vitamin K absence" oder "antagonist II" (PIVKA-II) bezeichnet, ist der zweite wichtige Tumormarker. Es ist ein anormales Prothrombin, das in malignen Hepatozyten produziert wird und erhöhte DCP-Werte scheinen besonders häufig bei AFP-negativen Patienten aufzutreten. Die Sensitivität von DCP ist der von AFP unterlegen, insbesondere beim kleinen HCC, jedoch scheint die Spezifität von DCP der des AFP überlegen zu sein (Weitz, 1993). Eine Korrelation zwischen AFP und DCP besteht nicht, jedoch erhöht die kombinierte Bestimmung der beiden Marker die Sensitivität.

Andere Tumormarker wie  $\alpha$ -L-Fucosidase, Hepatom-spezifische Gammaglutamyltransferase, CEA, Ca 19-9 haben bisher keinen Eingang in die klinische

Routinediagnostik für das HCC gefunden. Ebenso wurden zahlreiche Zytokine wie VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-8 (interleukine 8), TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor) oder IGF-II (insulin like growth factor II) untersucht und scheinen teilweise als Marker für Diagnostik und Therapie sinnvoll zu sein, jedoch ist ein Routineeinsatz auch hier noch nicht denkbar.

### **1.2.3 Pathologische Aspekte**

Die hepatozellulären Karzinome gehören zu den epithelialen Tumoren der Leber, da sie von den Parenchymzellen, den Hepatozyten ausgehen. Sie manifestieren sich entweder als große intraparenchymale oder subkapsuläre Tumore mit Satellitenknoten oder als multiple Läsionen, deren Wachstumsmuster an eine Leberzirrhose erinnert. Charakteristisch für die Tumorzellen ist auch das Nachahmen der Zytoarchitektur des normalen Lebergewebes, das in den meisten Tumoren zumindest partiell anzutreffen ist.

Histomorphologisch finden sich unterschiedliche Wachstumsmuster, so dass man entsprechend den Empfehlungen der WHO trabekuläre, pseudoglanduläre und azinäre, szirrhöse, solide und fibrolamelläre Karzinome unterscheidet. In bis zu 30% der Tumore ist auch eine Galleproduktion nachweisbar.

Vom zytologischen Aspekt lässt sich eine hepatozytäre Variante von einer pleomorphen, einer klarzelligen, einer onkozytären und einer sarkomatoiden Variante unterscheiden (Drebber, 2006). Zur sicheren Differenzierung zwischen einem HCC, CCC oder Lebermetastasen ist oftmals zusätzlich zur histomorphologischen und zytologischen Beurteilung der Einsatz von immunhistochemischen und molekularen Markern unerlässlich (Tab. 1).

Tab. 1: Histologische Differentialdiagnose von hepatozellulären Karzinomen und von Adenokarzinomen (primär: CCC/ sekundär: Metastasen) (nach Modern Pathology (2007), Neoplasms of the liver, Goodman)

	HCC	Adenokarzinom
Stroma	sehr wenig	desmoplastisch
Wachstumsmuster	trabekulär	tubulär und glandulär
	kompakt	papillär (selten)
	pseudoglandulär	solide
	szirrhös (selten)	
Schleimbildung	fehlend	oft nachweisbar
Gallebildung	oft (in etwa 65%)	fehlend
Kanalikuli	nachweisbar	fehlend
Immunhistologie		
CEA (polyklonal)	kanalikulär	diffus
HepPar 1	granulär positiv	negativ/schwach positiv
Alpha-fetoprotein	positiv/negativ	negativ (meistens)
Panzytokeratin	negativ/schwach positiv	positiv
CK7 und CK19	positiv/negativ	positiv (meistens)
CK8 und CK18	positiv (meistens)	positiv/negativ
$\alpha_1$ -Antitrypsin	positiv/negativ	positiv/negativ

Die Klassifikation des hepatozellulären Karzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation (Tab. 2). Dabei werden neben der Größe des Primärtumors die intrahepatische Metastasierung, die Lokalisation, die Gefäßinvasion sowie Lymphknoten- und Fernmetastasen berücksichtigt.

Die Metastasierung erfolgt lymphogen entlang der Gefäßäste an der Leberpforte, der Zöliakalgefäße oder peripankreatisch. Die regionären Lymphknoten für die Lebertumore sind die des Leberhilus, die hepatischen (entlang der Art. hepatica propria), die periportal (entlang der V. portae) und diejenigen entlang der abdominalen V. cava inferior oberhalb der Vv. renales (Wittekind, 2006). Empfohlen wird nach UICC/AJCC die Aufarbeitung von zumindest 3 Lymphknoten.

Multiple intrahepatale Herde (disseminiertes Wachstum) und Satellitenknoten werden auf frühe intrahepatische Gefäßinvasion und portale Streuung zurückgeführt.

Das intrahepatische Rezidiv ist weit häufiger anzutreffen als extrahepatische Absiedelungen und grundsätzlich erfolgt die Metastasierung/Rezidivierung meist spät. Metastasen wurden in der Lunge, den Knochen, den Nebennieren sowie im Zwerchfell und in mediastinalen Lymphknoten beschrieben (Tanaka, 2008), (Poon, 2002).

Tab. 2 TNM-6 Klassifikation des HCC nach AJCC/UICC 2002

(p)T1	Solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion (ohne Größenangabe)
(p)T2	Solitärer Tumor mit Gefäßinvasion, mehrere Herde <5cm
(p)T3	Multipel, > 5cm oder Infiltration eines großen Pfortader- oder Lebervenenastes
(p)T4	Invasion benachbarter Organe (ohne Gallenblase) oder Durchbruch durch viszerales Peritoneum
(p)N0	Keine regionären LK Metastasen
(p)N1	Regionäre LK Metastasen
(p)Nx	Regionäre LK können nicht beurteilt werden
(p) M0	Keine Fernmetastasen
(p)M1	Fernmetastasen
(p)Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar

Auf der TNM-Klassifikation basierend wird das HCC wiederum nach der „International Union against Cancer“ (UICC) in 4 Stadien eingeteilt (Tab. 3).

Tab. 3: Stadieneinteilung nach UICC

Stadium nach UICC	TNM 6-Klassifikation
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
IIIA	T3 N0 M0
IIIB	T4 N0 M0
IIIC	Jedes T N1 M0
IV	Jedes T jedes N M1

Weiterhin erfolgt ein Grading des Tumors. Bereits 1954 wurde das Grading System nach Edmondson und Steiner (Tab. 4) publiziert, das bis dato noch angewandt wird (Edmondson und Steiner, 1954).

Tab. 4: Grading nach Edmondson-Steiner (1954)

G1	Hochdifferenzierter Tumor, der aus Tumorzellen besteht, die schwer von denen eines hepatozellulären Adenoms zu unterscheiden sind
G2	Tumorzellen ähnlich normalen Hepatozyten, aber die Kerne sind größer und zeigen einen höheren Chromatingehalt; häufig findet sich eine azinäre Anordnung
G3	Die Kerne sind gewöhnlich größer und chromatinreicher als bei G2, sie nehmen den größeren Teil der Zelle ein; Gallebildung selten; azinäre Anordnung seltener als G2; häufiger Tumorriesenzenellen
G4	Schlecht differenzierter Tumor mit hyperchromatischen Kernen, die den Großteil der Zellen einnehmen; Trabekel schwer zu differenzieren; vielfach größere Zellmassen mit fehlender Kohärenz; Gallebildung extrem selten; spindelzellige und kleinzellige Areale können vorkommen

Das TNM-System und die Stadieneinteilung nach UICC berücksichtigen jedoch nur die Tumormorphologie. Für die Prognose spielen aber vor allem auch patienten- und organspezifische Faktoren eine Rolle, weshalb in den letzten Jahren zahlreiche Staging bzw. Scoring Systeme für das HCC entwickelt wurden.

Die Basis für alle weiteren Staging Systeme stellt der Child-Pugh/ Child-Turcotte-Pugh-Score dar, der zur Klassifikation der Zirrhose bereits 1964 von Child und Turcotte entwickelt und 1973 von Pugh aktualisiert wurde (Child und Turcotte, 1964)

(Pugh, 1973). Das erste Staging System ausschließlich für das HCC war das Staging nach Okuda, das 1985 von Okuda entwickelt wurde (Okuda, 1985).

In Europa wird derzeit hauptsächlich der CLIP (Cancer of the Liver italian Program) und BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) Score angewendet, wobei der BCLC Score bislang der einzige Score ist, von dem sich unmittelbar Therapiestrategien ableiten lassen (CLIP investigators, 1998) (Llovet, 1999).

#### **1.2.4 Therapiemöglichkeiten**

Zur Therapie des HCC stehen chirurgische und nicht-chirurgische Therapie-maßnahmen zur Verfügung. Zu den nicht-chirurgischen zählen die regionalen/interventionellen Therapieverfahren sowie systemisch-medikamentöse Therapien.

Das bisher immer noch einzige gesicherte Verfahren mit Aussicht auf Heilung ist die Resektion. Meist wird dabei eine Leberteilresektion durchgeführt. Von Vorteil ist hierbei das hohe Regenerationsvermögen der Restleber. Jedoch muss eine strenge präoperative Risikostratifizierung aufgrund der häufig assoziierten Leberzirrhose beim HCC vorgenommen werden. Entscheidend für die Indikationsstellung sind neben dem Tumorstadium und der Lokalisation vor allem die Beschaffenheit der Restleber und vorhandene Ko-Morbiditäten. Die Risikostratifizierung erfolgt anhand der Klassifikation nach Child-Pugh und anhand des BCLC-Scores. Hierdurch kann eine Abschätzung der Prognose erfolgen und ein Behandlungsplan abgeleitet werden.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit der vollständigen Entfernung der Leber mit nachfolgender Transplantation, insbesondere bei Patienten mit kleinen Karzinomen und assoziierter Leberzirrhose. Eine orthotope Lebertransplantation ermöglicht als einzige Therapie die potentielle Heilung sowohl der Karzinomerkrankung als auch der meist zugrunde liegenden Zirrhose. Die Grenzwerte vieler Zentren für die Transplantation sind ein maximaler Tumordurchmesser von bis zu 5 cm sowie höchstens drei Tumorknoten bis zu 3cm entsprechend den Milan Kriterien (Mazzaferro,1996).

Regionale/interventionelle Therapieverfahren kommen als Maßnahmen in Betracht, wenn eine chirurgische Therapie nicht möglich ist. Dies ist z.B. der Fall bei reduzierter Leberleistung durch die Zirrhose, zu vielen Tumorherden, schwieriger Tumorlokalisierung, schweren internistischen Begleiterkrankungen und auch als so genannte „bridging Therapie“ bis zur Lebertransplantation.

Zu den regionalen/interventionellen Therapieverfahren zählen: Kryoablation, Radiofrequenzablation (RFA), die perkutane Ethanolinjektion (PEI) und die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Die TACE ist eine gut validierte Therapieoption, die in erster Linie bei Kontraindikationen für ein chirurgisches oder lokal ablatives Verfahren zum Einsatz kommt. Derzeitige Indikationen sind in Tabelle 5 beschrieben (Vogl, 2008). Als absolute Kontraindikationen für eine TACE beschrieben Lubienski et al. einen Tumorbefall von mehr als 75% des Leberparenchyms durch ein diffuses HCC, extrahepatische Metastasen, nicht regionäre Lymphknotenmetastasen, eine Leberzirrhose Child C, eine hepatische Enzephalopathie, einen Karnofsky-Index <50%, eine floride Infektsituation und eine akute, schwere kardiopulmonale Begleiterkrankung (Lubienski, 2007).

Tab. 5: Indikationen für TACE (Vogl, 2008)

Indikationen	Ziel
1. Palliative Therapie	Tumorkontrolle, Überlebensverlängerung
2. Kurative Therapie	Neoadjuvantes Setting, „Downsizing“
3. „Bridging“ Therapie	Überbrückung bis Lebertransplantation
4. Symptomatische Therapie	Behandlung lokaler Kapselspannungsschmerzen, Blutungen
5. Rezidivtherapie	Nach Resektion - Tumorkontrolle

Liegt ein durch Lokalthherapie nicht mehr zu kontrollierendes HCC vor, kann unter palliativen Gesichtspunkten eine systemisch-medikamentöse Therapie in Betracht gezogen werden. Standard hierfür ist derzeit bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC, gutem Allgemeinzustand und fehlender Leberdekomensation der Multikinaseinhibitor Sorafenib, da für diesen in einer großen randomisierten Studie (SHARP) eine Verbesserung des Überlebens nachgewiesen werden konnte (Llovet, 2008). Derzeit besteht außerhalb von Studien keine Indikation für die Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und Sunitinib und den monoklonalen Antikörper Bevacizumab. Aufgrund einer weitestgehenden Resistenz des HCC gegen Chemotherapeutika stellt die Chemotherapie keinen Standard beim fortgeschrittenen HCC dar. Bei einem Progress der Erkrankung unter Sorafenib sollte daher die Entscheidung für eine Chemotherapie kritisch überdacht werden. Entscheidend für den Einsatz hierbei sind der Performance Status (PS) und die Leberfunktion, da sich bei schlechtem PS,

Pfortaderthrombose, signifikantem Aszites oder erhöhtem Bilirubin ( $>2\text{mg/dl}$ ) die Chancen auf ein Chemotherapieansprechen wohl weiter reduzieren (Nagahama, 1997). Eine Möglichkeit stellt beispielsweise die Kombination aus Gemcitabine und Oxaliplatin, eine Doxorubicin-Monotherapie sowie 5-FU und Capecitabin dar.

Bei unzureichender Datenlage ist derzeit eine Hormontherapie mit Tamoxifen (CLIP Group, 1998) oder Octreotid nicht zu empfehlen (Becker, 2007). Ebenso kann eine Interferontherapie aufgrund des hohen Nebenwirkungspotentials und der dadurch nicht verbesserten Überlebensraten nicht empfohlen werden (Llovet, 2000).

### **1.2.5 Karzinogenese**

In den letzten Jahren konnten neben den Risikofaktoren auch verschiedene molekulare Mechanismen entdeckt werden, die zur Entstehung eines HCC führen. Im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom, bei dem die Karzinomsequenz weitgehend aufgeklärt ist, sind beim HCC die beteiligten Faktoren und ihre Sequenz noch nicht hinreichend verstanden.

Bekannt ist jedoch, dass die Entwicklung von regenerativen Knoten in der Zirrhose zu Hyperplasien und zu einem hepatozellulären Karzinom einen komplexen Prozess darstellt, der in mehreren Schritten abläuft und in dem multiple genetische Alterationen zu einer malignen Transformation führen (Fausto und Webber, 1993) (Abb. 3, Abb. 4).

Hepatozelluläre Karzinome sind sehr heterogene Tumore und weisen häufig eine Vielzahl von chromosomalen Veränderungen wie Allelverluste, Polyploidie, Deletionen, Amplifikationen und Translokationen auf (Ozturk, 1999). Die maligne Transformation ist meist Folge einer chronischen Leberschädigung, zu der es typischerweise bei chronischem Alkoholkonsum, bei Stoffwechselerkrankungen und chronischen Virushepatitiden kommt.

Durch diese chronische Schädigung und durch die gesteigerten Regenerationsprozesse erhöht sich die Proliferationsrate von primären, reifen Hepatozyten, wodurch es wiederum vermehrt zu genetischen Alterationen wie Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Telomeraseaktivierung (Erlitzki und Minuk, 1999) und zu Defekten der DNA-Reparaturmechanismen (Macdonald, 1998) kommen kann (Abb. 3).

