

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Hypoxia-Inducible Lipid Droplet-Associated Protein (HILPDA)
als neuer prognostischer Marker und mögliche therapeutische Zielstruktur
im Hepatozellulären Karzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Kristina Lenk, geborene Berndt
aus Mainz

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

01.03.2024

Für meinen Ehemann
und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Klinik und Diagnostik.....	3
1.1.3 Histopathologie, Pathogenese und HCC-Subgruppen	4
1.1.4 Therapie und Prognose	7
1.2 HILPDA, ein neuer Prognostischer Biomarker	12
1.2.1 Erstentdeckung, Induktion und Lokalisation von HILPDA.....	12
1.2.2 Bedeutung von HILPDA im Lipidmetabolismus	12
1.2.3 Bedeutung von HILPDA in Malignomen	15
1.3 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Chemikalien und Lösungen.....	22
2.1.4 Puffer und Medien.....	24
2.1.5 Zellkultur	25
2.1.6 Kits und Assays	26
2.1.7 Immunhistochemie.....	26
2.1.8 Antikörper	27
2.1.9 Oligonukleotid-Sequenzen	29
2.1.10 Vektoren und Plasmide	30
2.1.11 Humanes Lebergewebe	31
2.1.12 Zelllinien	33

2.1.13	Bakterienkultur	33
2.1.14	Software	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Mikroskopische Techniken.....	34
2.2.2	Zellkultur	38
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	42
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.5	Statistische Methoden.....	51
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Analyse der Proteinexpression von HILPDA <i>in situ</i>	53
3.2	Nachweis von HILPDA <i>in vitro</i>	58
3.3	Induktion von HILPDA durch Hypoxie	61
3.4	Lokalisation von HILPDA <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	65
3.5	Funktionsanalyse der Überexpression von HILPDA <i>in vitro</i>	70
3.5.1	Quantifizierung der Lipidtropfengröße unter HILPDA-Überexpression in HepG2-Zellen	71
3.5.2	Migrationsversuche.....	73
3.5.3	Proliferationsversuche	76
4	Diskussion	82
4.1	Stärken und Limitationen der Studie	82
4.2	Differenzielle Expression von HILPDA im HCC und Validierung als prognostischer immunhistochemischer Marker.....	83
4.3	Assoziation der HILPDA-Expression mit prognostisch ungünstigen klinischen Faktoren und histopathologischen Parametern.....	84
4.4	Einfluss der Ätiologie auf die HILPDA-Expression im HCC	87
4.5	HILPDA als potenzieller Mediator einer vermehrten Tumoraggressivität....	88
4.6	Fazit und Ausblick.....	92
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

7 Anhang	113
Danksagung.....	V
Lebenslauf	VI

Abkürzungsverzeichnis

AFP	α 1-Fetoprotein
AFP-L3	Lektin-reaktives α -Fetoprotein
AJCC	„American Joint Committee on Cancer“
ALBI	Albumin-Bilirubin-Score
Amp	Ampicillin
Ang2	Angiopoietin 2
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
ASR	„age standardized incidence rates“
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
BCLC	„Barcelona Clinic Liver Cancer staging classification“
BODIPY®	4,4-Difluor-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diazas-Indacene
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	Chemolumineszenzreaktion
ECOG	„Eastern Cooperative Oncology Group“
EDTA	Ethylen-diamin-N,N,N',N'-Tetra-Acetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Retikulum

FCS	fetales Rinderserum
FLIM	Fluoreszenz Lifetime Imaging Mikroskopie
FS	Fettsäuren
GPX	Glutathionperoxidasen
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
HBV	Hepatitis B-Virus
HCA	Hepatozelluläres Adenom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
H&E	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HH	hereditäre Hämochromatose
HIF	„Hypoxia Inducible Factor“
HIG2	„Hypoxia-Inducible Gene 2 Protein“
HILPDA	„Hypoxia-Inducible Lipid Droplet-Associated“
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDH	Lactatdehydrogenase
LK	Ladekontrolle

