

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
PROF. DR. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN GOOSECOID, SNAIL
UND TWIST IM HUMANEN GEWEBE DES HEPATOZELLULÄREN
KARZINOMS**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julian Schlagheck

2018

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
PROF. DR. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN GOOSECOID, SNAIL
UND TWIST IM HUMANEN GEWEBE DES HEPATOZELLULÄREN
KARZINOMS**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julian Schlagheck

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Weiß

2. Berichterstatter: PD Dr. Jens Werner

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2018

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Grundlagen der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)	4
1.1.1 Spemann-Organisator	4
1.1.2 Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren	6
1.1.3 Entstehung und Bedeutung der EMT	6
1.1.4 Induktion der EMT	9
1.1.5 TGF- β Signalweg	10
1.1.6 Wnt/Catenin-Signalweg	10
1.1.7 Notch-Signalweg	11
1.1.8 Hedgehog-Signalweg	11
1.1.9 Die drei Subtypen der EMT	12
1.1.10 Transkriptionsfaktoren Goosecoid, Snail und Twist als mesenchymale Marker	13
1.2 Ätiologie des HCC	19
1.2.1 Epidemiologie und Bedeutung des HCC für die Gesellschaft	19
1.2.2 Alkohol und HCC	21
1.2.3 Hepatitis-C-Virus (HCV) und HCC	22
1.2.4 Hepatitis-B-Virus (HBV) und HCC	23
1.2.5 Aflatoxin	24
1.2.6 Leberzirrhose und das Hepatozelluläre Karzinom	26
1.3 Diagnostik des HCC	27
1.3.1 Klinische Diagnostik	27
1.3.2 Alpha-Fetoprotein (AFP) und Karzinome	28
1.3.3 Histologische Diagnose	29
1.3.4 TNM-Klassifikation im HCC	31
1.3.5 Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Klassifikation	32
1.4 Therapieoptionen der aktuellen S3-Leitlinie	33
1.4.1 Operative und radiologische Therapie	33
1.4.2 Optionen der Chemotherapie nach histologischer Sicherung	34
1.5 Fragestellungen	35
2 Material und Methoden	37
2.1 Gewebeproben und Erhebung von Patientendaten	37
2.2 RNA-Isolation	38
2.2.1 Prinzip	38
2.2.2 Vorbereitung	38
2.2.3 Durchführung	40
2.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	41

2.4 Elektrophorese der RNA zur Qualitätsbestimmung	41
2.4.1 Prinzip	41
2.4.2 Vorbereitung	42
2.4.3 Durchführung	42
2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (qRT-PCR)	43
2.6 Immunhistochemische Färbung von Goosecoid im HCC	44
2.7 Statistische Analyse	45
2.7.1 Prüfung Normalverteilung	45
2.7.2 Kolmogorov-Smirnov-Test	45
2.7.3 Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben	46
2.7.4 Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben	46
2.7.5 Chi-Quadrat-Test nach Pearson	47
2.7.6 Korrelationskoeffizient nach Pearson zum Test auf lineare Abhängigkeit	48
2.7.7 Kaplan-Meier-Überlebenskurven und Log-Rank-Test	49
2.7.8 Boxplots	50
2.8 Material	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Ergebnisse der Vorarbeit im Mausmodell in vivo und in vitro	52
3.2 Epidemiologie und humanes Gewebe	53
3.3 Genexpressionsanalyse	55
3.3.1 Nachweis einer nichtparametrischen Verteilung	55
3.3.2 Erhöhte Expression von Snail-mRNA in nicht karzinogenem Gewebe und Goosecoid-mRNA in Tumorgewebe	57
3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Goosecoid in Tumor- gegenüber nicht karzinogenem Gewebe	60
3.4 Analysen der histologischen und klinischen Parameter	65
3.4.1 Erhöhte Expression von Goosecoid im Tumorgewebe großer HCC	65
3.4.2 Erhöhte Expression von Goosecoid im Tumorgewebe unifokaler HCC	66
3.4.3 Erhöhte Expression von Snail im nicht karzinogenen Gewebe multifokaler HCC	68
3.4.4 Analyse der Korrelation von mRNA-Expression der EMT-Marker mit Staging und Grading	70
3.5 Korrelation der Transkriptionsfaktoren mit dem Serummarker alpha Fetoprotein (AFP)	70
3.6 Analyse der Überlebensprognose	70
3.7 Analysierte Daten	72

4 Diskussion	79
4.1 Analyse des Transkriptionsfaktors Snail im HCC	80
4.2 Analyse des Transkriptionsfaktors Goosecoid im HCC	84
4.3 Analyse des Transkriptionsfaktors Twist im HCC	88
4.4 Analyse der Überlebensprognose in Korrelation mit den EMT-Markern	89
4.5 Epidemiologie	90
5 Zusammenfassung	91
6 Literaturverzeichnis	92
7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	110
7.1 Tabellen	110
7.2 Diagramme	111
7.3 Abbildungen	112
8 Posterpräsentationen	114
9 Eidesstattliche Erklärung	115
10 Danksagung	116

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)

1.1.1 Spemann-Organisator

Hans Spemann und seine Doktorandin Hilde Mangoldt stellten 1923 ihre Ergebnisse von Versuchen an Molch-Embryonen vor. Sie hatten Zellen der dorsalen Urmundlippe der Gastrula eines Geberembryos einer hellen Molch-Art in das ventrale Entoderm eines Wirt-Embryos einer dunklen Molch-Art transplantiert, um später die verschiedenen Strukturen farblich voneinander differenzieren zu können.



Fig. 15 und 16. Nahe über dem Urmund (näher als beim Keim der Fig. 8) ein Stück herausgenommen und einem anderen gleich alten Keim in die Gegend der späteren Epidermis verpflanzt. Dort entwickelt es sich neben dem normalen (Med) zu einem kleinen überzähligen Medullarrohr (Med).

Abb. 1 Aus der Originalarbeit von Spemann und Mangold (1923); Transplantation von Embryogewebe.

Es wurde beobachtet, dass die Zellen des hellen Molches bei früher Implantation (Stadium der Gastrula) eine zweite Körperachse mit vollständig ausgebildetem Nervensystem bildeten. Es waren nicht nur Zellen des transplantierten Gewebes die diese bildeten, die Zellen des Transplantats induzierten auch Zellen des Wirtembryos zur Bildung der Zweitachse. Das Transplantat musste über ein Zentrum verfügen, welches den umgebenden Zellen Proliferationsziele vorgab, da sich das Neuralrohr eigentlich aus Zellen entwickelte, die weit über der Lokalisation des entnommenen Transplantats lagen. Nahm man die als Organisator-Zentrum vermutete Zellformation aus der Blastula ohne diese in einen Wirtembryo zu implantieren, entwickelte sich lediglich der Bauch des Molches ohne Kopf, Neuralrohr oder Muskeln. Die speziellen Ziele der Entwicklung mussten folglich von dieser Zellformation ausgehen (Spemann

& Mangold, 1923). Versuche zu Induktionszentren für die Linse des Auges waren vorrausgegangen.

Bereits im Jahr 1744 stellte der Gründervater der Entwicklungsbiologie Abraham Trembley ein Experiment an Hydra vor. Er beobachtete, dass ein in Hälften geschnittenes Exemplar sich wieder zu zwei vollständigen Exemplaren regenerierte. Auch zeigte er die Eigenschaft von zwei oder mehreren halbierten Individuen mit körperfremden Hälften der gleichen Spezies zusammenwachsen zu können (Trembley, 1744).

Beide Versuche deuten auf die Fähigkeit von Organismen hin, Proliferation von Zellen sowie Zellteilung von Zentren aus zu steuern. Spemann und Mangold nachfolgende Arbeiten haben gezeigt, dass maßgeblich Transkriptionsfaktoren die Kommunikation zwischen Induktionszentren und Regulation von Zellwachstum bestimmen.

Jeder Organismus ist abhängig von der Bereitstellung von Proteinen, die z. B. als Enzyme, Rezeptoren oder als Bestandteile von Kollagen fungieren. Die im Zellkern hergestellten Untereinheiten der Ribosomen schließen sich zu funktionellen Einheiten am rauen endoplasmatischen Reticulum zusammen. Diese benötigen mRNA als Vorlage zur Produktion von Aminosäureketten, die wiederum zu Proteinen gefaltet werden können. Die mRNA wird durch das Enzym RNA-Polymerase II von der im Nucleolus befindlichen DNA transkribiert. RNA-Polymerase II bindet einen Promotor, der als BRE (TFIIB Recognition-Box), TATA-Box oder einer anderen spezifischen Sequenz definiert ist. Gemeinsam mit RNA-Polymerase II bindenden allgemeinen Transkriptionsfaktoren (TF) wie TFII, bilden spezifische TF am distalen und proximalen Promotorelement einen Präinitiationskomplex. Nur gemeinsam mit TFII-Helikase kann die Transkription durch den offenen Initiationskomplex nach Entwindung der DNA-Helix gestartet werden. Ob eine Transkription tatsächlich gestartet wird ist durch die spezifischen TF gesteuert.

Aktiviert oder inhibiert wird die Transkription durch die Bindung von URF (upstream regulatory factors) an Sequenzen, die vor dem Initiationskomplex mit Promotorsequenz liegen. Die GC-Box (Sequenz GGC GG) liegt etwa 40 Nucleotide, die CAAT-Box (Sequenz GGCCAATCT) etwa 70 Nucleotide vor der

Promotorsequenz (Berg, Tymoczko & Stryer, 2013). Diese URF sind Transkriptionsfaktoren wie Snail, Twist und Gooseoid.

1.1.2 Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren

Schon um 1980 konnte durch Robert Roeder und Donald Brown et al. nachgewiesen werden, dass für die Transkription einer 5S-RNA Einheit eines Ribosoms einer *Xenopus laevis* Zelle mindestens drei Faktoren außer einer RNA-Polymerase an DNA binden müssen (Parker & Roeder, 1977) (Pelham, Wormington, & Brown, 1981). Einer davon wurde von der Arbeitsgruppe von Aaron Klug 1985-1990 als TFIIIA identifiziert, einem Protein, das mit der 5S-RNA der Ribosomen im Komplex vorliegt. Jeder der Komplexe enthielt nach Analyse zwischen sieben und elf Zink-Ionen. In weiteren Experimenten konnte ein Protein aus neun fast gleichen Proteinabschnitten mit jeweils einer Zink bindenden Domäne herausgearbeitet werden. Sie weisen jeweils über Cystein- und Histidin-Enden eine koordinative Bindung zu einem Zink-Ion auf und sind untereinander mit Aminosäureketten verbunden. So können beispielsweise in diesem Fall 45 Basenpaare einer DNA-Sequenz gebunden werden (Churchill, Tullius & Klug, 1990). 1991 konnte erstmals ein Zinkfingerprotein mittels Röntgenstrukturanalyse in Bindung mit DNA beschrieben werden. Nikola Pavletich und Carl Pabo synthetisierten Kristalle aus DNA-TF Bindungen mit Zif268 und führten sie einer Röntgenstrukturanalyse zu. Unter anderem ergab diese eine die Basenpaare der DNA bindende Alpha-Helix, die in Analogie ihrer 1.-3. Windung die jeweiligen Basenpaare der DNA-Bindungsstelle binden (Pavletich & Pabo, 1993).

Aaron Klug äußerte sich 1993 zu den möglichen Perspektiven dieser Erkenntnisse in einem Aufsatz gemeinsam mit Daniela Rhodes.

„Hier tut sich eine interessante Perspektive auf. Vielleicht lassen sich Zinkfinger-Module einmal maßgeschneidert herstellen, so dass sie jeweils gewünschte DNA-Sequenzen erkennen. Solche molekularen Werkzeuge könnten sowohl für die Erforschung der Genregulation als auch für medizinische Zwecke bedeutsam sein.“
(Klug & Rhodes, 1993)

1.1.3 Entstehung und Bedeutung der EMT

Der Begriff der Epithelialen mesenchymalen Transition steht für die Fähigkeit von Zellen von einem epithelialen in einen mesenchymalen Typ überzugehen. Gesteuert

durch Transkriptionsfaktoren lösen sich die Zellen aus epithelialen Verbänden und werden mobil (Thiery, Acloque, Huang & Nieto, 2009). Dass Zellen in Wundheilung, Chemotaxis und Embryogenese migrieren können, ist spätestens seit der Veröffentlichung von Tickle und Trinkaus im Jahre 1976 bekannt (Tickle & Trinkaus, 1976). Beobachtungen von Fibroblasten hatten zu vermehrter Forschung zu Zellmobilität geführt. Elizabeth Hay sprach in der Folge vor dem Hintergrund der reversiblen Adhäsion von initial mobilen Zellen 1985 im Rahmen einer Arbeit zu Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett während der Entwicklung des Auges in der Embryogenese von „Epithelialer mesenchymaler Transformation“ (Hay, 1985). 1988 veröffentlichte sie eine Arbeit zu Zellen der Schilddrüse, in der sie Umbauvorgänge von Epithelzellen beschrieb, die zu mesenchymalen Zellen transformierten (Greenberg & Hay, 1985). 1989 diskutierte sie mögliche Mechanismen der Mesenchymalisierung von Epithelzellen (Hay, 1989).

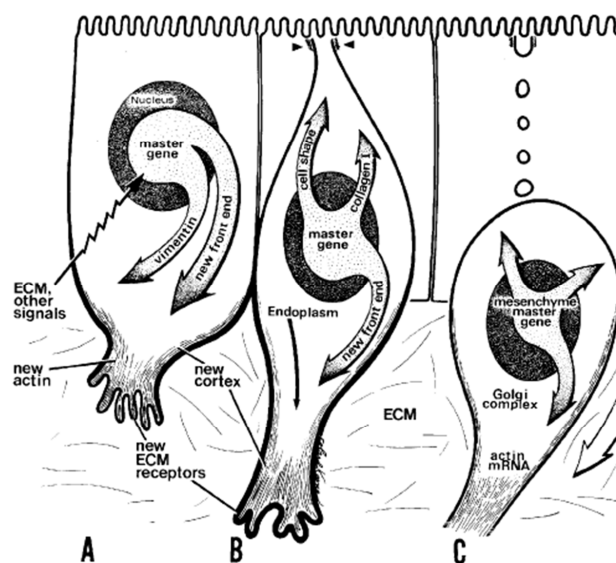


Abb. 2 Schema einer Epithelzelle die sich von der Epithelmembran löst um eine EMT zu unterlaufen (Hay, 1989).

Diese Transformation von epithelial verankerten Zellen zu Fibroblasten-ähnlichen mesenchymalen Zellen ist ein entscheidender Schritt in der kontrollierten Migration von Zellen in der Embryogenese über Keimbahngrenzen hinweg. Eine Zellinvasion, ausgehend von einer entarteten Neoplasie in Nachbargewebe sowie in Blut- und Lymphgefäßen zur Bildung einer Metastase, ist ebenfalls auf diesen Vorgang angewiesen (Stracke & Liotta, 1992). Epitheliale Zellen sind untereinander durch Zell-Zell-Kontakte verbunden, vor allem Zonulae adhaerentes spielen lateral eine

Rolle. Über extrazelluläre Signale (TGF- β , HGF etc.) werden zytoplasmatische Effektoren aktiviert. Diese aktivieren transkriptionelle Repressoren und die Genexpression von E-Cadherin/ β -Catenin wird herabgesetzt. Die Struktur der Zonulae adhaerentes ist auf diesen Proteinkomplex angewiesen (Kalluri & Weinberg, 2009). So können sich Zellen ohne die Zell-Zell-Kontakte aus einem epithelialen Verband lösen. Aufgrund der Auflösung von Kontakten kommt es zum Verlust der Zellpolarität. Die zielgerichtete Mobilität von Mesenchymzellen als Reaktion auf Zytokine und andere Botenstoffe erfolgt entlang von Aktinfilamenten. Mit dem Einbau von Vesikeln mit membranständigen Chemotaxinen erfolgt der Anbau von G-Aktin an der mit Zytokinen behafteten Seite, während auf der anderen G-Aktin enzymatisch zerfällt. Intrazellulär besteht das beschriebene Aktin-Skelett zusätzlich aus Intermediärfilamenten vom Typ 3, den Desminen. Hierzu gehören GFAP (glial fibrillar acidic protein), Desmin, Vimentin und Peripherin. Vimentin wurde bisher in Versuchen als spezifischer Marker zum Beweis einer Mesenchymalisierung von Zellen gemessen. Mesenchymale Zellen sind multipotent und weisen eine hohe Mitoserate auf (Wachtler, 2005).

Die Epithelzellen der Lebersinusoiden sind die Hepatozyten. Cholangiozyten sind die Epithelzellen der Gallengänge. Für diese Epithelzellen ist bereits eine Mesenchymalisierung beschrieben worden (Zeisberg et al., 2007) (Sato et al., 2010).

HSC (Hepatische Stern'sche Zellen) sind diejenigen Zellen, die im Mesenchym bzw. Disse-Raum Matrix-Proteine produzieren und so bei Überproduktion die Entwicklung einer Fibrose bedingen können (Friedman, Roll, Boyles, & Bissell, 1985). Sowohl die Bildung von Metastasen durch migrierende maligne Zellen als auch Entzündungs- und Fibroseprozesse sowie die Embryogenese wird durch EMT gesteuert.

Diese mesenchymalen Zellen sind in der Lage den Prozess umgekehrt zu durchlaufen und sich von der mesenchymalen in eine epitheliale Form zurück zu entwickeln. Geht man davon aus, dass die EMT an der Bildung von Metastasen beteiligt ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Prozess an anderer Stelle wieder umkehrbar ist, sobald die Bindung von TGF- β , HGF, PDGF oder EGF ausbleiben würde. Die Induktion einer solchen mesenchymalen epithelialen Transition (MET) kann z. B. durch Protein-Kinase A an Zellen des Mamma-Karzinom erfolgen und wird aktuell als mögliche Tumorthherapie diskutiert (Pattabiraman et al., 2016). Weiterhin wurde gezeigt, dass das Gen für bone morphogenic protein 7 (Bmp7) die TGF- β

induzierte EMT konterkariert und zu einer Epithelialisierung von Mesenchymzellen führt (Zeisberg et al., 2003).

1.1.4 Induktion der EMT

Bindet einer der bisher bekannten EMT-Induktoren (TGF- β , Growth Factors, hedgehog, notch) an eine Epithelzelle wird mRNA für Proteine wie Snail, Slug, zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), Twist, Goosecoid oder FOXC2 transkribiert (Kalluri & Weinberg, 2009). Während der EMT werden zum einen die tight junctions unterbrochen und die für die tight junctions essentiellen Proteine ZO-1, Claudin 1 und Occludin delokalisiert. Auch die Zonulae adhaerentes, welche maßgeblich aus dem Proteinkomplex E-Cadherin/ β -Catenin bestehen, können aufgrund der erhöhten Expression von Snail nicht aufrechterhalten werden (Vincent et al., 2009). Snail initiiert EMT außerdem über Repression der Occludin- und Claudin-Expression sowie durch verminderte Expression von für die Zellpolarität essentiellen Gene Discs large (Dlg) und Crumbs homolog 3 (Crb3) (Ikenouchi et al., 2008) (Cavatorta et al., 2008) (Whiteman et al., 2008).

Snail ist hinsichtlich der Inhibition der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten entscheidend. Die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten geschieht sehr früh im Prozess der EMT. Daraufhin verlieren die Zellen ihre apikal-basale Polarität und verändern ihre Morphologie zu einem fibroblastenähnlichen, spindelförmigen Zelltyp. Hierzu wird das Zytoskelett umstrukturiert, die Expression von Strukturproteinen wie N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, smooth muscle alpha-actin (SMA) und Fibroblastenspezifisches Protein 1 (FSP1) wird vor allem über Hochregulierung des Transkriptionsfaktors Twist realisiert. Diese nun mesenchymalen Zellen zeigen folglich verminderte Adhäsionstendenzen, erhöhte Aktivitäten von extrazellulären Proteasen und Expression von Matrixproteinen, was insgesamt zu vermehrter Mobilität führt (Miyazono, 2009).

Die Marker, welche auf eine mesenchymale Zellpopulation hinweisen, sind für den Erhalt der Mobilität der Fibroblasten-ähnlichen mit mesenchymalen Eigenschaften ausgestatteten ehemaligen Epithelzellen essentiell. Goosecoid ist bereits für maligne Prozesse wie für das metastasierende Mammkarzinom als EMT-Marker bekannt, in HCC jedoch im Vergleich zum humanen korrespondierenden nicht karzinogenen Gewebe ohne extrahepatische Metastasierung noch nicht. Auch Twist schlossen wir in

die Analyse ein, da es neben seiner Aktivität in EMT bereits als EMT-Marker in HCC hinsichtlich der Tumervaskularisierung untersucht wurde (T. Sun et al., 2011).

Außer der beschriebenen Induktion durch TGF- β und die Wachstumsfaktoren PDGF, EGF sowie HGF sind drei weitere Hauptwege nachgewiesen. Der Wnt/Catenin-, Notch- und Hedgehog-Signalweg führt jeweils ebenfalls zur Induktion einer EMT.

1.1.5 TGF- β Signalweg

TGF- β bindet an den transmembranen Rezeptor T β R. Dieser wird aus zwei Untereinheiten T β R-I und -II mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität gebildet. Der intrazelluläre Teil T β R-II phosphoryliert den intrazellulären Teil des TGR-I. Smad2 und Smad3 werden zum Komplex geformt, Smad4 bindet sekundär ebenfalls. So diffundiert dieses in den Nucleus sowie Nucleolus und bindet über einen Co-Aktivator am DNA-bindenden Protein. Transkriptionsfaktoren wie Snail werden transkribiert und initiieren unter anderem eine EMT. Auch ohne den Smad-Signalweg induziert TGF- β über verschiedene Signalwege Zellfunktionen und Transformationen. Über die Phosphorylierung des T β R-I kann zum Beispiel die PI3-Kinase aktiviert werden, die für Zellmigration ebenfalls essentiell ist (Miyazono, 2009).

1.1.6 Wnt/Catenin-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist sowohl für die normale Entwicklung von Lebewesen essentiell als auch für die Karzinogenese. Das „W“ in Wnt steht für Wingless, da bei Knockout des Gens für dieses Signalprotein eine Flügellose *Drosophila melanogaster* entsteht. Das „nt“ steht für Int-1, dessen Gen durch die Integration von Mausmammatumovirus (MMTV) aktiviert wird und Mamma-Karzinome bei Mäusen hervorruft (Nusse & Varmus, 1982).

An der Signaltransduktion des Wnt-Signalweges sind zahlreiche Proteine beteiligt. Er ist essentiell für die Embryogenese und wird auch bei bestimmten Krebsformen beobachtet. Vor allem ist er für uns von Interesse, da er die Gsc-Expimierung vor der Gastrulation induziert. Nach derzeitigem Wissensstand bindet das Wnt-Signalprotein an den Rezeptor Frizzled (zusammen mit dem Co-Rezeptor LRP), welcher das Protein Dishevelled aktiviert, welches wiederum inhibierend auf einen Proteinkomplex (bestehend aus GSK-3 β -Kinase, dem Tumorsuppressor-Protein APC und dem Protein Axin-1) einwirkt, der normalerweise β -Catenin abbaut. Da nun die Degradation von β -Catenin inhibiert ist, sammelt sich dieses im Cytoplasma und im

Zellkern an. Im Zellkern bildet β -Catenin mit TCF (T-Cell-Transcription Factor) einen Protein-Komplex und aktiviert so spezifische Zielgene (Clevers, 2006).

1.1.7 Notch-Signalweg

Als weiterer EMT-Induktor ist der Notch-Signalweg beschrieben worden. In Analogie zu vielen anderen Signalwegen ist das membranständige Protein Notch ebenfalls an der *Drosophila melanogaster* entdeckt worden. Hier fiel auf, dass ohne Notch-Gen keine Kerben in den Flügeln auftreten (Mohr, 1919). Wie an anderen Faktoren der Embryogenese bereits gezeigt, wurde 2010 Notch bei Induktion von EMT durch TGF- β wie auch Snail im Nierenzellkarzinom überexprimiert gefunden (Saad et al., 2010). In einem Hypoxie-Modell konnte unter Hypoxie eine Induktion einer EMT gezeigt werden, wobei Notch direkt die Expression von Snail durch Bindung der intrazellulären Domäne an den Snail-Promotor induzierte (Sahlgren et al., 2008). In einer Zelllinie eines Cholangiozellulären Karzinoms sind EMT-Muster bei Überexpression von Notch1 gefunden worden (Zhou, Wang, Peng, Liang, & Li, 2013).

Der Notch-Signalweg basiert auf Proteolyse des intramembranösen Proteins Notch, wobei durch die Bindung der Liganden Delta oder Serrate die intrazelluläre Komponente abgespalten wird und einen Komplex mit weiteren Proteinen eingeht (Bray, 2006). Zunächst konnte CBF-1 als zentrales Protein des Komplexes gefunden werden (Lu & Lux, 1996). Inzwischen wurde der gesamte Komplex durch Kristallographie analysiert. CBF-1 steht demnach in Verbindung mit Su(H) und lag-2, zusammen also CSL. Dieser Komplex bindet an die intrazelluläre Komponente von Notch-1 und einem weiteren Koaktivator (mastermind) und komplettiert so den Notch1-Aktivator-Komplex (Nam et al., 2003). Konnte dieser zunächst nur für *Caenorhabditis elegans* entschlüsselt werden, so ist er inzwischen auch für Vertebraten gezeigt. Dieser Komplex verstärkt die Transkription der Enhancer of Split (E(Spl))-Komplex Gene sowie des Gens hairy (Lai, 2002). Für Snail ist diese Aktivierung bisher nur indirekt gezeigt worden.

1.1.8 Hedgehog-Signalweg

Gefunden wurde dieser Signalweg durch Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980 als Kontrollmechanismus der embryonalen Entwicklung in *Drosophila melanogaster* (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Der Hedgehog-Weg funktioniert wie die

meisten Signalwege mittels Proteolyse. Die Bindung durch Hedgehog-Protein an den Rezeptor Patched (Ptch) löst durch Phosphorylierung des ebenfalls membranständigen Proteins Smo (Smoothened) die Inhibition der Degradation des regulatorischen Proteins Cubitus interruptus (Ci) aus. Dieses komplexiert mit den Proteinen Costal, der Serin-Threonin-Kinase Fused (Fu) und dem Hemmer von Fused. Der Komplex diffundiert in den Zellkern und induziert in Säugetieren die Rechts-links-Symmetrie. Er ist für die korrekte Bildung von Gliedmaßenanlagen verantwortlich (Jiang & Hui, 2008). 2008 fanden Omenetti und andere heraus, dass bei Patienten mit primärer biliärer Zirrhose (PBC) ein aktivierter Hedgehog-Signalweg EMT in Cholangiozyten induziert. Während chronischer Cholestase wurde bei induzierter EMT eine fortschreitende Leberfibrose gefunden (Omenetti et al., 2008).

1.1.9 Die drei Subtypen der EMT

Die EMT wird den Prozessen nach, in denen sie eine Rolle spielt, von Robert Weinberg in drei Subtypen unterteilt. Welche Induktoren für welche Unterart verantwortlich sind, ist nicht abschließend geklärt.

Typ 1 ist keine Reaktion auf Gewebeschaden oder kanzerogene Prozesse, sondern ist während der Embryogenese essentiell um primäres Gewebe per EMT migrationsfähig zu machen und per MET an anderer Stelle in sekundäres Mesenchym umzuwandeln (Kalluri & Weinberg, 2009). Hier spielt über Inhibierung der Expression von für die EMT unerlässlichen Faktoren Chordin (auch in Spemann-Organizer gefunden) (Oelgeschläger, Kuroda, Reversade, & De Robertis, 2003), Snail sowie BMP-7 eine Rolle (Bi, Jin, Xu, & Yang, 2012). In der Implantations- und der Gastrulationsphase, aber auch in der Entwicklung des Neuralrohrs konnten EMT-Prozesse nachgewiesen werden (Duband & Thiery, 1982) (Nakaya & Sheng, 2008).

Bei EMT infolge einer Entzündung oder einer Fibrose sprechen Kalluri und Weinberg vom EMT-Typ 2. Bei dieser durch Entzündungsmediatoren hervorgerufenen EMT-Form sind typische mesenchymale Marker wie das Fibroblast-specific protein 1, Zytoskelettprotein S100, alpha-SMA, Discoidin domain receptor tyrosin kinase 2 (DDR2), Vimentin und Desmin sowie Kollagen I in verschiedenen Geweben wie Leber (Zeisberg et al., 2007), Niere (Rastaldi et al., 2002), und Lunge (Kim et al., 2006) nachgewiesen worden. Im Zuge einer Untersuchung von humanem Colon-Gewebe bei bestehendem Morbus Crohn wurden ebenfalls EMT-Mechanismen

gezeigt (Botaille et al., 2008). Nachdem die Zellen von der Basalmembran gelöst sind, wandern sie in das Interstitium ein und entwickeln sich zu Zellen mit fibroblastischem Phänotyp, nun ohne nachweisbare epitheliale Marker (Okada et al., 1996). An TGF- β induzierten fibrotischen Maus-Nieren gelang es mit dem TGF- β Antagonisten BMP-7 den für EMT typischen Verlust von E-Cadherin umzukehren und beschädigte epitheliale Zellverbände mit gesunden Epithelzellen wiederherzustellen (Zeisberg et al., 2003).

Typ 3 fasst EMT in kanzerogenen Prozessen ein. Anhand der Beispiele Goosecoid, Snail und Twist wird hierauf im Folgenden eingegangen.

Der prominenteste der EMT-stimulierenden Mediatoren ist TGF- β , ein lokales Zytokin das bei Heilungs- und Umbauprozessen im Sinne eines EMT-Typs 2 ausgeschüttet wird. So konnte bei Hepatozyten mit Pestiziden und dem Hepatitis-C-Virus-Protein NS5A über TGF- β Überexpression eine Reduktion von epithelialen Markern wie E-Cadherin und Albumin und eine Hochregulierung von mesenchymalen Markern wie Snai1, alpha-SMA, Kollagen und FSP1 mit migratorischen Eigenschaften induziert werden (Akkari et al., 2012) (Zucchini-Pascal et al., 2012).

1.1.10 Transkriptionsfaktoren Goosecoid, Snail und Twist als mesenchymale Marker

Blumberg et al. isolierten 1991 Homöobox-Gene in *Xenopus laevis* im Zuge des Versuches ein cDNA Screening des dorsalen Urmundes durchzuführen. 23 von 30 isolierten Genen wiesen einen bislang noch unbekanntem Code auf. Da eines dieser Gene in den ersten 2/3 der Homöodomäne einem Gen der *Drosophila* ähnelte, das bereits Gooseberry benannt worden war. Da es weiterhin eine bicoid Struktur aufwies, wurde es Goosecoid genannt (Blumberg, Wright, De Robertis, & Cho, 1991). Grundlage dieser Arbeit war das Ergebnis des Mangold-Spemann Experiments, das oben bereits beschrieben wurde (siehe 1.1.1).

Harland zeigte ebenfalls 1991 mittels in situ Hybridisierung, dass die Expression von Goosecoid in *Xenopus laevis* eine Stunde vor dem Beginn der Gastrulation signifikant ansteigt. Tatsächlich konnte Anfang der 90er Jahre gezeigt werden, dass eine Mikroinjektion des Genproduktes (mRNA) des Homöoboxgens Goosecoid in die ventralen Blastomere des 4-Zell Embryos von *Xenopus laevis* das Phänomen des Spemann Organisators nahezu perfekt imitieren kann. Es kommt zur Formung eines

zweiten dorsalen Urmundes und damit zu einer zweiten Körperachse (Cho et al., 1991).

Ein wichtiger Mediator des Spemann Organisations ist der Transkriptionsfaktor Goosecoid, ohne den die Embryogenese nicht funktionieren kann. Wenn also Marker wie AFP, Snail, Wnt oder Notch den Schluss vermuten lassen, dass Mechanismen der Embryogenese an der Karzinogenese des HCC teilhaben, ist zu erwarten, dass auch der Faktor Goosecoid (Gsc) und somit der Spemann Organisations essentiell für diese ist.

Die Expression von Goosecoid erfolgt nicht autonom zu einem bestimmten Zeitpunkt, sie wird durch das im Nieuwkoop-Zentrum gebildete Wnt und Activin induziert. Ebenfalls an *Xenopus laevis* wurde dies für Activin (Green & Smith, 1990), sowie für Wnt (Christian, McMahon, McMahon, & Moon, 1991) gezeigt, indem mittels Mikroinjektion eine Gastrulation mittels Goosecoid induziert werden konnte. Activin und Wnt werden wie auch Goosecoid im Mesoderm gebildet, auf der ventralen Seite der Blastula. Eine Aktivierung des Mesoderms führt zu Aktivierung des Ektoderms und der weiteren Gastrulation. Allerdings wird ein Mesoderm nur jenseits des Stadiums der 64-Zellen-Blastula gebildet. Isoliert und kultiviert man die Zellen vor diesem Stadium, kann kein Mesoderm entstehen (Nieuwkoop, 1973).

Der Arbeitsgruppe um Robert Weinberg fiel auf, dass Tumorgenese und Metastasenbildung Ähnlichkeiten mit der Embryogenese insbesondere im Stadium der Gastrulation aufweisen. In beiden Fällen benötigen die Prozesse die Fähigkeit, sich von epithelial verankerten zu mesenchymalen Zellen und vice versa zu verändern. So versuchten sie den typischen Faktor des Spemann Organisations im Gewebe des Mamma-Karzinoms im Vergleich zum nicht karzinogenen Gewebe nachzuweisen. Es gelang eine signifikante Erhöhung der Goosecoid-Expression im metastasierenden Tumorgewebe nachzuweisen (Hartwell et al., 2006).

1987 konnte gezeigt werden, dass mit E-Cadherin codierten Plasmiden transfizierte Zellen ihre mesenchymale Struktur verlieren und epitheliale Eigenschaften entwickeln (Nagafuchi et al., 1987). In vivo wurde die Rolle von E-Cadherin im Zusammenhang mit EMT und MET an invasiven Fibroblasten der Cornea des Auges nachgewiesen. Hay und Vanderburg transfizierten 1996 E-Cadherin-Gene in

Fibroblasten, diese organisierten sich zu stratifiziertem Epithel mit Ausbildung von Desmosomen (Vanderburg & Hay, 1996).