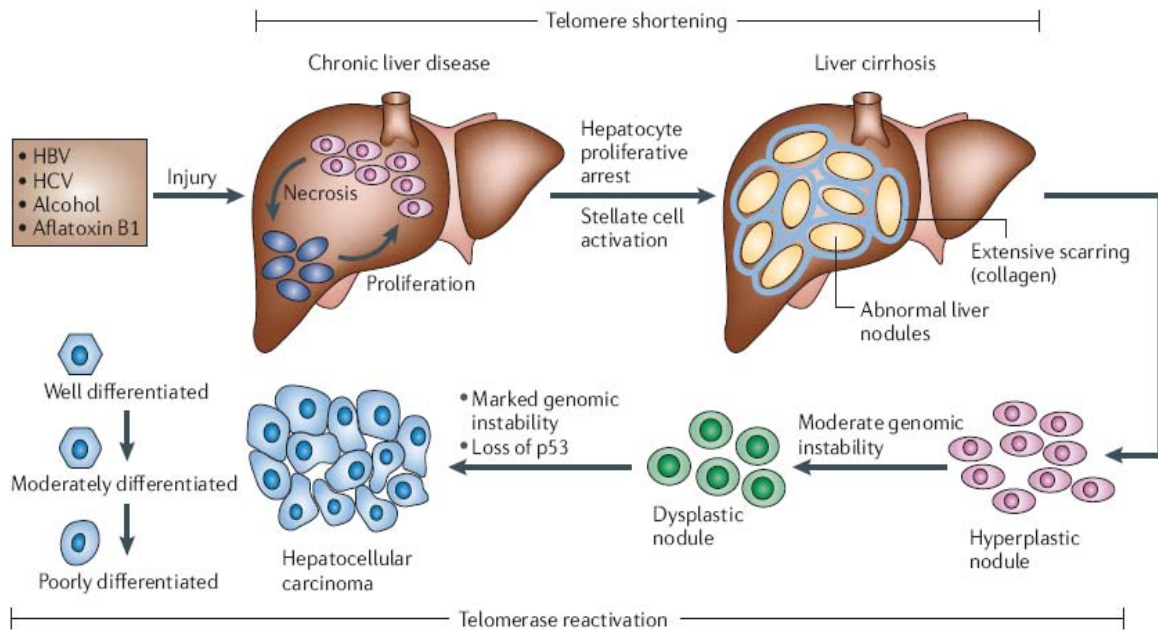


Abb. 3: Histopathologische Entwicklung und molekulare Merkmale des hepatozellulären Karzinoms (aus Farazi und DePinho, 2006)

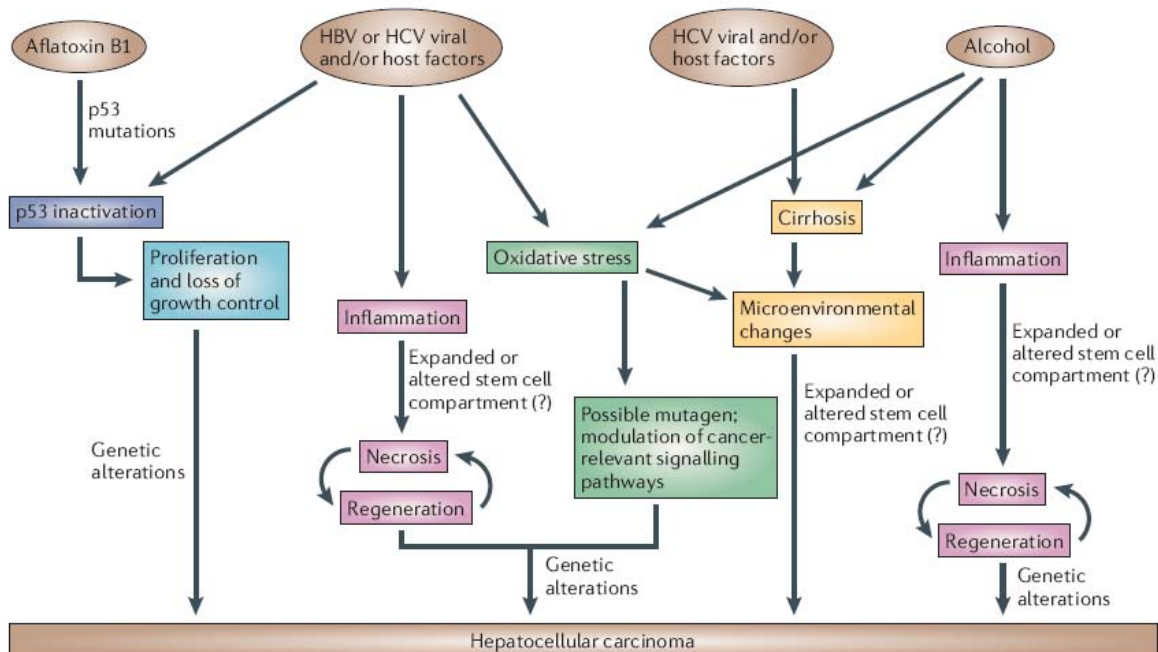


Abb. 4: Mechanismus der Hepatokarzinogenese: Dargestellt ist der vermutete Mechanismus der Karzinogenese, ausgehend von verschiedenen Risikofaktoren (aus Farazi und DePinho, 2006).

Von besonderer Bedeutung für die maligne Transformation scheint dabei das entstehende gestörte Verhältnis der Aktivität von Proto-Onkogenen zu Tumorsuppressorgenen, wie es in regenerativen Knoten als auch in HCC Gewebe nachgewiesen werden konnte (Livni, 1995), zu sein. So finden sich neben einer Mutation des Tumorsuppressorgens p53 in 30% aller HCCs auch häufig Mutationen von p16 und des Retinoblastom (RB)-Gens im HCC (Ozturk, 1999).

Im HCC kommt es, wie bei vielen anderen malignen Tumoren auch, zu einer unkontrollierten Expression von Wachstumsfaktoren oder von Komponenten ihrer Signaltransduktionskaskaden.

Zu diesen Wachstumsfaktoren, die mit der HCC Entwicklung assoziiert sind, zählen EGF, TGF $\alpha$  und HGF (Daveau, 2003). Häufig kommt es auch zu einer Insulin-growth-factor-Aktivierung durch IGF2 (insulin-like growth factor 2), zu einer IGF2R (insulin-like growth factor 2 receptor) Mutation sowie zu einer Mutation von AXIN 1 (axis inhibition protein 1).

Es gibt jedoch auch direkte Mechanismen, die zu einer malignen Transformation der Hepatozyten führen und deren Auftreten spezifisch ist im Zusammenhang mit einigen Risikofaktoren. Derartige spezifische Mechanismen existieren bei einer Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus sowie bei einer Exposition mit Aflatoxinen oder Vinylchlorid.

Durch eine HBV-Infektion kann über drei Mechanismen eine Karzinogenese erfolgen. Zum einen kann über den Einbau der Virus-DNA eine Chromosomeninstabilität entstehen, die in der Folge z.B. zu Deletionen, Inversionen und Duplikationen führt (Matsubara und Tokino, 1990) (Aoki, 1996). Weiterhin wird beschrieben, dass die HBV-DNA an spezifischen Stellen in das humane Genom integriert wird, so beispielsweise in das Exon des Retinoinsäurerezeptors  $\beta$  (RAR- $\beta$ ) (Brand, 1988). RAR- $\beta$  gehört zur Gruppe der nukleären Rezeptoren, welche die Transkription verschiedener, in der Zelldifferenzierung involvierter Gene steuern. Diese Integration führt zu einer Überexpression von RAR- $\beta$  und zu einer Veränderung seiner Eigenschaften. Eine weitere bekannte spezifische Integration der HBV-DNA erfolgt in das Cyclin-A-Gen und führt auch hier zu einer Aktivierung des Gens (Wang, 1990). Der dritte Mechanismus der Karzinomentstehung in Verbindung mit einer HBV-Infektion beruht auf einer Expression von viralen Proteinen, die zu einer Veränderung in der Zellproliferation führen. Dies konnte vor allem für das virale Protein HBx in zahlreichen Studien gezeigt werden, welches auch mit dem Tumorsuppressorgen p53 interagieren soll (Feitelson, 1998).

Auch für Aflatoxin und Vinylchlorid konnten spezifische Mechanismen identifiziert werden. So führt die Exposition mit Aflatoxin zu einer selektiven G zu T Mutation im Tumorsuppressorgen p53 (Ozturk, 1999) und die Exposition mit Vinylchlorid zu einer Mutation des K-ras-2 Gens (Weihrauch, 2001).

### **1.3 Augmenter of liver regeneration (ALR)**

Das Protein Augmenter of Liver Regeneration (ALR) wurde aus einer Homogenatfraktion fetalen Lebergewebes isoliert und gilt als ein wichtiger Faktor im Prozess der Leberregeneration (Francavilla, 1994). Der spezifische molekulare Einfluss von ALR auf den Stoffwechsel der Leberzellen ist derzeit jedoch noch nicht abschließend geklärt.

ALR wird auch als HSS (hepatic stimulating substance) oder Hepatopietin (HPO) bezeichnet (Wang, 1999). LaBreque et al. isolierten 1975 aus einem Homogenat von sich regenerierenden Rattenlebern eine Fraktion, die sie als HSS bezeichneten (LaBreque, 1975). Im Weiteren wurde aus dieser als HSS bezeichneten Fraktion ein Protein isoliert sowie sequenziert und dann Augmenter of liver regeneration (ALR) genannt (Francavilla, 1994).

Im Jahr 1994 gelang es Hagiya et al. die Aminosäuresequenz sowie die cDNA-Sequenz von ALR aus Ratten zu entschlüsseln (Hagiya, 1994). Kurz darauf entschlüsselten Giorda et al. die cDNA-Sequenz von humanem ALR (Giorda, 1996) und Yang et al. zeigten, dass das humane HPO, welches aus humaner fetaler Leber isoliert worden war, ein Homolog des humanen ALR ist (Yang, 1997).

ALR gehört zusammen mit dem *Saccharomyces cerevisiae* Homolog Erv1p (Lisowsky, 1992) zu einer neuen ALR/Erv1p Proteinfamilie. Die Proteine aus dieser Familie werden in niederen Eukaryonten z.B. der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und höheren Eukaryonten z.B. Mäusen, Ratten und Menschen sowie auch in einigen doppelsträngigen DNA-Viren exprimiert (Polimeno, 1999) und weisen eine hohe Homologie auf. So ist das Protein aus der Maus und dem Menschen zu 42% identisch mit jenem aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Lisowsky, 1995).

Als einzige funktionelle Domäne besitzen die Mitglieder der ALR/Erv1p Proteinfamilie an ihrem C-Terminus ein CXXC Motiv. Dieses Motiv ist charakteristisch für Proteine mit einer Sulfohydryloxidase-Aktivität (Lisowsky, 2001). In der Nachbarschaft dieser funktionellen Domäne befindet sich zusätzlich ein nicht kovalent gebundenes FAD-Molekül, welches kennzeichnend ist für Thioredoxin-ähnliche Proteine (Wu, 2003).

Durch diesen Aufbau scheint es ALR möglich zu sein, sowohl das Erstellen von Disulfidbindungen in einer Reihe von Proteinen zu regulieren (Lisowsky, 1992) (Lisowsky, 2001) als auch eine Rolle bei der Reifung und dem Export von zytosolischen Eisen-Schwefel-Klusterproteinen zu spielen (Lange, 2001).

Das zugehörige Gen für ALR befindet sich im menschlichen Genom auf dem Chromosom 16 und es konnte gezeigt werden, dass ALR in allen Zellen des Körpers exprimiert wird, so z.B. auch in den Nieren und im Gehirn (Lisowsky, 1995). Während in vielen Zellen des Körpers und in zahlreichen unterschiedlichen Gewebearten von Ratten (Hagiya, 1994) (Klissenbauer, 2002) und Mäusen (Gordia, 1996) ALR nur in geringem Maße exprimiert ist, findet man es in großer Menge im Hoden und besonders in der Leber (Hagiya, 1994) (Klissenbauer, 2002) (Gordia, 1996).

ALR kommt in den Geweben in unterschiedlichen Splice-Varianten vor (Francavilla, 1994) (Li Y, 2002). Das längere Protein mit 205 Aminosäuren ist hauptsächlich im Intermitochondrienraum lokalisiert und enthält eine N-terminale Sequenz, die es dem Protein zu ermöglichen scheint, in den intermitochondrialen Membranbereich transportiert zu werden (Polimeno, 1999). Dort spielt es eine Rolle bei der Biogenese der zytosolischen Fe/S Clusterproteine (Lange, 2001) und beim Import von Peptiden ins Innere der Mitochondrien. Für das kürzere Protein mit 125 Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass es nach einer partiellen Hepatektomie in vivo und im Rahmen einer Leberregeneration in der Leber vermehrt exprimiert wird (Francavilla, 1994) (Gandhi, 1999) (Wang, 1999).

Wie bereits erwähnt, wurde ALR ursprünglich als ein hepatotropher Faktor identifiziert, der spezifisch in vivo die Leberregeneration nach einer partiellen Hemihepatektomie stimuliert (Francavilla, 1994). Dabei korrelieren die Serumspiegel von ALR mit der Größe der Hemihepatektomie (Gandhi, 1999).

Auch bei in vitro Untersuchungen konnte durch die Gabe von rekombinantem ALR ein proliferativer Effekt sowohl an primären Hepatozyten als auch an Hepatomzellen (HepG2) nachgewiesen werden (Li Y, 2001) (Thasler, 2006). Zusätzlich wird ALR auch ein protektiver Effekt auf Hepatozyten zugeschrieben, die durch chemische Noxen geschädigt wurden (Theocharis, 1998).

Weiterhin konnte im Gegensatz zum Normalgewebe in humanem zirrhotischen Lebergewebe eine vermehrte ALR Expression nachgewiesen werden (Thasler, 2005). In Rattenlebern führt ALR zu einer Inhibition der TIMP-1-Expression sowie zu einer verminderten Bildung von Kollagen Typ I und III. Dadurch scheint ALR einer

Fibrose und deren Übergang in eine Zirrhose entgegenzuwirken (Li Q, 2005) (Zhang, 1996). Eine erhöhte ALR-Expression wurde auch in Gewebeproben von Patienten mit hepatozellulärem und cholangiozellulärem Karzinom nachgewiesen (Thasler, 2005).

Im Jahre 1999 gelang es Wang et al. erstmals einen Rezeptor für ALR auf Hepatozyten zu identifizieren. Da in kompetitiven Bindungsassays von ALR mit EGF, TGF- $\alpha$  und Insulin ALR nicht von seinem Rezeptor verdrängt werden konnte, schloss man daraus, dass der Rezeptor für ALR spezifisch ist und sich von den Rezeptoren für EGF (epidermal growth factor), TGF- $\alpha$  (transformation growth factor  $\alpha$ ) und Insulin unterscheidet (Wang, 1999). Bei der Bindung von ALR an diesen postulierten Rezeptor wird der EGF-Rezeptor unabhängig von der EGF-Bindung und der EGF-R-Kinase-Aktivität phosphoryliert und damit aktiviert. Dadurch werden zusätzlich sowohl die MAPK (mitogen activated protein kinase/ERK1/2) als auch die MEK (MAPKK/extracellular signal-regulated kinase) als weitere Bestandteile der EGF-Signalkaskade aktiviert (Li Y, 2000). Im Zuge der Aktivierung des EGF-Signalweges werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren exprimiert, welche ihrerseits zu einer verstärkten Transkription führen.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte auch ein spezifischer Rezeptor für ALR auf Kupffer-Zellen nachgewiesen werden, welcher an das cholerasensitive G-Protein gekoppelt ist und somit zur G-Proteinfamilie gehört (Ghandi, 2010).

Es konnte zudem durch Ghandi et al. gezeigt werden, dass über die Aktivierung dieses Rezeptors die NO, TNF- $\alpha$ , und Interleukin-6 Synthese stimuliert wird. Von diesen Molekülen wiederum ist bekannt, dass sie die Leberregeneration fördern (Michalopoulos, 1997).

Im Gegensatz dazu vermittelt intrazelluläres ALR sein Signal durch die Bindung und Aktivierung von JAB-1 (jun activation domain-binding-protein), was die Aktivierung des Transkriptionskomplexes AP-1 zur Folge hat. Die AP-1-Aktivierung ist dabei durch eine c-Jun-Aktivierung vermittelt und unabhängig davon, ob zuvor JNK (c-Jun N-terminale Kinase) phosphoryliert wurde (Lu, 2002).

Eine weitere interessante Fähigkeit von ALR ist die Inhibierung der lytischen Aktivität von leberresidenten NK-Zellen, indem es die Interferon- $\gamma$ -Expression supprimiert (Vujanovic, 1995) (Tanigawa, 2000). Dies könnte eine zusätzliche, proliferierende Wirkung im Prozess der Leberregeneration bewirken.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ALR auch einen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Leber besitzt. Dabei stellte man fest, dass mit steigenden ALR-Werten, wie im Rahmen einer Leberregeneration und im Rahmen einiger Lebererkrankungen beobachtet, Cytochrom-P450-Isoenzyme in ihrer Aktivität und Expression reduziert werden (Thasler, 2006).

Diese bisherigen Erkenntnisse zeigen, dass ALR proliferationsunterstützende Eigenschaften aufweist und pathophysiologisch relevante Signalwege induzieren kann. ALR scheint weiterhin nicht nur im Rahmen der Leberregeneration von Bedeutung zu sein, sondern auch im Prozess der Zirrhoseentstehung sowie möglicherweise auch in der HCC-Entstehung eine wichtige Rolle zu spielen.

#### **1.4 Zielsetzung**

Das Hepatozelluläre Karzinom zählt weltweit zu einem der am häufigsten vorkommenden malignen Tumore. Auch in der westlichen Welt gewinnt es aufgrund einer steigenden Inzidenz in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Wichtige Schritte und Faktoren in der Karzinogenese des HCC sind bereits bekannt.

ALR könnte ein weiterer wichtiger Faktor in der Entwicklung eines HCC sein, da es nicht nur - wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt - in der gesunden Leber exprimiert wird, sondern auch in zirrhotischem Lebergewebe und im HCC.