M	molar
MIF	Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor
Min	Minute
mRNA	„messenger“ RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-1-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NK	Natürlichen Killerzellen
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PHH3	Phosphohiston H3
PLIN1	PLIN1
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
P / S	Penicillin /Streptomycin
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat

siRNA	„small interfering“ RNA
SIRT	selektive interne Radiotherapie
SVR	„sustained virological response“
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TAM	Tumor-assoziierte-Makrophagen-Infiltration
TBS	„Tris-Buffered Saline“-Puffer
TBST	„Tris-Buffered Saline“-Puffer mit Tween 20
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylethyldiamin
TMA	Tissue Microarray
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]- ether
TRS	„Target Retrieval Solution“
Tween 20	Polyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	„Union for International Cancer Control“
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
VLDL	„Very Low Density Lipoproteins“

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Molekulare Klassifikation der HCC-Subgruppen.....	7
Abbildung 2: Stadiengerechte Therapie des HCCs bei Leberzirrhose, Abb. modifiziert nach „EASL Guidelines“, 2018.....	10
Abbildung 3: Hypothesen zur Rolle von HILPDA im Lipidstoffwechsel.	14
Abbildung 4: Hypothesen zum Einfluss der HILPDA-Expression auf die Tumorzell-Aggressivität	16
Abbildung 5 Intensitätsgrade der immunhistochemischen Färbung von HILPDA	36
Abbildung 6: HILPDA-Immunhistochemie im TMA mit humanen HCC- und respektiven, nicht-neoplastischen Lebergewebeproben	53
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse der HILPDA-Expression im HCC	54
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse der HILPDA-Expression in HCC-Patienten der TCGA-Datenbank	55
Abbildung 9: Induktion von HILPDA in der Hepatokarzinogenese	56
Abbildung 10: Assoziation von chronischen Lebererkrankungen mit der HILPDA-Expression	57
Abbildung 11: Assoziation von pathologisch relevanten Kriterien mit der HILPDA Expression	58
Abbildung 12: HCCs mit TP53-Mutation zeigen eine erhöhte und HCCs mit CTNNB1-Mutation eine niedrigere HILPDA-Expression in der TCGA-Kohorte	58
Abbildung 13 HILPDA-Detektion mittels Immunblot	60
Abbildung 14: HILPDA-mRNA weist eine Tendenz zu höherer Expression in HCC-Proben im Vergleich zum umliegenden nicht-neoplastischen Lebergewebe auf.....	61
Abbildung 15: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der HILPDA-Expression und Hypoxie in HepG2-, HEK293T- und Huh7-Zellen	62
Abbildung 16: Semiquantitative real-time PCR von HILPDA auf mRNA-Ebene in Zellen der Linien Huh7 (A) sowie HepG2 (B) unter Hypoxie-Bedingungen im Vergleich zu zur Kultivierung unter Normoxie-Bedingungen	63
Abbildung 17: Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie von Zellen der Linie HepG2	64
Abbildung 18: Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie von Zellen der Linie Huh7	64

Abbildung 19: Konfokale Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskopie der HILPDA-GFP-Überexpressionskonstrukte und von Lipidtropfen in Zellen der Linien Huh7, HEK293T und HepG2	65
Abbildung 20: Immunhistochemie von endogenem HILPDA in Zellen der Linie HepG2	66
Abbildung 21: Konfokale Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskopie von endogenem HILPDA und Lipidtropfen im humanen HCC-Gewebe.....	67
Abbildung 22: Konfokale Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskopie von HILPDA und Mitochondrien nach Überexpression von HILPDA-FLAG in Zellen der Linien Huh7, HEK293T und HepG2	68
Abbildung 23: Konfokale Laserscanning-Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie von HILPDA und Vimentin in HCC-Gewebe.....	69
Abbildung 24: Konfokale Laserscanning-Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie mit Anfärbung von HILPDA und PLIN1 im HCC.	70
Abbildung 25: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf die Lipidtropfengröße von HepG2-Zellen.....	72
Abbildung 26: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf die Zellkernmorphologie von HepG2- und Huh7-Zellen	72
Abbildung 27: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf das Migrationsverhalten von HEK293T-Zellen.....	74
Abbildung 28: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf das Migrationsverhalten von Huh7-Zellen.....	75
Abbildung 29: Einfluss einer HILPDA-Expressionsminderung mittels siRNA auf das Migrationsverhalten von Huh7-Zellen	76
Abbildung 30: Hohe HILPDA-Expression korreliert im HCC positiv mit hoher Proliferationsrate.....	77
Abbildung 31: Auswirkung der Überexpression von HILPDA auf die Proliferation von HEK293T-Zellen	79
Abbildung 32: Auswirkung der Überexpression von HILPDA auf die Proliferation von Huh7-Zellen	80
Abbildung 33: Auswirkung der Herunterregulation von HILPDA auf die Proliferation von Huh7-Zellen	81