Snail ist ein Transkriptionsfaktor, der die Synthese des Proteins E-Cadherin inhibiert (Cano et al, 2000, Sugimachi et al., 2003). Dieses ist essentiell für die Bildung des E-Cadherin/ β -Catenin Komplexes, der als Zell-Zell-Kontakt in epithelialen Zellverbänden fungiert. Im Rahmen der TGF- β induzierten EMT bildet Snail einen Repressor-Komplex mit SMAD3/4. Ziel des Komplexes sind E-Boxes sowie SMAD-bindende Codons in Genen die mesenchymale Marker und funktionelle Proteine wie E-Cadherin, CAR sowie Occludin exprimieren (Vincent et al., 2009).

Wird Snail vermehrt exprimiert, werden Zell-Zell-Kontakte vermindert ausgebildet. Snail ist nach aktuellem Stand ein spezifischer Marker für die Inhibition der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, da E-Cadherin für andere Funktionen nicht identifiziert wurde (Kudo-Saito, Shirako, Takeuchi, & Kawakami, 2009). Der Weg einer Zelle von epithelial nach mesenchymal ist zwar nicht auf diesen Faktor reduzierbar, ohne diesen wäre er jedoch nicht möglich.

Wie andere Faktoren der Epithelialen mesenchymalen Transition, ist auch Snail für die Embryogenese essentiell. Ein Maus-Embryo ohne Snail kann sich nicht über das Stadium der Gastrulation hinaus entwickeln (Carver et al., 2001)

Bislang sind sieben Induktionswege für die Expressierung von Snail bekannt. Der mutmaßlich wichtigste und am besten untersuchte ist die Induktion mittels Wachstumsfaktoren. Transforming-Growth-Factor β ist 2003 als Snail-Induktor identifiziert worden, woraufhin auch andere Wachstumsfaktoren diesbezüglich untersucht wurden (Peinado, Quintanilla, & Cano, 2003). Insbesondere in Bezug auf HCC ist der Hepatocyte Growth Factor (HGF) als EMT Induktor von Snail über MAP-Kinasen und PI3-Kinasen identifiziert worden (Grotegut, von Schweinitz, Christofori, & Lehenbre, 2006). Für den Epidermal Growth Factor (EGF) ist bereits ein therapeutischer Inhibitor der Rezeptor-Tyrosinkinase entwickelt worden (Afatinib), der zur Therapie des kleinzelligen Lungen-Karzinoms mit mutiertem EGFR-Gen zugelassen ist (Sequist et al., 2013). Auch für EGF im Endometrium-Karzinom wurde eine signifikant erhöhte Expression von Snail gezeigt (Hipp et al., 2009).

Wachstumsfaktoren nutzen sowohl die verschiedenen mitogen activated Protein (MAP) -Kinasen als auch den Signalweg der Phosphatidylinositol-Kinase (PI3K). Die

PI3K ist aufgrund der durch sie regulierten Zielgene essentiell für Zelldifferentierung, Proliferation und Tumorgenese (Engelman et al., 2006) (Kang, Bader, & Vogt, 2005) (Vivanco et al., 2002).

Zu diesen Zielgenen gehören FOXA-2 und weitere Gene der FOX-Gruppe, Twist sowie Snail. Interessanterweise wurde für die PI3K ein als Tumorsuppressor aktiver Gegenspieler PTEN (Phosphatase und Tensin homolog) identifiziert. Eine Mutation dieser führt zu einer erhöhten Inzidenz für Endometrium-, Prostata- und Mamma-Karzinomen als auch zu verschiedenen tumorassoziierten Syndromen (Li et al., 1997). Die bisher bekannten sind das Cowden-Syndrom, das Lhermitte-Dulcos-Syndrom, das familiäre Oligodendrogliom, das Ruvalcaba-Myhre-Smith-Syndrom und das Proteus-Syndrom. In Zusammenschau der publizierten Arbeiten können die von Zellen als Zell-Zell-Signale sezernierten Wachstumsfaktoren in Form von small molecules als Induktoren von Snail und damit auch als EMT-Induktoren gelten.

Auch der oben beschriebene Notch-Signalweg induziert die Transkription von Snail. Insgesamt ist in HCC die Rolle von Notch und Snail bislang nur in Widersprüchen besprochen worden (Koch & Radtke, 2007). 2008 legte Sahlgren eine Arbeit vor, in der Snail durch Anwesenheit von Notch direkt hochreguliert wurde (Sahlgren et al., 2008). Auch Saad konnte 2010 zeigen, dass bei EMT-Aktivierung durch TGF- β sowie Angiotensin-II sowohl die Transkription/Translation von Notch, als auch die von Snail erhöht sowie die Produktion von E-Cadherin supprimiert war. Mittels DAPT (gamma-Sekretase inhibitor) wurde die Notch-Aktivierung inhibiert, Snail zeigte daraufhin eine signifikant verminderte Expression. Dies zeigte sich in Zellkulturen von Zervix, Colon- und Ovarkarzinomen sowie Glioblastomen (Saad et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde das Protein Notch in HCC nicht als Snail-Induktor gefunden. 2011 konnte im Gegenteil eine gezielte Degradierung von Snail durch die intrazelluläre Domäne von Notch1 in HCC gezeigt werden (Lim et al., 2011). Damit ist eine Gegenregulation von Snail im Sinne einer protektiven Funktion durch Notch speziell in der Leber möglich.

Auch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert die Snail-Expression (Berge et al., 2008). Der Wnt Signalweg ist sowohl für die normale Entwicklung von Lebewesen essentiell als auch für die Tumorgenese.

Ein Vertebrat der ein Knockout für den Effektor des aktivierten Wnt aufweist, bildet kein Mesoderm aus und geht nicht in die Phase der Gastrulation über (Haegel et al.,

1995). Über die oben beschriebene Signalkaskade werden Zielgene aktiviert, die unter anderem für eine Inhibierung der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten sorgen. Unter diesen befindet sich auch Snail (Berge et al., 2008) und Twist (Howe et al., 2003).

Durch Snail wird über das inflammatorische Zytokin TNF- α zudem der NF- κ B-Signalweg induziert. Dieser spielt eine Rolle in Regenerationsvorgängen bei Inflammation. Insgesamt ist es inzwischen Konsens, dass durch chronische Entzündung wie beispielsweise Hepatitis oder durch Alkohol induzierte Inflammation des Lebergewebes Neoplasien hervorgerufen werden können. TNF- α induziert den NF- κ B-Signalweg der erwiesenermaßen zu einer Transkriptionsinduktion der COX-2 und somit zur Translation von Prostaglandin E2 führt (Charalambous et al., 2009) (Wu et al., 2005).

2009 konnte gezeigt werden, dass eine Stabilisierung von Snail durch NF- κ B essentiell für eine durch Inflammation ausgelöste Mesenchymalisierung von Zellen und Zellinvasion ist. Zellreihen von Lungenmetastasen wurden mittels TNF- α induziert, es konnte eine Zellmigration und Invasion diagnostiziert werden. Bei Zellen die ein Knockout-Gen für Snail enthielten, blieb diese Reaktion aus (Yadi Wu et al., 2009).

In Bezug auf HCC zeigte eine erste Arbeit aus dem Jahr 2003 eine Überexpression von Snail in 7 von 43 Tumor-/Normalgewebe Korrelaten. In diesen 7 Fällen konnte eine erhöhte Invasivität nachgewiesen werden (Sugimachi et al., 2003).

Wie an den Beispielen Afatinib und BMP-7 gezeigt, ist diese Aktivierung der EMT durch Antagonisierung der zuständigen Tyrosinkinase-Rezeptoren der Empfängerzellen inhibierbar. Auch für das Tumorsuppressor-Protein p53 ist bereits mehrfach eine Inhibierung von unkontrollierter Zellinvasion ausgehend von Tumoren beschrieben worden (Stiewe, 2007). Einer dieser Wege führt über die Degradation des Transkriptionsfaktors Snail, speziell in Zellkultur von HCC-Zellen. Lim et al. zeigten, dass p53 und Snail in Immunopräzipitation binden. Daraufhin zeigten Immunoblot-Analysen von Hep3B Zellen mit Überexpression von p53-Wildtyp eine signifikant niedrigere Snail-Expression als in solchen ohne transfizierte p53 überexprimierenden Zellen. Auch bei p53 mutierten Zelltypen war keine niedrigere

Snail Expression zu beobachten. Durch Degradation in Anwesenheit von p53 wird geschlossen, dass EMT gedrosselt wird (Lim, Kim, & Jung, 2010).

Auch der Transkriptionsfaktor Twist ist in *Drosophila melanogaster* entdeckt worden, zunächst als Genabschnitt *twi*. Es spielt in der Entwicklung des Mesoderms während der Gastrulation eine entscheidende Rolle. Mäuse mit einem Knockout für Twist sind nicht entwicklungsfähig. Aus diesem Experiment entstand auch der Name Twist, da betreffende Embryos fehlende Anteile des Mesoderms aufwiesen. Es ergab sich phänotypisch eine Drehung des Abdomens (Thisse, Messal, & Perrin-Schmitt, 1987). Eine Insuffizienz, beziehungsweise Fehlbildung, des TF Twist existiert auch in natura. In diesem Fall zeigt sich eine Störung der Kraniosynostose im Sinne des Saethre-Chatzen Syndroms (El Ghouzzi et al., 1997). In schweren Fällen zeigt dieses ein nicht geschlossenes Neuralrohr und Dysplasien der Extremitäten (Young & Swift, 1985).

Hinsichtlich der Rolle von Twist in Tumorgenese und Metastasenbildung ist inzwischen in vielen Entitäten eine erhöhte Expression von Twist nachgewiesen worden. 2004 konnten Yang et al. erstmals an Zell-Kulturen von Mamma-Karzinom Zellen Twist mit einer vermehrten Metastasenbildung korrelieren (Yang et al., 2004). Auch in HCC wurde eine Überexpression von Twist nachgewiesen. Allerdings wurde auch hier, wie beim Nachweis von Gsc in HCC, Twist im Primarius gegen Twist in Metastasen gemessen (Lee et al., 2006).

Tab. 1 Tumorentitäten mit erhöhter Twist-Expression mit Referenzen.

Tumorentität mit erhöhter Twist-Expression	Referenzen
Prostata-Karzinom	Kwok et al., 2005
Magen-Karzinom	Yang et al., 2007
Pankreas-Karzinom	Ohuchida et al., 2007
Nasopharyngeale Tumore	Horikawa et al., 2007
Gliome	Elias et al., 2005
Melanome	Weiss et al., 2012
Blasen-Karzinom	Zhao et al., 2014
Ovarial-Karzinom	Hosono et al., 2007
Phäochromozytom	Waldmann et al., 2009
Hepaocelluläres Karzinom	Lee et al., 2006
Mamma Karzinom	Yang et al., 2004

Analog zu Snail inhibiert Twist die Expression von epithelialen Proteinen wie E-Cadherin und induziert die Expression von mesenchymalen Proteinen Vimentin und smooth muscle actin (Vesuna et al., 2008).

Auch Twist verhindert eine Apoptose durch den Tumorsuppressor p53. Maestro et al. zeigten 1999, dass die Apoptose durch p53 durch Twist antagonisiert wird. In Zellkulturen mit ektopter Expression von Twist konnte eine Induktion einer Apoptose allenfalls sehr langsam stattfinden (Maestro et al., 1999).

Diskutiert wurde in der Literatur eine Beteiligung von Twist in der Angiogenese von Tumorversorgenden Gefäßen durch Induktion von VEGF-Produktion (Mironchik et al., 2005).

1.2 Ätiologie des HCC

1.2.1 Epidemiologie und Bedeutung des HCC für die Gesellschaft

Die letzten großen epidemiologischen Studien zum HCC stammen aus dem Jahr 2004, durchgeführt von Bosch und Fattovich. Bosch beschäftigte sich vor allem mit der Inzidenz im weltweiten Vergleich und konstatierte eine weltweit in 80% verantwortliche Hepatitis B oder C Infektion als Ursache. Abschließend forderte er die weltweite Impfung für Hepatitis B und eine einheitliche Transfusionshygiene hinsichtlich Hepatitis C, um die Erkrankung entscheidend einzudämmen (Bosch, Ribes, Díaz, & Cléries, 2004)¹. Fattovich dagegen zeigt verschiedene Prädilektionsfaktoren auf. So steigt demnach die Mortalitätsrate der an HCC erkrankten Patienten in den westlichen Staaten mit den Zivilisationskrankheiten wie Adipositas, Alkoholismus oder der nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH). Bei Patienten mit der Diagnose Leberzirrhose aufgrund einer Hepatitis C Infektion beträgt die kumulative Inzidenz in 5 Jahren 30%, somit ist das Risiko an einem HCC zu erkranken für diese Patienten am höchsten. Eine Koinfektion mit dem Hepatitis-B- und dem Hepatitis-C-Virus erhöht das Risiko um das 2-6 fache. Es folgen die hereditäre Hämochromatose mit 21% kumulativer Inzidenz in 5 Jahren sowie Hepatitis B mit 15% in Endemie-Gebieten. In äthyltoxischen Leberzirrhosen beträgt die kumulative Inzidenz in 5 Jahren zwar lediglich 8%, jedoch steigt die Inzidenz der Grunderkrankung deutlich und ist inzwischen der häufigste Grund für die Entwicklung eines HCC in westlichen Ländern. Liegt eine Hepatitis-B- oder Hepatitis-C-Virus-

Infektion vor, erhöht ein gleichzeitiger Alkoholmissbrauch das Risiko um das 2-4 fache (Fattovich, Stroffolini, Zagni, & Donato, 2004).

So lässt sich nach einem Blick in die Epidemiologischen Daten sagen, dass das hepatozelluläre Karzinom durch Prävention im Sinne einer Diagnose und Therapie prädisponierender Erkrankungen entscheidend bekämpft werden könnte.

In Deutschland starben laut des statistischen Bundesamts insgesamt 230.840 Menschen im Jahr 2013 an einer Neoplasie. 25% der Gesamttodesursachen sind auf eine maligne Neoplasie zurückzuführen. 54,4% dieser Patienten waren Männer, womit diese nur leicht überrepräsentiert sind. An bösartigen Neubildungen der Leber unter der ICD-10 Ziffer „C22 Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge“ starben 2014 7686 Menschen, das sind etwa 3,2% der Gesamttodesursachen. Darunter waren 2440 Patienten Frauen und 5246 Männer, die Männer sind deutlich überrepräsentiert. In Deutschland liegt 2014 eine etwa doppelt so hohe Mortalitätsrate bei Männern im Vergleich zu Frauen vor (Bundesamt, 2015)³. Der Altersgipfel beider Geschlechter lag bei 70-80 Jahren. Insgesamt wurde 2008 letztmalig eine altersstandardisierte Inzidenz des HCC in Deutschland errechnet, diese lag zu diesem Zeitpunkt bei 9,2-10,7/100.000 Einwohnern für Männer und bei 1,6-3,6/100.000 Einwohnern für Frauen (Jacques Ferlay et al., 2010)⁴.

Der wichtigste Prädilektionsfaktor des HCC ist die Leberzirrhose, die am häufigsten auf der Grundlage einer Hepatitis-Virus-Infektion oder einer äthyltoxischen Leberzirrhose auftritt. Weltweit ist die Prävalenz der Zirrhose in Patienten mit HCC 80-90%. Tatsächlich differieren die Zahlen geographisch und nach Stichproben. Studiendesign sowie Biopsietechnik treffen eine Vorauswahl von Stichproben. Werden beispielsweise nur Feinnadelbiopsien untersucht, liegt meist kein potentiell kuratives Stadium vor. Insgesamt streut die Prävalenz von 46 bis 93%. 1995 zeigten Nzeako et al. (Nzeako et al., 1995), dass unter 804 nordamerikanischen Patienten mit HCC 42,6% aller untersuchten Präparate nach Hemihepatektomie ohne Zirrhose waren. Dagegen konnte in einer Arbeit von 1998 in Italien nur für 6,9% histologisch eine Zirrhose in Lebern mit HCC ausgeschlossen werden. Bei 1148 Patienten wurde die Diagnose Zirrhose zu nicht aufgeführten Anteilen klinisch und/oder durch Leberbiopsie gestellt. 73% der Patienten mit Zirrhose waren HCV positiv, 12% waren HBV positiv (Stroffolini et al., 1998). In Frankreich wurde 2000 eine Arbeit

vorgestellt, in der von 330 Patienten mit HCC 80 Lebern (24%) ohne Zirrhose und histologisch höchstens mit milder Fibrose befundet wurden. In dieser Stichprobe waren 27% der zirrhotischen Lebern mit Hepatitis C, 32% mit Hepatitis B infiziert. (Bralet et al., 2000). Insgesamt fällt eine besonders hohe Prävalenz in mediterranen Ländern auf. In Italien ist die Prävalenz in ländlichen Gegenden besonders hoch. Dieses Phänomen hängt mit der demographischen Struktur zusammen. Je höher der Altersdurchschnitt, desto höher die Prävalenz für Hepatitis B und C. In den mediterranen Ländern ist erst in den 70er-Jahren ein Bewusstsein für Hygienestandards bei Operationen entstanden sowie der Wechsel von Injektionen mit wiederverwendbaren Glasspritzen und Kanülen auf Einmalbesteck erfolgt. Auch die Transfusionsbestimmungen wurden in mediterranen Ländern erst spät den infektiologischen Erkenntnissen angepasst. So ist ein deutlicher Rückgang der Prävalenz in den jüngeren Jahrgängen gezeigt worden (Raffaele et al., 2001).

Die süddeutsche Bevölkerung ist im weltweiten Vergleich nur gering mit Hepatitis-Viren durchseucht. Hier war in 458 Patienten im Zeitraum von 1994 - 2008 ein HCC zu 57,2% bei dokumentiertem Auftreten des Risikofaktors eines chronischen Alkoholabusus aufgetreten. Bei 347 Patienten der Stichprobe war die Diagnose Zirrhose gestellt worden, lediglich 10% wiesen eine HBV-, 20% eine HCV-Infektion auf (Kirchner et al., 2010).

1.2.2 Alkohol und HCC

Europa ist die WHO-Region mit dem höchsten Pro-Kopf-Verbrauch von reinem Alkohol. Die Rate an Patienten die eine Leberzirrhose aufgrund eines chronischen Alkoholabusus entwickelt ist daher besonders hoch. 2012 waren in Deutschland etwa 70% aller Leberzirrhosen alkoholbedingt, ein Unterschied zwischen Männern und Frauen zeigt sich nicht (Männer 70,8%, Frauen 70,3%), damit nimmt Deutschland mit Tschechien, Finnland, Kroatien, Frankreich, Slowakei, Großbritannien und Ungarn einen weltweiten Spitzenplatz ein. Ein Leberkarzinom entwickelte sich in Frankreich ebenfalls in 69% der Fälle aufgrund einer äthyltoxischen Leberzirrhose (Borie, 2009). Insgesamt ist bei der insgesamt schlechten Prognose die Inzidenzrate der HCC auf dem Boden einer äthyltoxischen Leberzirrhose nahezu identisch mit der Mortalitätsrate (Ferlay et al., 2013).

Die ständige Metabolisierung von Ethanol zu Ethanal sorgt für einen zu großen NADH/NAD-Quotienten. Durch eine Erhöhung des Redoxpotentials wird der

Tricarbonsäurezyklus gehemmt. Acetyl-CoA führt zu vermehrter Fettsäuresynthese innerhalb des Leberparenchyms. Zunächst noch reversibel, führt die vermehrte Regenerationstätigkeit zur Fibrosierung und letztlich zur Zirrhose (Cederbaum, 2012).

Es fällt auf, dass HCC in einem kulturell antialkoholisch geprägten Land wie Indien bei der Größe der Bevölkerung von aktuell 1,3 Milliarden jährlich lediglich 27.000 mal auftritt. In China leben nur 76 Millionen Menschen mehr, HCC tritt aber 394.000-mal auf. Zwischen 2008 und 2010 registrierte die WHO in Indien ein pro Kopf Alkoholkonsum der 15 jährigen und älteren von 2,2 Liter reinem Alkohol aus. In China waren es 5,0 Liter, sodass ein Teil der Differenz hierdurch erklärbar wäre. Der Anteil der Bevölkerung, der abstinent lebte, war in Indien mit 74,2% (WHO Global Alcohol Report India, 2010) mehr als doppelt so hoch wie in China, wo 38,2 % (WHO Global Alcohol Report China, 2010) der Bevölkerung nie Alkohol trank. Das Phänomen der unterschiedlichen Inzidenzen kann aber auch hierdurch nicht allein erklärt werden. In Deutschland ist die Inzidenz der Leberzirrhose und des HCC deutlich geringer als in China, hier wurde jedoch im Alter über 15 Jahren 11,2 Liter Alkohol zwischen 2008 und 2010, also deutlich mehr konsumiert (WHO Global Alcohol Report Germany, 2014). Hier ist wie oben beschrieben wiederum die Inzidenz der chronischen Hepatitiden deutlich geringer.

1.2.3 Hepatitis-C-Virus (HCV) und HCC

Die Häufigkeit von Hepatitis-C-Virus-Infektionen ist aufgrund des meist asymptomatischen Verlaufs nach der Akutphase nicht exakt untersucht. Auch die Inzidenz der registrierten Fälle ist schwer zu interpretieren, da Gesundheitssysteme der besser entwickelten Ländern mehr Fälle detektieren als die weniger entwickelter Länder und hier zudem die asymptomatischen Fälle seltener als Zufallsdiagnose gestellt werden dürften. In Deutschland sind 2014 aktuelle Daten des Robert-Koch-Instituts (RKI) erschienen. Demnach wurden 5814 (7,1/100.000 Inzidenzrate) Hepatitis-C-Virus-Infektionen diagnostiziert, 2013 waren es noch 5171 (6,3/100.000 Inzidenzrate) Neumeldungen (Robert Koch Institut, 2015). Etwa 75% aller Hepatitis-C-Virus-Infektionen verlaufen chronisch. Eine Leberzirrhose entwickeln bis zu 35% aller Patienten mit chronischer Hepatitis innerhalb von 20 Jahren. 1-2% dieser Patienten mit Hepatitis-induzierten Leberzirrhosen entwickelt pro Jahr ein primäres Leberzellkarzinom. (Di Bisceglie, 1997)

Speziell in Deutschland liegt die tatsächliche Hepatitis-C-Virus-Antikörper-Prävalenz in der Bevölkerung vermutlich höher als die veranschlagten 5148 Neuinfektionen für das Jahr 2014. In der DEGS1-Studie des RKI (Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland) wurden Personen aus Heil- und Pflegeanstalten, Krankenhäusern und Justizvollzugsanstalten ausgeschlossen, Patienten mit intravenösem Drogenabusus, Menschen aus Ländern mit einer höheren HCV-Prävalenz und weitere stärker betroffene Gruppen waren nicht repräsentativ vertreten (Gilsdorf, 2015). Das gleiche Problem gilt für die letzte US-amerikanische Studie, auch hier wird eine ausreichende Repräsentanz der Daten aufgrund von Ausschluss oder nicht ausreichend rekrutierten Risikogruppen von den Autoren selbst bezweifelt (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

1.2.4 Hepatitis-B-Virus (HBV) und HCC

Bei etwa 30% aller HBV-Träger kommt es zu einer chronischen Hepatitis. Von diesen entwickeln 20% in 10 Jahren eine Leberzirrhose, von diesen wiederum 15% ein primäres Leberzellkarzinom. Je größer die Viruslast, desto größer die Wahrscheinlichkeit eine Zirrhose und folglich ein HCC zu entwickeln. Von 100 Hepatitis-B-Virus-Trägern erkranken also etwa 0,9 Patienten an einem HCC. Eine Assoziation zwischen Hepatitis B und HCC wurde zuerst 1970 beschrieben, Sherlock et al. fanden eine positive Korrelation zwischen positivem Serum-Antigen im Blut und dem Auftreten von HCC (Sherlock, Niazi, Fox, & Scheuer, 1970). In Endemie-Gebieten wie Taiwan fand man eine Korrelation von 80% seropositiver Patienten mit HCC. Das relative Risiko (RR) ein HCC zu entwickeln liegt für Hepatitis-B-Virus-Infizierte im Gegensatz zu seronegativen Patienten in Taiwan bei 63. (Beasley, Lin, Hwang, & Chien, 1981). In anderen Endemie-Gebieten für HCC wurden allerdings geringere RR gefunden, in Haimen-City in Südost-China beispielsweise 18,8 für Männer und 33,2 für Frauen (Evans et al., 2002). Insgesamt steigt die Wahrscheinlichkeit ein HCC zu entwickeln mit Anstieg der Viruslast (Chen, 2006). Ein weiterer Risikofaktor ist hereditär bedingt. Ein Polymorphismus des KIF1B-Gen (rs17401966) auf Chromosom 1 bedeutet für HBsAg-positive Patienten ein nochmals erhöhtes Risiko an einem HCC zu erkranken. Hier wurde eine Odds-Ratio zwischen für HBsAg seropositiven HCC-Patienten mit und ohne Sequenzvariation von 0,61 errechnet (Zhang et al., 2010). Aus einer Koinfektion mit Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Virus resultiert im Vergleich zur Monoinfektion ein etwa verdoppeltes Risiko für die Entwicklung eines HCC (Donato, Boffetta, & Puoti, 1998).

Der Hepatitis-B-Virus löst, so wird vermutet, seine karzinogene Wirkung auf direktem und auf indirektem Wege aus. Direkt über die Integration der Hepatitis-B-Virus-DNA in die Hepatozyten und die über Transkription und Translation vermittelten Effekte, indirekt über die durch Inflammation und Regeneration ausgelöste Fibrose-assoziierte Zirrhose. Das bekannteste Genprodukt der integrierten DNA ist das Hepatitis-Bx-Protein, das in Stoffwechsel- und Wachstumsabläufe eingreift. Zunächst ist der ras-raf-MAP-Kinase-Weg zu nennen, der im Rahmen der Embryogenese auf verschiedenen Wegen an Zell-Differenzierung und Zell-Wachstum, aber auch an Apoptose beteiligt ist (Benn & Schneider, 1994). Die über den Anfangspunkt EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) initiierte Phosphorylierungskaskade ist in 30% aller Karzinom-Entitäten, so auch im HCC, hyperaktiviert. Am Ende stehen Effektoren wie NFκB, das als Transkriptionsfaktor eine Inhibierung der Apoptose sowie Proliferation von Zellen bewirkt und so kanzerogen wirkt (Plümpe et al., 2000).

Im Jahr 2016 zeigten Kim et al., dass HBx-Protein eine Repression von E-Cadherin über eine Inhibierung der Transkription von E12/E47 bewirkt. Insgesamt ließ sich durch die Implantation von Hepatitis-Bx-Protein-DNA eine epitheliale mesenchymale Transition in humanen Hepatozyten hervorrufen. Mesenchymale Marker wie Fibronectin und Vimentin ließen sich erhöht nachweisen. (Shin Kim, Yeom, Kwak, Ahn, & Lib Jang, 2016).

Weiterhin interagiert Hepatitis Bx-Protein mit p53 und inhibiert so die Transkription von p53 und inhibiert so die effektive Inhibierung des Zellzyklus (Iyer & Groopman, 2011).

Allerdings haben sich nicht nur in den genannten Arbeiten Hinweise verdichtet, dass nicht jeder Hepatitis-B-Phänotyp die gleiche kanzerogene Potenz aufweist. So ist für Hepatitis B Typ C sowie E eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit ein HCC zu entwickeln nachgewiesen worden als für die anderen Typen. Zudem sind Therapien in unterschiedlichen Genotypen des Hepatitis-B-Virus unterschiedlich gut wirksam (Cao, 2009).

1.2.5 Aflatoxin

Aflatoxin ist ein Mykotoxin, das zunächst nur im Schimmelpilz *Aspergillus flavus* gefunden wurde. Von diesem leitet sich der Name ab. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass dieses auch in anderen *Aspergillus*-Stämmen produziert wird, und dass

etwa 20 verschiedene Konformitäten existieren. Die für den Menschen relevante Form ist das Aflatoxin B1. Für dieses ist bekannt, dass bei chronischer Aufnahme von toxischen Dosen durch Nahrungsmittel ein Hepatocelluläres Karzinom induziert wird (Murray R., 2009).

Eine akute hepatotoxische Wirkung im Sinne einer Leberdystrophie ist bei Aufnahme von über 10µg/kg Körpergewicht in Säugetieren beschrieben. Bei oraler Aufnahme von im Mittel 7,2mg/kg Körpergewicht ist Aflatoxin B1 in Ratten letal. Bei chronischer Aufnahme sind bereits niedrigere Aufnahmedosen toxisch und kanzerogen. In einer Arbeit über Aflatoxin B1 in Ratten konnte gezeigt werden, dass Aflatoxin eines der kanzerogensten Substanzen überhaupt ist (Tseng, 1994) (Lopez, Ramos, Bulacio, Ramadan, & Rodriguez, 2002).

Aflatoxin B1 wird nach gastrointestinaler Aufnahme in Hepatozyten durch Cytochrom P450 im Rahmen der Biotransformation I in ein Epoxid oxidiert (8,9-dihydroxy-8-(N7)guanyl-9-hydroxy-AFB1) (Fujimoto, Hampton, Luo, Wirth, & Thorgeirsson, 1992). Dies kann zum einen durch die Bindung an Glutathion-S-Konjugat löslich gemacht und dadurch ausgeschieden werden, zum anderen in einer metabolisierten Form (Aflatoxin-B1-Formamidopyrimidin) in Nucleoli diffundieren und dort kanzerogene Mutationen auslösen (Lin et al., 2014).

Es wurde gezeigt, dass besagtes Epoxid eine Guanin-zu-Thyrosin-Mutation in Codon 249 (Arginin zu Serin) des Tumorsuppressor-Gens p53 induziert. Hierdurch verliert dieses seine Funktion. Aflatoxin B1 bewirkt also durch seine mutagene eine kanzerogene Wirkung (Hsu et al., 1991) (C.-C. Lee et al. 1998).

Es fällt zudem auf, dass in Endemie-Gebieten häufig eine Infektion mit Hepatitis B mit einer Aflatoxin-Kontamination der Patienten einhergeht. Hier waren zunächst die Gebiete Swaziland in der Subsahara und Gungxi in China untersucht worden. Es wurde gezeigt, dass in Endemie-Gebieten Aflatoxin-B-Infektionen eine höhere Korrelation mit HCC-Erkrankungen aufweist als die Hepatitis B-Infektion (Peers et al., 1987) (Yeh et al., 1990). In transgenen Mäusen wurde später gezeigt, dass die Inzidenz von HCC in solchen Mäusen am höchsten ist, in denen sowohl Hepatitis B- als auch AFB1-Infektionen vorlagen (Sell et al., 1991). Inzwischen sind verschiedene Interaktionen zwischen Aflatoxin und Hepatitis-B-Virus vermutet worden. Eine chronische Hepatitis-B-Virus-Infektion scheint Cytochrom P450 zu aktivieren,

welches bei Infektion mit Aflatoxin B1 dessen Metabolisierung zum kanzerogenen Epoxid vornimmt (Gemechu-Hatewu et al., 1997).

1.2.6 Leberzirrhose und das Hepatozelluläre Karzinom

Per definitionem ist eine Leberzirrhose eine irreversible Fibrosierung des Parenchyms, hervorgerufen durch Untergang und Regeneration im Zuge einer Infektion oder Intoxikation. Der Übergang zwischen Fibrose und Zirrhose ist nicht klar zu definieren. Kupfersche-Sternzellen (HSC) sind diejenigen Zellen die im Mesenchym die meiste Bindegewebs-Matrix produzieren und so die Entwicklung einer Fibrose bedingen (Friedman et al., 1985). Eine eindeutige Diagnose kann in frühem Stadium nur in Zusammenschau der klinischen Symptome, der sonographischen Bildgebung, laborchemischer Parameter und im Zweifel einer Probebiopsie gestellt werden. Die im Child-Pugh-Score zusammengefassten Kriterien setzen in späteren Stadien den Maßstab. Dieser galt lange Zeit als sensitivster Parameter einer Prognoseschätzung (Child & Turcotte, 1964).

Tab. 2 Kriterien und entsprechende Score-Punkte des Child-Pugh-Score (Child & Turcotte, 1964).

Parameter	Punkte		
	1	2	3
Albumin (g/l)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Bilirubin (mg/dl) bei PBC	<2 <4	2-3 4-10	>3 >10
Quick-Wert (%) (alternativ INR)	>70 <1,7	40-70 1,7-2,3	<40 >2,3
Aszites	Kein	mäßig	Stark
Enzephalopathie	Keine	Stadien I-II	Stadien III-IV
Parameter	Klassifikation		
	A	B	C
Punkte	5-6	7-9	10-15
OP-Risiko	<1%	ca. 10%	>50%
1-Jahres Letalität	3-10%	10-30%	50-80%

Inzwischen ist aufgrund des subjektiven Einflusses der Untersuchung hinsichtlich des Ausmaßes der Aszitesbildung und der sonographischen Einteilung der MELD-Score

in einigen Bereichen in den Vordergrund gerückt (Lebertransplantationen). Dieser bezieht sich lediglich auf laborchemische Parameter:

$$\text{MELD-Score} = (10 \times (0,957 \times \ln(\text{Serumkreatinin}) + 0,378 \times \ln(\text{Bilirubin ges.}) + 1,12 \times \ln(\text{INR}) + 0,643$$

Möglich sind Werte zwischen 6 und 40. Je höher der Wert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Versterbens innerhalb dreier Monate (Kamath et al., 2001).

Weltweit liegt die Inzidenz pro Jahr und 100.000 Menschen bei 1,03 (Lozano et al., 2012). 170.000 Erkrankungen werden davon allein in Europa diagnostiziert (Blachier et al., 2013). Die Dunkelziffer ist aber weitaus höher zu veranschlagen, da im Obduktionsgut in Europa je nach Arbeit 25-50% aller post mortal diagnostizierten Leberzirrhosen vor dem Tode nicht diagnostiziert worden waren (Graudal et al., 1991) (Savolainen et al., 1992).

In Ländern Zentral-Afrikas, Südamerikas oder Südostasiens ist der Anteil der auf dem Boden einer äthyltoxischen Leberzirrhose entwickelten HCC geringer, diese sind Endemie-Gebiete für Hepatitis-B- oder Aflatoxin-Exposition.