Ziel dieser Arbeit ist es:

1. die Expression von ALR im HCC an einer größeren Fallzahl zu untersuchen
2. die Expression von ALR im HCC mit der ALR-Expression in gesundem Lebergewebe und in der Leberzirrhose zu vergleichen
3. die Expression von ALR im HCC mit histomorphologischen, laborchemischen, klinischen Daten und Überlebensdaten zu korrelieren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Gewebe und klinische Daten**

#### **2.1.1 Gewebearray: "Tissue-micro-array" (TMA)**

Der Gewebearray „HCC“ wurde vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg in Zusammenarbeit mit mehreren europäischen pathologischen Instituten erstellt. Neben Regensburg zählte zu den Instituten Basel, Mailand und Turin.

Ziel dieser Kooperation ist es, eine große Anzahl von hepatozellulären Karzinomen für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung zu haben. Der Vorteil eines Gewebearrays ist hierbei, dass sich eine große Anzahl von Geweben auf einem Objektträger befinden und somit die jeweilige Immunhistochemie an allen diesen Geweben mit einem Färbegang durchgeführt werden kann.

Auf dem untersuchten Gewebearray befanden sich Proben von 233 HCCs, 163 Zirrhosen und 18 Proben von normalem Lebergewebe.

Zu den auf dem TMA befindlichen Proben wurden Daten erhoben. Bei den HCC-, Zirrhose- und Normalgewebe-Proben sind jeweils Alter und Geschlecht, für die Zirrhose- und HCC-Proben ist zusätzlich die Ätiologie der Erkrankung angegeben. Weiterhin wurden für die HCC-Proben Angaben zu Tumorgröße, Grading, Angioinvasion und zum TNM- System gemacht.

#### **2.1.2 HTCR-Gewebebank (Human Tissue and Cell Research)**

Weiteres Probenmaterial für die immunhistochemischen Untersuchungen konnte von der Gewebebank der Stiftung HTCR bereitgestellt werden.

Aus der HTCR-Gewebebank wurden retrospektiv 64 Patienten ausgewählt, die im Zeitraum von März 2000 bis August 2005 an der Universitätsklinik Regensburg in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie aufgrund eines Lebertumors operiert worden waren und von denen sowohl klinische Daten als auch Gewebe vorhanden waren.

Darunter befanden sich 53 Patienten mit einem hepatozellulärem Karzinom, 3 Patienten mit einer Leberzirrhose und 8 Patienten mit normalem Lebergewebe (kolorektale Metastasen Chirurgie)

Die jeweilige Diagnosestellung sowie bei den hepatozellulären Karzinomen das Grading und die TNM-Angabe wurden vom Institut für Pathologie der Universität Regensburg im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt.

Die klinischen Daten wurden aus den Patientenakten und den den Gewebeproben zugrunde liegenden Daten der Gewebebank zusammengestellt. Die histopathologischen Daten der HCCs wie Grading, TNM, Tumorgröße, Tumorart und Ergebnisse von einer eventuell durchgeführten immunhistochemischen Markeranalyse wurden mit Hilfe der histopathologischen Befunde und der Patientenakten ermittelt.

Nachdem die Daten dieser 64 Patienten, so weit vorhanden, vervollständigt worden waren, wurde das entsprechende Gewebe aus dem Archiv der Pathologie ausgewählt. Die Diagnose (Zirrhose, Normalgewebe, HCC) wurde anschließend nochmals von einem Pathologen bestätigt sowie ein repräsentativer Gewebekblock ausgewählt.

Von 16 dieser HCCs konnte zusätzlich auch den Tumor umgebendes Normalgewebe beurteilt werden sowie von weiteren 25 HCCs den Tumor umgebendes zirrhotisches Gewebe.

Insgesamt standen damit 53 HCCs, 28 Zirrhosen und 24 Normalgewebe zur immunhistochemischen Analyse der ALR-Expression zur Verfügung.

## 2.2 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich zelluläre Antigene nachweisen. In diesem Fall erfolgte die immunhistochemische Färbung mit der APAAP-Methode (**A**lkalische **P**hosphatase-**A**nti-**A**lkalische **P**hosphatase).

Der APAAP-Komplex besteht aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, welche spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind.

Bei der Durchführung der APAAP-Methode (Abb. 5) wird als erstes ein Primärantikörper (zumeist aus der Maus stammend) auf den histologischen Gewebeschnitt gegeben, der an das entsprechende Antigen im Gewebe bindet.

Anschließend wird ein Brückenantikörper (polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-IgG) zugegeben, der an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet. Nun wird der APAAP-Komplex (monoklonaler Maus-IgG) zugegeben, der wiederum an den Brückenantikörper bindet.

Damit der Brückenantikörper nicht mit beiden Fab-Regionen am Primärantikörper bindet, wird er im Überschuss zugegeben. So ist garantiert, dass einige Fab-Regionen des Brückenantikörpers zur Bindung der APAAP-Komplexe frei bleiben.

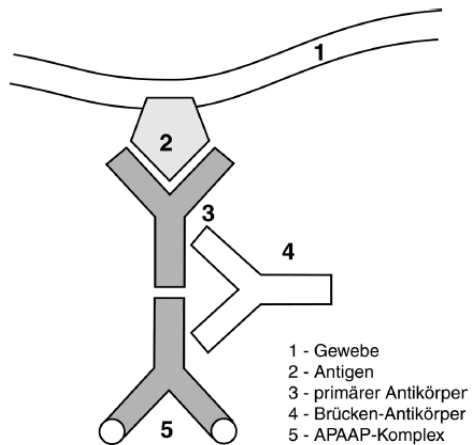


Abb. 5: Schematische Darstellung der APAAP-Methode

Um die Antikörperbindung in Form einer Farbreaktion sichtbar zu machen, wird die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes mit einem Substrat (Naphtol) und einem Chromogen unter Bildung eines roten Farbstoffs umgesetzt. Die endogene Alkalische-Phosphatase-Aktivität kann dabei durch Levamisol blockiert werden.

Wird hingegen ein Primärantikörper aus dem Kaninchen verwendet, wie bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode, muss ein zusätzlicher Schritt mit einem Maus-anti-Kaninchenantikörper eingefügt werden, damit der Brückenantikörper, der wie der APAAP-Komplex auch aus der Maus stammt, binden kann.

### 2.2.1 Erstellen und Vorbereiten der Schnitte für die immunhistochemische Färbung

Aus jedem der ausgewählten Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom mindestens 4 Schnitte mit einer Dicke von  $2\mu\text{m}$  angefertigt. Um eine günstige Konsistenz für den Zuschnitt zu erhalten, wurden die Blöcke zuvor auf einer Kälteplatte gekühlt.

Die hergestellten Schnitte wurden anschließend in ein Wasserbad mit  $30\text{-}35^\circ\text{C}$  überführt, um sie zu strecken, und schließlich auf Objektträger (Super Frost™, G. Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen.

Im Folgenden wurden die Schnitte für mindestens 20 min in einen Wärmeschrank mit  $65^\circ\text{C}$  zum Trocknen gestellt, um ein späteres Ablösen der Schnitte während des Entparaffinierens und der immunhistochemischen Färbung zu verhindern. In diesem Zustand konnten die Schnitte bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

Der in Paraffin eingebettete Gewebearray wurde bereits vom Institut für Pathologie geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Für die Immunhistochemie

stand jeweils ein Schnitt des Arrayblockes für den ALR-Nachweis und für die Negativkontrolle zur Verfügung.

Vor dem Beginn der Immunhistochemie mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden die Schnitte für zweimal 10 min in Xylol gegeben, der Schnitt des Gewebearrays für zweimal 30 min. Anschließend wurden die Schnitte von den Paraffinblöcken und der Arrayschnitt erneut gleich behandelt. Zur Entfernung des Xylols musste eine absteigende Alkoholreihe von den Schnitten durchlaufen werden (Tab. 6).

Tab. 6: Absteigende Alkoholreihe

100% Ethanol	10 min
96% Ethanol	10 min
90% Ethanol	10 min
80% Ethanol	10 min
70% Ethanol	10 min
aqua dest.	10 min

Im Anschluss an das Entparaffinieren und im Anschluss an die Alkoholreihe musste eine Antigendemaskierung an den Gewebeschnitten durchgeführt werden, da es bei der Fixierung des Gewebes, meist mit Formalin, zu einer Änderung der Tertiärstruktur des Antigens kommen kann.

Die durch das Fixieren entstandene Konformationsänderung führt entweder zu einer chemischen Quervernetzung im Protein, zu so genannten intramolekularen cross-links, oder aber zu Quervernetzungen zwischen verschiedenen Proteinen, so genannten intermolekularen cross-links. Diesen Prozess bezeichnet man als Antigenmaskierung oder besser Maskierung des Epitops, da ein Antigen aus einem oder mehreren Epitopen besteht. Folge der Antigenmaskierung ist ein partieller oder vollständiger Verlust der Immunreaktion.

Die für das Gelingen der Immunhistochemie notwendige Demaskierung kann entweder durch Enzyme oder durch Hitzeeinwirkung erfolgen.

Für die enzymatische Antigendemaskierung stehen dabei verschiedene Enzyme wie Neuraminidase, Proteinase, Pronase, Pepsin und Trypsin zur Verfügung. Die Hitzedemaskierung kann in der Mikrowelle, im Autoklaven oder im Schnellkochtopf durchgeführt werden. Auch können beide Methoden kombiniert werden. Die

verschiedenen Methoden sollten dabei für jeden Antikörper individuell getestet werden, um die jeweils am besten geeignete Methode zu ermitteln.

Die Antigenmaskierung wurde an den Paraffinschnitten sowie am Schnitt des Gewebearrays mit Proteinase K (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) durchgeführt.

Nach Umrandung der Schnitte mit Dako-Fettstift (DAKO, Hamburg, Deutschland) wurde in 50mM Tris-Puffer (pH 7.5) 1:4 verdünnte Proteinase K auf die Schnitte aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann durch 5-minütiges Waschen in aqua dest. die Aktivität der Proteinase K gestoppt.

### **2.2.2 Durchführung der Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie wurde mit einem Dako Envison System (DAKO, Hamburg, Deutschland) an den Schnitten von den Paraffinblöcken und dem Schnitt des Gewebearrays nach demselben Protokoll durchgeführt.

Alle nun folgenden Schritte der Methode wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein humaner Antikörper gegen ALR verwendet, der selbst hergestellt wurde.

Vor dem Auftragen des Primärantikörpers wurde eine Blockierung mit humanem Serum an den Schnitten vorgenommen, um die Spezifität des ALR-Antikörpers zu erhöhen, indem durch die im Serum vorhandenen Antikörper Epitope blockiert werden, die der Aminosäuresequenz von ALR in Abschnitten ähnlich sind.

Nach dem Abpipettieren des Blockierserums wurde der Primärantikörper gegen ALR aus dem Kaninchen, der mit 3% Human Serum verdünnt in PBS (3% HS/PBS) 1:600 verdünnt wurde, aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte einmal mit PBS für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und alle weiteren Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Anschließend wurde als sekundärer Antikörper ein Maus-anti-Kaninchenantikörper (DAKO M0737, Hamburg, Deutschland) 1:50 in 3% HS/PBS verdünnt und auf die Proben aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 1 h. Wie bereits oben erklärt wurde, ist dieser Schritt notwendig, da der Primärantikörper aus dem Kaninchen stammt.

Bevor der Brückenantikörper aufgetragen werden konnte, musste erneut für 5 min mit PBS gewaschen werden. Als Brückenantikörper wurde ein Ig-Maus-Antikörper

aus dem Kaninchen (DAKO Z0259, Hamburg, Deutschland) verwendet. Dieser wurde in der Verdünnung 1:25 eingesetzt. Verdünnt wurde erneut mit 3% HS/PBS.

Nach erfolgter einstündiger Inkubation wurde wiederum für 5 min in PBS gewaschen. Nun konnte der APAAP-Komplex aus der Maus (DAKO D0651, Hamburg, Deutschland) in der Verdünnung 1:100 aufpipettiert werden. Nach der 30-minütigen Inkubation wurde erneut einmal mit PBS für 5 min gewaschen.

Die Färbung wurde vervollständigt durch das Inkubieren der Schnitte für 20 min mit Fast Red Chromogen (Roche 11496549001, Penzberg, Deutschland), das mit 2ml 0.1M Tris-Puffer (pH 8.2) verdünnt wird und nach 1-3 min über einen 0,2 µm Filter gefiltert wird. In dieser Chromogenlösung ist neben Naphtol und Chromogen auch Levamisol enthalten, das die endogene alkalische Phosphataseaktivität des Lebergewebes inhibiert.

Zuletzt wurden die Schnitte mit Mayer`s Hämatoxylin zur Kernfärbung gegengefärbt (Vektor H3404, Buringame, Kanada) und mit Aquatex (Merck 108562, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### **2.2.3 Erstellen von Negativkontrollen**

Negativkontrollen wurden sowohl an den Schnitten der Paraffinblöcke als auch an einem Arrayschnitt durchgeführt. Ziel hierbei war es, eine spezifische von einer unspezifischen Färbung zu unterscheiden.

Die Schnitte für die Negativkontrolle wurden auf dieselbe Weise wie die Positivproben geschnitten und entparaffiniert. Ebenfalls erfolgten die Antigendemaskierung und die Blockierung analog.

In der Immunhistochemie jedoch wurde der Primärantikörper durch einen IgG-Kaninchenantikörper (Sigma I5006, München, Deutschland) ersetzt.

Alle weiteren Schritte der immunhistochemischen Färbung wurden wiederum wie oben beschrieben durchgeführt.

### **2.2.4 Rezepturen für benötigte Puffer und Lösungen**

50 mM Tris-HCl mit pH 7,5:

0,6057g/100ml Tris-HCl

pH 7,5 mit NaOH einstellen

0,1 M Tris-HCl mit pH 8,2:  
1,2114g/100ml Tris-HCl  
pH 8,2 mit NaOH einstellen

PBS:

8g NaCl

0,2g KCl

1,44 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

in 800ml aqua dest. lösen, pH auf 7,4 einstellen und dann auf 1l auffüllen

3% Human Serum, verdünnt mit PBS:

Human Serum bei 56°C 30 min inaktivieren, danach in PBS verdünnen

### 2.2.5 Reagenzien, Materialien und Geräte

Tab. 7: Antikörper

Maus-anti-Kaninchenantikörper	DAKO M0737, Hamburg, Deutschland
Ig-Maus-Antikörper aus dem Kaninchen	DAKO Z0259, Hamburg, Deutschland
APAAP-Komplex aus der Maus	DAKO D0651, Hamburg, Deutschland
IgG-Kaninchenantikörper	Sigma Aldrich I5006, München, Deutschland

Tab. 8: Reagenzien

Xylol	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Proteinase K	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Fast Red Chromogen	Roche 11496549001, Penzberg, Deutschland
Mayer`s Hämatoxylin	Vektor H3404, Buringame, Kanada
Aquatex	Merck 108562, Darmstadt, Deutschland
Trishydroxyethylaminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tab. 9: Materialien und Geräte

Objektträger	Super Frost™, G. Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Dako- Fettstift	DAKO, Hamburg, Deutschland
0,2 µm Filter	Nalgene Labware, Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Eppendorf Cups	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop /-kamera	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Kühlplatte	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

### 2.3 Auswertung des Färbeergebnisses der Immunhistochemie

Die von der Alkalischen Phosphatase (APAAP- Komplex) katalysierte Farbreaktion ergibt an der Position des vom Antikörper erkannten Zielantigens einen roten Farbniederschlag. Zellkerne werden von der Hämatoxylin-Gegenfärbung blau angefärbt.

Die Auswertung des immunhistochemischen Färbeergebnisses der Gewebeschnitte und des Arrays erfolgte durch einen Pathologen.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Anfärbung wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Färbung wurde als spezifisch angesehen, wenn die parallel durchgeführte Negativkontrolle keinen roten Farbniederschlag zeigte.

Als positiv wurden die Schnitte beurteilt, wenn eine rote zytoplasmatische Färbung der Zellen vorlag. Zum einen wurde die Intensität der Färbung, zum anderen die Anzahl der angefärbten Zellen quantitativ durch einen Pathologen ausgewertet.

Die Intensität der Färbung wurde mittels eines Scores in vier Gruppen eingeteilt. Keine rote Anfärbung entspricht dabei der Intensität 0 bzw. negativ (-), schwache Anfärbung der Zellen der Intensität 1 bzw. positiv (+), mäßige Färbung der Intensität 2 bzw. stark positiv (++) und starke Anfärbung der Intensität 3 bzw. sehr stark positiv (+++) (Tab. 10).

Tab. 10: Score für die Farbeintensität

Score	Färbeintensität
0 / -	keine immunhistochemische Färbung
1 / +	schwache immunhistochemische Färbung
2 / ++	mäßige immunhistochemische Färbung
3 / +++	starke immunhistochemische Färbung

Die Anzahl der positiven Zellen wurde von 0% bis 100 % angegeben und daraus fünf Gruppen gebildet (Tab. 11). Bei einer Anzahl von <10% der angefärbten Zellen wurde die Anfärbung als negativ gewertet.