Tabellen:

Tabelle 1 TNM-Klassifikation und UICC-Stadium des HCC.....	5
Tabelle 2 Barcelona Clinic Liver Cancer staging classification (BCLC), nach Llovet et al (1999).....	8
Tabelle 3 Geräte und Hersteller	20
Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien und Hersteller	22
Tabelle 5 Chemikalien / Lösungen und Hersteller	22
Tabelle 6 Puffer und Medien, sowie ihre Zusammensetzung	24
Tabelle 7 Zellkulturmaterialien	25
Tabelle 8 verwendete Kits, sowie Assays und ihre Bezugsquelle.....	26
Tabelle 9 Immunhistochemische Substanzen	26
Tabelle 10 Primärantikörper	27
Tabelle 11 Sekundärantikörper	28
Tabelle 12 Immunfluoreszenzantikörper.....	28
Tabelle 13 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	29
Tabelle 14 Primer-Sequenz.....	29
Tabelle 15 siRNA	30
Tabelle 16 Charakterisierung des Mainzer Kollektivs	32
Tabelle 17 verwendete Zelllinien	33
Tabelle 18 Software	33
Tabelle 19 Immunreaktiver Score (Remmele und Stegner 1987)	35
Tabelle 20 PEI-PBS Transfektionsschema.....	40
Tabelle 21 Pipettierschema des High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	43
Tabelle 22 Pipettierschema eines Ansatzes für die real-time PCR	45
Tabelle 23 Volumina der pipettierten Substanzen für Polyacrylamidgel	48
Tabelle 24 Volumina der pipettierten Substanzen für Tris-Tricin Gele	49
Tabelle 25 Ansatz der ECL-Lösung für die Entwicklung einer Membran	50
Tabelle 26 ECOG-Status zur Beurteilung des Allgemeinzustands (Eastern Cooperative Oncology Group) nach Oken et al., 1982	113
Tabelle 27 Child-Pugh-Klassifikation, nach Child und Turcotte, 1964.....	113

1 Einleitung

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Primärer Leberkrebs war im Jahr 2020 weltweit mit 905 677 Neuerkrankungen die sechsthäufigste Krebsart und stellte mit 830 180 Todesfällen die dritthäufigste Krebstodesursache dar [1]. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit 75-90 % der häufigste maligne primäre Tumor der Leber [2–5]. Weltweit stieg die Inzidenz von primären Lebertumoren, vor allem des HCC, zwischen 1990 und 2015 um 75 % an, wobei sich der Anstieg durch eine veränderte Altersstruktur und durch das Bevölkerungswachstum teilweise erklären lassen [6]. Es wird geschätzt, dass im Jahr 2040 die weltweite Gesamtinzidenz 1 436 744 Fälle betragen wird [1, 7]. In Deutschland erkrankten den Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten des RKI zufolge 2018 etwa 9500 Menschen neu an Leberkrebs, bei ca. 8000 Sterbefällen [4]. Aufgrund der ungleichen Exposition gegenüber Risikofaktoren, wie Alkoholkonsum und viralen Hepatitiden, besteht eine eindeutige Geschlechterprädisposition an einem HCC zu erkranken, wobei Männer dreimal so häufig wie Frauen betroffen sind [1, 7].

Die Leberzirrhose ist als Endstufe aller chronischen Lebererkrankungen zu betrachten und stellt als Vorläuferläsion den Hauptrisikofaktor für die Entstehung des HCC dar, wobei 80-90 % aller HCCs auf der Grundlage einer Zirrhose entstehen [2, 8]. Beispielsweise im Rahmen einer chronischen Hepatitis kommt es durch Leberzellnekrosen und Entzündung zunehmend zur irreversiblen Schädigung und Fibrosierung des Lebergewebes [9]. Wie Kohortenstudien zeigen konnten, unterscheidet sich abhängig von der Ätiologie der Leberzirrhose das relative HCC-Risiko erheblich. So liegt die Wahrscheinlichkeit an einem HCC zu erkranken pro 100 Patientenjahren im Rahmen einer HBV-Infektion bei 3,6 % [10], bzw. 2,2 % [11], bei einer HCV-Infektion je nach Quelle zwischen 1,23 % bis 3,9 % [10, 12–14] und bei einer alkoholbedingten Zirrhose bei 0,6 % [10].