69% aller primären Leberkarzinome in Frankreich entstehen auf dem Boden einer äthyltoxischen Leberzirrhose. Aufgrund einer Hepatitis-B-Virus-Infektion kommt es bei 20-35% der Patienten in Europa zu einer Leberzirrhose, sieht man die Daten aus Frankreich und Portugal als repräsentativ an (Cadranel et al., 2007) (Mota et al., 2011). Hiervon entwickeln 25% ein primäres Leberkarzinom. Dies entspricht einem Gesamtanteil an durch Hepatitis-B-Virus-Infektion verursachten HCC von 10-15% (Hatzakis et al., 2011).

1.3 Diagnostik des HCC

1.3.1 Klinische Diagnostik

Zu Beginn einer jeden Diagnostik steht die klinische Untersuchung, bei der typischerweise Zeichen einer Lebersynthesestörung sowie einer portovenösen Stauung auffallen. Die Diagnostik eines HCC richtet sich im Wesentlichen nach einer vorliegenden Leberzirrhose Pathognomonisch zeigt sich oft Aszites aufgrund einer portovenösen Stauung in Verbindung mit verringertem osmotischem Druck bei verminderter Albuminproduktion der Leber. Ebenfalls typisch ist ein Caput medusae bei Anastomosenbildung über die Bauchhautvenen aufgrund des erhöhten portovenösen Drucks bei Rückstau. Gleichfalls entstehen so Ösophagus- und

Magenvarizen mit entsprechenden hämorrhagischen Symptomen wie Teerstuhl oder Hämatemesis. Hier kommt es durch die Leberzirrhose und der damit einhergehenden Leberinsuffizienz aufgrund der verminderten Produktion von Gerinnungsfaktoren zu Komplikationen bei kompromittierter Gerinnung. Eine Abdominalglatze zeigt sich bei verändertem Hormonhaushalt im Sinne einer Abnahme der Testosteron- sowie Anstieg der Östrogenproduktion. Eine Quickwertentgleisung bei verminderter Produktion von Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren fördert oft Gerinnungsstörungen die der Patient und der Untersucher zum Beispiel an vermehrt auftretenden Hämatomen nach Bagatelltraumata bemerken (Suttorp et al., 2015).

Ist keine Zirrhose oder eine andere Grunderkrankung, die eine solche bedingt, bekannt, ist der Patient ambulant an keine Routineuntersuchung angebunden. Symptome wie die Folgen einer portovenösen Stauung oder einer Lebersynthesestörung treten erst spät auf. Typische Symptome die einen Hausarzt zur weiterführenden Diagnostik veranlassen sind Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Kachexie oder generelles Krankheitsgefühl. Hier sind typische Differentialdiagnosen jedoch andere, Beispiele sind Anämie, virale oder bakterielle Infektionen oder auch Lungen- oder Magen-Karzinome. Leberspezifische Symptome treten erst später auf, hier sind Zeichen einer portovenösen Stauung sowie Veränderungen aufgrund einer Lebersynthesestörung zu nennen. Ist eine prädestinierende Vorerkrankung oder sind Risikofaktoren bekannt, soll der Patient regelmäßig mittels klinischer und laborchemischer Untersuchung sowie Sonographie des Abdomens ambulant untersucht werden. Teils aufgrund mangelnder Compliance des Patienten, aber auch aufgrund fehlender Sensibilisierung der Patienten, findet dies nicht in ausreichendem Umfang statt. Beispielsweise werden bekannte Patienten mit chronischem Alkoholabusus nicht flächendeckend zur ambulanten Untersuchung einbestellt oder nehmen nicht aktiv an bestehenden Vorsorgeangeboten teil (Wiegand & Berg, 2012).

1.3.2 Alpha-Fetoprotein (AFP) und Karzinome

Eine übliche Untersuchung zum Screening des HCC ist die Bestimmung der AFP-Konzentration im Blutserum der Patienten. Das erste Protein der Gruppe der embryospezifischen Fetuine wurde bereits 1944 von Pedersen als embryospezifischer Marker entdeckt. Erst 1963 wurde eine Untersuchung publiziert, die eine Sekretion von AFP in implantiertem HCC-Gewebe der adulten Maus fand. Dieses war insofern interessant, als dass AFP eigentlich in adulten Tieren nicht hätte

vorkommen dürfen. 1964 konnte dieses Phänomen für das humane HCC beschrieben werden (Tatarinov, 1964). Analog fanden Assecritova et al. 1967 eine detektierbare Konzentration von AFP in den stammzellosoziierten Tumoren der Teratokarzinome Ovarial- und Hoden-Karzinom. Das Lebergewebe als regeneratives Gewebe mit Fähigkeit zur Organisation von neu entstehenden Zellen wurde hinsichtlich des AFP erst 1980 durch Harada et al. untersucht. Hier fand man in Gewebe von Leberzirrhose aufgrund einer Virushepatitis erhöhte AFP-Level. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass durch AFP-Sekretion die Rekrutierung von Progenitor-Zellen aus Sternzellen gesteuert wird, die maßgeblich an der Regeneration beteiligt sind (Kuhlmann & Peschke, 2006).

1.3.3 Histologische Diagnose

Wie jedes Karzinom ist auch das HCC eine histologische Diagnose. Der dringende Verdacht wird nach klinischer Untersuchung und Sonographie, wobei hier inzwischen die Kontrastmittelsonographie der Goldstandard ist, geäußert. Unter Einbeziehung der Risikofaktoren stellt man zwar auch ohne histologischen Befund mit hoher Wahrscheinlichkeit eine zutreffende Diagnose, einen histologischen Befund ersetzt dies jedoch nicht. Allerdings soll mit der Evidenzqualität „starker Konsens“ nur dann eine Biopsie erfolgen wenn sich auch eine therapeutische Konsequenz ergibt. So ist beispielsweise bei weit fortgeschrittenen Karzinomen mit bereits schweren Komplikationen keine Biopsie indiziert. Die Klassifikation solcher ist nach dem WHO-Grading zu erfolgen. Hier kann auch die Qualität der Einschätzung besonderer Merkmale einfließen. Es wird außerdem gefordert das HCC einer Subtypisierung zu unterziehen (Greten et al., 2013).

Ein HCC entwickelt sich auf der Grundlage von entarteten Hepatozyten. Diese stellen im Leberparenchym die Epithelzellen dar, die maßgeblich die Aufgaben der Leber erfüllen. Allerdings ist auch die Architektur des Feinbaus der Leber gestört. Es werden histologisch verschiedene Phänotypen unterschieden, die auch Hinweise auf Genese oder Invasivität geben können (Böcker et al., 2012).

Solide-trabekuläres HCC: In dieser Form ist die Architektur der Leber in trabekulärer und sinusoidaler Anordnung der Zellen erhalten, allerdings ist die Organisation in Läppchen nicht mehr differenzierbar. Trabekuläres Wachstum mit verschobener Kern-Zytoplasma-Relation, Basophilie des Zytoplasmas und Kernhäufung sind pathognomonisch.

Pseudoglanduläres HCC: Hier ist eine einreihige Anordnung als Pseudodrüse typisch. Auch ist eine PAS-positive Färbung ein Merkmal einer pseudoglandulären Ausbildung. Die PAS Reaktion zeigt hier vor allem kohlenhydratreiche Sekrete, die in anderen HCC Formen nicht vorkommen.

Kompaktes HCC: Eine trabekuläre, sinusoidale oder lobuläre Anordnung der Zellen kann nicht mehr nachvollzogen werden. Die Zellen sind schlecht differenziert, es ist lediglich eine solide Anordnung von Zellformationen sichtbar.

Fibrolamelläres HCC: Dieses tritt meist bei jungen Menschen auf, die ein HCC ohne die Grundlage einer Leberzirrhose entwickeln und zeigt bindegewebige Septen mit eingelagerten Zellformationen.

Histologisch wird ein Leberkarzinom als ein frühes Karzinom eingestuft wenn der größte Befund unter 2cm im Durchmesser ist. Ob dieses lediglich langsamer wächst oder eher metastasiert spielt hier keine Rolle. Im Falle des fibrolamellären Typs ist dies von klinischer Relevanz, hier sind junge Patienten betroffen die meist keine Leberzirrhose und Umbauvorgänge zeigen. Die anderen drei Subtypen sind zur Abgrenzung von anderen Tumorentitäten aber ebenfalls abzugrenzen.

Als Früherkennung hat die Sonographie des Abdomens als nicht invasive und gut verfügbare Methode den höchsten Stellenwert. Die laborchemische Untersuchung des alpha-Fetoprotein zeigt in etwa 50% der Fälle bei HCC einen positiven Wert, sodass dieser ebenfalls bestimmt wird. Steht der Verdacht auf ein HCC im Raum, sollte eine kontrastmittelgestützte Sonographie erfolgen. Hier kann sowohl eine bessere Treffsicherheit von 90,3% der Diagnose (Strobel et al., 2008) als auch die Detektion von mehr Foci (Oldenburg et al., 2007) gewährleistet werden als in der nativen Sonographie. Im Regelfall wird dennoch eine Computertomographie des Thorax und Abdomens angeschlossen, um eine etwaige Fernmetastasierung zu diagnostizieren. Ein HCC gilt jedoch erst dann als gesichert, wenn ein histologisches Gutachten vorliegt. Hierzu kann eine Computertomographie- oder Sonographie-gestützte Punktion erfolgen. Bei eindeutigen Vorbefunden wird die Indikation zur Hemihepatektomie ohne vorherige Punktion gestellt, die histologische Sicherung erfolgt aus dem Operationspräparat. Am Ende einer Diagnostik sollte eine möglichst komplette TNM-Klassifikation des Karzinoms stehen.

1.3.4 TNM-Klassifikation im HCC

Die Einordnung eines HCC hat nach S3-Leitlinie für die Diagnose und Behandlung von HCC nach der pTNM Klassifikation zu erfolgen, da auf dessen Grundlage die Einteilung in Therapieschemata erfolgt und eine morphologische Einteilung und Vergleichbarkeit erlaubt (Greten et al., 2013). Auch die Qualität der Diagnose kann anhand kleiner Buchstaben vor den TNM-Variablen für c wie clinical, u für Ultraschall und p für histologisch gesichert eingebracht werden. Eine Prognoseabschätzung ist hierdurch jedoch nicht möglich (Llovet et al., 1998).

Tab. 3 Kriterien der TNM-Stadien sowie die Zusammenfassung im UICC-Score nach der Originalversion des UICC (Union internationale contre le cancer) (Wittekind et al., 2014).

Primärtumor T	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Primärtumor kann nicht gefunden werden
T1	Solitärer Tumor ohne vaskuläre Invasion
T2	Solitärtumor mit vaskulärer Invasion oder mehreren Tumoren aber keiner größer als 5cm im Durchmesser
T3a	Multipler Tumor, mindestens ein Herd mit über 5cm Durchmesser
T3b	Solitärtumor oder multiple Tumore egal welcher Größe mit Infiltration der Vena hepatica oder Vena portae hepatis
T4	Tumor solitär oder multipel mit Infiltration eines anderen Organs außer der Gallenblase oder mit Peritonealkarzinose
Regionale Lymphknoten N	
NX	Regionale Lymphknoten nicht untersuchbar
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen
Fernmetastasen M	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
Fibrose Score nach Ishak (Ishak et al., 1995)	
F0	Keine oder moderate Fibrose
F1	Schwere Fibrose oder Zirrhose
Histologisches Grading Gewebisdifferenzierung	
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Gering differenziert
G4	Undifferenziert

UICC Score	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
IIIC	T4	N0	M0
IVA	T1-4	N1	M0
IVB	T1-4	N0/N1	M1

1.3.5 Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Klassifikation

Diese Klassifikation wird seit 2013 durch den Konsens der S3-Leitlinie in Zusammenschau mit der TNM-Klassifikation zur prognostischen Abschätzung empfohlen (Greten et al., 2013). Hier kann die morphologische Qualität des Karzinoms mit der klinischen Situation des Patienten in Zusammenhang gebracht werden. In Deutschland ist trotz klarer Empfehlung bisher keine flächendeckende Einordnung in die BCLC-Klassifikation erfolgt. Zum einen wird der Allgemeinzustand meist nicht nach dem Performance-Score der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (Llovet et al., 1999), sondern allenfalls nach Karnofsky (Karnofsky et al., 1949) bewertet, zum anderen die chirurgische Therapie eher nach Erfahrung der Operateure angewandt, weniger nach bestehenden Klassifikationen oder Empfehlungen. Hiernach wird von den Autoren Llovet et al. lediglich in den Stadien A1 bis A3 die chirurgische Resektion empfohlen, in A4 und B eine Transplantation. In Stadien C und D kommt nach Empfehlung lediglich eine Anwendung von Chemoembolisation und Sorafenib, oder im Rahmen der Palliativtherapie eine Anwendung von Medikamenten der Studien-Phase II in Frage.

Tab. 4 Kriterien und Bezifferung der BCLC-Klassifikation (Llovet et al., 1999).

BCLC Stadium	Allgemeinzustand	Tumor	Leberfunktion
A1	ECOG 0	1 Herd < 5cm	Keine portale Hypertension; normales Bilirubin
A2	ECOG 0	1 Herd < 5cm	Portale Hypertension Normales Bilirubin
A3	ECOG 0	1 Herd < 5cm	Portale Hypertension Hyperbilirubinämie
A4	ECOG 0	≤ 3 Herde < 3cm	Child-Pugh A oder B

B	ECOG 0	Groß multilokulär	Child-Pugh A oder B
C	ECOG 1-2	M1 oder V1	Child-Pugh A oder B
D	ECOG 3-4	Egal	Child-Pugh C

1.4 Therapieoptionen der aktuellen S3-Leitlinie

1.4.1 Operative und radiologische Therapie

Zu Beginn des Kapitels Therapie in den aktuellen S3-Leitlinien (Greten et al., 2013) steht die Konsens-basierte Empfehlung alle HCC-Patienten in einer interdisziplinären Tumorkonferenz vorzustellen. Daraus leitet sich bereits die Notwendigkeit eines gemeinsamen internistischen, radiologischen, chirurgischen sowie strahlentherapeutischen Therapiekonzepts ab. Ist die Diagnose HCC also mittels klinischer und laborchemischer Untersuchung, kontrastmittelgestützter Sonographie (CEUS), Computertomographie sowie histologischer Sicherung gestellt, richtet sich die Therapie vor allem nach der TNM-Klassifikation und den klinischen Zeichen. Aktuell stehen drei Verfahren zur kurativen Behandlung eines HCC im Mittelpunkt, chirurgische Resektion bzw. Hemihepatektomie, Lebertransplantation oder die Ablation.

Zunächst ist die Leberzirrhose ein entscheidendes Kriterium, denn jedes HCC das potentiell resektabel ist und nicht auf dem Boden einer Leberzirrhose entstanden ist soll reseziert werden. Ob ein HCC resektabel ist soll auf dem Boden eines Expertenkonsenses ein erfahrener Chirurg entscheiden. Laut der BCLC-Empfehlung ist eine Resektion bis Stadium A indiziert. Für die Indikationsstellung und OP-Planung ist von Bedeutung, ob ein funktionell ausreichender Teil belassen werden kann und ob eine Gefäßinvasion stattgefunden hat. Ist ein HCC gesichert und weist einen Phänotyp innerhalb der Mailand-Kriterien (ein Herd < 5cm, maximal 3 Herde < 3cm) auf, besteht die Indikation zur Lebertransplantation. Außerhalb der Mailand-Kriterien sollte die Transplantation als Expertenkonsens individuell erwogen werden (Mazzaferro et al., 1996). Liegt eine extrahepatische Metastasierung oder eine makroskopische Gefäßinvasion vor, besteht keine Indikation zur Lebertransplantation (Bruix & Sherman, 2011).

Nach den oben bereits zitierten Mailand-Kriterien ist ein Patient Transplantationskandidat, wenn nicht mehr als einen Tumor mit maximal 5cm

Durchmesser oder maximal drei Herde mit maximal jeweils 3cm Durchmesser bestehen. Weitere Ausschlusskriterien sind die Infiltration großer Gefäße sowie der extrahepatische Tumorbefall (Mazzaferro et al., 1996). Je nach CHILD-Stadium erwartet Patienten dieser Kriterien nach Transplantation eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von bis zu 70% (Llovet, Schwartz & Mazzaferro 2005). Ein sogenannter sekundärer Ausschluss von der Warteliste erfolgt, wenn es bei einem Patienten zu einer Progredienz der Tumorerkrankung während der Wartezeit bis zur Transplantation gekommen ist. Dies ist bei etwa der Hälfte aller Patienten nach 12 Monaten Wartezeit der Fall (Yao, Bass, Ascher, & Roberts, 2004).

Bei Patienten mit CHILD-A- oder CHILD-B-Zirrhose mit kompensierter Leberfunktion und nur gering- oder mäßiggradiger portaler Hypertension (Bilirubin im Serum < 2mg/dl; keine Splenomegalie, Thrombozyten > 100.000/µl Blut) sollte bei bis zu drei HCC-Herden die kleiner als 3cm im Durchmesser sind eine Radiofrequenz-Ablation durchgeführt werden. Die Wirksamkeit einer Resektion in diesem Stadium basiert nicht auf einer Evidenz, kann jedoch laut Empfehlung auf der Basis eines Expertenkonsenses durchgeführt werden (Greten et al., 2013).

Beträgt die Größe des HCC-Herdes zwischen 3 und 5cm im Durchmesser, soll vor einer Radiofrequenz-Ablation zunächst eine transarterielle Chemoembolisation erfolgen (Morimoto et al., 2010). Bei über 5cm im Durchmesser messenden Tumoren sollte laut Empfehlung die sofortige Resektion erwogen werden. Die Radiofrequenz-Ablation ist insgesamt die Standardmethode der perkutanen Lokalablation des HCC. (Di Costanzo, Francica, & Pacella, 2014).

Radiologische Verfahren wie die transarterielle Chemoembolisation oder die Radiofrequenz-Ablation werden zum Bridging bis zur Transplantation zur lokalen Tumorkontrolle oder bei Rezidiven empfohlen (Mazzaferro et al., 2004). Im Zuge der perkutanen Radiofrequenz-Ablation kann es zu Tumorzellverschleppung kommen. Diese sollte daher gegebenenfalls offen durchgeführt werden (Llovet et al., 2001).

1.4.2 Optionen der Chemotherapie nach histologischer Sicherung

Sorafenib ist aktuell das einzige akzeptierte Medikament zur Anwendung bei Patienten, bei denen eine andere Therapie nicht mehr in Frage kommt (Bruix & Sherman, 2011). Andere Monotherapien sind nicht erfolgsversprechend, wobei Cisplatin-haltige Kombinationstherapien auf niedrigem Level wirksam sind. Nach den

AWMF-Leitlinien ist die Chemotherapie keine Standardempfehlung. Auch eine adjuvante systemische Therapie wie mit Interferon oder Sorafenib nach Lebertransplantation, Resektion oder Ablation wird aktuell nicht empfohlen.

1.5 Fragestellungen

Vor dem Hintergrund der Gemeinsamkeiten zwischen embryogenetischen Regulationsvorgängen und der Karzinogenese verschiedener maligner Tumore bzw. deren Metastasierung, ist es von Interesse die Rolle von embryonalen Transkriptionsfaktoren des Hepatozellulären Karzinoms zu untersuchen.

Beim HCC spielt die Fernmetastasierung eine untergeordnete, jedoch die intrahepatische Metastasierung eine wichtige Rolle. Die Frage, ob in Umbauprozessen der Leber EMT/MET stattfindet, ist in Bezug auf Regenerationsvorgänge einer grundlegenden Fibrose und Zirrhose weitgehend geklärt. Hingegen ist unklar, ob die Karzinogenese der intrahepatischen Herde von der EMT beeinflusst wird und es einen Zusammenhang zwischen der Expression von Transkriptionsfaktoren und dem Fortschreiten der Karzinogenese gibt. Daher sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Werden die mesenchymalen EMT-Marker Snail, Twist und Goosecoid in Tumor und seinem korrespondierendem nicht karzinogenem Gewebe unterschiedlich exprimiert?
- Steht die Tumorgröße in Zusammenhang mit einer erhöhten Expression der EMT-Marker in Tumor- oder nicht karzinogenem Gewebe?
- Werden EMT-Marker bei solitären im Vergleich zu multifokalen Karzinomen differentiell exprimiert?
- Besteht eine Korrelation von mRNA und Protein-Expression der EMT-Marker?
- Besteht ein Zusammenhang der Expression von EMT-Markern mit der Malignität und Invasivität des Karzinoms?
- Lassen sich Aussagen zu einem Expressionsmuster von EMT-Markern in Bezug auf die Stadien der Karzinogenese treffen?
- Lässt sich die Expression von EMT-Markern als prognostische Marker für Diagnostik und Therapie nutzen?

- Sind Risikofaktoren wie chronischer Alkoholabusus, Diabetes mellitus Typ II, Adipositas, Hyperurikämie oder Hypercholesterinämie assoziiert mit der Expression der ausgewählten Transkriptionsfaktoren assoziiert?
- Stellt die AFP-Konzentration im Serum ein mögliches Bindeglied zwischen Embryogenese und Karzinogenese in Hinblick auf die EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren dar?

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben und Erhebung von Patientendaten

Der zentrale Bestandteil der Arbeit war die Isolation von RNA aus Gewebe des humanen HCC und die Korrelation mit jeder Probe zugeordneten Patientendaten wie Überlebensdauer, Ursache des HCC oder histopathologischer Beurteilung. Die Gewebeproben von Patienten mit der Diagnose „Hepatozelluläres Karzinom“ wurden von der Stiftung „Human Tissue and Cell Research“ zur Verfügung gestellt.

Bei allen Patienten ist entweder eine Leberteilresektion oder eine Transplantation an der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt worden. Daher konnte für jedes Gewebeasservat mit der histologischen Diagnose HCC auch ein Gewebekorrelat aus dem makroskopisch nicht mit Tumor befallenem Gewebe gewonnen werden. Bereits intraoperativ wurden die Proben asserviert und mit einem Puffer zum Schutz vor RNasen versehen sowie in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einer Gewebebank wurden diese bei -80°C gelagert. Insgesamt wurde von 87 gepaarten Proben (Tumor- und umgebendes nicht kanzerogenes Gewebe) RNA isoliert sowie die Gesamt-RNA einer PCR zur Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren Snail, Twist und Goosecoid unterzogen. Die histologische Beschaffenheit des nicht kanzerogenen Gewebes war in den histopathologischen Befunden aufgeführt worden und war in die statistische Untersuchung eingegangen. Vor Entnahme von Patientengewebe sind alle Patienten über den Prozess der Asservierung und der Forschungstätigkeit schriftlich aufgeklärt worden, es liegt jeweils eine Einverständniserklärung vor. Das Einholen der Einverständniserklärung und der Prozess der Asservierung erfolgte nach den Richtlinien der gemeinnützigen Forschungsstiftung HTCR (Human Tissue and Cell Research - weitere Einzelheiten unter www.htcr.de) und wurde von der lokalen Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt.

Die Daten der histopathologischen Begutachtung, der laborchemischen Untersuchung des Blutes und weitere klinische Parameter wie Risikofaktoren, Begleiterkrankungen sowie Hepatitis-Serologien wurden aus Arztbriefen und Gutachten im Archiv der Universitätsklinik Regensburg zusammengetragen. Als Indikator zur Invasivität sollte die TNM-Klassifikation gelten, da diese ausschlaggebend für die Therapieentscheidung ist und die histopathologischen

Merkmale repräsentiert. Die Klinik für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg nahm die Klassifizierung vor.

Die Sterbedaten der untersuchten Patienten sind in Zusammenarbeit mit dem Tumorzentrum Regensburg e.V. erfasst worden. So konnte die Überlebenszeit nach zwei Jahren mit der Expression der Transkriptionsfaktoren sowie dem Grading und Staging korreliert werden.

2.2 RNA-Isolation

2.2.1 Prinzip

Die Isolation der RNA erfolgte mit einem Gesamt-RNA Isolationskit (RNeasy Maxi Kit®). Nach mechanischer Lyse des Gewebes wurden extrazelluläre Proteine sowie die DNA/RNA-Hydrathüllen in β -Mercaptoethanol und dem chaotropen Salz Guanidinisothiocyanat denaturiert.

Die Disulfid-Brücken extrazellulärer Proteine müssen reduziert werden, damit eine vollständige Denaturierung möglich ist. β -Mercaptoethanol führt zu Spaltung von Disulfidbrücken über Reduktion der -S-S- Bindungen zu -S-H H-S-. So wird die RNA durch β -ME vor dem Verdau durch (Ribonukleasen) RNasen geschützt.

Die äußeren hydrophoben Kräfte der Hydrathüllen halten Moleküle wie Proteine, DNA und RNA in ihren Strukturen. Um die Hydrathüllen auszufällen müssen die hydrophoben Kräfte gestört werden, was durch ein chaotropes Salz wie GITC gelingt.

Das erhaltene Lysat wurde auf eine Silicamembran gegeben. Durch Einsetzen von ausreichend Ethanol wurde für die Präzipitation von RNA und DNA die Bindung der Wasserstoffbrückenbindungen verringert, sodass eine Bindung zwischen Si (Silicium) und Phosphat-Natrium Bindungen möglich wurde.

RNasen wurden durch GITC bereits denaturiert. Unter Zentrifugation war lediglich RNA von über 200 Basenpaaren in der Silicium-Struktur der Säule gebunden. Nach dreimaliger Zentrifugation von RNase freiem Wasser durch die Säule war eine im Photometer zu bestimmende Menge RNA im Zentrifugat enthalten.

2.2.2 Vorbereitung

Da sich nach Resektion von Gewebe aus dem Organismus Hypoxie und viele chemische Prozesse ergeben die auch die Nukleinsäuren betreffen, wurden die

Gewebe in 1ml RNAlater gegeben sowie direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren.

RNasen sind Enzyme, welche die hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen in Ribonukleinsäure(RNA)-Ketten katalysieren und in der Umwelt ubiquitär vorkommen. RNAlater ist eine saure Lösung aus Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7$), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$) sowie destilliertem Wasser bei einem pH-Wert von ca. 5. Bei diesem pH-Wert und in Anwesenheit der genannten Reagenzien sind RNasen nicht funktionsfähig.

Die Gewebe wurden zunächst auf Trockeneis langsam aufgetaut, RNAlater wurde extrahiert. Auf der Petrischale wurde das Gewebe zunächst gewogen. Daraufhin wurde das Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert um eine gute Voraussetzung für die Lyse zu schaffen. Nun wurde ein RLT-Puffer zur Zelllyse eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung des RLT-Puffers ist laut des Herstellers Qiagen zwar im Einzelnen vertraulich. Dennoch wird für den RLT-Puffer eine hohe Konzentration an Guanidinisothiocyanat beschrieben und soll vor Gebrauch mit β -Mercaptoethanol versetzt werden.

Bei über 300mg Gewicht wurden 15ml RLT-Lysepuffer hinzugegeben, bei unter 300mg 7,5ml. So wurde einer zu hohen Konzentration an Zellbestandteilen im Lysat vorgebeugt, die zu einer Überladung der Säule und zu Verunreinigungen führen kann.

1 μ l β -Mercaptoethanol wurde pro 1ml RLT-Puffer hinzugegeben. Das Gemisch aus Gewebestücken und β -Mercaptoethanol versetzt mit RLT-Puffer wurde nun in einen M-Tube gegeben und mit dem gentleMacs-Homogenisator im Programm m_liver_02 homogenisiert. Hierzu ist in den Verschluss der rotierende gentleMACS-Dissociator eingebracht. Laut Hersteller ist diese Verfahrensweise für 0,02-4g Gewebe in einem M-Tube bei 4-40°C optimal. Das Lysat ist nach Abschluss des Programms ohne größere Gewebestücke verwendbar, bei Reststücken wird das Programm nochmals durchlaufen.

Das hier verwendete 70%-Ethanol wurde aus 96%-Ethanol sowie mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem, autoklaviertem Wasser hergestellt. DEPC wurde in einer Konzentration von 0,1% zugegeben um RNasen zu denaturieren. zur

Degradation des DEPC ist das Wasser bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert worden.

2.2.3 Durchführung

Zunächst wurde das Homogenat bei 4500 x g für 20 Minuten in konisch zulaufenden Zentrifugen-Tubes (50ml) zentrifugiert. Hierdurch waren nun die Überreste der Gewebe- und Zellbestandteile pelletiert. Der klare Überstand wurde in neue Röhrchen pipettiert, es wurden 7,5 oder 15ml 70%-Ethanol hinzugegeben. Insgesamt sollten für >300mg Gewebe 30ml Volumen entstehen, für <300mg 15ml. War das Volumen durch die Lyse vermindert, wurde dieses auf 15/30ml mit 70%-Ethanol aufgefüllt.

Die Silica-Säule des RNeasy Maxi Kits ist in einer Aufhängung eingesetzt, die in ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit konisch zulaufendem Boden passt. 15ml des Lysat-Ethanol wurden auf die Säule gegeben und bei 3500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das aus der Säule gelaufene Zentrifugat wurde zunächst bei 7°C aufgehoben, um dieses bei schlechter RNA-Bindung nochmals durch die Säule zu zentrifugieren.

Nach dem Passieren der Säule wurde ein DNA-Verdau angeschlossen. Dieser funktioniert mittels einer auf die Säule gegebenen DNase I, welche Rest-DNA aus der Säule degradiert, da diese ebenfalls eine Affinität zu Silicium-Salzen aufweist.

Hierzu wurden zur Vorbereitung 1500 Kunitz-Einheiten DNase in 550µl RNase-freiem Wasser gelöst. 30µl dieser Lösung wurden zu 210µl RDD-Puffer gegeben. Die Zusammensetzung dieses Puffers wurde durch den Hersteller nicht preisgegeben, enthält jedoch Salze die für eine Stabilisierung der RNA-Bindung in der Silica-Säule sorgen. Diese 240µl wurden auf die Silica-Säule gegeben, für 15 Minuten sollte die Lösung auf der Säule stehen. Nun wurden 7,5ml RW1-Puffer auf die Silica-Säule pipettiert und mittels Zentrifugieren für 5 Minuten bei 3500 x g durch die Säule gezogen.

Nach Addierung der entsprechenden Menge Ethanol zum RPE-Puffer-Konzentrat (20ml Konzentrat zu 80ml 100%-Ethanol) konnte dieser verwendet werden. 10ml des RPE-Puffers werden auf die Säule gegeben und für 2 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert. Ein weiteres Mal wurde dieser Schritt mit 10 Minuten Zentrifugation durchgeführt.

Zur Eluierung der RNA wurden 1,2ml RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und für eine Minute stehen gelassen. Für 3 Minuten wurde die Säule in einem neuen Zentrifugen-Tube bei 3500 x g zentrifugiert. Danach befindet sich die RNA in etwa 1ml Wasser zur weiteren Verarbeitung.

2.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA wird bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Quarzküvette gemessen. Die Abnahme der Intensität I des Lichts längs der Schichtdicke d wird durch eine Funktion beschrieben. Für die Schichtdicke ist 1cm gewählt. Der Logarithmus der Ausgangsintensität des Lichtstroms vor Eintritt in die Schicht wird in Verhältnis zur Intensität des Lichtstroms gestellt, der nach Austritt aus der Schicht gemessen wird. RNA bei einer optischen Dichte von 1,0 ergibt 40µg RNA/1ml. Der molare Extinktions-(Abnahme)-koeffizient ist für RNA also 40. Nach dem Gesetz von Lambert-Beer kann somit die Konzentration der RNA im Eluat errechnet werden. Vor Vermessung ist das Eluat um 1:100 verdünnt worden.

$$E = \lg(I_0/I) = \epsilon \cdot c \cdot d \cdot 100$$

E	Extinktion	ϵ	Extinktionskoeffizient
I_0	Intensität des eingestrahlteten Lichtes	c	Konzentration
I	Intensität des abgeschwächten Lichtstrahls	d	Schichtdicke

Die RNA wird jedoch auch bei 280nm Wellenlänge vermessen. Die Werte aus A260 und A280 werden zur Abschätzung der Reinheit der Proben in Beziehung gesetzt. Generell wird eine Ratio von A260/A280 = 2 bezogen auf vermessener RNA als rein angesehen. Die Ergebnisse variieren jedoch mit unterschiedlicher Konzentration unterschiedlicher Nukleotide, pH-Wert oder Verunreinigung durch Phenole oder Proteine, welche ebenfalls bei etwa 280nm Wellenlänge Licht absorbieren.

2.4 Elektrophorese der RNA zur Qualitätsbestimmung

2.4.1 Prinzip

Die Qualität von RNA kann mittels Elektrophorese analysiert werden. Eine Elektrophorese ist die Methode der Wahl um einen möglichen Zerfall der RNA in kleinere Untereinheiten zu detektieren. In dieser Arbeit wird ein Chip-System der Firma Agilent verwendet, das mit Gel gefüllte Glaskapillaren enthält. Die zu untersuchenden Moleküle sind in diesen mobil. Ein Fluoreszenzfarbstoff wird zur

Färbung der Nukleotidstränge benutzt. Einzelne Moleküle werden aufgrund unterschiedlicher Ladungen entlang eines elektrischen Feldes zwischen Katode und Anode unterschiedlich schnell in den Kapillaren laufen. Durch diese Mobilität sind die Moleküle in Banden getrennt, je nach Position kann die Größe abgelesen werden. Die Größe von RNA-Strängen korreliert mit der Ladungsstärke. Auf einem Chip können mehrere Proben gleichzeitig getestet werden. Die Banden werden gegen einen RNA-Leiter mit RNA-Strängen unterschiedlicher bereits bekannter Größe gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels Software.

2.4.2 Vorbereitung

Zur Vorbereitung wurde zunächst ein Gel-Farbstoff-Gemisch hergestellt. Zu 32,5µl gefilterter Gel-Matrix wurden 0,5µl Farbstoffkonzentrat gegeben. Jeweils 9µl des hergestellten Gemisches wurden in die Vertiefung „G“ pipettiert. Mittels einer eigens konzipierten Spritze wurde dieses unter Luftdruck in die Kapillare gepresst. Der Luftdruck wurde für 30 Sekunden angelegt. Die zwei verbliebenen mit „G“ gekennzeichneten Vertiefungen wurden nun ebenfalls mit jeweils 9µl Gel-Matrix gefüllt. Danach war der Chip bereit für das Auftragen der RNA.