Tab. 11: Score für die Anzahl der angefärbten Zellen

Score	Anzahl der angefärbten Zellen in %
0	<10%
1	10-25%
2	>25-50%
3	>50-75%
4	>75%

## 2.4 Statistische Methoden

Der statistische Vergleich der 3 Gruppen (HCC, Normalgewebe und Zirrhose) erfolgte durch den ungepaarten, nichtparametrischen Mann-Whitney-Test bei ungepaarten Gruppen, bei gepaarten Gruppen mittels dem gepaarten, nichtparametrischen Wilcoxon-Test.

Innerhalb der Gruppe der HCCs erfolgte der Vergleich der Gruppen durch den Chi-Quadrat-Test nach Pearson.

Die statistische Auswertung der Überlebensdaten und des rezidivfreien Überlebens erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurven.

Alle angegebenen p-Werte sind Ergebnisse zweiseitiger Tests. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bei einem p-Wert kleiner 0,05 angesehen.

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Software SPSS (SPSS Science Chicago).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Lokalisation der ALR-Expression im Lebergewebe

Zunächst erfolgte die Auswertung der parallel durchgeführten Negativkontrollen. Alle Negativkontrollen zeigten keine rote Anfärbung (Abb. 6), womit die rote Anfärbung als spezifisch für die ALR-Expression angesehen werden konnte (Abb. 7) und somit alle Schnitte ausgewertet werden konnten.

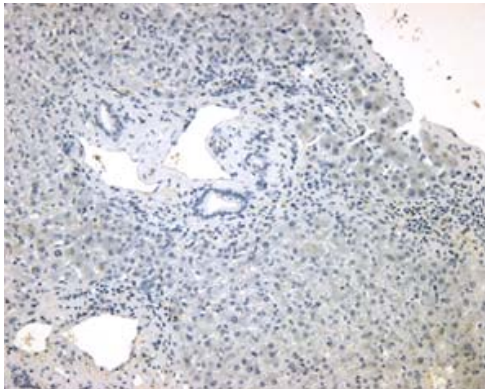


Abb. 6: Immunhistochemie mit einem humanen IgG-Kaninchenantikörper als Primärantikörper als Negativkontrolle im HCC

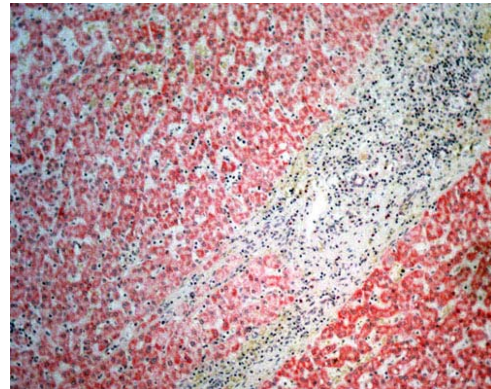


Abb. 7: Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen ALR als Primärantikörper in der Zirrhose

In den Gewebeproben, in denen ALR exprimiert war, konnte ALR durch die Immunhistochemie im Zytoplasma von Hepatozyten im Normalgewebe, Zirrhose und den Zellen des HCC in Form roter Granula nachgewiesen werden (Abb. 8, Abb. 9). Positiv für ALR zeigten sich auch Gallengangszellen in den Portalfeldern (Abb. 9). Keine Färbung und damit kein Nachweis von ALR fand sich in nichtparenchymalen Leberzellen (Kupfer-Zellen, Stern`sche Zellen).

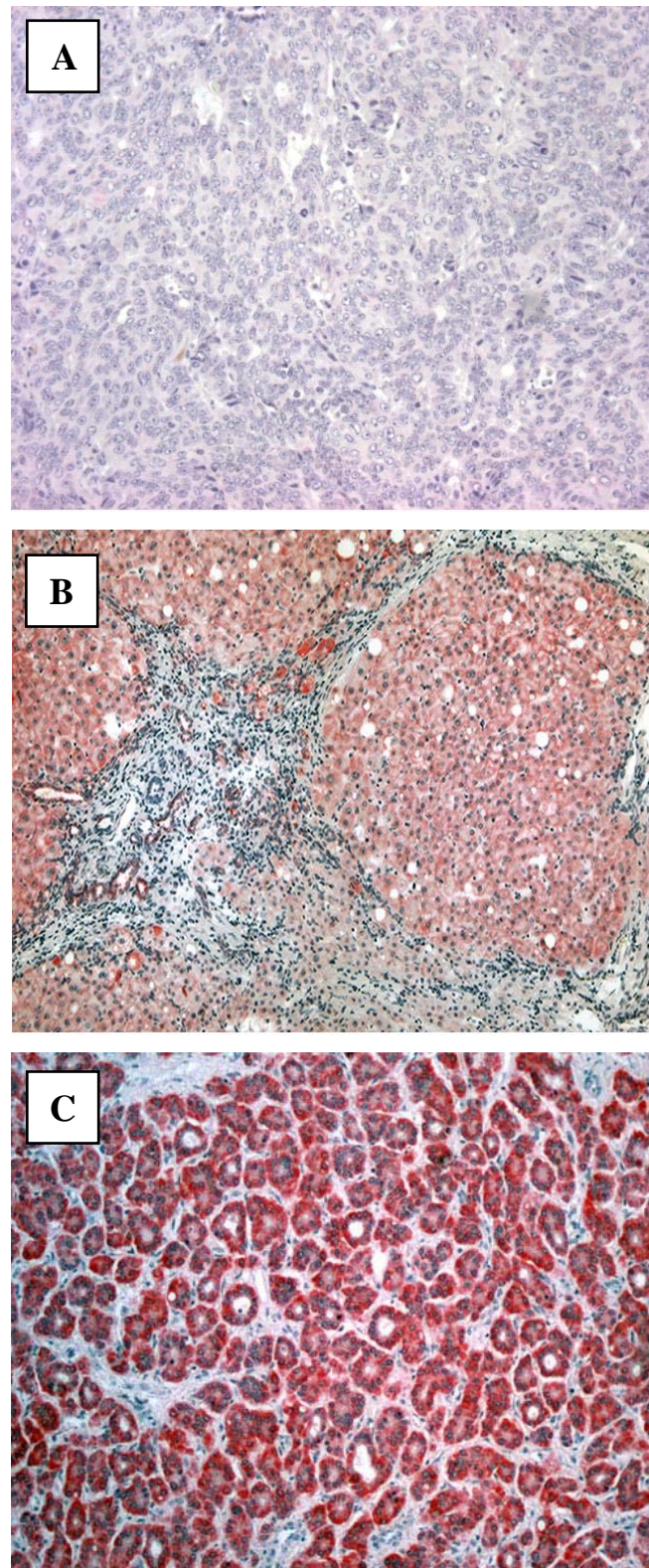


Abb. 8: ALR Expression in normalem und zirrhotischem Lebergewebe und im HCC: es zeigt sich eine schwache Färbung der Hepatozyten im normalem Lebergewebe (A) und eine starke Färbung der Hepatozyten in den regenerativen Knoten in zirrhotischem Lebergewebe (B) sowie der Zellen im HCC (C), ALR-Expression findet sich in Form roter Granula im Zytoplasma von Hepatozyten (B) und Zellen des HCC (C), jedoch in zirrhotischem Lebergewebe auch in den Cholangiozyten des Periportalfeldes (B).

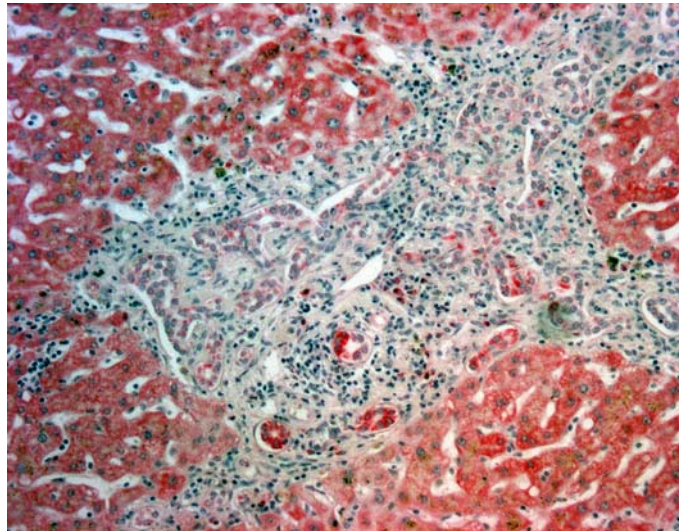


Abb. 9: ALR-Immunfärbung in Cholangiozyten des Periportalfeldes in zirrhotischem Lebergewebe.

### **3.2 Immunhistochemische Untersuchung der ALR-Expression im Lebergewebe**

Tissue micro array (TMA):

Bei der Auswertung des Gewebearrays (TMA) zeigte sich, dass sehr viele Gewebeproben bezüglich der ALR-Expression nicht bewertet werden konnten, da entweder kein Leberparenchym vorhanden war oder dieses nicht vital war. So konnten von den 233 HCC des Arrays nur 139 (60%), von den 163 Zirrhosen nur 65 (40%) beurteilt werden. Die 18 Normalgewebeproben konnten alle beurteilt werden.

Im Weiteren zeigte sich auch, dass sehr viele der auswertbaren Gewebeproben keine Anfärbung zeigten, also negativ waren. Von den verbliebenen 139 HCCs waren 70 (50%), von den 65 Zirrhosen 50 (77%) und von den 18 normalen Leberproben 16 (89%) negativ.

In einer Studie mit geringeren Fallzahlen waren jedoch die Zirrhosen und HCCs immer positiv gewesen, so dass sich der Verdacht aufdrängte, dass die Ergebnisse falsch negativ sein könnten. Deshalb und vor allem auch wegen der Unvollständigkeit der klinischen Daten erfolgte keine weitere Auswertung des Arrays, da nachfolgende Korrelationsstudien nicht hätten durchgeführt werden können.

HTCR-Gewebebank:

Die Gewebeschnitte aus der HTCR-Gewebebank konnten alle ausgewertet werden. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse stammen daher aus der Auswertung dieser Gewebeschnitte und der dazu vorliegenden histomorphologischen, laborschemischen und klinischen Daten.

### 3.2.1 Deskriptive Auswertung

Normalgewebe:

Das mittlere Alter der Patienten, von denen Normalgewebe untersucht wurde, betrug 66,4 Jahre, der älteste Patient war 79, der jüngste Patient 35 Jahre alt. Von den 28 Normalgewebeproben stammten 18 von Männern und 6 von Frauen.

Zirrhose:

Das mittlere Alter der Patienten mit einer Leberzirrhose betrug 64 Jahre. Der älteste Patient war 79, der jüngste Patient war 35 Jahre alt. Die Leberzirrhosen stammten von 26 männlichen und 2 weiblichen Patienten.

Bezüglich der Ätiologie der Zirrhose zeigte sich, dass von den 28 Patienten drei eine chronische Hepatitis-B-Infektion hatten. Ein Patient litt unter einer Hepatitis-C-Infektion und bei 11 Patienten lag ein erhöhter Alkoholkonsum (>60 g Ethanol pro Tag) vor.

HCC:

Das mittlere Alter bei den HCC-Patienten betrug 61,4 Jahre. Der älteste Patient war 79 und der jüngste 35 Jahre alt. 21 Patienten waren jünger als 60 Jahre, 32 Patienten 60 oder älter als 60 Jahre.

Bei der Geschlechtsverteilung ergab sich ein Verhältnis von 46 Männern zu 7 Frauen.

Eine Hepatitis-B-Infektion bestand bei 7 Patienten, eine Hepatitis-C-Infektion bei 3 und ein chronischer Alkoholabusus bei 17 Patienten.

Bei der histomorphologischen Tumorcharakterisierung ergab sich, dass 5 der Tumore im Stadium T1, 12 im Stadium T2, 16 im Stadium T3 und 1 im Stadium T4 waren. Bei den übrigen 19 Tumoren gab es keine Angabe zum Tumorstadium.

Bei weiteren 19 Tumoren lag eine Angioinvasion vor, bei 21 fehlte eine Angabe hierzu. Bei den übrigen 13 Tumoren lag keine Gefäßinvasion durch den Tumor vor.

Die Auswertung bezüglich des Gradings ergab: 11 Tumore mit G1, 26 mit G2, 8 mit G3 und kein Tumor mit dem Grading G4. Bei 8 HCCs gab es keine Angabe zum Grading.

Die Tumorgöße wurde mit  $<5\text{cm}$  und  $\geq 5\text{cm}$  angegeben, so dass 19 der HCCs  $<5\text{cm}$  waren und 20 HCCs  $\geq 5\text{cm}$ .

Die Angaben zum N- und M-Status sowie zur Lymphangiosis waren zu unvollständig, so dass keine Auswertung vorgenommen werden konnte.

Bei 22 HCCs zeigte sich eine Ki-67-Expression  $\leq 5\%$ , bei 19 HCCs lag eine Expression  $>5\%$  vor und bei 12 HCCs fehlte eine Angabe der Ki-67-Expression.

5 HCCs zeigten eine histologische Leberzellverfettung, 47 zeigten keine histologische Leberzellverfettung und bei 1 HCC fehlte eine Angabe hierzu.

Von 43 der 53 HCC Patienten konnten Überlebensdaten (Beobachtungszeitraum 60 Monate nach Tumorresektion) ermittelt werden. 26 dieser 43 Patienten verstarben innerhalb von 5 Jahren nach Tumorresektion, 17 Patienten lebten mehr als 60 Monate nach Tumorresektion. 16 dieser Patienten verstarben am HCC, bei 10 Patienten lag eine andere Todesursache vor.

Von 41 der 53 Patienten konnte zudem das rezidivfreie Überleben (Beobachtungszeitraum 60 Monate nach Tumorresektion) ermittelt werden. 27 Patienten entwickelten ein Tumorrezidiv innerhalb 60 Monate nach Tumorresektion, lediglich 14 Patienten zeigten ein rezidivfreies Überleben.

Bezüglich der weiteren deskriptiv ausgewerteten Parameter siehe Tabelle 12 und 13. Von 16 HCC-Patienten konnte die ALR-Expression im Vergleich zu umgebendem Normalgewebe beurteilt werden, bei weiteren 28 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom stand den Tumor umgebendes zirrhotisches Gewebe zur Auswertung zur Verfügung.

Tab. 12: Deskriptive Auswertung klinischer Daten

		Anzahl
ASA	Normaler, gesunder Patient	5
	Patient mit leichter Allgemeinerkrankung	28
	Patient mit schwerer Allgemeinerkrankung	19
	Patient mit lebensbedrohlicher Allgemeinerkr.	1
Gesamt		53
Body Mass Index	< 25 Normalgewicht	16
	> 25 - 30 Übergewicht	26
	> 30 Adipositas	10
Gesamt		52
Nikotinkonsum	ja	14
	nein	32
Gesamt		46
Diabetes mellitus	ja	16
	nein	32
Gesamt		48
Hypercholesterinämie	ja	6
	nein	41
Gesamt		47
Hypertonus	ja	19
	nein	29
Gesamt		48

Tab. 13: Deskriptive Auswertung der Laborparameter

		Anzahl
Alkalische Phosphatase	< 124 U/l	22
	≥ 124 U/l	19
Gesamt		41
Bilirubin	< 1 mg/dl	30
	≥ 1 mg /dl	16
Gesamt		46
GOT	< 50 U/l	27
	≥ 50 U/l	17
Gesamt		44
GPT	< 50 U/l	28
	≥ 50 U/l	18
Gesamt		46
GGT	< 70 U/l	10
	≥ 70 U/l	23
Gesamt		33
Cholinesterase	< 4,5 kU/l	15
	≥ 4,5 kU/l	22
Gesamt		37
Quick	< 70 %	6
	≥ 70 %	39
Gesamt		45
PTT	< 36 sec	30
	≥ 36 sec	15
Gesamt		45
AFP	< 10 ng/ml	17
	≥ 10 – 500 ng/ml	16
	≥ 500 ng/ml	7
Gesamt		40

### 3.2.2 Auswertung der ALR-Expression in normalem Lebergewebe, in der Leberzirrhose und im HCC

In jedem der 53 untersuchten HCC konnte eine spezifische Anfärbung und damit ALR-Expression nachgewiesen werden.

16 (30,2%) der 53 HCCs waren positiv (Intensität 1/+), 15 (28,3%) stark positiv (Intensität 2/++) und 33 (62,3%) sehr stark positiv (Intensität 3/+++) (Abb. 10).