Chronische Infektionen mit Hepatitisviren stellen bereits ohne das Vorliegen einer Leberzirrhose einen Risikofaktor für die Entstehung eines HCCs dar [6]. Aufgrund der endemischen Situation mit erhöhter Prävalenz chronischer Virushepatitiden besteht in Asien eine deutlich höhere HCC-Inzidenz als in Westeuropa und Nordamerika [1, 7, 15]. Obwohl durch eine leitliniengerechte Therapie mit oralen Virostatika die HCC-Inzidenz reduziert wird [16], ist das HCC die wichtigste Langzeitkomplikation einer

chronischen HBV-Infektion [17]. Da bei konnatal erworbener HBV-Infektion das karzinogene Risiko besonders erhöht ist, wird von der World Health Organisation (WHO) als Primärpräventionsmaßnahme eine Impfung gegen Hepatitis B für alle Neugeborenen und Gruppen mit besonderer Gefährdung empfohlen [18]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass für HCV-Patienten unter einer DAA-Therapie (*direct acting antivirals*), bei welchen ein anhaltendes virologisches Ansprechen (SVR-*sustained virological response*) über mindestens 12 Wochen erreicht werden konnte, das HCC-Risiko reduziert wurde [19]. Zusätzliche Risikofaktoren für das Entstehen eines HCC bei HCV-Infektion umfassen ein hohes Alter, männliches Geschlecht, eine lange Infektionszeit und Ko-Infektionen mit HIV oder HBV [20].

Infolge eines hohen Alkoholkonsums über einen längeren Zeitraum, definiert als eine tägliche Dosis von 40-60 g Alkohol pro Tag, kann es zu einer alkoholischen Steatohepatitis (ASH) kommen, welche einen Risikofaktor für das HCC darstellt [21].

Bislang sind in Deutschland die häufigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines HCCs eine chronische HCV-Infektion oder das Vorliegen einer ASH. Aufgrund der steigenden Prävalenz von Adipositas im Rahmen eines metabolischen Syndroms ist die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) in den westlichen Industriestaaten die häufigste chronische Lebererkrankung und stellt damit einen an Relevanz zunehmenden Risikofaktor für die HCC-Entstehung dar [22, 23]. Unter dem Begriff NAFLD versteht man das Erkrankungsspektrum von isolierter *Steatosis hepatis* ohne Entzündung, bis hin zur nicht-alkoholbedingten Steatohepatitis (NASH) mit Entzündung und Hepatozytennekrosen/ Ballonierung, welche zu einer Fibrose oder Zirrhose führen kann [24]. NASH-Patienten können auch in Abwesenheit einer Leberzirrhose ein HCC entwickeln [25–27]. Eine Diabetes mellitus-Erkrankung geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines HCC einher und das HCC-Risiko ist bei Kopathogenese von Diabetes mellitus mit Adipositas weiter erhöht [28, 29].

Weitere seltenere Ursachen für die Entstehung eines HCCs sind eine (hereditäre) Hämochromatose, ein alpha-1-Antitrypsin-Mangel, autoimmune Hepatitiden, cholestatische Lebererkrankungen (Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)), Primär Biliäre Cholangitis (PBC) und Morbus Wilson. Die Exposition gegenüber Aflatoxinen, einem vom Pilz *Aspergillus flavus* gebildeten Karzinogen, gilt ebenso als seltener Risikofaktor für die Entstehung eines HCCs. [15]