2.4.3 Durchführung

Der RNA-Leiter wurde nun bei 70°C für 2 Minuten erhitzt, sodass die Nukleotid-Stränge denaturierten und entfaltet vorlagen. In die für den Leiter vorgesehene Vertiefung ließen sich 2µl des Größenstandards sowie 7µl des RNA-Fluoreszenzmarkers auf den Chip laden. Nun verblieben 12 weitere Vertiefungen, in die jeweils 7µl des RNA-Fluoreszenzmarkers und 1µl der Proben pipettiert wurden. Mit einem für die Chips angefertigten Vibrator wurde der Chip bei 2400rpm für eine Minute geschüttelt.

Hiernach war der Chip zur Elektrophorese verbreitet. In den Slot des Bioanalyzers eingelegt, wurde eine elektrische Spannung angelegt, die Moleküle wanderten ihrer Ladung entsprechend entlang der Kapillare. Detektiert wurden diese mittels laserinduzierter Fluoreszenz. Das Programm vergleicht die Position des RNA-Standards mit den Positionen der Banden nach einer bestimmten Zeit und kann so über die Größe der Moleküle Auskunft geben. Das Verhältnis zwischen großen und sehr kleinen Fragmenten gibt den Ausschlag für den RIN-Wert. Dieser gibt eine Hilfestellung zur Entscheidung ob eine Probe qualitativ rein ist. So gibt der Hersteller

einen Wert von 10 als Indikator für reine, nicht degradierte RNA an. Bei einem Wert von 6 ist eine moderate Degradation beschrieben. Insgesamt beachteten wir ob zwischen den Peaks für 18 und 26 Svedberg signifikante weitere Peaks angezeigt wurden. Die Auswertung wird als Banden und Elektropherogramme angezeigt.

2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (qRT-PCR)

Zum quantitativen Nachweis von mRNA der Transkriptionsfaktoren Snail, Twist und Goosecoid wurde zunächst eine Synthese von zur mRNA komplementärer DNA (cDNA) unter Anwendung der reversen Transkriptase vorgenommen. Der RNA-Strang wurde mittels RNase H abgebaut, der verbleibende DNA-Strang mittels DNA-Polymerase unter Verwendung von Primern zum Doppelstrang komplettiert. Die Amplifizierung spezifischer Gene wurde unter Verwendung von TaqMan-Sonden realisiert. Die Angabe der Quantität wurde mit dem „cycle threshold“ Logarithmus angegeben. Hiermit wird der Zyklus einer PCR beschrieben, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der ΔCt -Wert beschreibt diesen Wert als Abstand zu einem Standard-Vergleichswert. Ein $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert drückt wiederum die Subtraktion des ΔCt des Referenzgens vom ΔCt des Zielgens aus.

Der Fold Change (FC) wird mit folgender Formel errechnet:

$$\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Als House-Keeping-Gene wurde das der Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) als Referenz genutzt. Insgesamt wurde ein mindestens 2x erhöhter FC der Testgruppe Tumor-/nicht karzinogenes Gewebe im Vergleich zur Basisgruppe Tumor-/nicht karzinogenes Gewebe gegen PPIA als Überexpression gewertet.

Zur Amplifizierung der gewonnenen mRNA erfolgte eine Umschreibung in cDNA und die anschließende Analyse mittels qRT-PCR (quantitative Real-Time-PCR) mithilfe von TaqMan-Sonden. Die qRT-PCR wurde im Leibniz-Institut für Arbeitsforschung der Technischen Universität Dortmund, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Jan Hengstler, vorgenommen.

Die Analyse ist mit TaqMan Proben von Applied Biosystems durchgeführt worden (Hs00418279_m1 Human Gsc, Hs00361186_m1 Human Twist, Hs00195591_m1 Human Snail1 Hs99999904_m1 Human PPIA).

2.6 Immunhistochemische Färbung von Goosecoid im HCC

Zur Bestimmung der Proteinexpression von Goosecoid im Lebergewebe wurden Gewebeschnitte angefertigt, die im Anschluss immunhistochemisch gefärbt wurden. Für die Analyse wurden 5 Gewebeprobe von nicht kanzerogenem Gewebe und 8 von Tumorgewebe ausgewählt. Die Gewebe entstammten der Gewebebank im Auftrag der HTCR und waren bei -80°C gelagert worden. Zunächst wurden die Gewebe in Paraffinblöcken fixiert. Daraus wurden $3\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gelegt. Mittels Xylol und Ethanol wurden diese wieder entparaffinisiert und in destilliertem Wasser rehydratisiert. Nun wurden die Antigene demaskiert indem die Schnitte in EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) - Puffer in zwei Schritten erhitzt wurden. Nach Abkühlung erfolgte die Inkubierung mit 3% Hydrogen-Peroxidase in TBS-T (Tris-buffered saline with Tween 20) - Puffer. Dieser Schritt wurde zur Reduzierung unerwünschter Hintergrundfärbung durch Immunkonjugate und endogene Antikörper durchgeführt. Nun wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper gegen Goosecoid (polyklonaler Antikörper (Ab65032) aus Kaninchen) inkubiert. Nach mehreren Wasch-Vorgängen mit Puffer und Wasser wurde die EnVision®- Lösung aufgetragen. Hier ist der Sekundärantikörper mit einem Dextran-Molekül verbunden, das sich durch 3,3'-diaminobenzidine (DAB) färben lässt.

Der Grad der Färbung wurde sowohl qualitativ in vier Gruppen (Intensität der Färbung) als auch quantitativ in fünf Gruppen (Anzahl der angefärbten Zellen) ausgewertet. Diese Auswertung erfolgte für das Cytosol und den Zellkern separat. Danach wurde ein Score gebildet (Intensität x Anzahl) für den Kern und (Intensität x Anzahl) für das Zytosol. Ebenso wurden die Werte für die Cytosol und Zellkern addiert. Die Tumorgewebe wurden von zwei Mitarbeitern der Arbeitsgruppe begutachtet, die nicht karzinogenen Gewebe von einem.

Tab. 5 Abstufung der quantitativen Auswertung für IHC Goosecoid in HCC.

Anzahl der positiv-gefärbten Zellen				
0 bei <10%	1 bei 11-24%	2 bei 25-49%	3 bei 50-74%	4 bei 75-100%

Tab. 6 Abstufung der qualitativen Auswertung für IHC Goosecoid in HCC.

Intensität			
0 bei <0,5	1 bei 0,5-1,49	2 bei 1,5-2,49	3 bei > 2,5

2.7 Statistische Analyse

Alle statistischen Tests wurden mit dem Computerprogramm SPSS Version 23 durchgeführt.

2.7.1 Prüfung Normalverteilung

Um eine Entscheidung treffen zu können, welche statistischen Tests für die Signifikanzprüfungen geeignet sind, wurde zunächst geprüft ob die FC-Werte der Transkriptionsfaktoren normalverteilt sind. Dies wurde in einem Balkendiagramm geschätzt und die Hypothese mittels Kolmogorov-Smirnov-Test abgelehnt.

Verteilen sich Messwerte symmetrisch um einen Mittelwert, beschreibt man die Verteilung der Beobachtungen mit der Varianz als Streuungsmaß. Die Varianz ist umso größer, je weiter die Beobachtungen um den Mittelwert streuen. Je weiter ein erhobener Messwert vom Mittelwert entfernt ist, desto seltener wird dieser bei normalverteilten Stichproben beobachtet. Es entsteht eine Funktion mit einem Glocken-ähnlichen Graphen.

Die Normalverteilung wird durch zwei Parameter bestimmt, den erwarteten Maximalwert μ sowie der Standardabweichung σ , die sich aus der Wurzel der Varianz ergibt. Eine Stichprobe mit Normalverteilung nennt man daher auch parametrisch. (Gabler Wirtschaftslexikon, 2017)

2.7.2 Kolmogorov-Smirnov-Test

Um zu berechnen, ob die Expression der Transkriptionsfaktoren parametrisch verteilt ist, verwendeten wir den Kolmogorov-Smirnov-Test. Dieser verwendet als Prüfgröße den maximalen Abstand zwischen empirischer und hypothetischer Verteilungsfunktion, welche als Nullhypothese eine Normalverteilung annimmt. Der größte Abstand zwischen einer Beobachtung und der bei normalverteilter Stichprobe hypothetisch beobachteten Beobachtung ist d_{\max} . Die Differenzen der Beobachtungen des Werts der Nullhypothese und der empirischen Hypothese werden gemittelt und als Z-Wert angegeben. Der p-Wert ist hier die Wahrscheinlichkeit einem α -Fehler zu unterliegen. In diesem Fall würde eine Normalverteilung im Sinne der Nullhypothese angenommen, obwohl keine vorliegt. Grenzwert für die Beurteilung ist 0,05. Der Kolmogorov-Smirnov-Test benötigt hohe Differenzen um eine Normalverteilung abzulehnen und ist daher robust gegen α -

jedoch anfällig für β -Fehler. Falls das Ergebnis lautet die Nullhypothese anzunehmen, sind daher weitere Tests erforderlich. Diese Teststatistik ist nur bei metrisch skalierten Untersuchungsvariablen exakt, also wie in dieser Arbeit bei rationalen Zahlen mit einem Nullpunkt. (Bortz & Lienert, 2008)

2.7.3 Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben

Nachdem eine nicht-parametrische Verteilung festgestellt wurde, beachteten wir die Verbindung zwischen den Proben zunächst nicht und testeten, ob sich die Beobachtungen aus Tumor- und nicht kanzerogenen Geweben aus einer Grundgesamtheit stammen oder sich signifikant unterscheiden. Für nicht parametrische unverbundene Stichproben muss der Mann-Whitney-U-Test gewählt werden. Die Beobachtungen müssen mindestens ordinalskaliert sein.

Beim Mann-Whitney-U-Test werden metrische Daten durch Ränge ersetzt. Die absoluten Unterschiede zwischen einzelnen Beobachtungen werden nicht berücksichtigt, eine Beobachtung ist also nur kleiner oder größer als eine andere. Weisen zum Beispiel Rang 8 und Rang 9 den gleichen Wert auf, werden beide Ränge gemittelt und bekommen den Rang 8,5 zugewiesen. Diese Ränge werden in zu vergleichenden Gruppen summiert und als Rangsummen angegeben. U gibt an wie viele Permutationen, also Vertauschungen zwischen zwei Variablen, existieren. Sind alle Werte in Stichprobe 1 niedriger als alle Werte in Stichprobe 2, ist U 0. Ist ein Wert in Stichprobe 1 höher als ein Wert in Stichprobe 2, so liegt eine Permutation vor. Sind 10 Werte in Stichprobe 1 höher als in Stichprobe 2, ist U 10. Die vereinfachte Formel lautet für u Gruppe 1 und u' Gruppe 2:

$$u = n_1 n_2 + n_2(n_2 + 1)/2 - r_2$$

$$u' = n_1 n_2 + n_1(n_1 + 1)/2 - r_1$$

n_1 Stichprobengrösse der Gruppe mit der grösseren Rangsumme
 n_2 Stichprobengrösse der Gruppe mit der kleineren Rangsumme
 $r_{1/2}$ grössere der beiden Rangsummen

Bei Stichproben mit mehr als 20 Beobachtungen wird über die Ermittlung eines Z-Werts die zweiseitige Signifikanz errechnet. (Bortz & Lienert, 2008)

2.7.4 Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben

Da den meisten Beobachtungswerten ein korrelierender Wert aus demselben Organ zugewiesen ist, wurde in der Folge der Wilcoxon-Test für nicht parametrische und

verbundene Stichproben angewendet. Auch dieser Test basiert auf Bildung von Rängen. Es wird die Differenz zwischen zugehörigen Beobachtungen, hier Tumorgewebe und nicht kanzerogenes Gewebe, gebildet. Zunächst werden den Absolut-Beträgen Ränge zugeordnet. Die kleinste erhält den Rang 1, die Größte den Rang n. Diese Differenzen ergeben entweder negative oder positive Ränge, je nachdem ob der Wert des Tumorgewebes größer oder kleiner ist als der Wert des Normalgewebes. So werden die Ränge in die Gruppen R^+ und R^- eingeteilt und wie im Mann-Whitney-U-Test Rangsummen gebildet. Die Rang-Werte r^+ und r^- werden summiert und als Rangsumme angegeben. Unterscheidet sich die Rangsummen und somit auch die Anzahl der positiven und negativen Differenzen signifikant, so existiert ein Unterschied zwischen den Beobachtungen der ersten und der zweiten Gruppe. (Bortz & Lienert, 2008)

2.7.5 Chi-Quadrat-Test nach Pearson

Ob die klinisch und histopathologisch ermittelten Daten einen Zusammenhang mit der Expression der Transkriptionsfaktoren aufweisen, wurde mittels des Chi-Quadrat-Test nach Pearson ermittelt. Dieser wird mittels intervallskalierten Variablen durchgeführt. Es werden also kategorisierte Daten verwendet, in dieser Arbeit wurden die Daten in Gruppen von erhöhten oder nicht erhöhten Werten, sowie in Ausprägungsmerkmalen klassiert. Diese werden dann in Kreuztabellen eingetragen. Der Chi-Quadrat-Test berechnet erwartete und beobachtete Häufigkeiten für jede Zelle der entstandenen Kreuztabelle. Die erwarteten Häufigkeiten errechnen sich aus den beobachteten Zellhäufigkeiten und werden in relativer Häufigkeit angegeben. Die relative Häufigkeit für die Zelle ist die Häufigkeit der Beobachtungen der Zeile multipliziert mit der Häufigkeit der Beobachtungen der Spalte geteilt durch die Stichprobengröße. Diese Rechnung wird für jede Zelle der Kreuztabelle durchgeführt. Der Chi-Quadrat-Wert zeigt den Unterschied zwischen den erwarteten Werten der Nullhypothese, aufgrund der die Variablen unabhängig voneinander sind, und den beobachteten Werten an. Dieser lässt sich durch diese Formel berechnen:

$$\chi^2 = \sum (h_{z,s} \times h'_{z,s})/h'_{z,s}$$

h	erwartete Häufigkeit	z	Zeile
h'	beobachtete Häufigkeit	s	Spalte

Um zu ermitteln wie wahrscheinlich ein erhaltener Chi-Quadrat-Wert innerhalb der Nullhypothese ist, wird ein p-Wert berechnet. Liegt dieser unter 5% nimmt man an, dass die Nullhypothese verworfen werden muss. (Bortz & Lienert, 2008)

2.7.6 Korrelationskoeffizient nach Pearson zum Test auf lineare Abhängigkeit

Da die Daten des Tests auf lineare Abhängigkeit zweier Variablen in dieser Arbeit intervallskaliert waren, führten wir die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson durch. Hierbei wird die Abhängigkeit zweier Variablen untersucht, daher ist es ein bivariater Test. Eine lineare Abhängigkeit besteht, wenn die Werte der x-Achse mit denen der y-Achse kovariieren. Positive Kovarianzen sind beispielweise hohe bzw. tiefe Werte der einen Variablen, die bei hohen bzw. tiefen Werten der anderen Variablen auftreten. Eine negative Korrelation bestünde, wenn niedrige Werte mit hohen Werten einhergehen und vice versa. Da der Test ungerichtet ist und daher keine abhängigen Stichproben berücksichtigt ist eine kausale Aussage nicht möglich. Wie weit die Werte um eine ideale Gerade streuen wird mit der Korrelationskoeffizient (r) nach Pearson berechnet.

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

x, y Werte der beiden Variablen x und y
 \bar{x} , \bar{y} Mittelwerte der beiden Variablen x und y
n Stichprobengröße

Die Werte des Korrelationskoeffizienten r kann alle Zahlen zwischen -1 und 1 annehmen. Eine -1 steht für eine perfekte negativ-lineare Korrelation, eine 1 für eine perfekte positive Korrelation. Die Höhe des Wertes entscheidet über die Stärke des Zusammenhangs. Zudem spielt die Stichprobengröße eine Rolle. Je kleiner die Stichprobe ist, desto höhere Korrelationskoeffizienten sind für ein signifikantes Ergebnis nötig. Es wird die Wahrscheinlichkeit getestet, zu wie viel Prozent r nicht gleich 0 ist. (Bortz & Lienert, 2008)

Um zu bestimmen, wie groß der gefundene Zusammenhang ist, kann man sich an der Einteilung von Jacob Cohen orientieren (Cohen, 1988):

$r = 0,10$ entspricht einem schwachen Effekt

$r = 0,30$ entspricht einem mittleren Effekt

$r = 0,50$ entspricht einem starken Effekt

2.7.7 Kaplan-Meier-Überlebenskurven und Log-Rank-Test

Um zu analysieren, ob sich die Überlebensraten zweier Gruppen innerhalb einer Stichprobe unterscheiden, wendeten wir den Kaplan-Meier-Test an. Die Überlebensrate ist der Anteil Überlebender von allen Patienten einer Stichprobe nach einer festgelegten Zeitspanne, auch $S(t)$ genannt.

Die Überlebenszeit eines Individuums ist durch einen Anfangs- und einen Endpunkt festgelegt. In unserem Fall legten wir die Entnahme des Gewebes als Anfangs- und den Todeszeitpunkt als Endpunkt fest. Da kein gemeinsamer Anfangspunkt besteht, werden die Tage zwischen Anfangs- und Endpunkt jeder Beobachtung gezählt. Falls zum Zeitpunkt der Auswertung das Ereignis noch nicht eingetreten ist, wird dieser Wert zensiert und gekennzeichnet. Immer wenn eine Beobachtung nicht zensiert ist, ist ein Patient entweder innerhalb der Zeitspanne bis t oder zwischen t und dem Zeitpunkt der Auswertung verstorben.

Die Werte in Tagen zwischen Entnahme des Gewebes und Versterben werden zwischen 0 und t_n der Größe nach sortiert. In einem Koordinatensystem werden die Ereignisse (Versterben) eingetragen. Die x-Achse zeigt die Zeit in Tagen, die y-Achse die Prozent an allen Patienten der Stichprobe, die zum jeweiligen Zeitpunkt noch leben an.

Um die Überlebensdaten zweier Stichproben zu vergleichen, wendeten wir den Log-Rank-Test an. Falls es keine Unterschiede zwischen dem Gruppenüberleben gibt, ist die Reihenfolge der Ereignisse unabhängig von der Gruppe. Unterscheidet sich das Überleben der Gruppen, treten die Ereignisse der Gruppe mit höherem Überleben später auf als die Ereignisse der Gruppe mit geringerem Überleben. So kann eine Differenz zwischen beobachteten und erwarteten Ereignissen gebildet werden. Hiermit lässt sich mittels Chi-Quadrat-Test eine Signifikanz p errechnen und die Nullhypothese angenommen oder verworfen werden. (Kaplan & Meier, 1958)

2.7.8 Boxplots

Die Darstellung von Werten in einem Boxplot-Diagramm erfolgt unter Zuhilfenahme einiger robuster Kennzahlen der Stichprobe. Das untere Quartil Q_1 hat die Eigenschaft, dass mindestens 25% aller Datenwerte kleiner oder gleich Q_1 und mindestens 75% aller Datenwerte größer oder gleich Q_1 sind.

Der Median ist der Zentralwert der Daten. Mindestens 50% aller Datenwerte sind kleiner oder gleich dem Median, 50% aller Datenwerte sind größer oder gleich dem Median. Mindestens 75% aller Datenwerte sind kleiner oder gleich Q_3 und mindestens 25% aller Datenwerte sind größer oder gleich Q_3 . Maximum und Minimum werden mittels „Whiskers“ dargestellt. (Dalglishi, 2013)

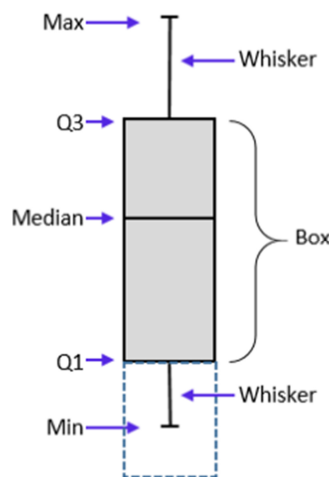


Abb. 3 Boxplot als schematische Darstellung mit Beschriftung wie in Text beschrieben (Dalglishi, 2013).

2.8 Material

Tab. 7 Verwendete Geräte sowie Reagenzien mit Herstellernachweis.

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
BioPhotometer	Eppendorf
gentleMacs TM Homogenisator	Miltenyi Biotec
M-Tubes	Miltenyi Biotec
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Chip-Priming-Station	Agilent Technologies
RNA 6000 LabChip®	Agilent Technologies
Vortex Mixer Model MS2-S8/MS2-S9	IKA Labortechnik
Reagenz	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Ethanol 100%	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
RNase Away	Molecular BioProducts
RNAlater	Ambion
RNeasy Maxi Kit	Qiagen
RNase Free-DNase Set	Qiagen
Dako REAL EnVision Detection System	Dako
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix	Agilent Technologies
Agilent RNA Nano Dye Concentrate	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Chip	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Ladder	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Marker	Agilent Technologies

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Vorarbeit im Mausmodell *in vivo* und *in vitro*

In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Dr. Hengstler (IfADo Leibniz-Institut Dortmund) wurde zunächst *in vitro* die Induzierbarkeit der Expression des mesenchymalen EMT-Markers Goosecoid analysiert. Dann wurde *in vivo* die Expression von Goosecoid im Mausmodell nach Leberschädigung untersucht.

Kultivierte Maushepatozyten wurden täglich mit Human Growth Factor (HGF) und Insulin versetzt (HGF 20ng/ml, Insulin 100nM). Die qPCR-Analyse von Goosecoid erfolgte unter Standardbedingungen. Es gelang eine erhöhte Expression von Goosecoid an den ersten beiden Tagen nachzuweisen, danach nivellierten sich die Ergebnisse der Negativkontrolle und der Kultur mit HGF-Behandlung. Es konnte eine Reaktion der Zellen auf Induktion in den ersten Tagen sowie Normalisierung der Expression im Verlauf gezeigt werden (Fig. 2).

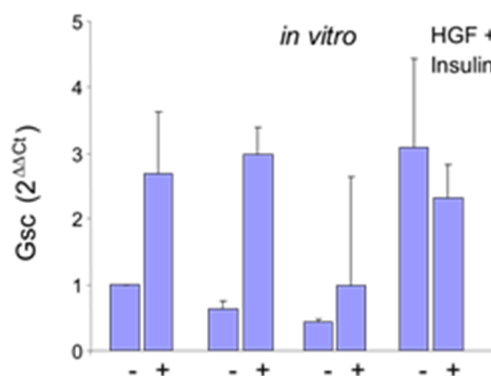


Fig. 1 Expression von Goosecoid-mRNA durch Insulin und HGF im Proliferationsmodell.

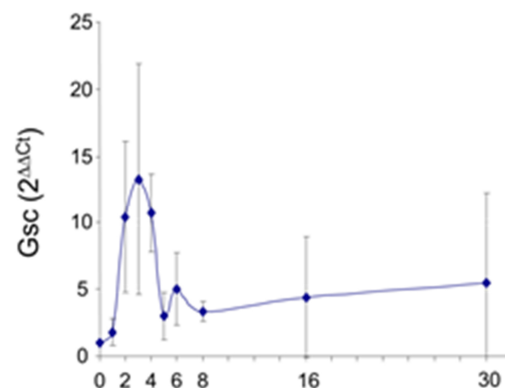


Fig. 2 Expression von Goosecoid-mRNA nach Leberschädigung mit CCl₄ im Mausmodell.

Daraufhin wurde die Expression von Goosecoid nach Leberschädigung mit intraperitonealer CCl₄-Injektion im Mausmodell analysiert. Die qPCR-Analyse von Goosecoid im Lebergewebe erfolgte nach einmaliger Gabe von CCl₄ (1,6g/kg, 3 Mäuse pro Zeitpunkt). Die Goosecoid-mRNA-Expression stieg bis zum dritten Tag auf ein Maximum an und fiel danach wieder ab (Fig. 3).

3.2 Epidemiologie und humanes Gewebe

Zur näheren Betrachtung der humanen Gewebe wurden Daten zur Altersstruktur, zu Ätiologie und zu Risikofaktoren der Patienten erhoben. Insgesamt waren 79,2% der Patienten männlich und 21,8% weiblich. Zwar war 2013 für Männer gegenüber Frauen in Deutschland eine doppelt so hohe Inzidenz ein HCC zu entwickeln gemessen worden. Für Süd-Deutschland konnte eine Arbeit von Kirchner et al. allerdings ein ähnliches Verhältnis von 4:1 veröffentlicht werden. Lediglich vier der von uns untersuchten Patienten waren nicht in Bayern oder Baden-Württemberg wohnhaft, sodass wir unsere Patienten-Gruppe diesbezüglich für repräsentativ halten.

Die Altersstruktur der Stichprobe ergibt ein Minimum von 20 und ein Maximum von 85 Jahren. Der 20 Jahre alte Patient zeigte in der histopathologischen Untersuchung ein fibrolamelläres HCC, eine besonders frühe Manifestation ist typisch für diese Form. Im arithmetischen Mittel lag das Alter bei 62,25, im Median bei 62,5 Jahren.

Die Grunderkrankung ist nicht bei allen Patienten in den archivierten Unterlagen dokumentiert. In 25,6% der Fälle ist ein regelmäßiger Alkoholkonsum mit fortgeschrittener Fibrose oder Zirrhose assoziiert. In lediglich 11,2% der Patienten war eine chronische Hepatitis B oder C diagnostiziert. 5 Patienten zeigten in der histopathologischen Gewebediagnose eine Hämochromatose (0,4%). Die Gewebediagnosen ergaben 55 Zirrhosen, 15 Fibrosen, 5 Hämochromatosen und 55 Normalgewebe.

Tumor- und nicht kanzerogenes Gewebe sind Begriffe, die einer engeren Definition bedürfen. Wird ein Patient aufgrund eines HCC einer (Hemi-)Hepatektomie unterzogen, gelangte das anfallende Gewebe zur weiteren Diagnostik in die Pathologie. Nachdem das Gewebe makroskopisch beurteilt wurde, sind durch den Pathologen Gewebeportionen in Eppendorf Cups mit und ohne RNase schützende Lösung verteilt worden. Die Entscheidung, ob es sich um Tumor- oder nicht kanzerogenes Gewebe handelt, erfolgte mikroskopisch. Das Tumorgewebe entstammt einem eindeutig zuzuordnenden Gewebeteilstück, das nicht kanzerogene Gewebe entstammt aus möglichst Tumor-fernem, nicht befallenem Gewebe. Der Begriff Normalgewebe würde implizieren, dass es sich hierbei um gesundes Gewebe handelt. Daher wird im Folgenden der Begriff „nicht karzinogenes Gewebe“

verwendet. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich um fibrotisches, zirrhotisches oder entzündetes Gewebe handelt.

Insgesamt liegt eine homogene Gruppe der Patienten mit Indikation zur (Hemi-) Hepatektomie vor. Bezüglich des Staging und Grading zeigt sich diese Homogenität am deutlichsten. Laut Empfehlung ist eine Resektion maximal bei drei Herden indiziert, bei dem keiner der Herde über 3cm im Durchschnitt messen soll. Für die Indikationsstellung und OP-Planung ist auch von Bedeutung, ob ein funktionell ausreichender Teil belassen werden kann und ob eine Gefäßinvasion stattgefunden hat. Ist ein HCC gesichert und weist einen Phänotyp innerhalb der Mailand-Kriterien (ein Herd < 5cm, maximal 3 Herde < 3cm) auf, besteht die Indikation zur Lebertransplantation. Somit fallen die meisten Patienten unter diese Kriterien. Die gering differenzierten HCC (G3) sind deutlich unterrepräsentiert. Kein entdifferenziertes HCC (G4) konnte eingeschlossen werden. Auch ein in die großen Gefäße der Leber oder über die Leber hinaus gewachsenes HCC (T4) ist nur zweifach repräsentiert.

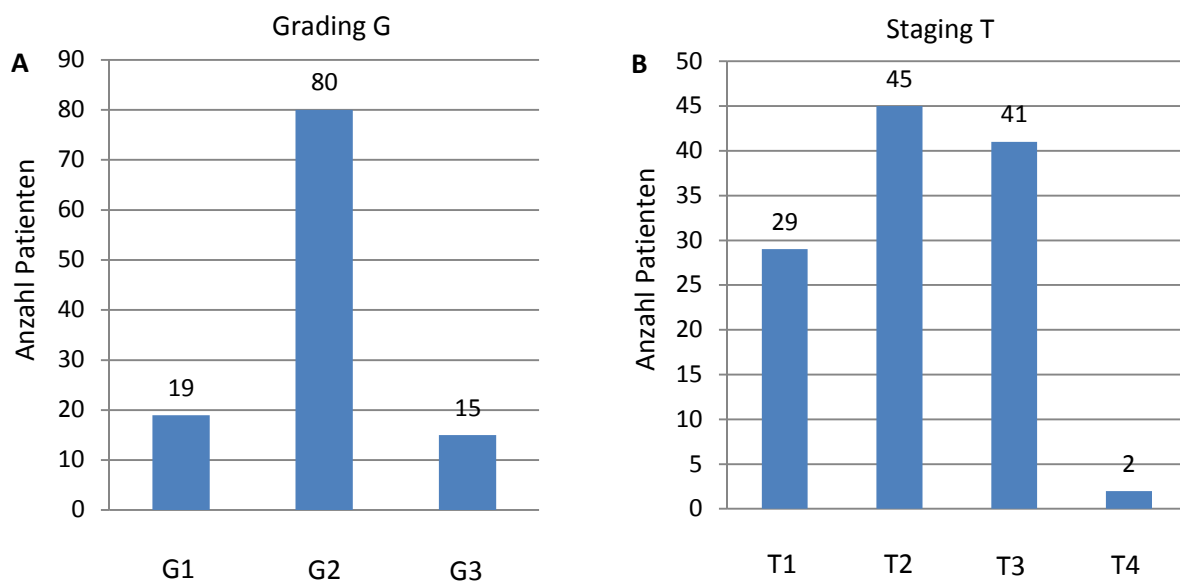


Fig. 3 A/B **A** Hochgradig differenzierte HCC sind unterrepräsentiert. 15 Gewebe von 114 wurden G3 klassifiziert. **B** Hochgradig invasiv klassifizierte HCC sind unterrepräsentiert. 2 von 117 HCC sind T4 klassifiziert.

3.3 Genexpressionsanalyse

Um zu bestimmen, ob die Genexpressionslevel der mesenchymalen Marker Snail, Twist und Goosecoid jeweils in Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe differenziell sind, wurde aus 87 Tumorgeweben und korrespondierenden nicht karzinogenen Geweben mRNA isoliert und die Expression mittels des Mann-Whitney-U-Tests für nicht verbundene Stichproben und des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben bewertet. In die Teststatistik des Mann-Whitney-U-Tests wurde ein Normalgewebe ohne korrespondierendes Tumorgewebe eingeschlossen. Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden in $\Delta\Delta Ct$ Werten als relativer Wert zum Housekeeping-Gen ermittelt und in Fold change umgerechnet (siehe 2.2.4). Die Signifikanzanalyse hinsichtlich der klinischen Daten, histopathologischen Beurteilungen und Laborwerten wurden mittels Kreuztabellen und dem Pearson's Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Jede Variable wurde jeweils mit der hohen/niedrigen Expression ($>2x$ / $<2x$) des Transkriptionsfaktors und der relativ erhöhten Expression im Vergleich zum korrespondierenden Gewebe (erhöht bei mindestens 2x erhöhter Expression im Vergleich zum korrespondierenden Gewebe) analysiert. Die Signifikanz wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ermittelt, wobei $p \leq 0,05$ akzeptiert wurde.

3.3.1 Nachweis einer nichtparametrischen Verteilung

Die Entscheidung für einen Signifikanztest zur Ermittlung von Unterschieden bezüglich der Genexpression setzt eine Prüfung der Normalverteilung voraus. Dies wurde zunächst anhand von Balkendiagrammen abgeschätzt (Fig. 3), dann mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Testes geschätzt.

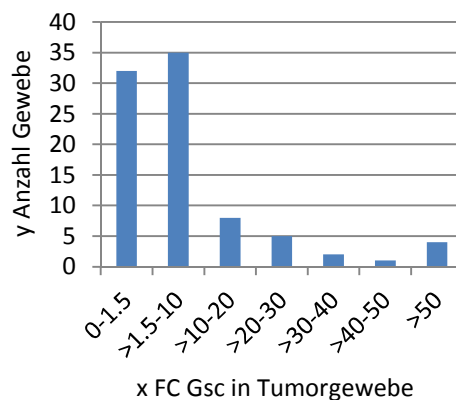


Fig. 4 Beispiel-Diagramm für x Anzahl Gewebe und y Fold Change (FC) von Goosecoid im Tumorgewebe.

Tab. 8 Testung der Hypothese, dass die Verteilung nicht parametrisch ist. Anhand des Kolmogorov-Smirnov-Test für einzelne Stichproben wird die Hypothese auf der Grundlage der Signifikanz auf 0,001-Ebene als wahr angenommen.

	Snail N	Snail T	Twist N	Twist T	Gsc N	Gsc T
n	88	87	88	87	88	87
K-S-Z	2,013	2,136	2,453	3,048	2,889	3,569
p	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Aufgrund der nichtparametrischen Verteilung muss für unverbundene Stichproben der Mann-Whitney-U-Test, für verbundene Stichproben der Wilcoxon-Test angewendet werden.

Um die Verteilung der Expressionslevel zu analysieren ermittelten wir trotz der nicht parametrischen Verteilung Mittelwert, Standardfehler des Mittelwertes (SE), Standardabweichung (SD), Varianz, Spannweite, Minimum und Maximum.

Tab. 9 Analyse der Verteilung der Expressionslevel für Snail, Twist und Goosecoid in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe.

Variable	N	Mittelwert/SE	SD	Varianz	Spannweite	Minimum	Maximum
Snail N	88	1,12/0,13	1,24	1,55	6,89	0	6,89
Snail T	87	0,59/0,08	0,7	0,49	3,04	0	3,04
Twist N	88	2,64/0,44	4,12	17,01	31,31	0	31,31
Twist T	87	5,08/1,21	11,32	128,11	60,64	0	60,64
Gsc N	88	2,75/0,59	5,49	30,12	34,01	0	34,01
Gsc T	87	14,95/5,37	50,07	2507,21	392,38	0	392,38

3.3.2 Erhöhte Expression von Snail-mRNA in nicht karzinogenem Gewebe und Goosecoid-mRNA in Tumorgewebe

Wir verglichen zunächst alle Werte der nicht karzinogenen Gewebe mit denen der Tumorgewebe. Wir wendeten daher den Mann-Whitney-U Test an und errechneten die Rangsummen. Hier zeigte sich eine signifikante Überexpression von Goosecoid im Tumorgewebe sowie von Snail in nicht karzinogenem Gewebe (siehe Fig. 4/5 und Tab. 11).