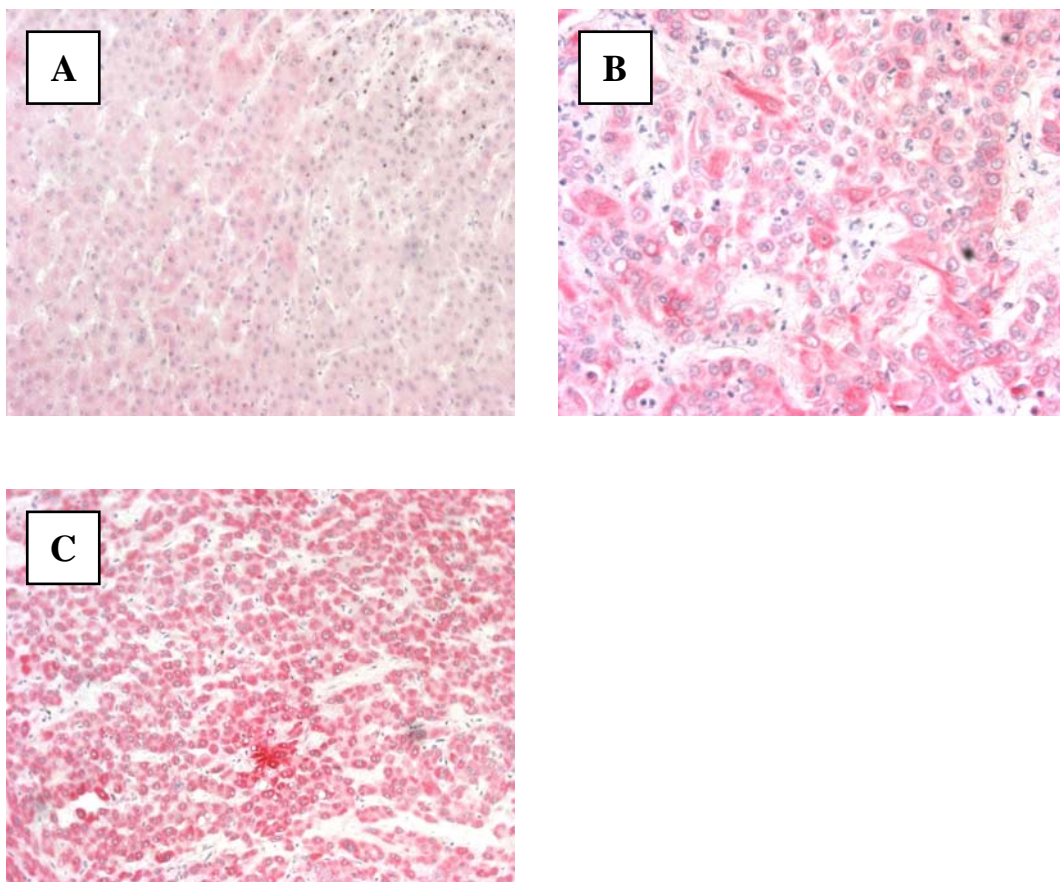


Abb. 10: Unterschiedliche Intensität der Färbung im HCC: positiv (Intensität 1/+) (A), stark positiv (Intensität 2/++) (B) und sehr stark positiv (Intensität 3/+++) (C).

Bezüglich der Anzahl positiver Zellen in % ergab sich folgende Verteilung bei den untersuchten HCCs (Tab. 14).

Tab. 14: Verteilung der Anzahl ALR-positiver Zellen in % im HCC

Anzahl der angefärbten Zellen in %:	Score	Anzahl der HCCs
<10%	0	0
10-25%	1	5
>25-50%	2	18
>50-75%	3	16
>75%	4	14

In jeder der 28 zirrhotischen Lebergewebeproben, die untersucht wurden, konnte eine spezifische Anfärbung und damit ALR nachgewiesen werden.

15 der Zirrhoseproben waren positiv (Intensität 1/+), 10 stark positiv (Intensität 2/++) und 3 sehr stark positiv (Intensität 3/+++) für ALR.

Bezüglich der Anzahl positiver Zellen in % ergab sich folgende Verteilung bei den untersuchten zirrhotischen Leberproben (Tab. 15).

Tab. 15: Verteilung der Anzahl ALR-positiver Zellen in % bei den zirrhotischen Leberproben

Anzahl der angefärbten Zellen in %:	Score	Anzahl der zirrhotischen Leberproben
<10%	0	0
10-25%	1	2
>25-50%	2	9
>50-75%	3	4
>75%	4	13

Von den 24 untersuchten normalen Lebergewebeproben waren hingegen 10 (41,7%) negativ (Intensität 0), 11 (45,8%) positiv (Intensität 1/+) und 3 (12,5%) stark positiv (Intensität 2/++). Kein untersuchtes Normalgewebe zeigte eine sehr starke Anfärbung (Intensität 3/+++).

Bezüglich der Anzahl positiver Zellen in % ergab sich folgende Verteilung bei den untersuchten Normalgewebeproben (Tab. 16).

Tab. 16: Verteilung der Anzahl positiver Zellen in % bei den Normalgewebeproben

Anzahl der angefärbten Zellen in %:	Score	Anzahl der normalen Leberproben
<10%	0	10
10-25%	1	3
>25-50%	2	4
>50-75%	3	0
>75%	4	7

Die statistische Auswertung unter Anwendung des Mann-Whitney-Tests (ungepaarter Vergleich) ergab, dass die Intensität der Anfärbung von ALR und damit dessen Expression im HCC signifikant ( $p < 0,0001$ ) höher ist als im Normalgewebe.

Weiterhin zeigte sich, dass auch die Intensität der Anfärbung von ALR und dessen Expression in den zirrhotischen Gewebeproben signifikant ( $p < 0,0001$ ) höher ist als in den normalen Lebergewebeproben.

Zwischen der Intensität der Anfärbung von ALR in HCC und zirrhotischem Gewebe zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,008$ ).

Bezüglich der Anzahl der positiven Zellen ergab sich bei der weiteren statistischen Auswertung unter Anwendung des Mann-Whitney-Tests, dass in den HCCs ( $p < 0,008$ ) und in den zirrhotischen Lebergeweben ( $p < 0,003$ ) signifikant mehr Zellen ALR exprimieren als im Normalgewebe.

Zwischen der Anzahl der positiven Zellen im HCC und in den Zirrhoseproben ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Bei der Auswertung ausschließlich der gepaarten Proben konnten diese Ergebnisse teilweise bestätigt werden.

Hierbei ergab sich nach der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon-Test, dass die Intensität der Anfärbung von ALR im HCC signifikant höher ist als im umgebenden Normalgewebe ( $p = 0,001$ ) und in dem umgebenden zirrhotischen Gewebe ( $p = 0,003$ ).

Zwischen der Anzahl positiver Zellen im HCC und im umgebenden Normalgewebe bzw. zirrhotischem Gewebe ergab sich kein Unterschied.

Im Folgenden wurde am Beispiel eines Scoring-Systems aus einer Veröffentlichung von Nan et al. 2005 ein Gewebe-Label-Index als Scoring-System erstellt, das die

Intensität der Anfärbung und die Anzahl der angefärbten Zellen mit ALR gleichermaßen berücksichtigt.

Die bisherige Einteilung für Intensität und Anzahl der angefärbten Zellen wurde beibehalten. Anschließend wurden die jeweiligen Werte miteinander multipliziert, wobei sich Werte zwischen 0 und 12 ergaben. Diese wurden erneut klassifiziert, da ansonsten die Subgruppen für eine weitere statistische Auswertung zu klein gewesen wären. Hierbei ergaben sich 3 Gruppen: 0: negativ, 1-5: positiv, 6-12 stark positiv (Tab. 17).

Tab. 17: Gewebe-Label-Index

Score (Anzahl der angefärbte Zellen in %)	Intensität			
	0	1	2	3
0	0	0	0	0
1	0	1	2	3
2	0	2	4	6
3	0	3	6	9
4	0	4	8	12

Nach Anwendung des Gewebe-Label-Index ergab sich für die hepatozellulären Karzinome, Zirrhoseproben und Proben von normalem Lebergewebe folgende Verteilung (Tab. 18).

Tab. 18: Verteilung von HCC, Zirrhose und Normalgewebe im Gewebe-Label-Index

	Gewebe-Label-Index			$\Sigma$	p-Wert
	negativ	positiv	stark positiv		
HCC	0	23	30	53	p < 0,0001*
Zirrhose	0	18	10	28	p < 0,0001*
Normalgewebe	10	12	2	24	

\* verschieden von Normalgewebe

In der statistischen Auswertung ergab sich unter Anwendung des Mann-Whitney-Test, dass signifikant (p<0,0001) mehr ALR im HCC vorhanden ist als im Normalgewebe. Weiterhin zeigte sich, dass auch in den zirrhotischen Gewebeproben

signifikant ( $p < 0,0001$ ) mehr ALR zu finden ist als in den normalen Lebergewebeproben (Tab. 18). Kein Unterschied in der Expression von ALR fand sich in den HCCs und den zirrhotischen Gewebeproben ( $p = 0,76$ ) (Tab. 18).

Bei der Auswertung ausschließlich der gepaarten Proben konnten diese Ergebnisse mittels des Wilcoxon-Tests bestätigt werden.

### 3.2.3 Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zu histopathologischen Daten

Für die weitere statistische Auswertung der HCC-Daten wurde ausschließlich der Gewebe-Label-Index verwendet (Tab. 17).

Berechnet wurde mittels Kreuztabellen die Korrelation der ALR-Expression im HCC zur histologischen Angioinvasion (Tab. 19), zum Grading (Tab. 20), zum (p)T-Status (Tab. 21), zur Tumorgröße in cm (Tab. 22), zur Expression von Ki-67 (Tab. 23) und zur histologischen Leberverfettung (Tab. 24).

Bei der statistischen Auswertung der Angioinvasion zeigte sich, dass die ALR-Expression in jenen hepatozellulären Karzinomen, bei denen eine Angioinvasion vorhanden ist, signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger war als in jenen Tumoren, die nicht gefäßinvasiv waren (Tab. 19).

Tab. 19: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zur Angioinvasion

Histologische Angioinvasion	Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
	negativ	positiv	stark positiv		
nein	0	2	11	13	p < 0,001*
ja	0	14	5	19	
Gesamt	0	16	16	32	

\* nein verschieden zu ja

Bei der statistischen Auswertung des Tumorgradings zeigte sich, dass mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors, d.h. mit steigendem Grading signifikant ( $p = 0,013$ ) weniger ALR in den Tumorzellen nachweisbar war (Tab. 20).

Tab. 20: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zum Grading

Grading	Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
	negativ	positiv	stark positiv		
1	0	2	9	11	p = 0,013
2	0	14	12	26	
3	0	6	2	8	
Gesamt	0	22	23	45	

Bei der Auswertung des (p)T-Status (Tab. 21) und der Tumorgröße in cm (Tab. 22) ergab sich kein signifikanter Unterschied in der ALR-Expression.

Tab. 21: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zum (p)T-Status

(p)T-Status	Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
	negativ	positiv	stark positiv		
(p)T1	0	1	4	5	p = 0,744
(p)T2	0	9	3	12	
(p)T3	0	4	12	16	
(p)T4	0	1	0	1	
Gesamt	0	15	19	34	

Tab. 22: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zur Tumorgröße

Tumorgröße in cm	Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
	negativ	positiv	stark positiv		
< 5cm	0	11	8	19	p = 0,882
≥ 5cm	0	8	12	20	
Gesamt	0	19	20	39	

Weiterhin erfolgte eine Auswertung bezüglich der ALR-Expression und der Expression des histopathologischen Proliferationsmarkers Ki67 im HCC. Hierbei ergab sich ebenfalls kein signifikanter ( $p=0,904$ ) Unterschied (Tab. 23).

Tab. 23: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zur Expression von Ki67

Ki 67	Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
	negativ	positiv	stark positiv		
< 5 %	0	10	12	22	p = 0,904
≥ 5 %	0	9	10	19	
Gesamt	0	19	22	41	

Kein signifikantes ( $p=0,256$ ) Ergebnis ergab sich hinsichtlich der histologischen Leberverfettung und der Höhe der ALR-Expression (Tab. 24).

Tab. 24: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation zur histologischen Leberverfettung

Histologische Leberverfettung	Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
	negativ	positiv	stark positiv		
ja	0	1	4	5	p = 0,256
nein	0	22	25	47	
Gesamt	0	23	29	52	

### 3.2.4 Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit laborchemischen und klinischen Parametern

Bei der Auswertung der laborchemischen und klinischen Daten zeigte sich, dass bei HCC-Patienten mit Diabetes mellitus signifikant mehr ALR exprimiert war, als bei HCC-Patienten ohne Diabetes mellitus (Tab. 25). Weiterhin zeigten sich eine signifikant erhöhte ALR-Expression bei HCC-Patienten mit einem schlechten präoperativen ASA-Wert (Tab. 25). Bei der Auswertung von zahlreichen weiteren laborchemischen und klinischen Daten ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Die Daten wurden in den Tabellen 25 und 26 zusammengefasst.

Tab. 25: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit klinischen Parametern

		Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
		negativ	positiv	stark positiv		
Alter	< 60 Jahre	0	10	11	21	p = 0,619
	≥ 60 Jahre	0	13	19	32	
	Gesamt	0	23	30	53	
Geschlecht	männlich	0	19	27	46	p = 0,451
	weiblich	0	4	3	7	
	Gesamt	0	23	30	53	
Alkohol- konsum	ja	0	7	10	17	p = 0,494
	nein	0	15	14	29	
	Gesamt		22	24	46	
Hepatitis- serologie	keine Hepatitis	0	19	21	40	p = 0,140
	Hepatitis A	0	2	0	2	
	Hepatitis B	0	1	6	7	
	Hepatitis C	0	1	2	3	
	Hepatitis E	0	0	1	1	
	Gesamt	0	23	30	53	
ASA	Normaler, gesunder Patient	0	4	1	5	p = 0,040
	Patient mit leichter Allg.erkr.	0	14	14	28	
	Patient mit schwerer Allg.erkr.	0	4	15	19	
	Patient mit lebensbedrohl. Allg.erkr.	0	1	0	1	
	Gesamt	0	23	30	53	

		Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
		negativ	positiv	stark positiv		
Body Mass Index	< 25 Normal- gewicht	0	6	10	16	p = 0,854
	> 25 -30 Übergewicht	0	13	13	26	
	> 30 Adipositas	0	3	7	10	
Gesamt		0	22	30	52	
Nikotinkonsum	ja	0	8	6	14	p = 0,408
	nein	0	14	18	32	
Gesamt		0	22	24	46	
Diabetes mellitus	ja	0	4	12	16	p = 0,026
	nein	0	19	13	32	
Gesamt		0	23	25	48	
Hyperchol- esterinämie	ja	0	3	3	6	p = 0,868
	nein	0	19	22	41	
Gesamt		0	22	25	47	
Hypertonus	ja	0	7	12	19	p = 0,219
	nein	0	16	13	29	
Gesamt			23	25	48	

Tab. 26: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit laborchemischen Parametern

		Gewebe-Label-Index			Gesamt	p-Wert
		negativ	positiv	stark positiv		
Alkalische Phosphatase	< 124 U/l	0	12	10	22	p = 0,651
	≥ 124 U/l	0	9	10	19	
Gesamt		0	21	20	41	
Bilirubin	< 1 mg/dl	0	14	16	30	p = 0,852
	≥ 1 mg /dl	0	7	9	16	
Gesamt		0	21	25	46	
GOT	< 50 U/l	0	12	15	27	p = 0,833
	≥ 50 U/l	0	7	10	17	
Gesamt		0	19	25	44	
GPT	< 50 U/l	0	13	15	28	p = 0,896
	≥ 50 U/l	0	8	10	18	
Gesamt		0	21	25	45	
GGT	< 70 U/l	0	6	4	10	p = 0,527
	≥ 70 U/l	0	11	12	23	
Gesamt		0	17	16	33	
Cholinesterase	< 4,5 kU/l	0	8	7	15	p = 0,732
	≥ 4,5 kU/l	0	13	9	22	
Gesamt		0	21	16	37	
Quick	< 70 %	0	4	2	6	p = 0,355
	≥ 70 %	0	18	21	39	
Gesamt		0	22	23	45	
PTT	< 36 sec	0	17	13	30	p = 0,144
	≥ 36 sec	0	5	10	15	
Gesamt		0	22	23	45	
AFP	< 10 ng/ml	0	8	9	17	p = 0,915
	≥ 10–500 ng/ml	0	10	6	16	
	≥ 500 ng/ml	0	3	4	7	
Gesamt		0	21	19	40	

### 3.2.5 Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit den Überlebensdaten

Ausgewertet wurden hierbei nur jene 43 von 53 Patienten, von denen tatsächlich bekannt war, ob sie lebten oder verstorben waren. Als Beobachtungszeitraum wurden 60 Monate nach Tumorresektion gewählt

Zunächst wurde das „*overall survival*“ betrachtet, d.h. auch jene Patienten waren in die Auswertung eingeschlossen, die innerhalb des Beobachtungszeitraums von 60 Monaten nach Tumorresektion an einer anderen Erkrankung als am HCC verstorben waren (Tab. 27).

Von 43 Patienten waren 26 Patienten nach 60 Monaten nach Tumorresektion verstorben.

Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich bei der Korrelation des „*overall survival*“ mit der ALR-Expression nicht (Abb. 11).