1.1.2 Klinik und Diagnostik

Da sich das klinische Erscheinungsbild bei erhaltener Leberfunktion zunächst sehr unspezifisch darstellen kann, wird das HCC häufig erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert. Unspezifische Symptome, welche gehäuft im Rahmen einer zugrundeliegenden Leberzirrhose auftreten sind Leistungsabfall, Gewichtsverlust, und Inappetenz. Erst im fortgeschrittenen Stadium ist ein Tumor im rechten Oberbauch tastbar, welcher mit Oberbauchbeschwerden einhergehen kann. Sofern die HCC-Diagnose erst nach Auftreten von Symptomen gestellt wird, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 0-10 % [30]. Um die Chance zu erhöhen, Patienten eine kurative Therapie zukommen zu lassen, sind Früherkennungsmaßnahmen erforderlich. Gemäß der S3-Leitlinie zur „Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome“ wird empfohlen, dass bei Patienten mit bekannter chronischer Lebererkrankung wie dem Vorliegen einer Leberzirrhose im Rahmen von Früherkennungsmaßnahmen alle 6 Monate eine Ultraschalluntersuchung erfolgen sollte, welche zusätzlich durch eine Bestimmung des α 1-Fetoproteins (AFP) im Serum ergänzt werden kann [8]. Als Tumormarker kann die AFP-Serumkonzentration labordiagnostisch durch einen schnellen und steilen Anstieg Hinweise auf ein malignes Geschehen der Leber geben. Die Bestimmung von AFP kann zur Kontrolle des Therapieerfolgs dienen, wird aktuell jedoch nicht zur HCC-Primärdiagnostik empfohlen [31, 32]. Für eine weitere Risiko-Stratifizierung bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion kann der PAGE-B Score, welcher Alter, Geschlecht und Thrombozytenzahl einschließt, eine Risiko-Stratifizierung bieten [17].

Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) soll das HCC bei über 1 cm messenden Raumforderungen in zirrhotischer Leber, anhand des charakteristischen Kontrastmittelverhaltens mit früharterieller Hypervaskularisation des Tumors und rascher Auswaschung („wash-out“) in der portalvenösen und venösen Phase diagnostiziert werden [33]. Für diese radiologischen Auffälligkeiten ist die verstärkte Vaskularisierung des HCC verantwortlich. Bei HCC-Verdacht wird für die HCC-Diagnosestellung bereits eine sichere Bildgebung mit spezifischem Kontrastmittelverhalten als beweisend angesehen [31]. Sollte der MRT-Befund nicht richtungsweisend sein, erfolgt anschließend eine Computertomographie (CT) oder eine Ultraschalldiagnostik. Besteht eine palliative Behandlungssituation oder liegt ein unklares Kontrastmittelverhalten in zwei unabhängig durchgeführten Bildgebungen im

kurativen Setting vor, so wird der Einsatz eines bioptischen Verfahrens empfohlen. [8, 34]

1.1.3 Histopathologie, Pathogenese und HCC-Subgruppen

Das histopathologische Tumorstaging wird für das HCC gemäß der international anerkannten TNM-Klassifikation und der Stadieneinteilung nach UICC (*Union for International Cancer Control*) erhoben (Tabelle 1 [35]). Hierbei werden Tumorausdehnung, Absiedlung in Lymphknoten oder Gefäßen, Metastasenbildung, der Differenzierungsgrad und der Status des Resektionsrandes untersucht [8]. Während das WHO-Grading eine gute, mittelgradige und schlechte Differenzierung des Tumors unterscheidet [36], beschreiben Edmondson und Steiner ein vierstufiges Grading-Modell [37]. Aus dem histologischen Grading ergeben sich Hinweise auf die Aggressivität des Tumors, da eine Entdifferenzierung ein prognostisch ungünstiger Parameter ist [38].

Neben Standardfärbungen wie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der PAS-Färbung erfolgt die Anfärbung der Retikulinfasern, um eine gestörte Tumorarchitektur mit verschmälerten Retikulinfasernetz nachzuweisen [8]. Da jeder Tumorknoten das Resultat einer Kombination aus somatischen Mutationen und epigenetischen Modifikationen ist, kann die Differenzierung des HCCs heterogene Wachstumsmuster aufweisen [30]. Während beim solide trabekulär gebauten HCC die ursprüngliche trabekuläre Leberarchitektur bei gleichzeitig aufgehobener Läppchengliederung und verschobener Zellkern-Zytoplasma-Relation erkennbar bleibt, ist die Trabekelbauweise beim kompakten Subtyp aufgehoben. Azinär bzw. pseudoglandulär gebaute HCCs besitzen eine einreihige Tumorzellformation mit PAS-positivem Material [39].