Da jedem nicht karzinogenen Gewebe Tumorgewebe aus demselben Patienten zugeordnet werden konnte, kam auch der Wilcoxon-Test für gepaarte Proben zur Anwendung. Die Expression ist ebenfalls für Snail in nicht karzinogenem Gewebe sowie Goosecoid im Tumorgewebe erhöht (siehe Tab. 12).

Goosecoid im Tumorgewebe ist in 68,67% der Paare im Tumorgewebe erhöht gegenüber dem makroskopisch nicht befallenen Gewebe exprimiert. In 57,63% der Paare ist Snail in nicht karzinogenem Gewebe im Vergleich zum Tumorgewebe erhöht exprimiert. Der Mann-Whitney-U- sowie Wilcoxon-Test zeigten für die Expression von Twist keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 10 Vergleich der mRNA-Expression im nicht karzinogenen Gewebe (N) und Tumorgewebe (T) aller Proben mittels Mann-Whitney-U-Test (ungepaart).

	N	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
Snail N	88	104,72	9215,5	< 0,001
Snail T	87	71,09	6184,5	
Twist N	88	93,58	8258,5	0,125
Twist T	87	82,09	7141,5	
Gsc N	88	69,57	6122,0	< 0,001
Gsc T	87	106,64	9278,0	

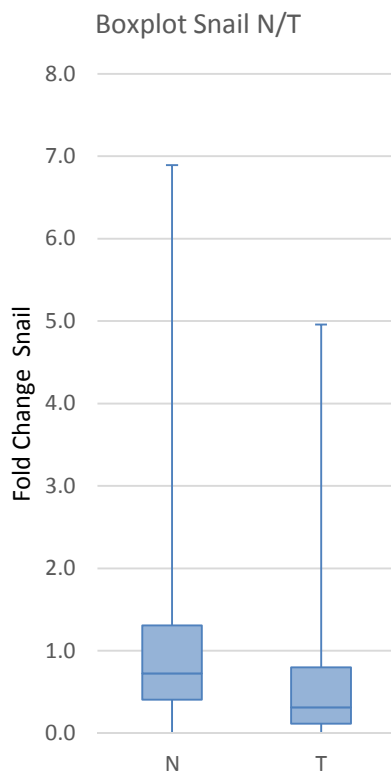


Fig. 5 Goosecoid ist in HCC-Gewebe im Vergleich zu nicht karzinogenem Gewebe erhöht exprimiert. 88 Tumorgewebe (T) und 87 nicht karzinogene Gewebe (N) sind unverbunden in Boxplots dargestellt.

Tab. 11 Eckdaten der Boxplots aus Fig. 5 für Fold Change Snail in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).

Fold Change Gsc	N	T
Minimum	0,0	0,0
Q ₁	0,2	1,0
Median	0,9	2,6
Q ₃	2,6	8,5
Maximum	34,0	392,4

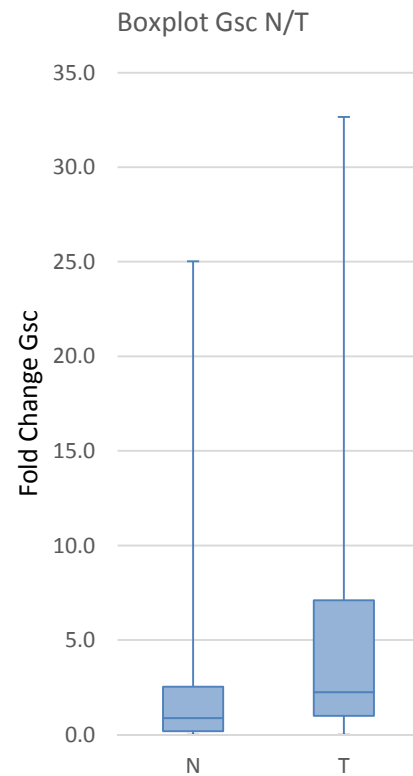


Fig. 6 Snail ist in nicht karzinogenem Gewebe im Vergleich zum Tumorgewebe erhöht exprimiert. 88 Tumorgewebe (T) und 87 nicht karzinogene Gewebe (N) sind unverbunden in Boxplots dargestellt.

Tab. 12 Eckdaten der Boxplots aus Fig. 6 für Fold Change Goosecoid in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).

Fold Change Snail	N	T
Minimum	0,0	0,0
Q ₁	0,4	0,1
Median	0,7	0,3
Q ₃	1,3	0,8
Maximum	6,9	5,0

Tab. 13 Vergleich der mRNA-Expression aller Proben mittels Wilcoxon-Test (gepaart). T: Tumorgewebe; N: nicht karzinogenes Gewebe.

Getestetes Paar	N	%	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
Gsc T - Gsc N	83				
Negative Ränge	11	13,25	34,5	379,5	
Positive Ränge	57	68,67	34,5	1966,5	
Bindungen	15	18,07			< 0,001
Twist T - Twist N	83				
Negative Ränge	35	42,17	31,5	1102,5	
Positive Ränge	27	32,5	31,5	850,5	
Bindungen	21	25,3			0,310
Snail T - Snail N	84				
Negative Ränge	47	57,63	29,0	1363,0	
Positive Ränge	10	11,90	29,0	290,0	
Bindungen	27	32,14			<0,001

3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Goosecoid in Tumor- gegenüber nicht karzinogenem Gewebe

Wir konnten zeigen, dass die mRNA-Expression von Goosecoid im Tumorgewebe im Vergleich zum nicht karzinogenen Gewebe erhöht ist. Daher wählten wir exemplarisch 13 Proben von Patienten aus, um zu überprüfen, ob die Expression der mRNA mit der Expression und nukleären Lokalisation von Goosecoid korreliert. Zunächst wurden mehrere Gewebeschnitte als Negativkontrolle mit einem isotypischen IgG-Antikörper inkubiert. Hierbei zeigte sich keine Immunreaktivität.

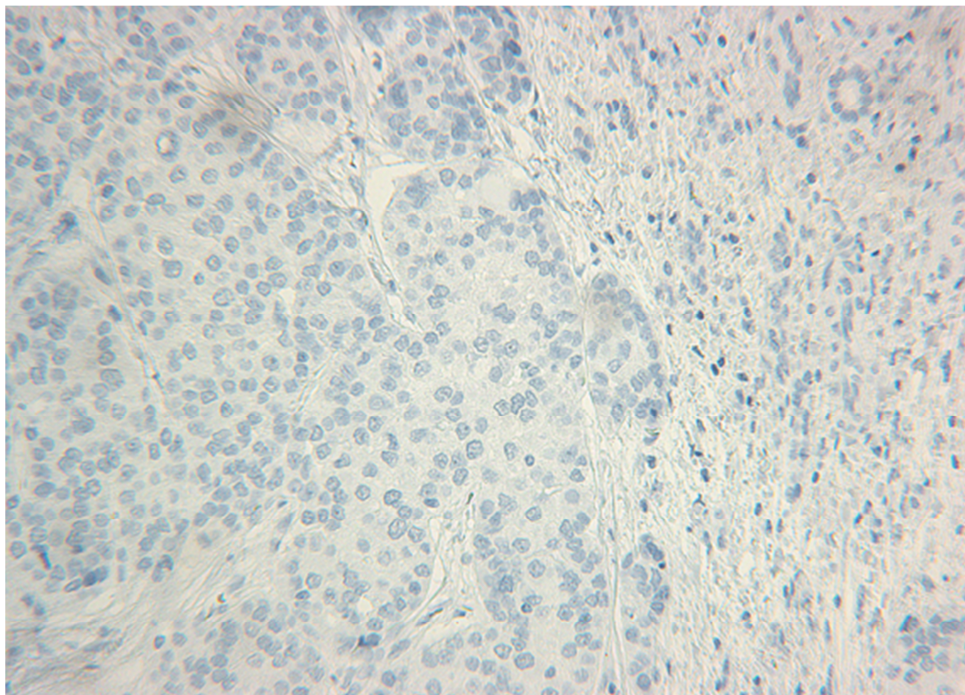


Abb. 4 Negativkontrolle eines Tumorgewebes. Parenchym- wie auch Epithelzellen zeigen ohne Antikörperfärbung keine Reaktion.

Bei der immunhistologischen Analyse wurde die Expression von Goosecoid im Cytosol und Zellkern analysiert. Die immunhistologische Auswertung ist in Tab. 12 aufgeführt. Es wurden sowohl die Intensität als auch die Anzahl positiver Zellen mit Immunreaktivität im Zytosol und Nukleus ausgewertet. Um die Lokalisation des Transkriptionsfaktors Goosecoid in Zellen darzustellen, wurden Lebergewebeproben immunhistochemisch gefärbt (siehe 2.5). Im nicht karzinogenen Gewebe zeigte sich lediglich eine schwache Färbung im Zytosol und Nukleus einiger Hepatozyten, jedoch keine Färbung in Epithelzellen der Gallenwege oder Blutgefäße. Im korrespondierenden Tumorgewebe erwarteten wir eine Farbreaktion, wo Goosecoid als Transkriptionsfaktor nach Synthese am endoplasmatischen Retikulum nach

Translokation im Nukleus die Transkription regulieren kann. Nach Inkubation mit Antikörper und Farbentwicklung zeigt sich hier eine deutliche Reaktion in Zellen entarteter Hepatozyten, nicht jedoch in Endothelzellen der Blutgefäße oder Gallengangszellen. Analog zur Analyse der mRNA-Expression von lässt sich eine stärkere Färbung von Goosecoid-Protein im Tumorgewebe nachweisen. Der addierte Score der Färbung von Cytosol und Nucleus ($(\text{Intensität} \times \text{Anzahl})_{\text{Cytosol}} + (\text{Intensität} \times \text{Anzahl})_{\text{Nucleus}}$) ergab für Tumorgewebe im Median 4,5, im Normalgewebe 2,0.

Tab. 14 Ergebnisse der Auswertung der immunhistochemischen Färbung von nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T) mit den zugehörigen Fold Change-Werten der mRNA-Expression von Goosecoid (FC-Gsc).

Ausprägung Gewebe	Iso- Nr.	FC- Gsc	Auswertung		
			Cytosol	Kern	addiert
N	372		0	0	0
N	377		0	1	1
N	380		0	2	2
N	516		4	0	4
N	520		4	1	5
T	1125	13,15	3	0,5	3,5
T	1093	69,23	4	1	5
T	1063	32,65	3,5	3	6,5
T	1061	20,18	3	2	5
T	1055	24,89	3	1	4
T	1053	23,35	3	0,5	3,5
T	1051	14,83	2	1	3
T	1042	71,92	4	2,5	6,5

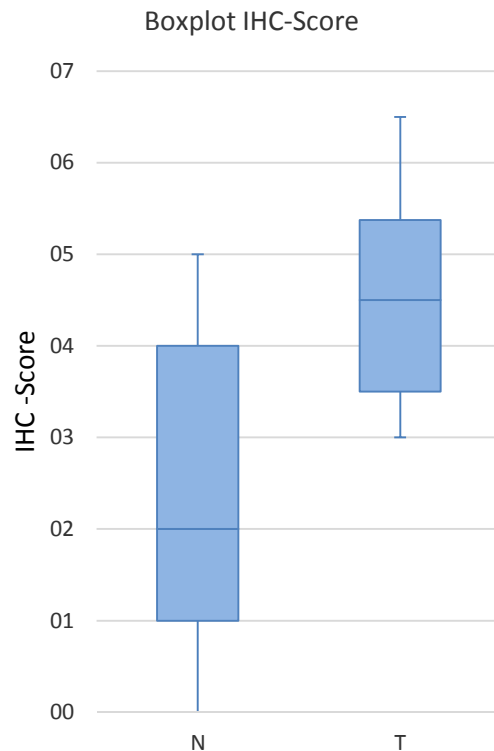


Fig. 7 Addierter IHC-Score (Nukleus und Zytosol) in 5 nicht kanzerogenen Geweben und 8 Tumorgeweben. HCC-Gewebe zeigt eine tendenziell stärkere Färbung.

Tab. 15 Eckdaten der Boxplots für IHC - Score in nicht kanzerogenem Gewebe und Tumorgewebe.

IHC-Score Summe	N	T
Minimum	0,0	3,0
Q1	1,0	3,5
Median	2,0	4,5
Q3	4,0	5,4
Maximum	5,0	6,5

Der Zusammenhang der Expression für Goosecoid im Tumorgewebe und den addierten IHC-Intensität/Quantität-Score-Werten für Nukleus und Zytosol ist tendenziell positiv linear. Zwar zeigt die Signifikanz lediglich einen Wert von 0,1, dies erscheint aufgrund der kleinen Stichprobe jedoch ausreichend um eine Abhängigkeit zu vermuten. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient zeigt nach Cohen einen starken positiven Zusammenhang mit einem Wert von 0,66 (Cohen, 1988). Einen Wert (Iso-Nr. 1055: FC 248.89; addierter Score 4) ließen wir als Extremwert für die Korrelation nach Pearson außer Acht.

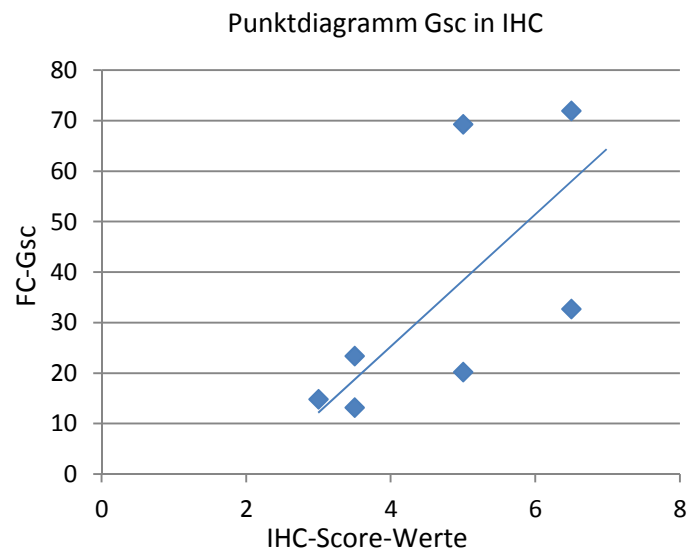


Fig. 8 Punktdiagramm zur Darstellung eines linearen Zusammenhangs der addierten IHC-Score-Werte (Nukleus und Zytosol) mit der Auswertung für Goosecoid (Gsc) im Tumorgewebe und den FC-Werten für Gsc der qRT-PCR.

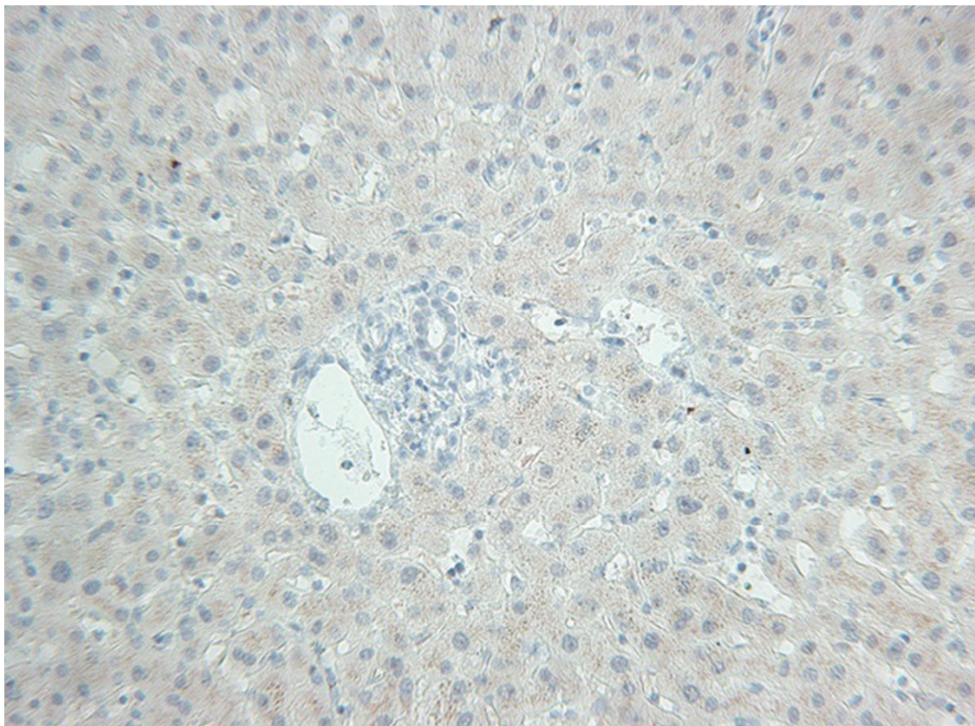


Abb. 5 Nicht karzinogenes Gewebe nach Inkubation mit Antikörper und Färbung. Keine signifikante Farbreaktion.

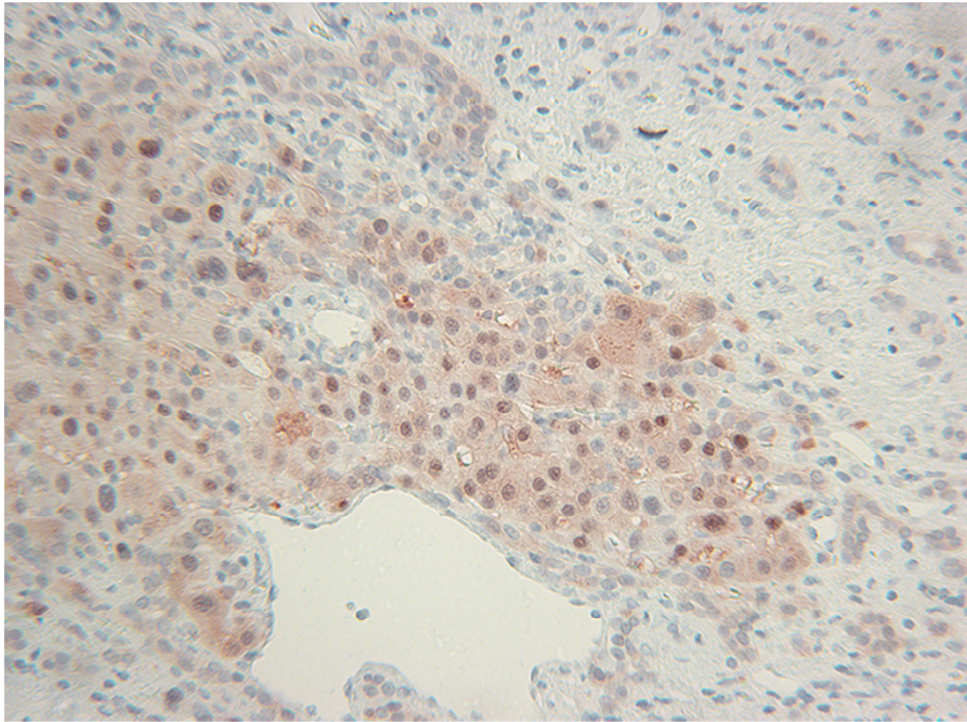


Abb. 6 Korrespondierendes Tumorgewebe nach Inkubation mit Antikörper und Färbung. Deutliche Farbreaktion, in diesem Schnitt maßgeblich in den Zellkernen von Hepatozyten.

Da die Daten nicht parametrisch verteilt sind, wurde trotz der kleinen Stichproben eine statistische Auswertung die Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Wir verwendeten hierfür nur die Auswertung eines Mitarbeiters. Hier zeigte sich eine starke Tendenz für eine stärkere Färbung in Tumorgeweben im Vergleich zu nicht karzinogenen Geweben. Die Einzelkomponenten Zytosol und Nucleus zeigten keine Tendenz zu einer stärkeren Färbung in einer der beiden Gruppen.

Tab. 16 Statistische Analyse des IHC-Intensität/Quantität-Score in nicht karzinogenem Gewebe gegen Tumorgewebe mittels Mann-Whitney-U-Test.

Mann-Whitney-U	Cytosol	Nucleus	Summe
U-Wert	13,0	16,5	9,0
Z-Wert	0,95	0,44	1,54
Signifikanz p	0,17	0,33	0,06

3.4 Analysen der histologischen und klinischen Parameter

3.4.1 Erhöhte Expression von Goosecoid im Tumorgewebe großer HCC

Wir konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von Goosecoid im Tumorgewebe mit einem erhöhten Tumordurchmesser einhergeht ($p=0,017$). Als Grenze zwischen einem großen und einem kleinen Tumor wurde $\leq/ > 5\text{cm}$ gewählt, da diese sich auch in der TNM-Klassifikation für das HCC, sowie in den Mailand-Kriterien für eine Lebertransplantation beim HCC wiederfindet. Eine erhöhte Expression ist bei einem 2-fach erhöhten FC-Wert im Tumorgewebe im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben akzeptiert (Tab. 13). Das Säulendiagramm zeigt die Anzahl von Tumorgeweben mit niedriger oder hoher Expression von Goosecoid bei $\leq/ > 5\text{cm}$ Tumordurchmesser (Fig. 8).

Tab. 17 Kreuztabelle Häufigkeiten Tumorgröße ($\leq/ > 5\text{cm}$) bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).

Variable	Klassierung	n	%	Gsc N			Gsc T		
				\leq	$>$	p	\leq	$>$	p
Tumorgröße		74							
	$\leq 5\text{ cm}$	33	44,59	25	8		15	18	
	$> 5\text{ cm}$	41	55,41	38	3	0,042	8	33	0,017

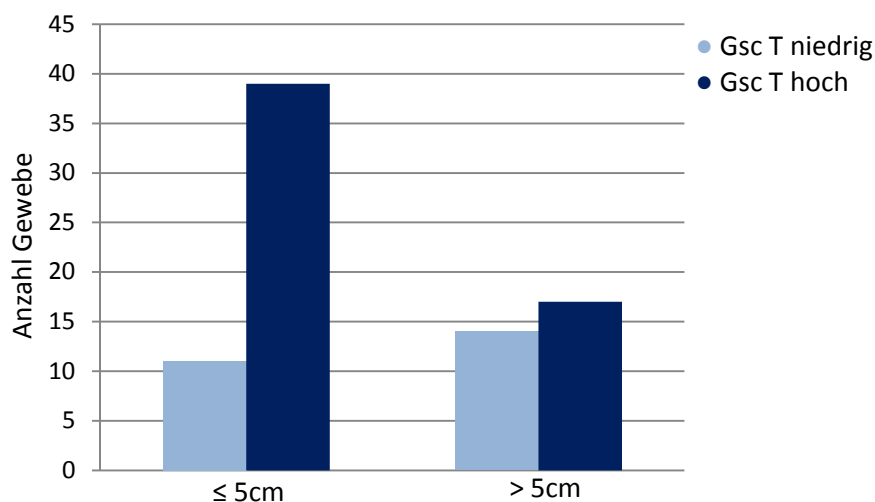


Fig. 9 Expression von Goosecoid im Tumorgewebe bei Tumordurchmesser von $\leq/ > 5\text{cm}$. 33 HCC Primärtumore $\leq 5\text{cm}$, 41 $> 5\text{cm}$ im Säulendiagramm.

3.4.2 Erhöhte Expression von Goosecoid im Tumorgewebe unifokaler HCC

Die Expression des mesenchymalen Markers Goosecoid ist im Tumorgewebe im Vergleich zum nicht karzinogenen Gewebe erhöht. Dies trifft besonders für unifokale, intrahepatisch nicht metastasierende Gewebe zu. Solitäre Tumore werden signifikant öfter beobachtet, wenn Goosecoid im Vergleich zum nicht karzinogenen Gewebe erhöht exprimiert wird ($p=0,028$).

In nicht kanzerogenem Gewebe wird eine Überexpression von Goosecoid im Vergleich zum korrespondierenden Tumorgewebe signifikant öfter bei multifokalen HCC beobachtet ($p=0,011$).

Tab. 18 Kreuztabelle Häufigkeiten unifokaler und multifokaler HCC bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe im Vergleich zu korrespondierendem Gewebe.

Variable	Klassierung	n	%	Gsc N			Gsc T		
				≤	>	p	≤	>	p
Herde		81							
	solitär	50	61,73	47	3		11	39	
	multifokal	31	38,27	23	8	0,011	14	17	0,028

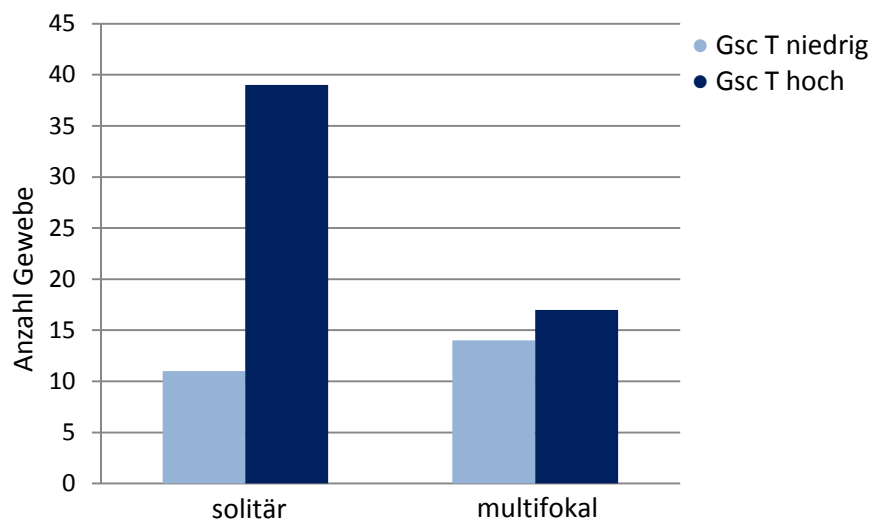


Fig. 10 Häufigkeiten unifokaler und multifokaler HCC bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in Tumorgewebe im Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe.

Da die Anzahl der nicht kanzerogenen Gewebe mit erhöhter Goosecoid-Expression klein ist ($n=11$), verglichen wir die Mittelwerte der FC-Werte von Goosecoid in nicht kanzerogenem Gewebe und Tumorgewebe bei solitärer und multifokaler Ausprägung

(Fig. 6/7). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Expression in nicht kanzerogenem Gewebe zwischen uni- und multifokalen HCC in Tumorgewebe, sodass wir eine erhöhte Expression von Goosecoid in Tumorgewebe von solitären HCC konstatieren. Lediglich eine Tendenz zeigt sich für höhere FC-Werte in nicht kanzerogenem Gewebe bei multifokaler Ausprägung.

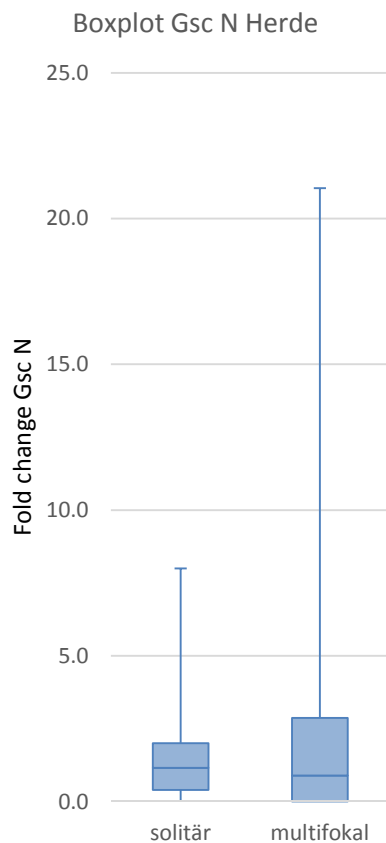


Fig. 11 Expression von Goosecoid im nicht kanzerogenen Gewebe bei solitären und multifokalen HCC. 50 HCC waren unifokal, 31 multifokal.

Tab. 19 Eckdaten der Boxplots aus Fig. 8 für FC Gsc in nicht kanzerogenem Gewebe aus solitären und multifokalen HCC.

FC Gsc N	solitär	multifokal
Minimum	0,0	0,0
Q1	0,4	0,0
Median	1,2	0,9
Q3	2,0	2,9
Maximum	8,0	21,0

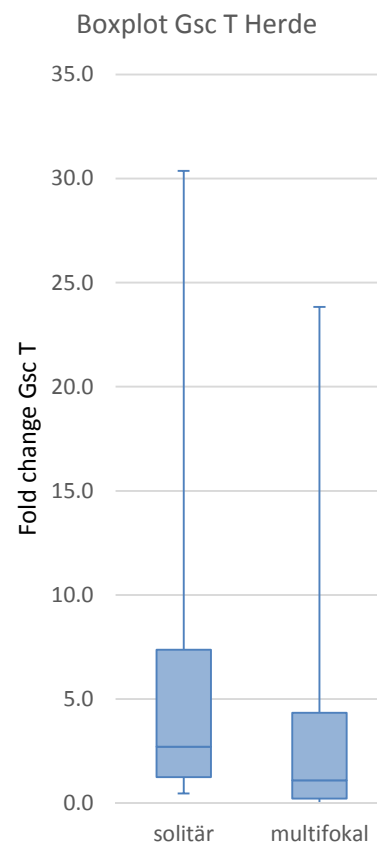


Fig. 12 Expression von Goosecoid im Tumorgewebe bei unifokalen oder multifokalen HCC. 50 HCC waren unifokal, 31 multifokal.

Tab. 20 Eckdaten der Boxplots aus Fig. 9 für FC Gsc in Tumorgewebe aus solitären und multifokalen HCC.

FC Gsc T	solitär	multifokal
Minimum	0,5	0,0
Q1	1,3	0,2
Median	2,7	1,1
Q3	7,4	4,3
Maximum	30,4	23,8

3.4.3 Erhöhte Expression von Snail im nicht karzinogenen Gewebe multifokaler HCC

Während Goosecoid im Tumorgewebe solitärer Ausprägung erhöht exprimiert wird, zeigt sich dies für Snail im nicht karzinogenen Gewebe multifokaler HCC. Während das Verhältnis in solitärer Ausprägung noch ausgeglichen ist, verschiebt sich die Expression in nicht karzinogenem Gewebe signifikant zugunsten der multifokalen Ausprägung. Dargestellt ist zunächst die Kreuztabelle für Snail in nicht kanzerogenem Gewebe und Tumorgewebe (Tab. 13). Die hohe bzw. niedrige Snail-Expression in nicht kanzerogenem Gewebe im Vergleich zum Tumorgewebe ist für solitäre und multifokale HCC im Säulendiagramm verdeutlicht.

Tab. 21 Kreuztabelle Häufigkeiten Tumorgöße (\leq / $>$ 5cm) bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T) im Vergleich zum korrespondierenden Gewebe.

Variable	Klassierung	n	%	Snail N			Snail T		
				\leq	$>$	p	\leq	$>$	p
Herde		82							
	solitär	50	60,98	27	23		43	7	
	multifokal	32	39,02	10	22	0,043	29	3	0,532

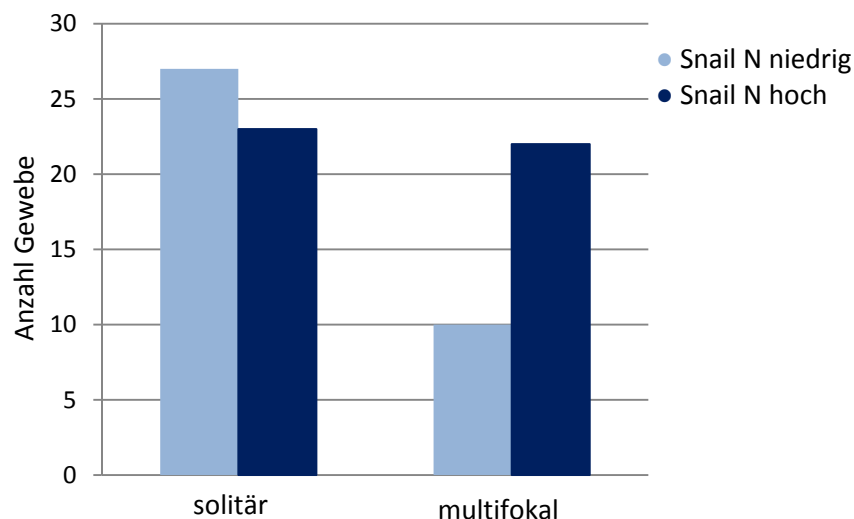


Fig. 13 Häufigkeiten von solitär und multifokal ausgeprägten Tumorgeweben bei hoher/niedriger Expression von Snail in nicht karzinogenem Gewebe im Vergleich zum korrespondierenden Tumorgewebe.

Auch können wir zeigen, dass eine erhöhte Expression von Goosecoid im Tumorgewebe mit einem erhöhten Tumordurchmesser einhergehen ($p=0,017$). Als

Grenze zwischen einem großen und einem kleinen Tumor wurde $\leq/ >$ 5cm gewählt, da diese sich auch in der TNM-Klassifikation für das HCC sowie in den Mailand-Kriterien für eine Lebertransplantation bei HCC wiederfindet. Eine erhöhte Expression ist bei einem 2-fach erhöhten FC-Wert im Tumorgewebe im Vergleich zum korrespondierenden nicht karzinogenen Gewebe akzeptiert (Tab. 13). Das Säulendiagramm zeigt die Anzahl von Tumorgeweben mit niedriger oder hoher Expression von Goosecoid bei $\leq/ >$ 5cm Tumordurchmesser (Fig. 8).

Tab. 22 Kreuztabelle Häufigkeiten Tumorgöße ($\leq/ >$ 5cm) bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).