Tab. 27: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit dem „*overall survival*“ im Beobachtungszeitraum von 60 Monaten nach Tumorresektion

„overall survival“	Gewebe-Label-Index			Gesamt
	negativ	positiv	stark positiv	
tot	0	11	15	26
lebend	0	9	8	17
Gesamt	0	20	23	43

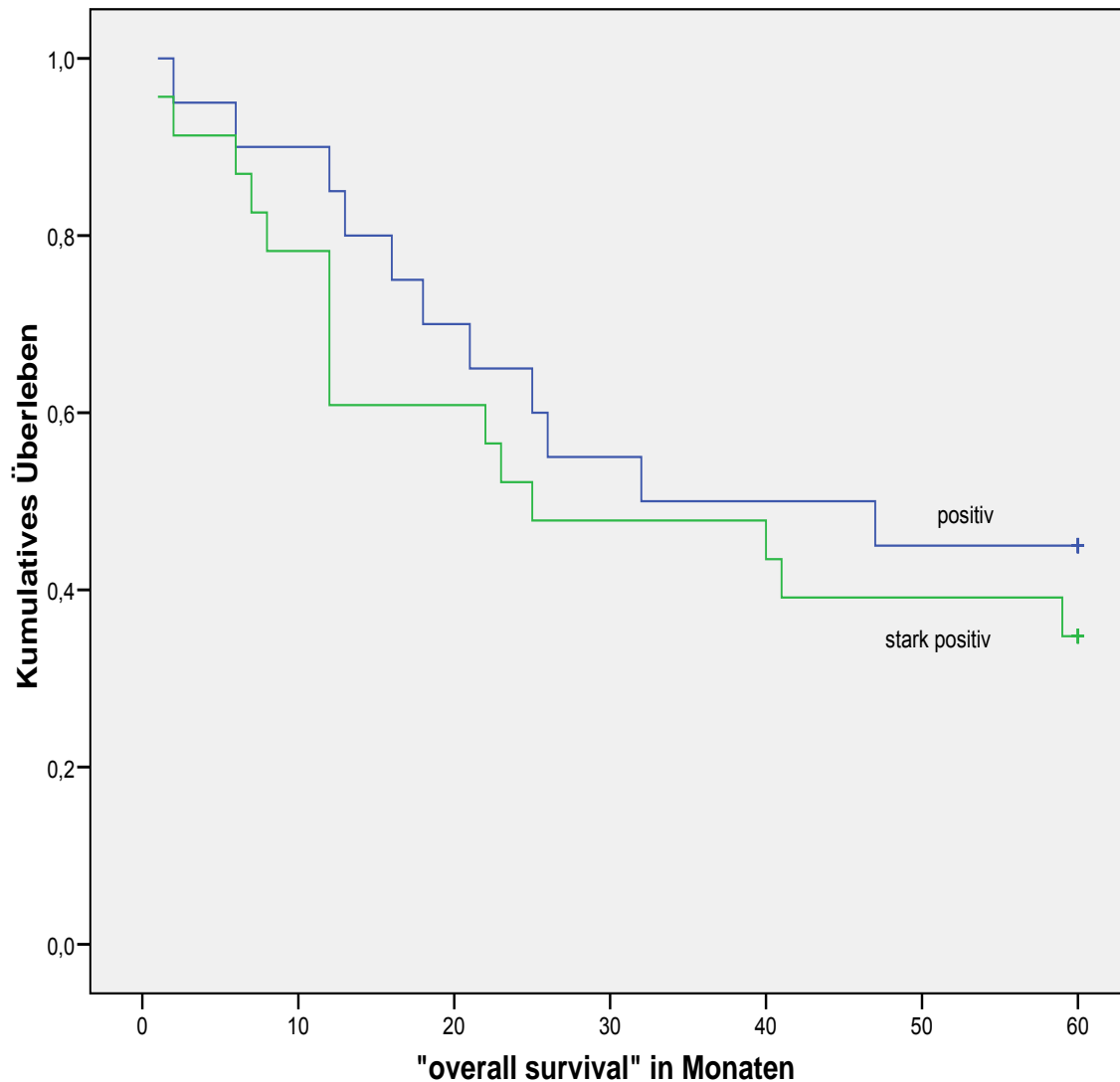


Abb. 11: Kaplan-Meier-Kurve zum „overall survival“ in Monaten in Abhängigkeit von der ALR-Expression

Im Anschluss wurde das Tumorüberleben ausgewertet. Hierzu erfolgte eine Auswertung der Überlebensdaten unter Ausschluss jener Patienten, die nicht am HCC verstorben waren (Tab. 28).

16 Patienten waren innerhalb des Beobachtungszeitraums am HCC verstorben, bei 10 Patienten lag eine andere Todesursache vor.

Auch hierbei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei Korrelation des Überlebens mit der ALR-Expression (Abb. 12).

Tab. 28: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit dem Tumorüberleben im Beobachtungszeitraum von 60 Monaten nach Tumorresektion

Tumorüberleben	Gewebe-Label-Index			Gesamt
	negativ	positiv	stark positiv	
tot	0	7	9	16
lebend	0	9	8	17
Gesamt	0	16	17	33

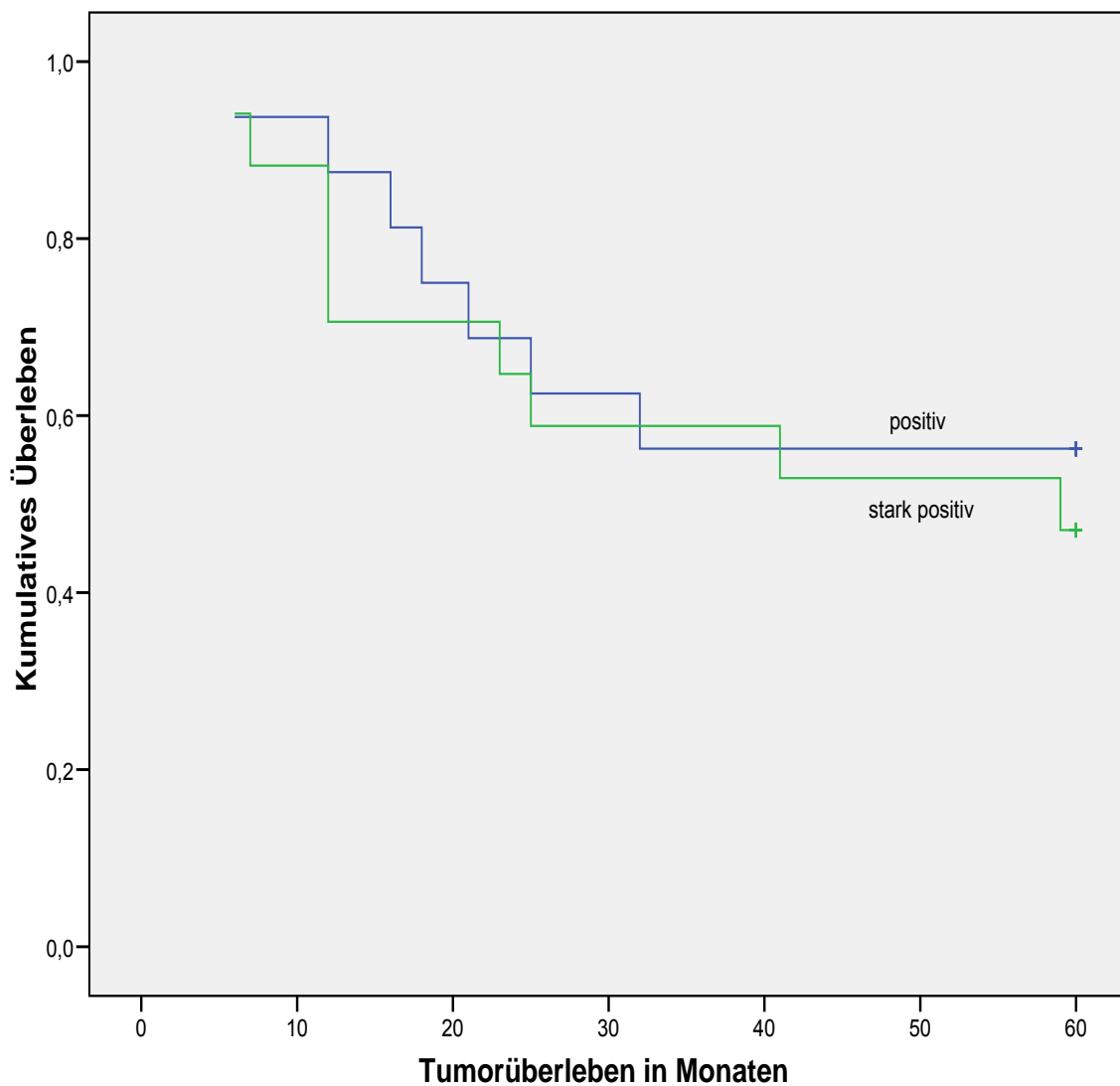


Abb. 12: Kaplan-Meier-Kurve zum Tumorleben in Monaten in Abhängigkeit von der ALR-Expression

Zuletzt erfolgte eine Auswertung der Daten bezüglich des rezidivfreien Überlebens (Tab. 29). Von 41 Patienten konnte das rezidivfreie Überleben im Beobachtungszeitraum von 60 Monaten ermittelt werden.

27 Patienten entwickelten ein Tumorrezidiv innerhalb 60 Monate nach Tumorresektion, lediglich 14 Patienten zeigten ein rezidivfreies Überleben.

Auch beim rezidivfreien Überleben ergab sich bei der Korrelation mit der ALR-Expression kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 13).

Tab. 29: Auswertung der ALR-Expression im HCC und Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben im Beobachtungszeitraum von 60 Monaten nach Tumorresektion

Rezidiv/ Tumorprogression	Gewebe-Label-Index			Gesamt
	negativ	positiv	stark positiv	
ja	0	11	16	27
nein	0	7	7	14
Gesamt	0	18	23	41

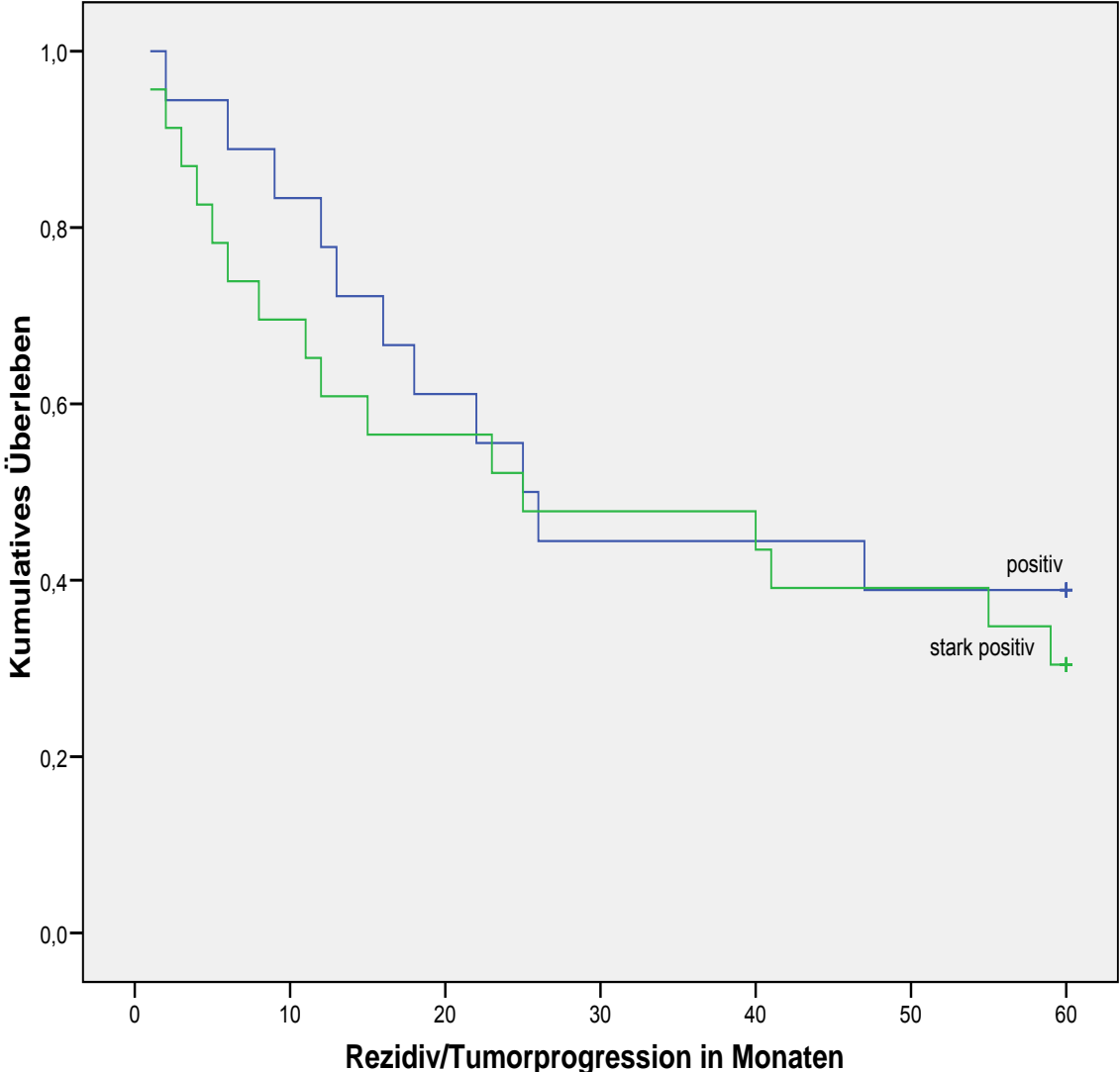


Abb. 13: Kaplan-Meier-Kurve zur Tumorprogression in Monaten in Abhängigkeit von der ALR-Expression

## **4. Diskussion**

Das Hepatozelluläre Karzinom zählt weltweit zu den am häufigsten vorkommenden Tumoren und weist eine steigende Inzidenz in der westlichen Welt auf. Die Entwicklung eines HCC ist ein komplexer Prozess, der in mehreren Schritten abläuft (Fausto und Weber, 1993) und noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

In der Mehrzahl der Fälle entwickelt sich ein HCC auf dem Boden einer chronischen Leberschädigung. Diese führt zu einer Zirrhose, auf deren Boden es zunächst zu hyperplastischen und anschließend zu dysplastischen Knoten und schließlich zum HCC kommt. Die maligne Transformation kann dabei unabhängig von der auslösenden Ursache als Folge einer chronischen Leberschädigung ablaufen. Durch die chronische Leberschädigung und die erhöhte Regeneration kommt es zu einer gesteigerten Proliferation der Hepatozyten, so dass es zu genetischen Alterationen wie Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Telomeraseaktivierung (Erlitzki und Minuk, 1999) und zu Defekten der DNA-Reparaturmechanismen (Mcdonald, 1998) kommen kann. Zudem kommt es wie bei vielen anderen Tumoren auch im HCC zur unkontrollierten Expression von Wachstumsfaktoren oder Komponenten ihrer Signaltransduktionskaskaden sowie von angiogenetischen Faktoren.

### **4.1 Nachweis von ALR in normalem Lebergewebe, in der Leberzirrhose und im HCC**

Zu den mit einer möglichen Karzinogenese assoziierten Faktoren zählt auch das Protein ALR, da eine vorangegangene Untersuchung zeigen konnte, dass ALR nicht nur in der gesunden Leber vorhanden ist, sondern auch erhöhte ALR-mRNA-Spiegel in zirrhotischem Lebergewebe und im Hepatozellulären Karzinom nachweisbar sind (Thasler, 2005). In dieser Arbeit sollte die immunhistologische Expression von ALR in normalem Lebergewebe, in der Zirrhose und im HCC an einer höheren Anzahl untersucht werden.

Als problematisch erwies sich die Auswertung der immunhistochemischen Analyse der ALR-Expression im verwendeten Gewebearray, da sich ALR in sehr vielen Proben des Arrays nicht nachweisen ließ, obwohl ALR als mRNA in vorangegangenen Studien in allen HCCs und Leberzirrhosen exprimiert war (Thasler, 2005).

Aufgrund dieser Vordaten und der später gemachten Beobachtungen drängte sich der Verdacht auf, dass die Ergebnisse falsch negativ sein könnten. Daher wurde die

immunohistochemische Analyse der ALR-Expression in paraffinfixierten Gewebeproben wie auch in der vorhergehenden Arbeit durchgeführt.

Hierbei zeigte sich erneut, dass ALR in allen HCCs und Leberzirrhosen exprimiert war. Es zeigte sich bei der histologischen Auswertung der Gewebeschnitte auch, dass ALR eine inhomogene Immunreaktivität aufwies.