Zur immunhistologischen und molekularpathologischen Sicherung des Befundes und zur Abgrenzung von Lebermetastasen oder dem intrahepatischen Cholangiokarzinom werden hepatozytäre Marker, wie Hepar-1 und Arginase 1 eingesetzt. Zur Dignitätsbeurteilung können immunhistologische Marker, wie Glutaminsynthetase (GS), Glypican 3 und HSP70 helfen [40, 40].

Tabelle 1 TNM-Klassifikation und UICC-Stadium des HCC [35]

TNM	Befund	UICC-Stadien
T1	solitärer Primärtumor ohne Gefäßinvasion	I
T2	solitärer Primärtumor mit Gefäßinvasion oder multiple Primärtumoren (<5cm)	II
T3a	multiple Primärtumoren >5cm ohne Gefäßinvasion	IIIA
T3b	solitärer Primärtumor oder multiple Tumoren >5cm mit Gefäßinvasion	IIIB
T4	Tumor mit Penetration in extrahepatisches Gewebe bzw. Perforation des viszeralen Peritoneums	IIIC
N0	kein Befall lokoregionaler Lymphknoten	-
N1	Befall lokoregionaler Lymphknoten	IVA
M0	keine Fernmetastasen	-
M1	Fernmetastasierung	IVB

Schädigende Einflüsse können bei chronischer Leberzellschädigung zu einer Leberfibrose führen, welche als Endstufe in eine Zirrhose übergehen kann. Das etablierte Modell der Zirrhose-Karzinom-Sequenz definiert einen schrittweise ablaufenden Prozess bei welchem sich, durch Akkumulation von molekularen und morphologischen Aberrationen, der präkanzerogene low-grade dysplastische Knoten (LDGN), über den high-grade dysplastischen Knoten (HFGN) zum frühen HCC und schließlich dem fortgeschrittenen HCC entwickelt [39, 41]. Die molekulare Pathogenese des HCCs variiert abhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie [2]. Inzwischen wurden verschiedene weit verbreitete genetische Mutationen im Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)-Promoter, im TP53- oder im CTNNB1-Gen identifiziert, welche als onkogene Treiber (*oncogenic driver*) zur Hepatokarzinogenese beitragen [42].

Mithilfe der Analyse von Genexpressionsprofilen konnten HCCs anhand typischer molekularer Eigenschaften in die proliferative oder nicht-proliferative Subgruppe unterteilt werden (Abb. 1) [41, 43–45].

Der makrotrabekulär-massive HCC-Subtyp ist in der Regel durch eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (TP53), einer gehäuften makro- und mikrovaskulären Invasion bei Aktivierung der Angiogenese (Hochregulierung von ANGPT2 und

VEGFA), einer erhöhten Zellproliferationsrate, sowie einem schlechteren klinischen Verlauf gekennzeichnet [41, 46, 47].

In retrospektiven Studien wurde die erhöhte immunhistochemische Expression von Cytokeratin 19 (CK19) im HCC mit einer erhöhten Rezidivrate nach einer Transplantation und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [48, 49], wobei man davon ausgeht, dass dieser HCC-Subtyp von hepatischen Progenitorzellen ausgeht und ebenfalls mit einer TP53-Mutation einhergeht [50].

CTNNB1-mutierte Tumoren weisen eine Aktivierung des Wnt- β -Catenin Signalwegs, einen cholestatischen Phänotyp und immunhistochemisch eine Hochregulation der Glutaminsynthetase auf. Patienten mit diesem HCC-Subtyp weisen eine geringere Rate tumoröser Gefäßinvasionen auf und haben in der Regel einen besseren klinischen Verlauf [41].

Der klassische Phänotyp des steatohepatischen HCCs ist gut differenziert, weist inflammatorische Infiltrate (T-Zellen und Neutrophile), ballonierte Zellen und Mallory-Denk-Körper auf [51]. Bei diesem Subtyp ist eine Hochregulation des Interleukin-6 einem Schlüsselregulator des JAK-STAT-Signalwegs, sowie einer daraus folgender Expressionssteigerung von CRP nachweisbar [41, 41].

Das fibrolamelläre HCC zeichnet sich durch breite fibrolamelläre Septen aus kollagenem Bindegewebe aus und stellt eine seltene HCC-Sonderform (<1 %) mit DNAJB1-PRKACA Translokation dar, welche vorwiegend bei jüngeren Patienten ohne Leberzirrhose vorkommt und gehäuft mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist [52].