Variable	Klassierung	n	%	Gsc N		p	Gsc T		
				\leq	$>$		\leq	$>$	p
Tumorgöße		74							
	\leq 5 cm	33	44,59	25	8		15	18	
	$>$ 5 cm	41	55,41	38	3	0,042	8	33	0,017

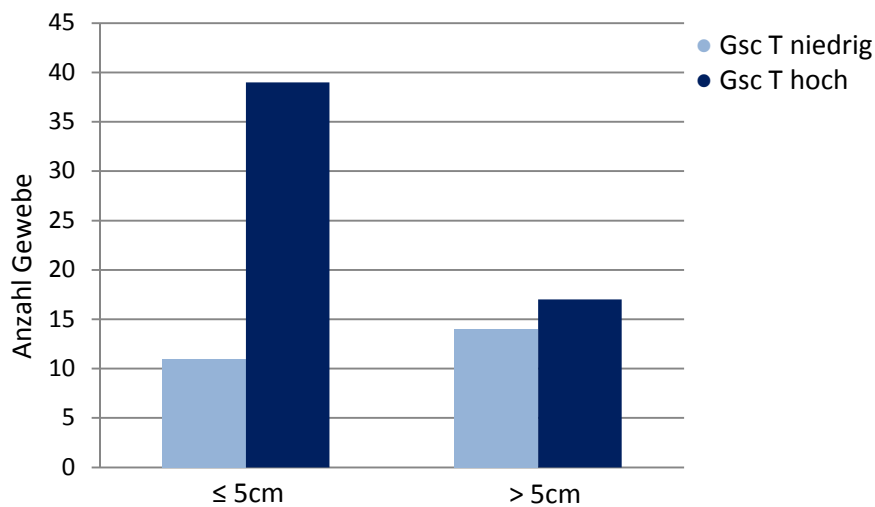


Fig. 14 Expression von Goosecoid im Tumorgewebe (T) bei Tumordurchmesser von $\leq/ >$ 5cm. 33 HCC Primärtumore \leq 5cm, 41 $>$ 5cm im Säulendiagramm.

3.4.4 Analyse der Korrelation von mRNA-Expression der EMT-Marker mit Staging und Grading

Es wurden Kreuztabellen für erhöhte/erniedrigte EMT-Marker im Vergleich zum korrespondierenden Gewebe angefertigt, die Staging und Grading Klassifikationen wurden unterschiedlich klassiert. Für die Expression der EMT-Marker Snail, Twist und Gooseoid ergibt sich keine signifikante Korrelation zur Klassifikation im Staging und Grading.

3.5 Korrelation der Transkriptionsfaktoren mit dem Serummarker alpha Fetoprotein (AFP)

In der Stichprobe sind lediglich 18 von 101 Fällen über dem Grenzwert von 400µg/l Serum (Talwalkar & Gores, 2004) gemessen worden. In der Literatur ist ein erhöhtes AFP im Serum bei ca. 50% aller HCC beschrieben. Hier sind es lediglich 17,8 Prozent.

3.6 Analyse der Überlebensprognose

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Expressionslevel der EMT-Marker und der Überlebenswahrscheinlichkeit aufzudecken, erhoben wir den Lifestatus der Patienten und die nach ICD-10 kodierte Todesursache. Die Zeitspanne zwischen Operation und Ableben war hier für uns von Bedeutung, da Patienten mit operablen Tumoren bezogen auf das Staging und Grading eine relativ homogene Stichprobe ergeben. Die Schätzung der Überlebenszeit wurde mittels Kaplan-Meyer Kurven vorgenommen. Sie geben an, wie hoch der Anteil y ist, der nach x Tagen noch lebt. Ob sich beide Kurven unterscheiden, wurde durch den nichtparametrischen Logrank-Test ermittelt. Aufgetragen sind je Diagramm zwei Kurven, eine steht für Patienten mit erhöhtem, die andere für Patienten mit nicht erhöhtem EMT-Marker in Tumor- oder Normalgewebe.

Das Überleben der Patienten mit Staging T1 oder T2 in unserer Stichprobe unterscheidet sich wie erwartet signifikant von denen mit Staging T3 oder T4 (Logrank-Test $p < 0,001$). Auch der Unterschied zwischen Patienten mit einem mäßig differenzierten HCC (G2) und einem schlecht differenzierten HCC ist signifikant (Logrank-Test $p < 0,001$). Damit kann die Stichprobe als repräsentativ angesehen werden. Die Überlebenskurven der Kaplan-Meier Kurve für unifokale und multifokale

HCC unterscheiden sich nicht. Auch sind die Überlebenskurven nicht abhängig von der Expression der EMT-Marker im Tumor- oder nicht karzinogenen Gewebe.

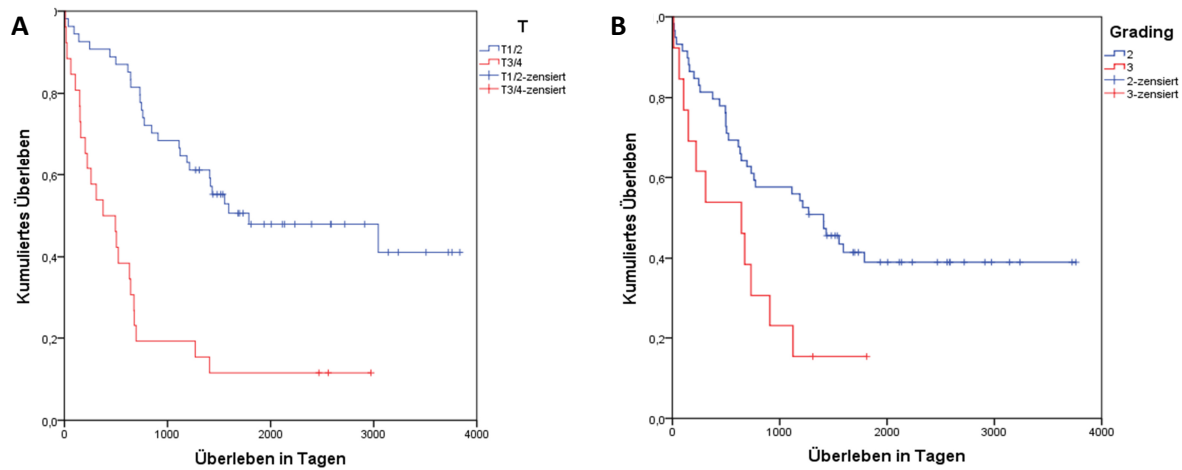


Fig. 15 A/B Kaplan-Meier-Kurven für die Staging Gruppen T1/2 und T3/4 und für Grading G2 und G3 als Kontrolle der Repräsentativität.

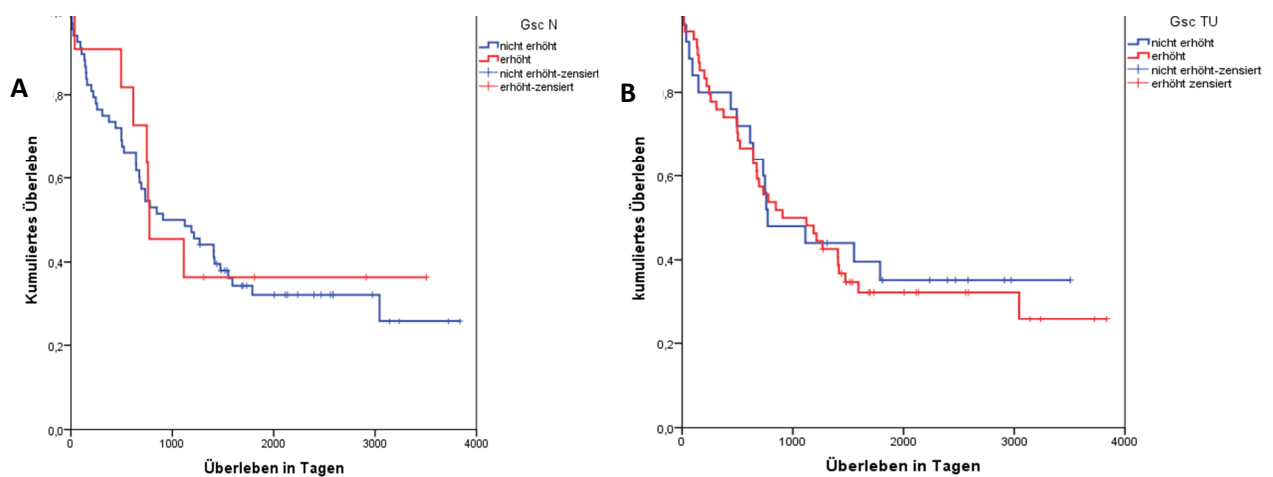


Fig. 16 A/B Kaplan-Meier-Kurven exemplarisch dargestellt für Goosecoid in Tumorgewebe (TU) und nicht karzinogenem Gewebe (N) erhöht (rot) bzw. nicht erhöht (blau) exprimiert.

Tab. 23 Signifikanz des Logrank-Tests der Überlebensstatistik. Kein p unterschreitet den Wert 0,05. T: Tumorgewebe; N: nicht karzinogenes Gewebe.

EMT-Marker	Snail N	Snail T	Twist N	Twist T	Gsc N	Gsc T
Logrank-Test p	0,894	0,774	0,785	0,668	0,810	0,798

3.7 Analyisierte Daten

Aus den zur Verfügung stehenden Patientenakten wurden folgende klinische Daten erfasst: Lifestatus, Hepatitis-Serologie, Geschlecht, Diagnose Primärtumor, Gewebediagnose, Indikation Chemotherapie, Chemo (neoadjuvant), Adipositas, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hypertonus, Hyperurikämie, Nikotinkonsum, Drogenkonsum, Alkoholkonsum, Alter, Größe/cm, Gewicht/kg und Medikamente. Bezüglich der histopathologischen Beurteilung des Tumorgewebes wurden folgende Aspekte aufgenommen: Tumordurchmesser des größten Tumors oder Primärtumors, solitär/multifokal, Zellkerne, Wachstumsmuster, Resektionsrand in cm, Grading, Staging (T, N, M, L, V). Die Laborchemischen Untersuchungen für folgende Parameter sind in die Analyse eingegangen: AP in U/l, Bilirubin in mg/dl, AFP µg/l, LDH U/l, CRP mg/l, GOT in U/l, GPT in U/l, GGT in U/l, PTT/s, Quick in %, CHE in U/l und Blutgruppe. Alle Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Tab. 24 Ergebnisse der Kreuztabellen für die histopathologischen, laborchemischen und klinischen Parameter und die Expression von Snail in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).

Variable	Klassierung	n	%	Snail N			Snail T		
				<	>	p	≤	>	p
G		78							
	G 1/2	66	84,62	25	41		57	9	
	G 3	12	15,38	7	5	0,185	11	1	0,613
T		80							
	T 1	22	27,50	11	11		19	3	
	T 2/3/4	58	72,50	24	34	0,488	51	7	0,850
V		68							
	nein	28	41,18	12	16		26	2	
	mikro	38	55,88	15	23		32	6	
	makro	2	2,94	1	1	0,931	2	0	0,488
L		59							
	Ja	48	81,36	21	27		41	7	
	nein	11	18,64	5	6	0,918	10	1	0,631
Herde		82							
	solitär	50	60,98	27	23		43	7	
	multifokal	32	39,02	10	22	0,043	29	3	0,532
Tumorgröße		80							
	≤ 5 cm	36	45,00	19	17		30	6	
	> 5 cm	44	55,00	16	28	0,141	40	4	0,308
AFP		65							
	≤ 10 ng/ml	30	46,15	14	16		25	5	
	> 10 ng/ml	35	53,58	15	20	0,758	32	3	0,322
CEA		14							
	≤5,0 ng/ml	11	78,57	5	6		10	1	
	>5,0 ng/ml	3	21,43	1	2	0,707	3	3	0,588
CA 19-9		16							
	≤ 37 U/ml	14	87,50	3	11		14	0	
	> 37 U/ml	2	12,50	2	0	0,025	2	0	-
GPT		82							
	≤ 35/50 U/l	47	57,32	22	25		40	7	
	> 35/50 U/l	35	42,68	14	21	0,349	33	2	0,188
GOT		73							
	≤ 35/50 U/l	40	54,79	19	21		34	6	
	> 35/50 U/l	33	45,21	12	21	0,236	33	0	0,020

GGT	62								
≤ 38/55 U/l	9	14,52	5	4			7	2	
> 38/55 U/l	53	85,48	22	31	0,334		49	4	0,169
Bilirubin	79								
≤ 1,1 mg/dl	56	70,89	27	29			47	9	
> 1,1 mg/dl	23	29,11	8	15	0,275		23	0	0,041
CHE	62								
≥ 3930/4620 U/l	54	87,10	27	27			48	6	
< 3930/4620 U/l	8	12,90	1	7	0,047		8	0	0,321
AP	78								
< 147/175 U/l	61	78,12	29	32			53	8	
≥ 147/175 U/l	17	21,79	6	11	0,269		16	1	0,409
LDH	50								
≤ 240 U/l	39	78,00	18	21			35	4	
> 240 U/l	11	22,00	5	6	0,620		8	3	0,170
PTT	80								
≤ 38 s	64	80,00	28	36			56	8	
> 38 s	16	20,00	7	9	0,613		15	1	0,479
Quick	66								
≥ 70 %	58	87,88	24	34			51	7	
< 70 %	8	12,12	4	4	0,462		8	0	0,299
Arterielle Hypertonie	84								
ja	40	47,62	16	24			36	4	
nein	44	52,38	21	23	0,476		38	6	0,607
Hypercholesterinämie	84								
ja	9	10,71	4	5			8	1	
nein	75	89,29	33	42	0,980		66	9	0,938
Diabetes mellitus Typ II	84								
ja	28	66,67	12	16			24	4	
nein	56	33,33	25	31	0,876		50	6	0,634
Adipositas	84								
Ja	20	23,81	8	12			18	2	
nein	64	76,19	29	35	0,676		56	8	0,763
Hyperurikämie	84								
ja	8	9,52	2	6			7	1	
nein	76	90,48	35	41	0,254		67	9	0,654

Tab. 25 Ergebnisse der Kreuztabellen für die histopathologischen, laborchemischen und klinischen Parameter und der Expression von Snail in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).

Variable	Klassierung	n	%	Gsc N			Gsc T		
				<	>	p	<	>	p
G		77							
	G 1	65	84,42	56	9		20	45	
	G 2/3	12	15,58	11	1	0,602	4	8	0,552
T		79							
	T 1	22	27,85	19	3		7	15	
	T 2/3/4	57	72,15	49	8	0,963	19	38	0,898
V		67							
	nein	28	41,79	25	3		9	19	
	mikro	37	55,22	30	7		13	24	
	makro	2	2,99	2	0	0,547	0	2	0,585
L		58							
	Ja	47	81,03	40	7		17	30	
	nein	11	18,97	8	3	0,328	5	6	0,568
Herde		81							
	solitär	50	61,73	47	3		11	39	
	Multifokal	31	38,27	23	8	0,011	14	17	0,028
Tumorgröße		74							
	≤ 5 cm	33	44,59	25	8		15	18	
	> 5 cm	41	55,41	38	3	0,042	8	33	0,017
AFP		65							
	≤ 10 ng/ml	30	46,15	27	3		8	22	
	> 10 ng/ml	35	53,85	29	6	0,406	11	24	0,674
CEA		14							
	≤5,0 ng/ml	11	78,57	8	3		4	7	
	>5,0 ng/ml	3	21,43	2	1	0,837	2	1	0,385
CA 19-9		16							
	≤ 37 U/ml	14	87,5	11	3		4	10	
	> 37 U/ml	2	12,5	2	0	0,468	1	1	0,541
GPT		81							
	≤ 35/50 U/l	46	56,79	40	6		11	35	
	> 35/50 U/l	35	43,21	31	4	0,827	13	22	0,196
GOT		72							
	≤ 35/50 U/l	39	54,17	35	4		8	31	
	> 35/50 U/l	33	45,83	28	5	0,531	15	18	0,024

GGT	61								
≤ 38/55 U/l	8	13,11	6	2			2	6	
> 38/55 U/l	53	86,89	47	6	0,285		16	37	0,764
Bilirubin	78								
≤ 1,1 mg/dl	55	70,51	49	6			13	42	
> 1,1 mg/dl	23	29,49	19	4	0,435		11	12	0,035
CHE	61								
≥ 3930/4620 U/l	53	86,89	47	6			14	39	
< 3930/4620 U/l	8	13,11	6	2	0,285		6	2	0,006
AP	82								
< 147/175 U/l	64	78,05	39	25			22	38	
≥ 147/175 U/l	18	21,95	11	7	0,989		2	15	0,050
LDH	50								
≤ 240 U/l	39	0,78	35	4			10	29	
> 240 U/l	11	0,22	10	1	0,909		1	10	0,242
PTT	79								
≤ 38 s	64	81,01	59	5			18	46	
> 38 s	15	18,99	10	5	0,007		6	9	0,368
Quick	65								
≥ 70 %	57	87,69	52	5			15	42	
< 70 %	8	12,31	5	3	0,021		4	4	0,168
Arterielle Hypertonie	83								
Ja	40	48,19	34	6			12	28	
Nein	43	51,81	38	5	0,651		14	29	0,802
Hypercholesterinämie	83								
Ja	9	10,84	6	3			3	6	
Nein	74	87,69	66	8	0,060		23	51	0,891
Diabetes mellitus Typ II	83								
Ja	28	33,73	25	3			11	28	
Nein	55	66,27	47	8	0,626		15	40	0,265
Adipositas	83								
Ja	20	24,10	18	2			3	17	
Nein	63	75,90	54	9	0,622		23	40	0,071
Hyperurikämie	83								
Ja	8	96,39	4	4			5	3	
Nein	75	90,36	68	7	0,001		21	54	0,101

Tab. 26 Ergebnisse der Kreuztabellen für die histopathologischen, laborchemischen und klinischen Parameter und der Expression von Twist in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).

Variable	Klassierung	n	%	Twist N			Twist T		
				<	>	p	<	>	p
G		77							
	G 1	65	84,42	36	29		47	18	
	G 2/3	12	15,58	9	3	0,205	5	7	0,037
T		79							
	T 1	22	27,85	10	12		17	5	
	T 2/3/4	57	72,15	37	20	0,114	36	21	0,231
V		67							
	nein	28	41,79	13	15		21	7	
	mikro	37	55,22	22	15		25	12	
	makro	2	2,99	2	0	0,251	1	1	0,664
L		58							
	Ja	47	81,03	24	23		33	14	
	nein	11	18,97	7	4	0,452	6	5	0,319
Herde		81							
	solitär	50	61,73	29	21		34	16	
	multifokal	31	38,27	18	13	0,995	21	10	0,981
Tumorgröße		74							
	≤ 5 cm	33	44,59	16	17		25	8	
	> 5 cm	41	55,41	25	16	0,283	27	14	0,252
AFP		65							
	≤ 10 ng/ml	30	46,15	21	8		15	14	
	> 10 ng/ml	35	53,85	21	14	0,298	25	10	0,105
CEA		14							
	≤5,0 ng/ml	11	78,57	6	5		7	4	
	>5,0 ng/ml	3	21,43	2	1	0,707	2	1	0,725
CA 19-9		16							
	≤ 37 U/ml	14	87,5	10	4		11	3	
	> 37 U/ml	2	12,5	2	0	0,550	1	1	0,383
GPT		81							
	≤ 35/50 U/l	46	56,79	29	17		29	17	
	> 35/50 U/l	35	43,21	18	17	0,294	25	10	0,428
GOT		72							
	≤ 35/50 U/l	39	54,17	25	14		26	13	
	> 35/50 U/l	33	45,83	16	17	0,182	23	10	0,493

GGT	61								
≤ 38/55 U/l	8	13,11	5	3			4	4	
> 38/55 U/l	53	86,89	30	23	0,753		35	18	0,307
Bilirubin	78								
≤ 1,1 mg/dl	55	70,51	34	21			33	22	
> 1,1 mg/dl	23	29,49	10	13	0,136		18	5	0,122
CHE	61								
≥ 3930/4620 U/l	53	86,89	34	19			32	21	
< 3930/4620 U/l	8	13,11	3	5	0,150		7	1	0,136
AP	82								
< 147/175 U/l	64	78,05	38	22			39	21	
≥ 147/175 U/l	18	21,95	8	9	0,227		12	5	0,667
LDH	50								
≤ 240 U/l	39	0,78	26	13			25	14	
> 240 U/l	11	0,22	8	3	0,704		6	5	0,405
PTT	79								
≤ 38 s	63	81,01	40	23			42	21	
> 38 s	16	18,99	6	10	0,060		11	5	0,874
Quick	65								
≥ 70 %	57	87,69	32	25			40	17	
< 70 %	8	12,31	4	4	0,744		5	3	0,660
Arterielle Hypertonie	83								
Ja	39	46,99	18	21			30	9	
Nein	44	53,01	30	14	0,043		26	18	0,084
Hypercholesterinämie	83								
Ja	8	09,64	3	5			6	2	
Nein	75	90,36	45	30	0,221		50	25	0,632
Diabetes mellitus II	83								
Ja	28	33,73	15	13			21	7	
Nein	55	66,27	33	22	0,575		35	20	0,296
Adipositas	83								
Ja	19	22,89	10	9			12	7	
Nein	64	77,11	38	26	0,601		44	20	0,648
Hyperurikämie	83								
Ja	8	09,64	4	4			6	2	
Nein	75	90,36	44	31	0,637		50	25	0,632

4 Diskussion

Das hepatozelluläre Karzinom ist unter den Krebserkrankungen ein bedeutender epidemiologischer und ökonomischer Faktor für die meisten Gesundheitssysteme. Vor dem Hintergrund der deutlichen Zunahme von Zivilisationserkrankungen wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, koronarer Herzerkrankung sowie des Lungen- oder Colon-Karzinoms zeigt sich auch die Inzidenz hinsichtlich des HCC auf dem Boden einer äthyloxischen Leberzirrhose in westlich orientierten Gesellschaften steigend. Ein wichtiger Weg zur Reduzierung der Mortalität ist die Prophylaxe im Sinne einer Behandlung der Risikofaktoren sowie die Vorsorgeuntersuchung. Besteht jedoch das Karzinom bereits, braucht der Therapeut eine Strategie, um dieses sinnvoll einzudämmen. Es existiert weiterhin keine entscheidend wirksame Chemotherapie, eine genmodulierende Therapie konnte noch nicht entwickelt werden. Lediglich für nicht resezierbare HCC besteht die Indikation zur Sorafenib-Medikation. Sorafenib ist ein Proteinkinaseinhibitor der sowohl die Raf-Kinase und damit die Zellteilung und Gewebsproliferation, als auch die Kinasen des VEGF-Signalwegs und damit die Tumorgefäßproliferation hemmt. Eine Lebensverlängerung im Vergleich zu nicht mit Sorafenib behandelten Patienten liegt bei lediglich 2-4 Monaten (Llovet et al., 2008). Für etwaige weitere Inhibitoren ist es nicht nur wichtig zu wissen, welche Transkriptionsfaktoren wie interagieren, sondern auch welchen Einfluss sie auf die Proteinexpression besitzen. Insbesondere ist es für die Entwicklung und Indikationsstellung neuer Therapien essentiell zu wissen, welche Transkriptionsfaktoren in welchen Phasen der Karzinogenese exprimiert werden.

Ein Ziel der Arbeit war es zu analysieren, welche Rolle die EMT beim HCC hinsichtlich der Prognose, der Invasivität und histopathologischer Gesichtspunkte spielt. Dabei gingen wir von einer Genexpressionsanalyse dreier bereits in anderen Untersuchungen als EMT-Marker beschriebener Transkriptionsfaktoren aus. In unsere Analyse ging Gewebe von Patienten ein, bei denen die Indikation zur Hemihepatektomie noch bestand, also HCC-Gewebe eines Stadiums ohne Fernmetastasierung oder sonstigen Kontraindikationen. Das Vorliegen von lediglich vier Geweben mit Lymphknotenbefall und nur zwei Fällen von HCC mit Staging T4, ist für eine Analyse der Korrelation mit den histopathologischen Indikatoren für Invasivität und Prognose ungünstig. Die Gruppen von mit hohem Staging und Grading klassifizierten HCC konnten also nur bedingt mit der Expression der

Transkriptionsfaktoren korreliert werden. Diese Homogenität ist jedoch für die Betrachtung der Expression von Transkriptionsfaktoren interessant, da ein Entwicklungsstadium der Karzinogenese abgebildet ist. Insgesamt können so Vermutungen darüber getroffen werden wie Transkriptionsfaktoren in diesen weniger invasiven Stadien exprimiert werden.

Seit der ersten Entdeckung von Snail als Repressor der E-Cadherin-Expression und der nachfolgenden Mesenchymalisierung (Cano et al., 2000) (Batlle et al., 2000) wird eine entscheidende Rolle der EMT auch in der Karzinogenese vermutet. Die EMT ist allerdings nicht nur auf diesen häufig untersuchten Mechanismus beschränkt. Je mehr Arbeiten über das Thema veröffentlicht werden, desto stärker zeigt sich die Komplexität der ablaufenden Prozesse. Immer mehr Faktoren zeigen direkten oder indirekten Einfluss auf die Mesenchymalisierung von Zellen. Oft überschneiden sich die Signalwege mit anderen Prozessen oder Transkriptionsfaktoren und werden nicht nur für die Mesenchymalisierung von Tumorzellen, sondern auch in Heilungs- oder Wachstumsprozessen genutzt.

4.1 Analyse des Transkriptionsfaktors Snail im HCC

Snail ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von E-Cadherin, ein Protein der Zell-Zell Kontakte, verringert (Cano et al, 2000). Es ist bereits bekannt, dass Snail zu frühem Zeitpunkt der EMT exprimiert wird, da es funktionell für die Lösung der Zell-Zell-Kontakte verantwortlich ist, ohne die eine Mesenchymalisierung der Zellen nicht möglich wäre. Eine Arbeit über Mamma-Karzinome und Her2/Neu zeigte beispielweise eine erhöhte Expression von EMT-Markern schon vor Beginn einer gesteigerten Invasivität (Menard, 2001). Die Mobilität maligner Tumorzellen wird durch den EMT-Marker Snail mittels Mesenchymalisierung ausgelöst. Es wurde bereits gezeigt, dass Tumorzellen Snail exprimieren und über Suppression der E-Cadherin-Expression die Mesenchymalisierung ermöglichen. Auch für das HCC ist dies bereits untersucht (Jiao et al., 2002).

Wir konnten zeigen, dass Snail in humanem, nicht karzinogenem Gewebe signifikant höher exprimiert wird als im korrespondierenden HCC-Gewebe. Entwickeln sich bereits intrahepatische Metastasen bei den untersuchten HCC-Proben ist Snail im umgebenden nicht karzinogenen Gewebe signifikant höher exprimiert als bei

solitären HCC. In der Literatur sind bisher widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht worden.

Hyun Young Woo et al. untersuchten 59 HCC-Gewebe mit den korrespondierenden nicht karzinogenen Geweben (Woo et al., 2005). Sie führten eine immunhistochemische Färbung für Snail und E-Cadherin durch und korrelierten die Ergebnisse mit klinischen und histopathologischen Daten. 20,3% der Tumorgewebe, jedoch lediglich 3,4% der nicht karzinogenen Gewebe zeigten eine positive Färbung von Snail. Die erhöhte Expression von Snail im HCC-Gewebe korrelierte mit einer hohen postoperativen Rezidivrate.

Erst kürzlich konnte durch Zhang et al. anhand einer immunhistochemischen Färbung von HCC-Geweben aus 83 Patienten eine Korrelation zwischen Differenzierungsgrad sowie Prognoseabschätzung und Snail-Expression gezeigt werden (Zhang et al., 2016). 10 nicht karzinogene Gewebe wurden als Kontrolle entnommen. Für eine unterschiedliche Snail-Expression zwischen Tumor- und nicht karzinogenem Gewebe konnte kein signifikantes Ergebnis gezeigt werden.

Eine weitere Arbeit zeigte ebenfalls eine Korrelation von Snail-Expression und schlechter Differenzierung des Gewebes (Miyoshi et al., 2005). Hier waren 55 HCC-Gewebe mittels qRT-PCR der Snail-mRNA untersucht worden. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und nicht karzinogenem Gewebe gezeigt werden. Allerdings stellte sich eine signifikante Korrelation zwischen verstärkt exprimierter Snail-mRNA und vermehrten intrahepatischen Metastasen dar. Dieses Ergebnis konnten wir auch in unserer Arbeit zeigen.

Sugimachi et al. untersuchten ebenfalls mittels qRT-PCR Snail-mRNA aus 43 humanen HCC-Geweben (Sugimachi et al., 2003). Die Expressionsanalyse ergab einen mittleren FC-Wert von 14,6 für Tumorgewebe sowie von 45,6 für korrespondierendes nicht karzinogenes Gewebe. Es konnten lediglich 7 Fälle von verstärkter Expression in Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Autoren gehen nicht näher auf dieses Ergebnis ein. Es hätte aber bereits 2003 eine erhöhte Expression von Snail in nicht karzinogenem Gewebe vermutet werden können.

In einer weiteren Arbeit wurde bei Ko-Expression von Twist und Snail eine vermehrte multifokale Ausprägung des HCC gefunden (Yang et al., 2009). Hier wurde zunächst bestätigt, dass eine erhöhte Expression von Snail eine verminderte E-Cadherin

Produktion nach sich zieht. So konnte ein Schlüsselmechanismus der EMT in HCC wieder nachgewiesen werden. In Immunoassays zeigte sich eine erhöhte Nachweisbarkeit von Snail in 60,2% der primären HCC. Ein Vergleich in den korrespondierenden nicht karzinogenen Geweben wurde nicht angeschlossen. Im Rahmen dieser Analyse der Snail- und Twist-Expression in HCC Huh7-Zellen wird konstatiert, dass bei Koexpression signifikant oft eine multifokale Ausprägung und mikroskopisch hohe Invasivität beschrieben ist. In 30,1% der primären HCC und in 60% der Rezidiv-HCC war dies der Fall. In unserer Genexpressionsanalyse finden sich nur 14 Fälle, in denen Twist und Snail in Tumorgewebe erhöht koexprimiert sind. Von diesen stammt die mRNA aus 11 unifokalen und 3 multifokalen HCC, sodass die Koexpression bei kleiner Stichprobe eher auf unifokale HCC deutet.

Insgesamt ist eine erhöhte postoperative Rezidivrate sowie eine vermehrte intrahepatische Metastasierung bei verstärkter Snail-Expression im Tumorgewebe nachgewiesen worden. Bisher bezog sich dies jedoch auf Tumorgewebe, wobei die Ergebnisse bezüglich eines Unterschieds der Expression zwischen Tumor- und nicht karzinogenem Gewebe widersprüchlich sind.

Auch für andere Tumorentitäten ist die Rolle von Snail untersucht worden. Moody et al. zeigten eine Überexpression von Snail in Rezidiven von Mamma-Karzinomen in transgenen Mäusen, wenn diese HER2/neu positiv waren. Hohe Level der Expression des Snail-Gens in Rezidiv-Karzinomen korrelierte mit einer herabgesetzten rezidivfreien Überlebenszeit in Frauen mit Mamma-Karzinom *in vivo* (Moody et al., 2005). Auch in Blasenkarzinomen konnte eine verstärkte Snail-Expression als signifikanter Prädiktor für Rezidive herausgearbeitet werden (Bruyere et al., 2010). Ein Bezug zu korrespondierendem nicht karzinogenem Gewebe wurde in beiden Arbeiten nicht hergestellt. Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe gezeigt werden.

Snail wurde auch als potentielles Target einer medikamentösen Therapie in einer Arbeit von Emadi et al. durch Knockdown von Snail untersucht. siRNA (small interfering RNA) von Snail wurde in Zelllinien von Prostata-Karzinomen zur Herabsetzung der Snail-Expression eingebracht. In den Kulturen zeigt sich ein signifikanter Rückgang der Zellzahl sowie eine frühere Induktion der Zellseneszenz. Es wurde vermutet, dass Snail für die Karzinogenese im Sinne eines

Überlebensfaktors der Zelle und eines Inhibitors der Zellseneszenz fungieren könnte (Emadi-Baygi et al., 2010).

Diese Vermutung wird durch eine kürzlich erschienene Arbeit verstärkt. In der Annahme, dass die über Fibroblasten gesteuerte Zellinvasion für die Karzinogenese entscheidend ist, wurde eine Zelllinie von humanen Fibroblasten (IMR90) mit siRNA von Snail untersucht. Nach der Zugabe zeigten die Zellen eine signifikant geringere Snail-Expression nach Inkubation mit TGF- β als die Kontrolle. Dies führte zu einer Verringerung der Zellmotilität und ebenfalls zu einer verfrühten Zellseneszenz. Durch Inhibition der Snail-Expression könnte also die Invasivität einer Tumorentität herabgesetzt werden (Furuya et al., 2017).

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten ein Hinweis auf die unterschiedlichen Expressionsmuster in einzelnen Stadien und zwischen verschiedenen Metastasierungs-verhalten sein. Die homogene Gruppe von Patienten in niedrigen Stadien des HCC könnte daher ein Schlüssel zur Interpretation unserer Ergebnisse sein.

Die frühe Expression von Snail kann über die Mesenchymalisierung von Zellen zur Metastasierung von Karzinomen führen. (Martin & Goldstein, 2014). Eine erhöhte Malignität eines Tumors kann daher durch eine EMT bedingt sein, da mesenchymale Marker für die Auflösung der Zellpolarität und von Zell-Zell-Kontakten sorgen. Somit sind Snail produzierende mesenchymale Zellen in der Lage, im Interstitium oder in Blutgefäßen mobil zu sein. Daher gehen wir davon aus, dass das von uns als nicht karzinogen bezeichnete Gewebe zwar frei von karzinogenen Zellverbänden, jedoch vermutlich nicht frei von einzelnen Tumorzellen ist. Es wurde bereits gezeigt, dass eine verstärkte Expression von EMT-Faktoren eher zu Migration einzelner Zellen als von kontrollierten Zellverbänden führt (Xue et al., 2014). So verwundert es zunächst nicht, dass bei multifokalen HCC die Snail-Expression in nicht karzinogenem Gewebe erhöht sein kann. Hier könnten bereits aus entartetem Epithelgewebe migrierte Zellen vorhanden sein, ohne die eine intrahepatische Metastase nicht entsteht. Diese Hypothese wird durch unser Ergebnis der verstärkten Snail-Expression im nicht karzinogenen Gewebe und bei intrahepatischer Metastasierung unterstützt. Snail ist dieser Hypothese nach zunächst in der Phase der Mesenchymalisierung im makroskopisch noch nicht entarteten Gewebe exprimiert,

Goosecoid im bereits makroskopisch als Tumor zu erkennendem, schlechter differenzierten Gewebe.

Insgesamt ist die Erkenntnis zu intrahepatischen Metastasen vor dem Hintergrund des Expressionsmusters interessant, da dieses für Entwicklungen von therapeutischen Strategien von entscheidender Bedeutung wäre. Ein HCC im fortgeschrittenen Stadium könnte per lokaler Hemmung der Snail-Expression weniger wahrscheinlich zugänglich sein als eine Hemmung bei noch nicht metastasierten, solitären Tumoren.