Dieser Befund könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich in 50% der HCCs und in 77% der Zirrhosen des Arrays kein ALR immunohistochemisch nachweisen ließ, da die einzelnen auf den Array aufgetragenen Gewebeproben zufällig aus einem Paraffinblock ausgestanzt wurden und einen sehr kleinen Probenquerschnitt darstellten. Durch die vielen negativen Gewebeproben verkleinerte sich die Fallzahl des Gewebearrays enorm. Zudem waren auch die klinischen Korrelationsparameter äußerst unvollständig erhoben worden, so dass sich die Anzahl der auswertbaren Proben nochmals minimierte.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Gewebeschnitte von ganzen Paraffinblöcken, die über die HTCR-Datenbank ermittelt wurden und von denen ausreichend Korrelationsdaten vorhanden waren, in die statistische Auswertung und in die Korrelationsstudien mit klinischen Parametern und Patientendaten aufgenommen.

An diesen Gewebeproben konnte bestätigt werden, dass ALR in der gesunden Leber, in der Zirrhose und im Hepatozellulären Karzinom nachweisbar ist. ALR konnte bereits 1994 durch Francavilla et al. in ihrem Ratten-Modell der Leberregeneration nach Hemihepatektomie im Zytoplasma der Hepatozyten nachgewiesen werden (Francavilla, 1994). Dies zeigt, dass ALR am Prozess der Leberregeneration und der damit verbundenen erhöhten Proliferation beteiligt ist, welche auch eine wesentliche Rolle im Prozess der Zirrhose- und HCC-Entstehung spielt.

Wie bereits in der vorangegangenen Arbeit mit niedriger Fallzahl (Thasler, 2005) konnte auch in dieser Arbeit die zytosolische und granuläre Expression von ALR in Hepatozyten und Cholangiozyten in normalen Lebern, Leberzirrhosen und HCCs immunohistochemisch gezeigt werden.

Es zeigte sich auch in dieser Arbeit erneut kein Nachweis von ALR in nicht-parenchymalen Leberzellen oder im Zellkern der Hepatozyten. In einer Studie an Rattenlebern hingegen wurde ALR im Zytosol von Hepatozyten als auch in

niedrigerer Konzentration in nichtparenchymalen Leberzellen (Sternzellen, Endothelzellen und Kupffer-Zellen) gefunden (Gandhi, 1999).

Allerdings variierte die Immunfärbung in den nicht-parenchymalen Leberzellen und konnte in kultivierten Zellen nicht nachgewiesen werden (Gandhi, 1999).

In anderen Arbeiten wurde im Gegensatz zu diesem Ergebnis ALR nicht nur im Zytosol sondern auch im Kern von Hepatomzelllinien und in Homogenaten aus Lebergewebe nachgewiesen (Li Y, 2002) (Lu, 2002). In beiden Arbeiten wurde jedoch keine Immunhistochemie durchgeführt. In der Arbeit von Li zeigte sich zudem im Kern nur die 15 kDa Form von ALR, während sich die 23 kDa Form von ALR im Zytosol fand.

#### **4.2 Korrelation der ALR-Expression in normalem Lebergewebe, in der Leberzirrhose und im HCC und Vergleich der Ergebnisse mit anderen Biomarkern für das HCC**

In dieser Arbeit konnte an einer größeren Fallzahl nicht nur gezeigt werden, dass ALR in der gesunden Leber, in der Zirrhose und im Hepatozellulären Karzinom nachweisbar ist, sondern es konnte erstmals auch eine signifikant höhere Expression von ALR in der Zirrhose als im normalen Lebergewebe festgestellt werden.

In der Entwicklung einer Leberzirrhose scheinen zahlreiche Zytokine wie TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF, EGF eine wichtige Rolle zu spielen (Andus, 1991). Diese hepatotrophe Wirkung konnte für die genannten Faktoren bereits gezeigt werden und es konnte ebenso eine erhöhte mRNA und auch eine erhöhte Proteinkonzentration dieser Faktoren in zirrhotischem Lebergewebe nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse über die erhöhte ALR-Expression in zirrhotischem Lebergewebe gegenüber normalem Lebergewebe parallelisieren diese Berichte, da ALR ursprünglich als ein hepatotropher Faktor identifiziert wurde, der die Leberregeneration nach einer Hemihepatektomie stimuliert (Francavilla, 1994). Die vorliegenden Ergebnisse weisen zudem daraufhin, dass ALR eine Rolle bei den regulatorischen Prozessen der Zirrhose spielen könnte.

Weiterhin zeigte sich auch eine signifikant höhere Expression von ALR im HCC als im Normalgewebe. Zwischen der ALR-Expression im HCC und in der Zirrhose zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied.

Eine Leberzirrhose entsteht durch eine chronische Leberschädigung und kann ihrerseits der Ausgangspunkt für eine HCC-Entstehung sein. Die Entwicklung von

regenerativen Knoten in der Zirrhose zu Hyperplasien und zu einem hepatozellulärem Karzinom stellt einen sehr komplexen Prozess dar (Fausto und Weber; 1993).

Von besonderer Bedeutung für die maligne Transformation scheint dabei das gestörte Verhältnis der Aktivität von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen zu sein, wie dies sowohl in regenerativen Knoten als auch in HCC-Gewebe nachgewiesen werden konnte (Livni, 1995). Wie in vielen anderen Tumoren auch, kommt es auch im HCC zu einer unkontrollierten Expression von Wachstumsfaktoren oder von Komponenten ihrer Signaltransduktionskaskaden.

Für die Wachstumsfaktoren TGF- $\alpha$  und - $\beta$ , EGF, FGF und HGF konnte bereits gezeigt werden, dass sie mit der HCC-Entwicklung assoziiert sind (Daveau, 2003) (Dürr und Caselmann, 2000). Bei dieser Untersuchung fand sich eine signifikant erhöhte Expression von ALR in HCC-Proben gegenüber Gewebeproben von normalen und zirrhotischen Lebern.

Auch TGF- $\beta$ , von welchem man weiß, dass es wesentlich an einer Fibroseentstehung beteiligt ist und auch in der Zirrhose überexprimiert wird (Ito, 1990), wird im HCC vermehrt exprimiert (Montgomery, 2001) (Matsuzaki, 2000) (Abou-Shady, 1999). Der genaue Mechanismus, inwiefern TGF- $\beta$  an der Karzinogenese beteiligt ist, ist jedoch noch unklar und wird kontrovers diskutiert (Montgomery, 2001).

Die Datenlage zu HGF und seinem spezifischen Rezeptor c-met ist sehr widersprüchlich und noch nicht abschließend geklärt. Beispielsweise beschreiben Boix et al. in ihrer Studie eine Überexpression von c-met im Vergleich zu umgebendem normalem Lebergewebe und eine HGF-Expression, während hingegen Selden et al. sowohl eine Über- als auch eine Unterexpression von c-met gegenüber umgebendem normalem Lebergewebe und keine HGF-Expression beschreiben (Boix, 1994) (Selden, 1994).

Auch das umgebende nicht neoplastische Normalgewebe bzw. das umgebende zirrhotische Gewebe derselben Patienten zeigte keine signifikant erhöhte ALR-Expression. Auch durch Guirouilh et al. wurde gezeigt, dass das umliegende Gewebe keinen Unterschied in der HGF-Expression gegenüber dem HCC zeigte (Guirouilh, 2001).

Hingegen gibt es zur Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) im HCC und im umgebenden normalen Lebergewebe widersprüchliche Aussagen. So fanden

Nakopoulou et al. eine geringe Expression im HCC und keine Expression im umgebenden Lebergewebe, während Yamaguchi et al. eine EGFR-Expression sowohl im HCC als auch im umgebenden Lebergewebe fanden (Nakapoulou, 1994) (Yamaguchi, 1995).

### **4.3 Korrelation der ALR-Expression im HCC mit histomorphologischen Daten, Überlebensdaten und laborchemischen Daten und Vergleich der Ergebnisse mit anderen Biomarkern für das HCC**

Das HCC stellt weltweit die dritthäufigste Krebstodesursache dar und die Leberzirrhose stellt den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung des HCC dar.

Nahezu alle HCCs scheinen auf dem Boden einer Vielzahl von sich akkumulierenden genetischen Alterationen zu entstehen, die wiederum durch verschiedene Risikofaktoren entstehen, jedoch ist der genaue Mechanismus der Hepatokarzinogenese weiterhin unklar. Das Langzeitüberleben ist schlecht, insbesondere auch durch eine sehr hohe Rezidivrate nach kurativer Resektion des Tumors.

Obwohl die Serum-AFP-Werte einen guten Marker für die Detektion und das Monitoring eines HCC darstellen, gibt es Patienten mit fortgeschrittenem HCC, die normale Serum-AFP-Werte aufweisen. Daher wurden viele unterschiedliche Marker für das HCC, leider bisher mit nicht zufrieden stellendem Erfolg, untersucht, um die Prognose des HCCs zu verbessern, um eine frühe Diagnosestellung und eine frühe Rezidiverkennung zu erreichen.

Zu den untersuchten immunhistochemischen Markern, die insbesondere auch bei der Diagnosestellung eine wichtige Rolle spielen, zählen insbesondere: HepPar1, pCEA, GPC-3, MOC-31 und das AFP (Yim, 2010). Keiner dieser Marker ist spezifisch genug für die Diagnosestellung eines HCC und einige scheinen während der Tumorgenese aufzutreten und/oder zu verschwinden, weshalb eine Kombination von immunhistochemischen Markern benutzt wird, um eine exakte Diagnose zu stellen (Yim, 2010).

HepPar1 ist bekannt als der sensitivste und spezifischste immunhistochemische Marker für das HCC und spiegelt die Differenzierung der Hepatozyten wider (Kakar, 2007). Dabei sind schlecht differenzierte HCCs meist negativ für Hepar1. In dieser Arbeit konnte dies auch für ALR gezeigt werden. Die ALR Expression in HCCs mit

guter Differenzierung (G1/G2) war signifikant höher als in HCCs mit schlechter Differenzierung (G3/G4).

Der immunhistochemische Nachweis von pCEA ist mit 90% hoch im HCC und zeigt ein kanalikuläres Verteilungsmuster in 60% bis 90% der Fälle, welches charakteristisch ist für das HCC und nicht gesehen wird in anderen Adenokarzinomen (Varma, 2004) (Lau, 2002). Die Sensitivität ist dabei auch hoch für gut und mäßig differenzierte HCCs und schlecht für schlecht differenzierte HCCs (Varma, 2004).

Ähnlich der Abnahme von ALR mit steigendem Grading, zeigte sich in dieser Arbeit auch eine signifikante Abnahme der ALR-Expression in HCCs mit Angioinvasion gegenüber HCCs ohne Angioinvasion.

Eine wesentliche Rolle im Prozess der Angioinvasion spielen, wie mittlerweile bekannt ist, Metalloproteinasen, da durch sie nicht nur Bindegewebsstrukturen aufgelöst werden, sondern sich auch einzelne Zellen aus dem Zellverband lösen können, so dass diese Zellen in die Lymph- und Blutbahn gelangen können. Dies stellt wiederum einen wichtigen Schritt auf dem Weg der Metastasierung dar. Li et al. konnten für die Leberfibrose zeigen, dass ALR die Expression des Gewebsinhibitors der Metalloproteinase 1 (TIMP1) vermindert und dadurch zu einer vermehrten Aktivität der Metalloproteinase 1 (MMP1) führt (Li Q, 2005). Eine TIMP1-Überexpression führt zu einer verminderten Proliferation und Invasivität der Hepatomzellen (Xia, 2006), ebenso wie im Umkehrschluss eine vermehrte Expression von MMP1 zu einer erhöhten Invasivität führt (Ip, 2005).

Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass eine erhöhte Invasivität mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (Zhou, 2002). Aufbauend auf dem in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie gefundenen Ergebnis, dass die ALR-Expression in jenen HCCs signifikant niedriger ist, die ein angioinvasives Wachstum zeigen, erfolgten Versuche mit Hepatomzellen. Hierbei konnte bestätigt werden, dass erhöhte ALR-Spiegel zu einer erniedrigten Fähigkeit zur Migration und Invasivität der Hepatomzellen führten.

Diese Abnahme der ALR-Expression bei HCCs, die bereits invasives Wachstum aufweisen, sowie die Abnahme mit zunehmendem Grading, d.h. steigender Entdifferenzierung der Zellen, könnte somit darauf hinweisen, dass ALR ab einem gewissen Punkt der Karzinogenese für die Tumorzellen nicht mehr notwendig ist und

somit die Abnahme der ALR-Expression einen Hinweis für eine schlechtere Prognose darstellen könnte.

Daher erfolgte in dieser Arbeit auch eine Auswertung der Überlebensdaten und eine anschließende Korrelation dieser Daten mit der ALR-Expression im HCC. Sowohl für das „overall survival“ als auch das rezidivfreie Überleben jeweils im Beobachtungszeitraum von 60 Monaten ergab sich kein signifikanter Unterschied in der ALR-Expression.

Bei der Korrelation der ALR-Expression mit dem Alter, dem Geschlecht, der Tumorgroße und dem T-Stadium, mit anderen Leberparametern und mit der Serumkonzentration von AFP ergab sich kein signifikantes Ergebnis. Auch für AFP, den bekanntesten Biomarker für das HCC, konnte in einer Arbeit von Görög et al. keine Korrelation zwischen der Expression und Alter und Geschlecht gefunden werden (Görög, 2005). Jedoch fand sich in einer Arbeit von Peng et al. höhere AFP-Werte bei jüngeren Patienten, wobei diese Patienten auch häufiger HBsAG positiv waren, was auch mit erhöhten AFP-Werten assoziiert war (Peng, 2004).

Weiterhin zeigte sich in dieser Arbeit, dass höhere AFP-Werte mit einer schlechten Differenzierung (G2-4), mit häufigerer Invasivität und auch mit einem schnelleren Tumorrezidiv korrelierten (Peng, 2004). Der AFP-Nachweis erfolgte jedoch mittels PCR und nicht mittels Immunhistochemie.

Aufgrund der Tatsache, dass weiterhin geeignete Biomarker für das HCC fehlen, gibt es zahlreiche Studien, in denen die Expression von unterschiedlichsten Marker mit unterschiedlichen klinischen, morphologischen, histomorphologischen und laborchemischen Daten korreliert werden. In einer ähnlich zu dieser Arbeit angelegten Studie von Nan et. al., in der immunhistochemisch die Expression von p57 im HCC und im normalen Lebergewebe untersucht wurde, konnte ebenfalls keine Korrelation der p57 Expression mit der Serumkonzentration von AFP bzw. mit dem Alter und der Tumorgroße gefunden werden (Nan, 2005).

## 5. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom ist der häufigste primäre Leberzelltumor und zählt zu den weltweit am häufigsten vorkommenden malignen Tumoren mit einer weiterhin steigenden Inzidenz in der westlichen Welt. Die Prognose gilt derzeit noch immer als schlecht, da das einzig kurative Therapieverfahren weiterhin die Resektion darstellt. Wichtige Faktoren und Schritte in der Karzinogenese sind bereits bekannt und meist entwickelt sich das HCC auf dem Boden einer chronischen Leberschädigung, die ihrerseits zu einer Leberzirrhose führt.

Das Protein ALR scheint möglicherweise zu den Faktoren zu zählen, die an der Karzinogenese beteiligt sind, da in einer vorangegangenen Arbeit ALR nicht nur in der gesunden Leber, sondern auch erhöhte ALR-Spiegel in zirrhotischem Lebergewebe und im HCC nachgewiesen werden konnten (Thasler, 2005). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die immunhistochemische Expression von ALR in normalem Lebergewebe, in der Zirrhose und im HCC an einer höheren Fallzahl zu untersuchen. Es zeigte sich erneut die zytosolische und granuläre Expression von ALR in Hepatozyten und Cholangiozyten in der normalen Leber, der Leberzirrhose und im HCC. Keine immunhistochemische Expression von ALR zeigte sich in nichtparenchymalen Leberzellen und Zellkernen.

In allen 53 untersuchten HCCs und jeder der 28 zirrhotischen Lebergewebeproben konnte eine ALR-Expression nachgewiesen werden. Von den untersuchten normalen Lebergewebeproben zeigten lediglich 58,3% der untersuchten Proben eine immunhistochemische ALR-Expression.

Zur Quantifizierung der immunhistochemischen ALR-Expression wurde ein Gewebe-Label-Index als Scoring-System entwickelt. Bei der statistischen Auswertung ergab sich, dass signifikant mehr ALR im HCC und in den zirrhotischen Gewebeproben exprimiert ist als im normalen Lebergewebe. Kein Unterschied in der Exprimierung von ALR fand sich hingegen in den HCCs im Vergleich zu den zirrhotischen Gewebeproben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die immunhistochemische ALR-Expression im HCC mit histomorphologischen, laborchemischen und klinischen Daten und mit Überlebensdaten zu korrelieren. Keine signifikanten Ergebnisse ergaben sich für die ausgewerteten laborchemischen und klinischen Daten.