Bislang existieren jedoch weder zielgerichteten Therapieoptionen noch wird das Wissen über die molekularen Eigenschaften der HCC-Subgruppen zur Verbesserung des Krankheitsmanagement im klinischen Entscheidungsprozess genutzt [8, 53].

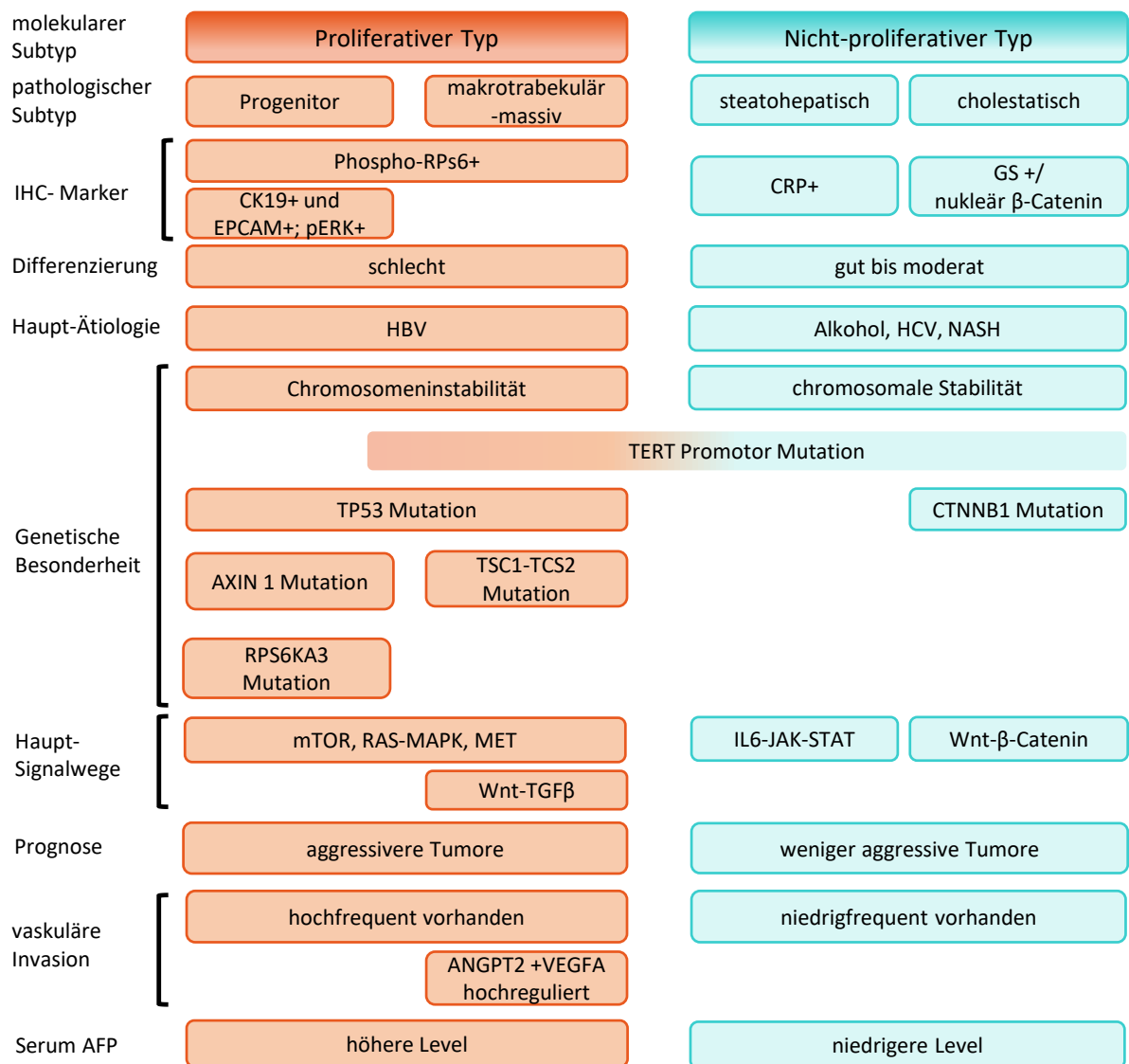


Abbildung 1: Molekulare Klassifikation der HCC-Subgruppen. Das HCC kann in zwei große molekulare Untergruppen eingeteilt werden, dem proliferativen und dem nicht-proliferativen Subtyp [43, 44]. Der proliferative Subtyp ist in der Regel schlechter differenziert, besitzt eine erhöhte Rate tumoröser Gefäßinvasionen und insgesamt eine schlechtere Prognose [41]. Diese oft HBV-assoziierten HCCs zeigen gehäuft eine Aktivierung der klassischen Zell-Proliferations-Wege wie PI3K-AKT-mTOR, RAS-MAPK und MET-Signalweg [54]. Diese Subklasse kann weiter untergliedert werden in einen proliferativen Progenitor-Zell Typ mit der Expression von Stammzellmarkern (CK19, EPCAM) [41] und einem Subtyp mit Wnt-TGFβ Aktivierung [55]. Die Nicht-proliferative Subgruppe ist in der Regel durch weniger aggressive Tumoren, einer guten Zelldifferenzierung und einer gehäuften Assoziation mit einer NASH, ASH oder HCV-Infektion gekennzeichnet. Die Subgruppe ist weiter unterteilt in CTNNB1-mutierte Tumoren mit einer Aktivierung des Wnt-β-Catenin Signalwegs [54, 55], sowie einem steatohepatischen HCC-Typ mit hochreguliertem IL6-JAK-STAT-Signalweg [41]. GS = Glutaminsynthetase; IHC = Immunhistochemie Abb. modifiziert nach Llovet, Kelley und Koautoren, 2021 [2]

1.1.4 Therapie und Prognose

Trotz verbesserten Screening- und Therapieoptionen weist das HCC eine ungünstige Gesamtprognose auf, mit einer geschätzten relativen Fünf-Jahres-Überlebensrate von