Unsere Arbeit zeigt zum ersten Mal eine signifikante Überexpression im nicht karzinogenen Gewebe. Außerdem können auch wir einen Zusammenhang zwischen intrahepatischer Metastasierung und Expression von Snail zeigen. Im nicht karzinogenen Gewebe ist die Expression von Snail in multifokalen HCC signifikant erhöht, sodass eine Induktion von Metastasen wie in bereits bestehender Literatur auch in unserer Arbeit durch die Mesenchymalisierung und anschließenden Epithelialisierung nur vermutet werden kann.

Insgesamt scheint erwiesen, dass Snail zur Ausbildung neuer Zellformationen beziehungsweise organisierter Strukturen nicht nur in embryonaler Entwicklung essentiell ist. Unser Ergebnis repräsentiert einen weiteren Baustein zum Beweis der These. Die Analogien zwischen Embryogenese, Heilungsprozessen entzündeten Gewebes, Karzinogenese und Metastasen-Bildung sind vor dem Hintergrund der bisher veröffentlichten Arbeiten in Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit offensichtlich.

4.2 Analyse des Transkriptionsfaktors Goosecoid im HCC

Der Transkriptionsfaktor Goosecoid ist ein Homöobox-Gen, das während der Embryogenese entscheidend ist, aber auch in der Karzinogenese bereits gefunden wurde (siehe 1.1.8.1). Goosecoid scheint eher zu Beginn des Wachstums einer kanzerogenen Raumforderung verstärkt exprimiert zu werden. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse eines Tiermodells unserer Kooperationsarbeitsgruppe gestützt (siehe 4.1). Die Expression von Goosecoid nach Leberschädigung mit CCl₄ im Mausmodell weist nach drei Tagen ein Maximum mit einer deutlichen Abnahme nach 4 Tagen auf. Die Ergebnisse dieser Vorarbeit durch Godoy et al. lassen hinsichtlich des Expressionsmusters von Goosecoid zu einer stattfindenden Induktion von

Wachstum und Proliferation in der Embryogenese aber auch der Karzinogenese eine Analogie erkennen. Zudem konnte eine Arbeit von Hartwell et al. zeigen, dass in Gewebe des Mamma-Karzinoms im Vergleich zum korrespondierenden nicht karzinogenen Gewebe die Expression von Goosecoid hochreguliert wird. Eine *in vivo* Applikation von Goosecoid produzierenden Zellen in Mäusen zeigte zudem ein langsames Wachstum der Karzinome. Hier konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Goosecoid eher früh im Wachstumsprozess vermehrt exprimiert ist (Hartwell et al., 2006).

In unserer Arbeit können wir erstmals eine verstärkte Expression von Goosecoid im HCC-Gewebe im Vergleich zum korrespondierenden nicht karzinogenen Gewebe zeigen. Auch ist Goosecoid im Tumorgewebe signifikant öfter verstärkt exprimiert, wenn der Tumor größer als 5cm im Durchmesser ist. Weiterhin ist Goosecoid bei unifokalen HCC verstärkt exprimiert.

Die Immunhistochemische Färbung zeigte trotz kleiner Stichprobe eine starke Tendenz zur vermehrten Expression von Goosecoid im Tumorgewebe im Vergleich zu nicht karzinogenem Gewebe. Hier fanden wir keinen Unterschied zwischen der Intensität im Zellkern und im Zytosol. Beide Kompartimente zeigten eine positive Färbung. Da der Transkriptionsfaktor im endoplasmatischen Retikulum des Cytosols produziert wird und im Zellkern die DNA-Bindung erfolgt, kann das Protein in beiden Kompartimenten erwartet werden.

Eine erst kürzlich erschienene Arbeit von Xue et al. beschäftigt sich mit Goosecoid als Biomarker im HCC. Zelllinien von entarteten Hepatozyten, die Lungenmetastasen bildeten, zeigten eine erhöhte Expression von Goosecoid. In Gewebe-Microarrays konnte bei 6 von 112 Fällen eine erhöhte Expression von Goosecoid in Lungenmetastasen im Vergleich zum Primarius gezeigt werden. Eine Gain-of-function Mutation zeigte eine Induktion der EMT mit radiär streuender Zell-Migration. In einer kontrollierten HCC-Zelllinie, die weniger Goosecoid exprimiert, zeigte sich eine kollektive Migration. Hieraus schließt die untersuchende Arbeitsgruppe, dass Goosecoid in HCC eine Metastasierung fördert (Xue et al., 2014). In 112 humanen Gewebiszylindern von Primarii wurde ein Microarray ohne korrespondierendes nicht kanzerogenes Gewebe durchgeführt. Eine höhere Goosecoid-Expression korrelierte mit schlechter Prognose und wurde verstärkt in Lungenmetastasen des HCC

nachgewiesen. Es wurde gefolgert, dass eine erhöhte Expression von Goosecoid in Metastasen ein Hinweis auf eine vermehrte Metastasierung des HCC ist.

Es stellt sich die Frage, ob eine Überexpression des EMT-Markers in wachsenden Zellverbänden generell besteht, oder ob dies hauptsächlich in Metastasen auftritt, die sich auf dem Boden des EMT-Prozesses entwickeln. Ist also Goosecoid als Ursache für eine Metastasierung zu sehen? Auf der Grundlage unserer Ergebnisse zeigt sich eher eine frühe Expression von Snail zur Entwicklung intrahepatischer Metastasen in noch nicht karzinogenem Gewebe zur Mesenchymalisierung von epithelialen Zellen. In bereits entstandenen Zellverbänden wurde Goosecoid vermehrt exprimiert. Daher gehen wir von einer konsekutiven Goosecoid-Expression während des Wachstums einer Raumforderung im Stadium der Promotion aus, nicht von einer Induktion von Metastasen durch den Transkriptionsfaktor. Dass, wie in der Arbeit von Xue et al. oder auch von Hartwell et al., die alleinige vermehrte Präsenz des Markers im Primärtumor oder in Metastasen zu dem Schluss einer Metastasen-Induktion durch Goosecoid führen, sehen wir nicht.

Zellteilungs- und Wachstumsprozesse sind während der Embryogenese auch bei Regenerations- und Inflammationsprozessen auf Goosecoid und den Spemann Organisator angewiesen. Es ist anzunehmen, dass ein schnell hyperplasierender Prozess wie ein HCC generell auf den Spemann-Organisator angewiesen ist, dessen maßgeblicher Marker Goosecoid darstellt. Die Fokussierung auf die Metastasierung bzw. Malignität wie sie in den bisherigen Arbeiten erfolgt erscheint einseitig, da auf die Fragestellung ob Goosecoid im Verlauf des Tumorwachstums oder zur Induktion einer Mesenchymalisierung exprimiert wird nicht eingegangen wird. So ist es möglich, dass ein Tumorprozess ab einem etablierten entdifferenzierten Zellkonglomerat, ob Metastase oder nicht, Goosecoid verstärkt exprimiert. Klinisch betrachtet ist das HCC mit Fernmetastasierung allein schon ein Grund für eine schlechte Prognose. Ob die Expression von Goosecoid in humanem Lebergewebe ohne Kontrolle des umgebenden nicht karzinogenen Gewebes als ursächlich für eine schlechte Prognose bezeichnet werden kann, darf kritisch gesehen werden.

Dass Goosecoid in kanzerogenen Prozessen eine Rolle spielt, scheint erwiesen zu sein. Der Mechanismus der kontrollierten Zellmigration mittels EMT während der Embryogenese findet sich also auch bei Tumorwachstum der Karzinogenese. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine intrahepatische Metastasierung

vermutlich keine erhöhte Expression von Goosecoid bedingt. Vielmehr ist in unserer Population an Patienten mit mehrheitlich operablen HCC Goosecoid-mRNA in solitären HCC vermehrt nachweisbar. Es war bisher nicht bekannt, ob Goosecoid zu Beginn eines Wachstums- oder Umbauprozesses erhöht exprimiert ist. Wenn Fernmetastasen im Vergleich zu Primarii erhöhte Goosecoid-Expression aufweisen, kann es bedeuten, dass Metastasen lediglich jünger sind. Es könnte sein, dass Goosecoid in den Metastasen zunächst erhöht exprimiert ist. Im Primarius kann dies vor Metastasierung ebenfalls der Fall gewesen sein. Im Vergleich zur Metastase könnte Goosecoid zu einem späteren Zeitpunkt in Relation wieder niedriger exprimiert sein.

So kann sowohl im Primarius eines Stadiums ohne Metastasierung, wie auch in Metastasen zu Beginn gleichfalls eine Goosecoid-Hochregulation vermutet werden, ohne dass dieser Fakt mit der erhöhten Metastasierungsrate in Verbindung gebracht werden muss.

Insgesamt deuten unsere Daten auf eine erhöhte Expression von Goosecoid in größeren, noch nicht intrahepatisch metastasierten, solitären Tumoren hin. So ist es möglich, dass sowohl Tumore ohne Metastasierung einen Peak bezüglich der Expression von Goosecoid zeigen, als auch Metastasen von weiter fortgeschrittenen Karzinomen, wenn die Expression im Primarius schon wieder abgefallen ist.

Dass Snail und Goosecoid nicht synchron auftreten wurde bereits 2010 durch Taube et al. gezeigt (Taube et al., 2010). Hier konnte in Gewebe von humanem Mamma-Karzinom eine erhöhte Expression von EMT-Markern wie Goosecoid, Snail und Twist gezeigt werden. Interessanterweise zog eine Überexpression dieser Transkriptionsfaktoren eine erhöhte Expression der restlichen untersuchten Marker wie FOXC2, Zeb1/2 und Slug nach sich. Allerdings zeigte eine Erhöhung eines dieser EMT-Marker in der Folge keine verstärkte Expression von Goosecoid. Daher wurde vermutet, dass dieses wie im Spemann Organisator isoliert reguliert wird. Die isolierte Regulation von Goosecoid könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Induktion von Metastasierung nicht durch Goosecoid, sondern durch andere von TGF- β - oder Activin-induzierte Transkriptionsfaktoren verursacht wird. Die Goosecoid-Expression würde dann wie im Spemann-Organisator durch Regulatoren in Analogie zum Nieuwkoop-Zentrum induziert werden.

4.3 Analyse des Transkriptionsfaktors Twist im HCC

Der Transkriptionsfaktor Twist ist ebenfalls mit der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten in Verbindung gebracht worden (siehe 1.1.8.3.). Wie Snail zeigt sich unter anderem eine verminderte Expression von E-Cadherin bei verstärkter Twist-Expression. Twist spielt wie Snail und Gooseoid in der Gastrulation, speziell in der Entwicklung des Mesoderms und des Neuralrohrs, eine entscheidende Rolle (Thisse et al., 1987) (Chen & Behringer, 1995).

Auch ist Twist in Metastasen des HCC im Vergleich zum Primarius verstärkt exprimiert. Das hat der Vergleich zwischen 60 HCC-Geweben mit den korrespondierenden Geweben von Metastasen mittels Gewebe-Microarrays und immunhistochemischen Färbungen gezeigt (Lee et al., 2006). Auch Niu et al. zeigten in ihrer Analyse von Twist in 30 HCC-Geweben mit korrespondierenden nicht karzinogenen Geweben mittels qRT-PCR der Twist-mRNA sowie Immunhistochemie die Assoziation von verstärkter Twist-Expression mit extra- und intrahepatischen Metastasen und damit auch der Überlebensprognose (Niu et al., 2007). Dieses Ergebnis wurde wenig später durch eine Arbeit von Matsuo et al. bestätigt. Hier wurden HCC-Zelllinien untersucht und bei erhöhter Twist-Expression eine Induktion von Mesenchymalisierung gefunden. In der angeschlossenen immunhistochemischen Färbung von Twist in 20 humanen HCC-Geweben und den korrespondierenden nicht karzinogenen Geweben zeigte sich zwar eine stärkere Färbung im Tumorgewebe, jedoch wies die Färbung keine Korrelation mit histopathologischen Parametern auf. HCC-Zelllinien zeigen eine Reduktion von Invasivität und Mesenchymalisierung bei Inhibition von Twist mittels entsprechender siRNA (Matsuo et al., 2009).

Unsere Arbeit untersuchte nun die bisher größte Fallzahl und kann keinen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von Twist in Tumor- und nicht karzinogenem Gewebe zeigen. Eine Assoziation mit histopathologischen Parametern ergibt sich nicht. Wir erhoffen uns weitere Arbeiten zu diesem Thema mit großen Fallzahlen zur besseren Einordnung der Rolle von Twist in HCC, da die bisherige Literatur zu dem Thema deutliche Hinweise auf eine Rolle in der Karzinogenese zeigt.

4.4 Analyse der Überlebensprognose in Korrelation mit den EMT-Markern

Die Überlebensprognose differiert wie oben dargestellt zwischen der verschiedenen Expression der Transkriptionsfaktoren nicht signifikant. Eine Aussage zur Überlebensdauer mit Assoziation zur Expression der Transkriptionsfaktoren der EMT ist schwer zu treffen. Gezählt wird in der Regel die Dauer zwischen Probenentnahme und Todeszeitpunkt, nicht etwa zwischen Auftreten des Primarius und dem Todeszeitpunkt. So ist es schwierig festzustellen, ob ein Tumor besonders schnell oder langsam wächst. Die TNM-Klassifikation und das Grading bilden nur eine Momentaufnahme ab. Die Indikation zur Hemihepatektomie oder Transplantation wird in frühen Stadien gestellt, sodass sich eine histologisch relativ homogene Gruppe ergibt. Eine erhöhte oder verminderte Expression ergibt hier keinen Unterschied in der Überlebensdauer. Die untersuchte Patientengruppe scheint repräsentativ zu sein, da die Überlebensprognose der Patienten mit den bisher untersuchten Patientengruppen übereinstimmt.

In den Arbeiten die bisher zum Thema EMT und Prognose veröffentlicht wurden, sind jedoch metastasierte Karzinome mit erhöhter EMT-Marker-Expression und schlechter Überlebensprognose assoziiert worden. Der Schluss, dass Patienten mit metastasierten Karzinomen eine schlechte Überlebensprognose haben, ist jedoch schon lange bekannt. Ob jedoch bei ähnlichem Stadium eine Prognosestellung nur mittels Expressionslevel der EMT-Marker möglich ist, wurde bislang noch nicht untersucht. Unsere Ergebnisse weisen insgesamt ebenfalls auf eine Rolle der EMT in HCC hin. Es können in Zusammenschau mit bereits bestehenden Arbeiten Hypothesen über ein Expressionsmuster erstellt werden. Ein prognostisches Mittel scheint die Messung von Transkriptionsfaktoren der EMT jedoch nicht zu sein. Dass die EMT für kanzerogene Prozesse essentiell ist, kann insgesamt als gesichert gelten. Eine mehr oder minder ausgeprägte EMT scheint jedoch eher Ausdruck eines Prozess-Stadiums zu sein, nicht unbedingt die Ursache für mehr oder weniger invasive Karzinome. So ist in oben bereits zitierter Arbeit von Wang et al. in Bezug auf EMT in HCC zwar eine schlechte Prognose unter fernmetastasierten HCC in Zusammenhang mit erhöhten Gooseoid-Werten gezeigt worden. Die Fernmetastasierung als solche scheint jedoch eher die Ursache für die schlechte Prognose zu sein als eine besonders aktive EMT des Primarius. Wir verstehen also

die EMT eher als das Mittel zum Zweck, weniger als einen Induktor besonders invasiver Tumore.

4.5 Epidemiologie

Wie in den Ergebnissen beschrieben ist die Mehrzahl der Fälle sowohl in unserer Stichprobe, als auch in anderen Arbeiten mit Mitteleuropäischen Patienten, der chronische Alkoholabusus der größte Faktor zur Entstehung eines HCC. Der übermäßige Alkoholenuss ist für die Inzidenz in Deutschland, Frankreich, Großbritannien und anderen europäischen Staaten entscheidend verantwortlich. Hepatitis spielt im Vergleich zu anderen Staaten der Welt eine untergeordnete Rolle. Die einzig sinnvolle Methode einer Eindämmung der Erkrankung in Deutschland ist die deutliche Reduktion des Alkoholkonsums. Der erhöhte Alkoholkonsum der Männer im Vergleich zu Frauen korreliert mit der erhöhten HCC-Inzidenz der Männer. Auch in unserer Patientengruppe bildet sich eine männliche Risikogruppe der Alkohol konsumierenden Männer ab.

5 Zusammenfassung

Bezüglich der Fragestellungen konnten wir zeigen, dass die mRNA-Expression von Goosecoid im Tumorgewebe im Vergleich zu den korrespondierenden nicht karzinogenen Geweben signifikant erhöht ist. Dieses Ergebnis konnte an einer kleineren Auswahl von Gewebeproben auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbung bestätigt werden. Es zeigte sich eine vermehrte Färbung des Transkriptionsfaktors Goosecoid im Tumorgewebe im Vergleich zum nicht karzinogenen Gewebe. Weiterhin konnte eine Assoziation mit über 5cm großen, solitären Tumoren bei erhöhter Goosecoid-Expression signifikant nachgewiesen werden.

Der EMT-Marker Snail ist im nicht karzinogenen Gewebe gegenüber dem Tumorgewebe signifikant erhöht exprimiert. Weiterhin ist Snail im nicht karzinogenen Gewebe bei multifokalen HCC erhöht nachweisbar. Ansonsten konnte aber kein Zusammenhang zwischen der Invasivität eines Tumors auf der Grundlage des Grading und Staging sowie der Expression der EMT-Marker gezeigt werden. Allerdings sind die mit T3 oder T4 klassifizierten Tumore meist als nicht operabel eingestuft und daher unterrepräsentiert in der Arbeit enthalten.

Die Korrelation der Serum-Werte mit der Expression der EMT-Marker ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Die Analyse der Erscheinungsbilder der beobachteten Zellkerne ließen keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zu. Auch die Risikofaktoren Diabetes Mellitus, Adipositas, Hypertonie und Hyperurikämie stehen nicht mit den Expressionslevel der Marker in Zusammenhang.

Insgesamt sehen wir als Ergebnis dieser Arbeit einen weiteren starken Hinweis auf die essentielle Rolle der EMT und des Spemann-Organisators im Rahmen der Karzinogenese. Neu ist die Analyse eines Stadiums ohne Fernmetastasierung einer Entität, die nicht bekannt für häufige Fernmetastasierung ist. Wir sehen die Ergebnisse vor diesem Hintergrund als neuen Hinweis, dass Karzinogenese auch in frühen Stadien auf EMT-Prozesse zurückgreift um eine Mesenchymalisierung und einen Wachstumsprozess zu ermöglichen. Sowohl die Goosecoid-Expression im Tumorgewebe bei meist noch solitären HCC zu einem mutmaßlich früheren Zeitpunkt der Karzinogenese, als auch die Snail-Expression in nicht karzinogenem Gewebe multifokaler HCC können in Zukunft zu therapeutischen Targets werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, J. Y., Jung, E. Y., Kwun, H. J., Lee, C.-W., Sung, Y.-C., & Jang, K. L. (2002). Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *The Journal of General Virology*, 83(11), 2765-72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388812>
- Akkari, L., Gregoire, D., Floc'h, N., Moreau, M., Hernandez, C., ..., Hibner, U. (2012). Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors. *Journal of Hepatology* 57(5), 1021-1028.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A. P., Bouchet, B. P., Thomas, C., ... Puisieux, A. (2008). Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell*, 14(1), 79-89. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.06.005>
- Assecritova, I. V., Abelev, G. I., Kraevsky, N. A., Perova, S. D., and Perevodchikova, N. I. (1967). Embryonal serum alphaglobulin in cancer patients *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk*, SSSR 22(5), 75-81.
- Battle, E. et al. (2000) The transcription factor Snail is a repressor of E-Cadherin gene Expression in epithelial tumor cells. *Nature Cell Biology* 2, 76-83.
- Beasley, R. P., Lin, C.-C., Hwang, L.-Y., & Chien, C.-S. (1981). Hepatocellular carcinoma and Hepatitis B virus. *The Lancet*, 318(8256), 1129-1133. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)90585-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)90585-7)
- Benn, J., & Schneider, R. J. (1994). Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10350-4. <http://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10350>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2013). Stryer Biochemie (7. Auflage.). Berlin, Heidelberg: *Springer Spektrum*.
- Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., & Nusse, R. (2008). Article Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies. *Stem Cell*, 3(5), 508-518. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.013>
- Bi, W. R., Jin, C. X., Xu, G. T., & Yang, C. Q. (2012). Bone morphogenetic protein-7 regulates Snail signaling in carbon tetrachloride-induced fibrosis in the rat liver. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(6), 1022-1026. <http://doi.org/10.3892/etm.2012.720>
- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D. C., Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*, 58(3), 593-608. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.005>
- Blumberg, B., Wright, C., De Robertis, E., & Cho, K. (1991). Organizer-specific homeobox genes in *Xenopus laevis* embryos. *Science*, 253(5016), 194-196. <http://doi.org/10.1126/science.1677215>

- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P., Moch, H., Höfler, G., Kreipe, H. (2012). Pathologie. *Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH* ISBN 9783437423857
- Borie, F., Tretarre, B., Bouvier, A. M., Faivre, J., Binder, F., Launoy, G., (2009). Primitive liver cancers: epidemiology and geographical study in France. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21, 984–989.
- Bortz, J., Lienert, G. A. (2008) Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung Springer-Verlag 2, 83 ff.; 3, 140 ff.; 3, 185 ff. 4, 240 ff. ISBN 978 3 540 75738 2
- Bosch, F. X., Ribes, J., Díaz, M., & Cléries, R. (2004). Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 127, 5-16. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.011>
- Botaille, F., Rohrmeier, C., Bates, R., Weber, A., Reider, F., Brenmoehl, J., ... Rogler, G. (2008). Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(11), 1514–1527. <http://doi.org/10.1002/ibd.20590>
- Bralet, M. P., Régimbeau, J. M., Pineau, P., Dubois, S., Loas, G., Degos, F., ... Terris, B. (2000). Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 32(2), 200-204. <http://doi.org/10.1053/jhep.2000.9033>
- Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E., & Ferlay, J. (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*, 132(5), 1133-1145. <http://doi.org/10.1002/ijc.27711>
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 678–689.
- Bruyere, F., Namdarian, B., Corcoran, N. M., Pedersen, J., Ockrim, J., Voelzke, B. B., ... Hovens, C. M. (2010). Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers. *Urologic Oncology*, 28(6), 591–6. <http://doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.11.005>
- Bruix, J., & Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*, 53(3), 1020–1022. <http://doi.org/10.1002/hep.24199>
- Bundesamt, S. (2009). Statistisches Bundesamt Gesundheit Todesursachen in Deutschland Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen. *Wirtschaft und Statistik*, 49.
- Bundesamt, S. (2015). Statistisches Bundesamt. *Gesundheit*, Fachserie 12 Reihe 4 2014
- Cadranel, J.-F., Lahmek, P., Causse, X., Bellaiche, G., Bettan, L., Fontanges, T., ... Denis, J. (2007). Epidemiology of chronic hepatitis B infection in France: risk factors for significant fibrosis--results of a nationwide survey. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(4), 565-76. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03400.x>

- Cano, A. Pérez-Moreno, M.-A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.-J., del Barrio, M.-G., Portillo F., Nieto M.-A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology* 2(2),76-83. DOI: 10.1038/35000025
- Cao, G.-W. (2009). Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World Journal of Gastroenterology* 15(46), 5761-5769. <http://doi.org/10.3748/wjg.15.5761>
- Carver E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K., Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biology* 21, 8184–8188.
- Cederbaum, A. (2012). Alcohol metabolism. *Clinical Liver Disease*, 16(4), 667-685. <http://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Viral Hepatitis Surveillance, United States, 25-36. Retrieved from <http://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2013surveillance/index.htm>
- Charalambous, M. P., Lightfoot, T., Speirs, V., Horgan, K., & Gooderham, N. J. (2009). Expression of COX-2, NF-kappaB-p65, NF-kappaB-p50 and IKKalpha in malignant and adjacent normal human colorectal tissue. *British Journal of Cancer*, 101(1), 106-115. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605120>
- Chen, C. (2006). Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. *Journal of the American Medical Association* 295(1), 65-73.
- Chen, Z. F. & Behringer, R. R. (1995). Twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & Development* 9, 686-699.
- Child, C. G., Turcotte, J. G., (1964). Surgery and portal hypertension in Child, C. G., *The liver and portal hypertension* WB Saunders, 50.
- Cho, K. W. Y., Blumberg, B., Steinbeisser, H., & De Robertis, E. M. (1991). Molecular Nature of Spemann's Organizer: the Role of the Xenopus Homeobox Gene goosecoid. *Cell*, 67(6), 1111-1120. <http://doi.org/10.1080/17439760500510569>
- Christian, J. A. N. L., McMahon, J. A., McMahon, A. P., & Moon, R. T. (1991). Xwnt-Q , a Xenopus Wnt-1 // nM-related gene responsive to mesoderm- inducing growth factors , may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Moon*, 1055, 1045-1055.
- Churchill, M. E. A., Tullius, T. D., & Klug, A. (1990). Mode of Interaction of the Zinc Finger Protein Tfiia with a 5s Rna Gene of Xenopus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14), 5528-5532.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469-480. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>

- Cohen, J. (1988). Statistical power analysis for the behavioral sciences. *Lawrence Erlbaum Associates*, (2nd Ed.), 21-23 ISBN 0-8058-0283-5
- Cui, Y., & Jia, J. (2013). Update on epidemiology of hepatitis B and C in China. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(1), 7-10. <http://doi.org/10.1111/jgh.12220>
- Dalgleishi, D. (2013). Create a Simple Box Plot in Excel Contextures Blog <http://blog.contextures.com/archives/2013/06/11/create-a-simple-box-plot-in-excel/>
- Darwish, M.A., Faris, R., Clemens, J.D., Rao, M.R., Edelman R. (1996). High seroprevalence of hepatitis A, B, C, and E viruses in residents in an Egyptian village in The Nile Delta: A pilot study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54, 554-558.
- Destatis (2010). Gesundheit, *Statistisches Bundesamt*, 49 (August).
- Di Bisceglie, A. M. (1997). Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 26(3), 34-38. <http://doi.org/10.1046/j.1440-1746.1998.01752.x>
- Di Costanzo, G. G., Francica, G., & Pacella, C. M. (2014). Laser ablation for small hepatocellular carcinoma: State of the art and future perspectives. *World Journal of Hepatology*, 6(10), 704-715. <http://doi.org/10.4254/wjh.v6.i10.704>
- Donato, F., Boffetta, P., & Puoti, M. (1998). A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 75(3), 347-354. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980130\)75:3<347::AID-IJC4>3.0.CO;2-2](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980130)75:3<347::AID-IJC4>3.0.CO;2-2)
- Duband, J. L., & Thiery, J. P. (1982). Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Developmental Biology*, 94(2), 337-350. [http://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90352-9](http://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90352-9)
- El Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A. L., Munnich, A. & Bonaventure, J. (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genetics*, 15(1), 42-6.
- Elias, M. C., Tozer, K. R., Silber, J. R., Mikheeva, S., Deng, M., Morrison, R. S., ... Rostomily, R. C. (2005). TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia*, 7(9), 824-37. <http://doi.org/10.1593/neo.04352>
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- Emadi-Baygi, M., Soheili, Z.-S., Schmitz, I., Sameie, S., Schulz, W.-A. (2010). Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biology and Toxicology*, 26, 553-567.

- Engelman, J. A., Luo, J., Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 606-19.
- Evans, A. a, Chen, G., Ross, E. a, Shen, F., Lin, W., London, W. T. (2002). Eight-Year Follow-Up of the 90,000-Person Haimen City Cohort: I . Hepatocellular Carcinoma Mortality, Risk Factors, and Gender Differences. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 11, 369-376.
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., & Donato, F. (2004). Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors. *Gastroenterology*, 127(5), 35-50. <http://doi.org/10.1053/j.gast.2004.09.014>
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893-2917. <http://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359-386. <http://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374-1403. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Friedman, S. L., Roll, F. J., Boyles, J., & Bissell, D. M. (1985). Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), 8681-5. <http://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8681>
- Fujimoto, Y., Hampton, L. L., Luo, L. D., Wirth, P. J., & Thorgeirsson, S. S. (1992). Low frequency of p53 gene mutation in tumors induced by aflatoxin B1 in nonhuman primates. *Cancer Research*, 52(4), 1044-1046. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310637>
- Furuya, S., Endo, K., Takahashi, A., Miyazawa, K., Saitoh, M. (2017). Snail suppresses cellular senescence and promotes fibroblast-led cancer cell invasion. *Federation of European Biochemical Societies Open Bio*, 7(10), 1586-1597. doi: 10.1002/2211-5463.12300
- Kamps, U. (2017). Gabler Wirtschaftslexikon Stichwort Normalverteilung *Springer Gabler Verlag*, <http://wirtschaftslexikon.gabler.de/Archiv/2071/normalverteilung-v12.html>
- Gemechu-Hatewu, M., Platt, K. L., Oesch, F., Hacker, H. J., Bannasch, P., & Steinberg, P. (1997). Metabolic activation of aflatoxin B1 to aflatoxin B1-8,9-epoxide in woodchucks undergoing chronic active hepatitis. *International Journal of Cancer*, 73(4), 587-591. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19971114\)73:4<587::AID-IJC21>3.0.CO;2-5](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19971114)73:4<587::AID-IJC21>3.0.CO;2-5)

<https://www.genesis.destatis.de/genesis/online/logon?sequenz=tabelleErgebnis&selection name=23631-0001&sachmerkmal=ICD10Y&sachschluessel=ICD10-C00-C97,ICD10-C00-C14,ICD10-C15-C26,ICD10-C16,ICD10-C18,ICD10-C20,ICD10-C25,ICD10-C30-C39,ICD10-C33-C34,ICD10C43-C44,ICD10-C50,ICD10-C51-C58,ICD10-C53,ICD10-C60-C63,ICD10-C61,ICD10-C64-C68,ICD10-C67,ICD10-C81-C96,ICD10-C91-C95>

Gilsdorf, A. (2015). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch*. <http://doi.org/10.1016/j.khinf.2014.09.017>

Green J. B., Smith J. C. (1990). Graded changes in dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. *Nature*, 347(6291), 391-4.

Greenburg, G., Hay, E. D. (1988). Cytoskeleton and thyroglobulin expression change during transformation of thyroid epithelium to mesenchyme-like cells. *Development*, 102(3), 605-22.

Greten, T., Malek, N., Schmidt, S., Arends, J., Bartenstein, P., Bechstein, W., ... Zech, C. (2013). Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 51(11), 1269-1326. <http://doi.org/10.1055/s-0033-1355841>

Graudal, N., Leth, P., Mårbjerg, L., Galløe, A. M., (1991). Characteristics of cirrhosis undiagnosed during life: a comparative analysis of 73 undiagnosed cases and 149 diagnosed cases of cirrhosis, detected in 4929 consecutive autopsies. *Journal of Internal Medicine*, 230(2), 165-71.

Grotegut, S., von Schweinitz, D., Christofori, G., & Lehenbre, F. (2006). Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *The EMBO Journal*, 25(15), 3534-3545. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601213>

Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., & Kemler, R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*, 121(11), 3529-37.

Harada, T., Shigeta, K., Noda, K., Fukumoto, Y., Nishimura, H., Mizuta, M., Takemoto, T., (1980). Clinical implications of alpha-fetoprotein in liver cirrhosis: five-year follow-up study. *Hepatogastroenterology*, 27(3),169-75.

Hartwell, K. A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A. E., Sgroi, D. C., & Weinberg, R. A. (2006). The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 18969-74. <http://doi.org/10.1073/pnas.0608636103>

Hatzakis, A., Wait, S., Bruix, J., Buti, M., Carballo, M., Cavaleri, M., ... Janssen, H. L. A. (2011). The state of hepatitis B and C in Europe: Report from the hepatitis B and C summit conference. *Journal of Viral Hepatitis*, 18(1), 1-16. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01499.x>

Hay, E. D. (1985). Matrix-cytoskeletal interactions in the developing eye. *Journal of Cellular Biochemistry*, 27(2), 143-56. <http://doi.org/10.1002/jcb.240270208>

- Hay, E. D. (1989). Theory for epithelial-mesenchymal transformation based on the "fixed cortex" cell motility model. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 14(4), 455-457. <http://doi.org/10.1002/cm.970140403>
- Hipp, S., Walch, A., Schuster, T., Losko, S., Laux, H., Bolton, T., ... Becker, K. F. (2009). Activation of epidermal growth factor receptor results in Snail protein but not mRNA overexpression in endometrial cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9), 3858-3867. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00526.x>
- Holbro, T., Civenni, G., & Hynes, N. E. (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research*, 284(1), 99–110. [http://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00099-X](http://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00099-X)
- Horikawa, T., Yang, J., Kondo, S., Yoshizaki, T., Joab, I., Furukawa, M., & Pagano, J. S. (2007). Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Research*, 67(5), 1970-1978. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3933>
- Hosono, S., Kajiyama, H., Terauchi, M., Shibata, K., Ino, K., Nawa, a, & Kikkawa, F. (2007). Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *British Journal of Cancer*, 96(2), 314-20. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603533>
- Howe, L. R., Watanabe, O., Leonard, J., & Brown, A. M. C. (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Research*, 63(8), 1906-1913.
- Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J., Harris, C.C., (1991). Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350(6317), 427-8
- Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., ... Thaler, H. (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 22(6), 696-699. [http://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80226-6](http://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80226-6)
- Iyer, S., & Groopman, J. D. (2011). Interaction of mutant hepatitis B X protein with p53 tumor suppressor protein affects both transcription and cell survival. *Molecular Carcinogenesis*, 50(12), 972-980. <http://doi.org/10.1002/mc.20767>
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (2011). Global Cancer Statistics: 2011. *CA - A Cancer Journal for Clinicians*, 49(2), 33-64, 69-90. <http://doi.org/10.3322/caac.20107>. Available
- Jia, L., Wang, X. W., & Harris, C. C. (1999). Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *International Journal of Cancer*, 80(6), 875-9.
- Jiang, J., & Hui, C.-C. (2008). Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental Cell*, 15(6), 801-812. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.010>
- Jiao, W., Miyazaki, K., Kitajima, Y. (2002). Inverse correlation between E-Cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*, 86, 98-101.