Bei der Auswertung der histomorphologischen Daten zeigte sich, dass in jenen HCCs, die eine Angioinvasion aufwiesen, signifikant weniger ALR exprimiert war, als

in jenen, die keine Angioinvasivität zeigen. Weiterhin zeigte sich, dass mit steigendem Grading und damit zunehmender Entdifferenzierung signifikant weniger ALR in den Tumorzellen nachweisbar war. Ein Einfluss der ALR-Expression auf das Überleben konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Der in dieser Arbeit immunhistochemisch gefundene Zusammenhang einer negativen Korrelation der Angioinvasivität und dem Grading mit der Höhe der ALR-Expression könnte zum einen daraufhin weisen, dass das Protein ALR eine wichtige Rolle im Prozess der Metastasierung beim HCC spielen könnte, indem es die Metastasierung verhindern und zum anderen einen Marker für eine schlechtere Prognose darstellen könnte.

Ein nächstes Ziel sollte es daher sein, zu versuchen den in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie gewonnenen inversen Zusammenhang zwischen ALR-Expression und Angioinvasion bzw. Grading, auf DNA-Ebene und Zellebene (Hepatomzellen) zu bestätigen. Sollten sich die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse hierbei bestätigen, könnte sich ALR zukünftig möglicherweise zu einem wichtigen Prognosemarker beim HCC entwickeln und indem ALR eine Metastasierung verhindert, therapeutisch genutzt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998, 28:751-755.

Abou-Shady M, Baer HU, Friess H, Berberat P, Zimmerman A, Graber H, Gold LI, Kore M, Buchler MW: Transforming growth factor betas and their signalling receptors in human hepatocellular carcinoma. *Am J Surgery* 1999, 177:209-215.

Allgaier HP: Das hepatozelluläre Karzinom. 1.Auflage, UNI-MED, Bremen 2002 :18-19.

Andus T, Bauer J, Gerok W: Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 1991, 13:364-375.

Aoki H, Kajino K, Akawara Y, Hino O: Molecular cloning of rat chromosome putative recombinogenic sequence homologous to hepatitis B virus encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:7003-7004.

Becker G et al.: Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study. *Hepatology* 2007, 45: 9-15.

Boix L, Rosa JL, Ventura F, Castells A, Bruix J, Rodés J, Bartons R: C-met mRNA overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994, 19:88-91.

Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de Thé H, Marchio A, et al: Identification of a second human retinoid acid receptor. *Nature* 1988, 332:850-852.

Child CG, Turcotte JG: Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1964, 1: 1-85.

CLIP Group: Tamoxifen in treatment of hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 1998, 352:17-20.

Daveau M, Scotte M, Francois A, Coulouarn C, Ros G, Tallet Y, Hiron M, Hellot MF, Salier JP: Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2003, 36:130-141.

Drebber U, Dienes HP: Diagnosis and differential diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Pathologie* 2006, 27: 294-299.

Dürr R, Caselmann WH: Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbeck's Arch Surgery* 2000, 385:154-161.

Edmondson HA, Steiner PE: Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954, 7: 462-503.

El-Serag HB, Mason AC: Rising incidence of hepatocellular carcinoma. *New Engl J Med* 1999, 340:745-750.

Erlitzki R, Minuk GY: Telomeres, telomerase and HCC: the long and the short of it. *J Hepatol* 1999, 31:939:945.

Farazi PA, DePinho RA: Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:674-687.

Fausto N, Webber EM: Mechanisms of growth regulation in liver regeneration and hepatic carcinogenesis. *Prog Liver Dis* 1993, 11:115-137.

Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT: Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissue from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1998, 8:1109-1117.

Fleig WE: Reaktionsformen und Symptome der Leber, In: Berdel W.E., Böhm M., Classen M., Diehl V., Kochsiek K., Schmiegel W. (Hrsg.): *Innere Medizin*, 5.Auflage, Urban&Fischer, München Jena 2004, 1259-1272.

Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE: Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 1994, 20:747-757.

Gandhi CR, Kuddus R, Subbotin VM, Prelich J, Murase N, Rao AS, Nalesnik MA, Watkins SC, DeLeo A, Trucco M, Starzl TE: A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats. *Hepatology* 1999, 29:1435-1445.

Ghandi CR, Murase N, Starzl TE: Cholera toxin-sensitive GTP-binding protein-coupled activation of augments of liver regeneration (ALR) receptor and its function in rat kupffer cells. *J Cell Physiol* 2010, 222:365-373.

Giorda R, Hagiya M, Seki T et al.: Analysis of the structure and expression of the augments of liver regeneration (ALR) gene. *Mol Med* 1996, 2:97-108.

Goodman ZD: Neoplasms of the liver. *Modern Pathology* 2007, 20:49–60.

Görög D, Regöly-Mérei J, Paku S, Kopper L, Nagy P: Alpha-fetoprotein expression is a potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005, 11(32):5015-5018.

Guirouilh J, Le Bail B, Boussarie L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A, Schuppan D, Rosenbaum J: Expression of hepatocyte growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2001, 34:78-83.

Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L et al.: Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994, 91:8142-8146.

Ip YC, Cheung ST, Leung KL, Fan ST: Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005, 11(40):6269-76.

Ito N, Kawata S, Tamura S, Takaishi K, Yabuuchi I, Matsuda Y, Nishioka M, Tarui S: Expression of transforming growth factor- beta 1 mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1990, 81:1202-1205.

Johnson PJ: Role of alpha-fetoprotein in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol* 1999, 14 (Suppl):32-36.

Kakar S, Gown AM, Goodman ZD, Ferrell LD: Best practices in diagnostic immunohistochemistry: hepatocellular carcinoma versus metastatic neoplasms. *Arch. Pathol Lab Med* 2007, 131:1648-1654.

Kleber G, Grothey A: Hepatozelluläres Karzinom: Epidemiologie, Labor, Prognose. *Der Onkologe* 2000, 6:292-300.

Klissenbauer M, Winters S, Heinlein UA, Lisowsky T: Accumulation of the mitochondrial form of the sulphhydryl oxidase Erv1p/ALR during the early stages of spermatogenesis. *J. Exp. Biol.* 2002, 205:1979-1986.

LaBreque DR, Pesh La et al.: Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (ss) from rat. *J. Physiol.* 1975, 248:273-278.

Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R: An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Ervp/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* 2001, 2:715-720.

Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R: Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2002, 33:1175-1181.

Li Q, Liu DW, Zhang LM, Zhu B, He YT, Xiao YH: Effects of augmentation of liver regeneration recombinant plasmid on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005, 11 (16):2439-2443.

Li Y, Li M, Xing G, Hu Z, Wang Q, Dong C, Wei H, Fan G, Chen J, Yang X, Zhao S, Chen H, Guan K, Wu C, Zhang C, He F: Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. *J Biol Chem* 2000, 275:37443-37447.

Li Y, Wie K, Lu C, Li Y, Li M, Xing G, Wei H, Wang Q, Chen J, Wu C, Chen H, Yang S, He F: Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription. *Eur J Biochem* 2002, 269:3888-3893.

Li Y, Xing G, Wang Q, Li M, Wei H, Fan G, Chen J, Yang X, Wu C, Chen H, He F: Hepatopoietin acts as an autocrine growth factor in hepatom cells. *DNA Cell Biol* 2001, 20:791-795.

Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A, Hofhaus G: Mammilian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig Liver Dis* 2001, 33:173-180.

Lisowsky T, Weinstat-Saslow DL, Barton N, Reeders ST, Schneider MC: A new human gene located in the PKD1 region of chromosom 16 is a functional homologue to ERV1 of yeast. *Genomics* 1995, 29:690-697.

Lisowsky T: Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 1992, 232:58-64.

Livni N, Eid A, Ilan Y, Rivkind A, Rosenmann E, Blendis LM, Shouval D, Galun E: p53 expression in patients with cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1995, 75:2420-2426.

Llovet JM et al.: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008, 359:378-390.

Llovet JM, Bru C, Bruix J: Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008, 48:1312-1327.

Llovet JM, Bru C, Bruix J: Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999, 19:329-338.

Llovet JM, Sala M, Castells L, Suarez Y, Vilani R, Bianchi L et al.: Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000, 31:54-58.

Lu C, Li Y, Zhao Y, Xing G, Tang F, Wang Q, Sun Y, Wei H, Yang X, Wu C, Chen J, Guan KL, Zhang C, Chen H, He F: Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway. *FASEB J* 2002, 16:90-92.

Lubienski A et al.: Update on chemoinfusion and chemoembolization treatments. *Radiologe* 2007, 47:1097-1106, 1108.

Macdonald GA, Greenon JK, Saito K, Cherian SP, Appelman HD, Boland CR: Microsatellite instability and loss of heterozygosity at DNA mismatch repair gene loci occurs during hepatic carcinogenesis. *Hepatology* 1998, 29:90-97.

Matsubara K, Tokino T: Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Biol Med* 1990, 7:248-260.

Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sakitani K, Yamashiki N, Seki T, Saito H, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K: Autocrine stimulatory mechanism by transforming growth factor beta in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000, 60:1394-1402.

Mazzaferro V et al.: Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996, 334:693-699.

Michalopoulos GK, DeFrances MC: Regeneration. *Science* 1997, 276:60-66.

Montgomery DB: Chronic liver injury, TGF-  $\beta$ , and cancer. *Experimental and Molecular medicine* 2001, 4:179-190.

Nagahama H et al.: Predictive factors for tumor response to systemic chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1997, 27:321-324.

Nakapoulou L, Stefanaki K, Filaktopoulos D, Giannopoulou I: C-erb-B-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Histopathol* 1994, 9:677-682.

Nan KJ, Guo H, Ruan ZP, Jing Z, Liu SX: Expression of p57(kip2) and its relationship with clinicopathology, PCNA and p53 in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005, 11(8):1237-40.

Okuda K et al.: Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985, 56:918-28.

Ozturk M: Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 1999, 19:235-242.

Parkin DM et al.: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:74-108.

Parkin, DM: International variation. *Oncogene* 2004, 23:6329-40.

Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC: High  $\alpha$ -fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and  $\beta$ -catenin mutations. *Int J Cancer* 2004, 112:44-50.

Polimeno L, Lisowsky T, Francavilla A: From yeast to man from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol* 1999, 31:494-500.

Poon RT et al.: Aggressive management of patients with extrahepatic and intrahepatic recurrences of hepatocellular carcinoma by combined resection and locoregional therapy. *J Am Coll Surg* 2002, 195:311-318.

Pugh RNH et al.: Transection of the esophagus in bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973, 60:648-52.

Selden C, Farnaud S, Ding SF, Habib N, Foster C, Hodgson HJF: Expression of hepatocyte growth factor mRNA, and c-met mRNA (hepatocyte growth factor receptor) in human liver tumours. *J Hepatol* 1994, 21:227-234.

Tanaka K et al.: Clinical features of hepatocellular carcinoma developing extrahepatic recurrences after curative resection. *World J Surg* 2008, 32:1738-1747.

Tanigawa K, Sakaida I, Mashuhara M, Hagiya M, Okita K: Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver disease. *J Gastroenterol* 2000, 35:112-119.

Thasler WE, Dayoub R, Muehlbauer M, Hellerbrand C, Singer T, Graebe A, Jauch KW, Schlitt HJ, Weiss TS: Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by novel hepatotrophic factor Augmenter of Liver Regeneration. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 316:822-829.

Thasler WE, Schlott T, Thelen P, Hellerbrand C, Bataille F, Lichtenauer M, Schlitt HJ, Jauch KW, Weiss TS: Expression of augmenter of liver regeneration (ALR) in human cirrhosis and carcinoma. *Histopathology* 2005, 47:57-66.

Theocharis SE, Margeli AP, Agapitos EV, Mykoniatis MG, Kittas CN, Davaris PS: Effect of hepatic stimulator substance administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced liver injury in rats. *Scand J Gastroenterol* 1998, 33:656-663.

Trojan J, Raedle J, Zeuzem S: Serum Tests for Diagnosis and Follow-Up of Hepatocellular Carcinoma after Treatment. *Digestion* 1998, 59 (suppl 2):72-74.

V Varma, C Cohen: Immunohistochemical and molecular markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Adv Anat Pathol* 2004, 11:239-249.

Varma V, Cohen C: Immunohistochemical and molecular markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Adv Anat Pathol* 2004, 11:239-249.

Vogl TJ et al.: Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: Palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications. *Eur J Radiol*, 2008.

Vujanovic NL, Polimeno L, Azzarone A, Francavilla A, Chambers WH, Starzl TE, Herbermann RB, Whiteside TL: Changes of liver-resident NK cells during liver regeneration in rats. *J Immunol* 1995, 154:6324-6338.

Wang G, Yang X, Zhang Y, Wang Q, Chen H, Wei H, Xing G, Xie L, Hu Z, Zhang C, Fang D, Wu C, He F: Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *J Biol Chem* 1999, 274:11469-11472.

Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Bréchet C: Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990, 343:555-557.

Weihrauch M, Benicke M, Lehnert G, Wittekind C, Wrbitzky R, Tannapfel A: Frequent k-ras-2 mutations and p16(INK4A)methylation in hepatocellular carcinomas in workers exposed to vinyl chlorid. *Br J Cancer* 2001, 84:982-989.

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

Wittekind C: Pitfalls in the classification of liver tumors, *Pathologie* 2006, 27:289-293.

Wu C, Dailey T, Dailey H, Wang B, Rose J: The crystal structure of augments liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase Protein. *Sci* 2003, 12:1109-1118.

Xia D, Yan LN, Xie JG, Tong Y, Yan ML, Wang XP, Zhang MM, Zhao LY: Overexpression of TIMP-1 mediated by recombinant adenovirus in hepatocellular carcinoma cells inhibits proliferation and invasion in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006, 5:409-415.

Yamaguchi K, Carr BI, Nalesnik MA: Concomitant and isolated expression of TGF- $\alpha$  and EGF-R in human hepatoma cells supports the hypothesis of autocrine, paracrine, and endocrine growth of human hepatoma. *J Surg Oncol* 1995, 58:240-245.

Yang XM, Xie L, Qiu ZH, Wu C, He FC: Cloning and characterizing of a new type human liver regeneration augments. *Sci China* 1997, 6:642-647.

Yim SH and Chung YJ: An overview of biomarkers and molecular signatures in HCC. *Cancers* 2010, 2:809-823.

Zhang M, Song G, Minuk GY: Effects of hepatic stimulator substance, herbal medicine, selenium/vitamin E and ciprofloxacin on cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1996, 110:1150-1155.

Zhou XD: Recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma: progress and prospects. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002, 1(1):35-41.

## 7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all jenen, die durch ihre vielfältige Hilfe zum Gelingen und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Prof. Dr. rer. nat. Thomas Weiß für die intensive, fachkundige und geduldige Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt, dem Leiter der Abteilung Chirurgie für die Ermöglichung der Forschungsarbeit und Überlassung des Themas.

Für die zahlreichen Erklärungen und Hilfestellungen, die für die Durchführung meiner praktischen Tätigkeit im Labor und der Erstellung der Daten erforderlich waren, bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere bei Sabine Laberer, Stefan Kirchner, Anja Gräbe und Rania Dayoub.

Danke auch an die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie, mein spezieller Dank gilt Prof. Dr. med. Arndt Hartmann und Prof. Dr. med. Frauke Bataille für die Mithilfe bei der Auswahl der Gewebeblöcke und der Auswertung der Immunhistochemie.

Ein großes Dankeschön gilt zuletzt und vor allem meiner gesamten Familie, die mir auf meinem bisherigen Lebensweg immer zur Seite stand und mich stets mit viel Liebe, Geduld und Aufmerksamkeit unterstützt hat. Herzlichen Dank auch an Robert, der zuletzt positiv zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name:	Wagner
Vorname:	Hannah Kristina
Geburtsdatum/-ort:	01.05.1981, Deggendorf
Familienstand:	ledig
Eltern:	Karl Wagner und Irene Wagner

### Schulbildung:

1987-1991	Grundschule Altenmarkt
1991-2000	Gymnasium Vilshofen mit Erlangen der Hochschulreife

### Hochschulstudium / Beruflicher Werdegang:

2000-2007	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
2003	Ärztliche Vorprüfung
2006-2007	Praktisches Jahr Uniklinik Regensburg, Klinik für Radioonkologie Uniklinik Regensburg, Klinik für Chirurgie Uniklinik Regensburg, Klinik für Innere Medizin
2007	2. Ärztliche Prüfung, Approbation als Ärztin
Seit 2008	Assistenzärztin in der Klinik für Radioonkologie der Uniklinik Regensburg

## 9. Publikationen und Präsentationen

### 9.1 Publikationen

Dayoub R, **Wagner H**, Bataille F, Stöltzing O, Spruss T, Buechler C, Schlitt HJ and Weiss TS. Liver Regeneration Associated Protein (ALR) Exhibits Antimetastatic Potential in Hepatocellular Carcinoma. Mol Med. 2011, 17(3-4)221-228.

### 9.2 Präsentationen

**Wagner H**, Thasler WE, Dayoub R, Bataille F, Hartmann A, Schlitt HJ, Weiß TS. The hepatotrophic factor ALR is highly expressed in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Eur Surg Res 38 (S1), 43 O81; 17.-20.05.2006: 41<sup>st</sup> Congress of the European Society for Surgical Research, Rostock, Germany.