- Kalluri, R. & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428. <http://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Kamath, P. S., Wiesner, R. H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T. M., Kosberg, C. L., ... Kim, W. R. (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*, 33(2), 464-470. <http://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172>
- Kang, S., Bader, A. G., & Vogt, P. K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 802-7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0408864102>
- Kaplan E. L., Meier P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457–81.
- Karnofsky, D. A., Burchenal, J. H., (1949). The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MacLeod, C. M. Evaluation of Chemotherapeutic Agents. *Columbia University Press*, 196
- Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., ... Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13180-5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0605669103>
- Kirchner, G., Kirovski, G., Hebestreit, A., Scholmerich, J., Schlitt, H. J., Stoeltzing, O., & Hellerbrand, C. (2010). Epidemiology and survival of patients with hepatocellular carcinoma in Southern Germany. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 3(2), 169-179.
- Klug, A., Rhodes, D., (1993). Zinkfinger. *Spektrum der Wissenschaft*, 4, 54.
- Krishnamachari, K.A. (1975). Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of western India. *Indian Journal of Medical Research*, 63, 1036-1049.
- Koch, U., Radtke, F. (2007). Notch and cancer: a double-edged sword. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2746-2762.
- Kuhlmann, W. D., & Peschke, P. (2006). Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *International Journal of Experimental Pathology*, 87(5), 343-359. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00485.x>
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., & Kawakami, Y. (2009). Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. *Cancer Cell*, 15(3), 195-206. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.023>
- Kwok, W. K., Ling, M. T., Lee, T. W., Lau, T. C. M., Zhou, C., Zhang, X., ... Wang, X. (2005). Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Research*, 65(12), 5153-5162. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3785>

- Lai, E. C. (2002). Keeping a good pathway down: Transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Reports*, 3(9), 840-845. <http://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf170>
- Lee, C.-C., Liu, J.-Y., Lin, J.-K., Chu, J.-S., & Shew, J.-Y. (1998). p53 point mutation enhanced by hepatic regeneration in aflatoxin B1-induced rat liver tumors and preneoplastic lesions. *Cancer Letters*, 125(1-2), 1-7. [http://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00415-1](http://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00415-1)
- Lee, T. K., Poon, R. T. P., Yuen, A. P., Ling, M. T., Kwok, W. K., Wang, X. H., ... Fan, S. T. (2006). Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical Cancer Research*, 12(18), 5369-5376. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2722>
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275(5308), 1943-7.
- Lim, S. O., Kim, H., & Jung, G. (2010). P53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. *FEBS Letters*, 584(11), 2231-2236. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.006>
- Lim, S.-O., Kim, H. S., Quan, X., Ahn, S.-M., Kim, H., Hsieh, D., ... Jung, G. (2011). Notch1 binds and induces degradation of Snail in hepatocellular carcinoma. *BMC Biology*, 9(1), 83. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-9-83>
- Lin, Y.-C., Li, L., Makarova, A.V., Burgers, P. M., Stone, M. P., Lloyd, R. S. (2014). Molecular basis of aflatoxin-induced mutagenesis - role of the aflatoxin B1-formamidopyrimidine adduct. *Carcinogenesis* 35(7), 1461-1468. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu003>
- Llovet, J. M., Bruix, J., Fuster, J., Castells, A., Garcia-Valdecasas, J. C., Grande, L., ... Rodés, J. (1998). Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power. *Hepatology*, 27(6), 1572-7. <http://doi.org/10.1002/hep.510270616>
- Llovet, J. M., Bru, C., Bruix J., (1999). Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Seminars in Liver Disease*, 19, 329-38.
- Llovet, J. M., Burroughs, A., & Bruix, J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362(9399), 1907-17. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14964-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14964-1)
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P. ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-90.
- Llovet, J. M., Schwartz, M., Mazzaferro, V., (2005). Resection and Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Seminars in Liver Disease*, 25(2), 181-200.

- Llovet, J. M., Vilana, R., Bru, C., Bianchi, L., Salmeron, J. M., Boix, L., ... Bruix, J. (2001). Increased risk of tumor seeding after percutaneous radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 33(5), 1124–1129. <http://doi.org/10.1053/jhep.2001.24233>
- Lopez, C., Ramos, L., Bulacio, L., Ramadan, S., & Rodriguez, F. (2002). Aflatoxin B1 content in patients with hepatic diseases. *Medicina*, 62, 313-316.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., ... Memish, Z. A. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2095-128. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Lu, F. M., & Lux, S. E. (1996). Constitutively active human Notch1 binds to the transcription factor CBF1 and stimulates transcription through a promoter containing a CBF1-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5663-7. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5663>
- Maestro, R., Dei Tos, A. P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., ... Hannon, G. J. (1999). Twist Is a Potential Oncogene That Inhibits Apoptosis. *Genes and Development*, 13(17), 2207-2217. <http://doi.org/10.1101/gad.13.17.2207>
- Martin, A. C., & Goldstein, B. (2014). Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development*, 141(10), 1987–1998. <http://doi.org/10.1242/dev.102228>
- Matsuo, N., Shiraha, H., Fujikawa, T., Takaoka, N., Ueda, N., Tanaka, S., ... , Yamamoto, K. (2009). Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *Biomed Central Cancer*, 9, 240.
- Mazzaferro, V., Battiston, C., Perrone, S., Pulvirenti, A., Regalia, E., Romito, R., ... Andreola, S. (2004). Radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients awaiting liver transplantation: a prospective study. *Annals of Surgery*, 240(5), 900-9. <http://doi.org/10.1097/01.sla.0000143301.56154.95>
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., ... Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*, 334(11), 693-9. <http://doi.org/10.1056/NEJM199603143341104>
- Miller, F. D., & Abu-Raddad, L. J. (2010). Evidence of intense ongoing endemic transmission of hepatitis C virus in Egypt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14757-14762. <http://doi.org/10.1073/pnas.1008877107>
- Mironchik, Y., Winnard, P. T., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A. P., ... Raman, V. (2005). Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Research*, 65(23), 10801-10809. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0712>

- Miyazono, K. (2009). Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(8), 314-323. <http://doi.org/10.2183/pjab.85.314>
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., Miyazaki, K. (2005). Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 92, 252-258.
- Mohr, O. (1919). Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in *Drosophila*. *Genetics*, 4, 275-282.
- Moody, S. E., Perez, D., Pan, T. C., Sarkisian, C. J., Portocarrero, C. P., Sterner, C. J., ... Chodosh, L. A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*, 8(3), 197-209. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.07.009>
- Morimoto, M., Numata, K., Kondou, M., Nozaki, A., Morita, S., & Tanaka, K. (2010). Midterm outcomes in patients with intermediate-sized hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial for determining the efficacy of radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization. *Cancer*, 116(23), 5452-5460. <http://doi.org/10.1002/cncr.25314>
- Mota, A., Areias, J., Cardoso, M.F., (2011). Chronic liver disease and cirrhosis among patients with hepatitis B virus infection in northern Portugal with reference to the viral genotypes. *Journal of Medical Virology*, 83, 71-77.
- Murray, P.R., (2009). Mycotoxins and Mycotoxicoses. *Medical Microbiology*, 6th ed. Elsevier, 211-216.
- Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K., Takeichi, M. (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, 329, 341-343.
- Nakaya, Y., & Sheng, G. (2008). Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: An embryological view. *Development Growth and Differentiation*, 50(9), 755-766. <http://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01070.x>
- Nam, Y., Weng, A. P., Aster, J. C., Blacklow, S. C. (2003). Structural requirements for assembly of the CSL intracellular Notch1 Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 21232-9.
- Nieuwkoop, P. D. (1973). The "organization center" of the amphibian embryo: its origin, spatial organization and morphogenetic action. *Advances in Morphogenesis*. 10, 1-39.
- Niu, R. F., Zhang, L., Xi, G. M., Wie, X. Y., Yang, Y., Shi, Y. R., ... Hao, X. S. (2007). Upregulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 26(3), 385-394.

- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E., (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795-801.
- Nusse, R., & Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), 99-109. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90409-3](http://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3)
- Oelgeschläger, M., Kuroda, H., Reversade, B., & De Robertis, E. M. (2003). Chordin is required for the spemann organizer transplantation phenomenon in *Xenopus* embryos. *Developmental Cell*, 4(2), 219-230. [http://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00404-5](http://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00404-5)
- Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ohhashi, S., Yamaguchi, H., Konomi, H., Nagai, E., ... Tanaka, M. (2007). Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: Clinical implication of Twist expression in pancreatic juice. *International Journal of Cancer*, 120(8), 1634-1640. <http://doi.org/10.1002/ijc.22295>
- Okada, H., Strutz, F., Danoff, T.M., Kalluri, R., Neilson, E.G. (1996). Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contributions to Nephrology*, 118, 147-54.
- Oldenburg, A., Albrecht, T., Hohmann, J., Skrok, J., Wolf, K. J., (2007). HCC-Detektion mittels KM-gestütztem Ultraschall mit SonoVue® in „low-MI-real-time-Technik“ im Vergleich zum konventionellen US. *Ultraschall in der Medizin*, 28, 5-27. <http://doi.org/10.1055/s-2007-988993>
- Omenetti, A., Porrello, A., Jung, Y., Yang, L., Popov, Y., Choi, S. S., ... Diehl, A. M. (2008). Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*, 118(10), 3331–3342. <http://doi.org/10.1172/JCI35875>
- Parker, C. S., & Roeder, R. G. (1977). Selective and accurate transcription of the *Xenopus laevis* 5S RNA genes in isolated chromatin by purified RNA polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(1), 44-48. <http://doi.org/10.1073/pnas.74.1.44>
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12), 3030-3044. <http://doi.org/10.1002/ijc.21731>
- Pattabiraman, D. R., Bierie, B., Kober, K. I., Thiru, P., Krall, J. A., Zill, C., Reinhardt, F., Tam, W. L., Weinberg, R. A. (2016). Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science*, 351, 6277. doi: 10.1126/science.aad3680
- Pavletich, N. P., Pabo, C. O. (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*, 261(5129), 1701-7.
- Pedersen, K. O., (1944). Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature*, 154, 575.
- Peers, F., Bosch, X., Kaldor, J., Linsell, A., Pluijmen, M., (1987). Aflatoxin exposure, hepatitis b virus infection and liver cancer in Swaziland. *International Journal of Cancer*, 39(5), 545-553. <http://doi.org/10.1002/ijc.2910390502>

- Peinado, H., Quintanilla, M., & Cano, A. (2003). Transforming growth factor β -1 induces Snail transcription factor in epithelial cell lines. Mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 21113-21123. <http://doi.org/10.1074/jbc.M211304200>
- Pelham, H. R., Wormington, W. M., & Brown, D. D. (1981). Related 5S RNA transcription factors in *Xenopus* oocytes and somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(3), 1760-1764. <http://www.pnas.org/content/78/3/1760.full.pdf>
- Plumpe, J., Malek, N. P., Bock, C.-T., Rakemann, T., Manns, M. P., & Trautwein, C. (2000). NF-kappa B determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *American Journal of Gastrointestinal Liver Physiology*, 278(1), 173-183.
- Raffaele, A., Valenti, M., Iovenitti, M., Matani, A., Bruno, M. L., Altobelli, E., D'Alessandro, A., Barnabei, R., Leonardis, B., Taglieri, G. (2001). High prevalence of HCV infection among the general population in a rural area of central Italy. *European Journal of Epidemiology*, 14(1), 41-46. <http://doi.org/10.1023/A:1010932832190>.
- Rastaldi, M. P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell'Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., ... D'Amico, G. (2002). Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney International*, 62, 137-146. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00430.x>
- Robert Koch Institut (2015). Epidemiologisches Bulletin. *Epidemiologisches Bulletin*, 15, 119-127. <http://doi.org/10.17886/EpiBull-2015-011.3>
- Saad, S., Stanners, S. R., Yong, R., Tang, O., & Pollock, C. A. (2010). Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(7), 1115-22. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.016>
- Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., & Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6392-6397. <http://doi.org/10.1073/pnas.0802047105>
- Sato, Y., Harada, K., Itatsu, K., Ikeda, H., Kakuda, Y., Shimomura, S., ... Nakanuma, Y. (2010). Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 177(1), 141-52. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090747>
- Savolainen, V. T., Penttila, A., Karhunen, P.J., (1992). Delayed increases in liver cirrhosis mortality and frequency of alcoholic liver cirrhosis following an increment and redistribution of alcohol consumption in Finland: evidence from mortality statistics and autopsy survey covering 8533 cases in 1968-1988. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 16, 661-4.

- Sell, S., Hunt, J. M., Dunsford, H. A., Mice, T., Chisari, F. V. (1991). Synergy between Hepatitis B Virus Expression and Chemical Hepatocarcinogens in Transgenic Mice Synergy between Hepatitis B Virus Expression and Chemical Hepatocarcinogens. *Cancer Research*, 51, 1278-1285.
- Sequist, L. V, Yang, J. C.-H., Yamamoto, N., O'Byrne, K., Hirsh, V., Mok, T., ... Schuler, M. (2013). Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(27), 3327-34. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.2806>
- Sherlock, S., Niazi, S. P., Fox, R. A., & Scheuer, P. J. (1970). Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with Hepatitis-associated (Australia) Antigen in serum. *The Lancet*, 295(7659), 1243-1247. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(70\)91737-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(70)91737-X)
- Shin Kim, S., Yeom, S., Kwak, J., Ahn, H.-J., & Lib Jang, K. (2016). Hepatitis B virus X protein induces epithelial-mesenchymal transition by repressing E-cadherin expression via upregulation of E12/E47. *The Journal of General Virology*, 97(1), 134-43. <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000324>
- Spemann, H., Mangold, H. (1923). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *International Journal of Developmental Biology*, 45(1), 13-38. <http://doi.org/10.1007/BF02108133>
- Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7, 165-167. doi:10.1038/nrc2072
- Stracke, M. L., Liotta, L. A., (1992). Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *In Vivo*, 6(4), 309-16.
- Strickland, G. T. (2006). Liver disease in Egypt: Hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology*, 43(5), 915-22. <http://doi.org/10.1002/hep.21173>
- Strobel, D., Seitz, K., Blank, W., Schuler, A., Dietrich, C., von Herbay, A., ... Bernatik, T. (2008). Contrast-enhanced ultrasound for the characterization of focal liver lesions--diagnostic accuracy in clinical practice (DEGUM multicenter trial). *Ultraschall in der Medizin*, 29(5), 499-505. <http://doi.org/10.1055/s-2008-1027806>
- Stroffolini, T., Andreone, P., Andriulli, A., Ascione, A., Craxì, A., Chiaramonte, M., ... Gasbarrini, G. (1998). Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy. *Journal of Hepatology*, 29(6), 944-952. [http://doi.org/10.1016/S0168-8278\(98\)80122-0](http://doi.org/10.1016/S0168-8278(98)80122-0)
- Sugimachi, K., Tanaka, S., Kameyama, T., Taguchi, K., Aishima, S., Shimada, M., ... Tsuneyoshi, M. (2003). Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9(7), 2657-2664.
- Sun, L. (2014). Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 40(2), 179-189. <http://doi.org/doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.02.07>

- Sun, T., Sun, B. C., Zhao, X. L., Zhao, N., Dong, X. Y., Che, N., ... Liu, Z. Y. (2011). Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: A study of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 54(5), 1690-1706. <http://doi.org/10.1002/hep.24543>
- Sun, T., Zhao, N., Zhao, X. L., Gu, Q., Zhang, S. W., Che, N., ... Sun, B. C. (2010). Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: Its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology*, 51(2), 545-556. <http://doi.org/10.1002/hep.23311>
- Suttorp, N., Möckel, M., Siegmund, B., Dietel, M. (2016). *Harrisons Innere Medizin. ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft*, 18. Auflage, Band 3, Teil 14, Abschnitt 2. ISBN 978 3 940615 20 6
- Talwalkar, J. A., & Gores, G. J. (2004). Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5), 126-132. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.026>
- Tanaka, Y., Hanada, K., Orito, E., Akahane, Y., Chayama, K., Yoshizawa, H., ... Mizokami, M. (2005). Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C epidemics in Japan. *Journal of Hepatology*, 42(1), 47-53. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.09.023>
- Tatarinov, Y. S. (1964). Übersetzung 1965 in *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24: T916.) Zitat aus: Smith, J. A., Francis, T. I., Edington, G. M., Williams, A. O. (1971) Human alpha-Fetoprotein in body fluids. *British Journal of Cancer*, 25(2), 337-42.
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., ... Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15449-54. <http://doi.org/10.1073/pnas.1004900107>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871-890. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thisse, B., Messal, M. El, & Perrin-Schmitt, F. (1987). The twist gene: Isolation of a Drosophila zygote gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Research*, 15(8), 3439-3453. <http://doi.org/10.1093/nar/15.8.3439>
- Thisse, B., Stoetzel, C., Messal, M. & Perrin-Schmitt, F. (1987). Genes of the Drosophila maternal dorsal group control the specific expression of the zygotic gene twist in presumptive mesodermal cells. *Genes and Development*, 1, 709-715.
- Tickle, C., Trinkaus, J. P. (1976). Observations on nudging cells in culture. *Nature*, 261(5559), 413.
- Trembley, A., (1744). Mémoires pour servir a l'histoire d' un genre de polypes d'eau douce: à bras en forme de cornes Abraham Trembley. *Verlag: Jean et Herman Verbeek*.

- Tseng, T.C., (1994). Recent aspects of aflatoxin Research in Taiwan. *J Toxicol Toxin Rev.* 13:229–241.
- UN. (2012). Population and Vital Statistics Report, LXIV, 8.
- Vanderburg, C. R., Hay, E. D. (1996). E-cadherin transforms embryonic corneal fibroblasts to stratified epithelium with desmosomes. *Acta Anatomica*, 157(2), 87-104.
- Vesuna, F., van Diest, P., Hshiang Chen, J., Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2), 235-241. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.151
- Vincent, T., Neve, E. P. A., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P. L., Crystal, R. G., Garcia de Herreros, A., Moustakas, A., Pettersson, R.F., Fuxe, J. (2009). A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial–mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 11, 943-950. <http://doi.org/10.1038/ncb1905>
- Vivanco, I., Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2, 489-501. <http://doi.org/10.1038/nrc839>
- Wachtler, F., (2005). Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. *Facultas*, Auflage: 7., veränd. Aufl. 1. September 2005 ISBN-10: 3850766810
- Waldmann, J., Slater, E. P., Langer, P., Buchholz, M., Ramaswamy, A., Walz, M. K., ... Fendrich, V. (2009). Expression of the transcription factor snail and its target gene twist are associated with malignancy in pheochromocytomas. *Annals of Surgical Oncology*, 16(7), 1997-2005. <http://doi.org/10.1245/s10434-009-0480-y>
- Weiss, M. B., Abel, E. V., Mayberry, M. M., Basile, K. J., Berger, A. C., & Aplin, A. E. (2012). TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells. *Cancer Research*, 72(24), 6382-6392. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1033>
- Wiegand, J., Berg T. (2013). The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis - part 1 of a series on liver cirrhosis. *Deutsches Ärzteblatt*, 110(6), 85-91. <http://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0085>
- Winkler, J., & Stolzenberg, H. (1999). Der Sozialschichtindex im Bundes-Gesundheitssurvey. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes)*, 61, 178-83.
- Wittekind, Ch., Asamura, H., Sobin, L. H., (2014). TNM Atlas. *John Wiley & Sons*, 7. Auflage.
- Woo, H. Y., Min, A. L., Choi, J. Y., Bae, S. H., Yoon, S. K., & Jung, C. K. (2011). Clinicopathologic significance of the expression of Snail in hepatocellular carcinoma. *Korean Journal of Hepatology*, 17(1), 12-18. <http://doi.org/10.3350/kjhep.2011.17.1.12>

- World Health Organization. (1999). Hepatitis C – global prevalence (update). *Weekly Epidemiological Record*, 74(49), 421-428.
- World Health Organization. (2010). WHO country profile - India, 2010. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/profiles/ind.pdf?ua=1
- World Health Organization. (2010). WHO country profile - China, 2010. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/profiles/ind.pdf?ua=1
- World Health Organization. (2014). Alcohol consumption: levels and patterns. *World Health Organisation*, 2, 27-42.
- Wu, C., Wang, C., Tseng, C., Chen, H., Wu, M., Lin, J., ... Chen, G. (2005). Helicobacter pylori promote gastric cancer cells invasion through a NF- κ B and COX-2-mediated pathway. *World Journal of Gastroenterology*, 11(21), 3197-3203.
- Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P. G., Qiu, S., Evers, B. M., & Zhou, P. (2009). Stabilization of Snail by NF- κ B Is Required for Inflammation- Induced Cell Migration and Invasion. *Cancer Cell*, 15(5), 416-428. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.016>. Stabilization
- Xia GL, Liu CB, Cao HL, Bi SL, Zhan MY, Su CA, et al. (1996). Prevalence of hepatitis B and C virus infections in the general Chinese population. Results from a nationwide cross-sectional seroepidemiologic study of hepatitis A, B, C, D, and E virus infections in China. *Int Hepatol Commun*. 5, 62-73.
- Xue, T. C., Ge, N. L., Zhang, L., Cui, J. F., Chen, R. X., You, Y., ... Ren, Z. G. (2014). Gooseoid promotes the metastasis of hepatocellular carcinoma by modulating the epithelial-mesenchymal transition. *Public Library of Science ONE*, 9(10), 1-10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0109695>
- Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., Chiou, S. H., Su, C. W., Chou, T. Y., ... Wu, J. C. (2009). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 50(5), 1464-1474. <http://doi.org/10.1002/hep.23221>
- Yang, J., Mani, S. a, Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. a, Come, C., ... Lamarque, A. (2004). Twist , a Master Regulator of Morphogenesis , Plays an Essential Role in Tumor Metastasis Ben Gurion University of the Negev. *Cell*, 117, 927-939. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
- Yang, Z., Zhang, X., Gang, H., Li, X., Li, Z., Wang, T., Han, J., Luo, T., Wen, F., Wu, X. (2007). Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3), 925-30.
- Yao, F. Y., Bass, N. M., Ascher, N. L., & Roberts, J. P. (2004). Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Lessons from the first year under the Model of End-Stage Liver Disease (MELD) organ allocation policy. *Liver Transplantation*, 10(5), 621-630. <http://doi.org/10.1002/lt.20159>

- Yeh, F.-S., Yu, M. C., Mo, C.-C., Luo, S., Tong, M. J., & Henderson, B. E. (1990). Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guangxi, China. *Health Policy*, 14(2), 157. [http://doi.org/10.1016/0168-8510\(90\)90389-U](http://doi.org/10.1016/0168-8510(90)90389-U)
- Young, I. D. & Swift, P. G. (1985). Parietal foramina in the Saethre-Chotzen syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 22(5), 413-414.
- Zeisberg, M., Bottiglio, C., Kumar, N., Maeshima, Y., Strutz, F., Muller, G. A., & Kalluri, R. (2003). Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 285(6), 1060-1067.
- Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., Kalluri, R. (2003). BMP-7 counteracts TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine*, 9, 964-968. <http://doi.org/10.1038/nm888>
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H., & Kalluri, R. (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23337-23347. <http://doi.org/10.1074/jbc.M700194200>
- Zhang, H., Zhai, Y., Hu, Z., Wu, C., Qian, J., Jia, W., et al., (2010). Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nature Genetics*, 42, 755-758. <http://doi.org/10.1038/ng.638>
- Zhao, J., Dong, D., Sun, L., Zhang, G., Sun, Li. (2014). Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer *International Brazilian Journal Of Urology* 40, 2. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.02.07>
- Zhou, Q., Wang, Y., Peng, B., Liang, L., & Li, J. (2013). The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Biomed Central Cancer*, 13, 244. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-13-244>
- Zucchini-Pascal, N., Peyre, L., de Sousa, G., Rahmani, R. (2012). Organochlorine pesticides induce epithelial to mesenchymal transition of human primary cultured hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 3963-70. doi:10.1016/j.fct.2012.08.009.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellen

Tab. 1	Tumorentitäten mit erhöhter Twist-Expression mit Referenzen.	18
Tab. 2	Kriterien und entsprechende Score-Punkte des Child-Pugh-Score (Child & Turcotte, 1964).	26
Tab. 3	Kriterien und Bezifferung der TNM-Stadien sowie die Zusammenfassung im UICC-Score. Die Tabellen sind nach der Originalversion des UICC (Union internationale contre le cancer) erstellt (Wittekind et al., 2014).	31
Tab. 4	Kriterien und Bezifferung der BCLC-Klassifikation (Llovet et al., 1999).	32
Tab. 5	Abstufung der quantitativen Auswertung für IHC Goosecoid in HCC.	44
Tab. 6	Abstufung der qualitativen Auswertung für IHC Goosecoid in HCC.	44
Tab. 7	Verwendete Geräte sowie Reagenzien mit Herstellernachweis.	51
Tab. 8	Testung der Hypothese, dass die Verteilung nicht parametrisch ist. Anhand des Kolmogorov-Smirnov-Test für einzelne Stichproben, wird die Hypothese auf der Grundlage der Signifikanz auf 0,001-Ebene als wahr angenommen.	56
Tab. 9	Analyse der Verteilung der Expressionslevel für Snail, Twist und Goosecoid in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe.	56
Tab. 10	Vergleich der RNA-Expression aller Proben mittels Mann-Whitney-U-Test (ungepaart). N: nicht karzinogenes Gewebe; T: Tumorgewebe.	57
Tab. 11	Eckdaten der Boxplots aus Fig.5 für FC Snail in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe.	58
Tab. 12	Eckdaten der Boxplots aus Fig.6 für FC Goosecoid in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe.	58
Tab. 13	Vergleich der mRNA-Expression aller Proben mittels Wilcoxon-Test (gepaart). T: Tumorgewebe; N: nicht karzinogenes Gewebe.	59
Tab. 14	Eckdaten der Boxplots für IHC Intensität/Quantität-Score in nicht kanzerogenem Gewebe und Tumorgewebe.	61
Tab. 15	Ergebnisse der Auswertung der immunhistochemischen Färbung von nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T) mit den zugehörigen FC-Werten der mRNA-Expression von Goosecoid (Gsc).	62
Tab. 16	Statistische Analyse des IHC-Intensität/Quantität-Score in nicht karzinogenem Gewebe gegen Tumorgewebe mittels Mann-Whitney-U-Test.	64

Tab. 17	Kreuztabelle Häufigkeiten Tumorgröße (\leq / $>$ 5cm) bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe.	65
Tab. 18	Kreuztabelle Häufigkeiten unifokaler und multifokaler HCC bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe im Vergleich zu korrespondierendem Gewebe.	66
Tab. 19	Eckdaten der Boxplots aus Fig. 8 für FC Gsc in nicht kanzerogenem Gewebe aus solitären und multifokalen HCC.	67
Tab. 20	Eckdaten der Boxplots aus Fig. 9 für FC Gsc in Tumorgewebe aus solitären und multifokalen HCC.	67
Tab. 21	Kreuztabelle Häufigkeiten Tumorgröße (\leq / $>$ 5cm) bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe und Tumorgewebe im Vergleich zum korrespondierenden Gewebe.	68
Tab. 22	Kreuztabelle Häufigkeiten Tumorgröße (\leq / $>$ 5cm) bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).	69
Tab. 23	Signifikanz des Logrank-Tests der Überlebensstatistik. Kein p unterschreitet den Wert 0,05. T: Tumorgewebe; N: nicht karzinogenes Gewebe.	71
Tab. 24	Ergebnisse der Kreuztabellen für die histopathologischen, laborchemischen und klinischen Parameter und die Expression von Snail in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).	73
Tab. 25	Ergebnisse der Kreuztabellen für die histopathologischen, laborchemischen und klinischen Parameter und der Expression von Snail in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).	75
Tab. 26	Ergebnisse der Kreuztabellen für die histopathologischen, laborchemischen und klinischen Parameter und der Expression von Twist in nicht karzinogenem Gewebe (N) und Tumorgewebe (T).	77

7.2 Diagramme

Fig. 1	Expression von Goosecoid-mRNA durch Insulin und HGF im Proliferationsmodell.	52
Fig. 2	Expression von Goosecoid-mRNA nach Leber-schädigung mit CCl4 im Mausmodell.	52
Fig. 3 A/B	A Hochgradig differenzierte HCC sind unterrepräsentiert. 15 Gewebe von 114 wurden G3 klassifiziert. B Hochgradig invasiv klassifizierte HCC sind unterrepräsentiert. 2 von 117 HCC sind T4 klassifiziert.	54
Fig. 4	Beispiel-Diagramm für x Anzahl Gewebe und y Fold change	55

	von Goosecoid im Tumorgewebe.	
Fig. 5	Goosecoid ist in HCC-Gewebe im Vergleich zu nicht karzinogenem Gewebe erhöht exprimiert. 88 Tumorgewebe (T) und 87 nicht karzinogene Gewebe (N) sind unverbunden in Boxplots dargestellt.	58
Fig. 6	Snail ist in nicht karzinogenem Gewebe im Vergleich zum Tumorgewebe erhöht exprimiert. 88 Tumorgewebe (T) und 87 nicht karzinogene Gewebe (N) sind unverbunden in Boxplots dargestellt.	58
Fig. 7	IHC-Intensität/Quantität-Score in 5 nicht kanzerogenen Geweben und 8 Tumorgeweben. HCC-Gewebe zeigt eine tendenziell stärkere Färbung.	62
Fig. 8	Punktdiagramm zur Darstellung eines linearen Zusammenhangs der IHC-Score-Werte mit der Auswertung für Goosecoid (Gsc) im Tumorgewebe und den FC-Werten für Gsc der qRT-PCR.	63
Fig. 9	Expression von Goosecoid im Tumorgewebe bei Tumordurchmesser von \leq / $>$ 5cm. 33 HCC Primärtumore \leq 5cm, 41 $>$ 5cm im Säulendiagramm.	65
Fig. 10	Häufigkeiten unifokaler und multifokaler HCC bei hoher/niedriger Expression von Goosecoid (Gsc) in Tumorgewebe im Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe.	66
Fig. 11	Expression von Goosecoid im nicht kanzerogenen Gewebe bei solitären und multifokalen HCC. 50 HCC waren unifokal, 31 multifokal.	67
Fig. 12	Expression von Goosecoid im Tumorgewebe bei unifokalen oder multifokalen HCC. 50 HCC waren unifokal, 31 multifokal.	67
Fig. 13	Häufigkeiten von solitär und multifokal ausgeprägten Tumorgeweben bei hoher/niedriger Expression von Snail in nicht karzinogenem Gewebe im Vergleich zum korrespondierenden Tumorgewebe.	68
Fig. 14	Expression von Goosecoid im Tumorgewebe (T) bei Tumordurchmesser von \leq / $>$ 5cm. 33 HCC Primärtumore \leq 5cm, 41 $>$ 5cm im Säulendiagramm.	69
Fig. 15 A/B	Kaplan-Meier-Kurven für die Staging Gruppen T1/2 und T3/4 und für Grading G2 und G3 als Kontrolle der Repräsentativität.	71
Fig. 16 A/B	Kaplan-Meier-Kurven exemplarisch dargestellt für Goosecoid in Tumorgewebe (TU) und nicht karzinogenem Gewebe (N) erhöht (rot) bzw. nicht erhöht (blau) exprimiert.	71

7.3 Abbildungen

Abb. 1	Aus der Originalarbeit von Spemann und Mangold (1923);	4
--------	--	---

	Transplantation von Embryogewebe.	
Abb. 2	Schema einer Epithelzelle die sich von der Epithelmembran löst um eine EMT zu unterlaufen (Hay, 1989).	7
Abb. 3	Boxplot als schematische Darstellung mit Beschriftung wie in Text beschrieben (Dalgleishi, 2013).	50
Abb. 4	Negativkontrolle eines Tumorgewebes. Parenchym- wie auch Epithelzellen zeigen ohne Antikörperfärbung keine Reaktion.	60
Abb. 5	Nicht karzinogenes Gewebe nach Inkubation mit Antikörper und Färbung. Keine signifikante Farbreaktion.	63
Abb. 6	Korrespondierendes Tumorgewebe nach Inkubation mit Antikörper und Färbung. Deutliche Farbreaktion, in diesem Schnitt maßgeblich in den Zellkernen von Hepatozyten.	64

8 Posterpräsentationen

Jahrestagung der German Association of the Study of the Liver - Regensburg 2011

Schlagheck, J.M., Godoy, P., Campos, G., Stöber, R., Hengstler, J.G., Vogt, R., Melter M., Weiss, T.S. (2011). Epithelial mesenchymal Transition (EMT) associated transcription factor Goosecoid is highly expressed in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 49 - P2_77 DOI: 10.1055/s-0030-1269594

Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft - Regensburg 2011

Schlagheck, J.M., Godoy, P., Campos, G., Stöber, R., Hengstler, J.G., Vogt, R., Melter M., Weiss, T.S. (2011). Die Expression des EMT - assoziierten Transkriptionsfaktors Goosecoid ist im Hepatozellulärem Karzinom (HCC) erhöht.

9 Eidesstattliche Erklärung

Name Julian Michael Franz Schlagheck
Geburtsdatum 22.11.1985
Geburtsort Essen

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst, andere als die in ihr angegebene Literatur nicht benutzt und dass ich alle ganz oder annähernd übernommenen Textstellen sowie verwendete Grafiken, Tabellen und Auswertungsprogramme kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, dass die vorgelegte elektronische mit der schriftlichen Version der Dissertation übereinstimmt und die Abhandlung in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

10 Danksagung

Ich danke zunächst meinem Doktorvater Prof. Thomas Weiß für die geduldige Ausbildung, der Hilfestellung bei der Erarbeitung der Promotionsarbeit sowie für die guten Ideen bezüglich der Fragestellungen. Auch für die Möglichkeit die Ergebnisse bei verschiedenen Gelegenheiten vorstellen zu dürfen möchte ich mich bedanken. Insbesondere danke ich ihm aber für die unermüdliche Motivation.

Mein Dank gilt zudem Dr. Rania Dayoub für die Hilfe bei der praktischen Ausführung der Laborarbeit. Zudem bedanke ich mich besonders bei Elke Gerstl und Susanne Heyn für die große Hilfe auf persönlicher sowie fachlicher Ebene im Laboralltag.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Jan Hengstler, insbesondere bei Dr. Patricio Godoy, möchte ich mich für die Durchführung der qRT-PCR bedanken.

Meine Eltern haben mir mein Studium ermöglicht und mich in allen Lebenslagen in beispielloser Weise unterstützt. Dafür, sowie für das komplizierte Lektorat, möchte ich mich besonders bedanken.

Meine Ehefrau Verena verzichtet aufgrund meines Berufs bereits seit einigen Jahren auf ein geregeltes Eheleben. Dies hat das Verfassen der Promotionsarbeit in letzter Zeit noch schwieriger gemacht. Ich bedanke mich bei ihr für die unendliche Geduld und die liebevolle Unterstützung.