15 % für beide Geschlechter [56]. HCC-Patienten sollen an ein Zentrum angebunden werden, in welchem alle kurativen Therapieoptionen angeboten werden [31]. Das therapeutische Vorgehen richtet sich aktuell nach der BCLC-Klassifikation („Barcelona Clinic Liver Cancer staging classification“, Tabelle 2) [5], wobei neben Tumorgröße, Lokalisation und extrahepatischer Tumorausbreitung zusätzlich Parameter wie die Leberfunktion („Child-Pugh-Score“ siehe Anhang, Tab. 28) und der Allgemeinzustand (ECOG-Status siehe Anhang, Tab. 27) berücksichtigt werden. Die Verlässlichkeit dieser Klassifikation wurde in mehreren klinischen Studien extern validiert [57, 58].

Tabelle 2 Barcelona Clinic Liver Cancer staging classification (BCLC), nach Llovet et al (1999) [59]

Stadium	Tumor Status	Leberfunktion (bei Leberzirrhose CHILD-Score)	Allgemeinzustand (ECOG)
0	singulärer Tumor < 2 cm	keine Leberzirrhose	ECOG 0
A1	solitärer Primärtumor < 5 cm	keine portale Hypertension, normales Bilirubin	ECOG 0
A2		portale Hypertension, normales Bilirubin	
A3		portale Hypertension, Bilirubin erhöht	
A4		≤ 3 Primärtumore < 3 cm	
B	multifokalaler Befall, Herde > 3 cm	Child-Pugh A oder B	ECOG 0
C	Gefäßinvasion oder Metastasen	Child-Pugh A oder B	ECOG 1-2
D	jedweder Status	Child-Pugh C	ECOG 3-4

Milano Kriterien (zum Abschätzen der Erfolgsaussichten einer Transplantation): ein HCC-Herd <5cm oder bis zu 3 HCC-Herde mit jeweils >3cm, keine extrahepatischen Metastasen, keine Gefäßinvasion (Mazzaferro und Koautoren, 1996 [60])

Bei guter Leberfunktion ohne Vorliegen einer Leberzirrhose, von Fernmetastasen oder einer Gefäßinvasion (BCLC 0 und A) profitieren Patienten von einer partiellen Leberresektion (Abb. 2). Diese muss anatomisch durchführbar und physiologisch tragbar sein, sodass dabei nicht weniger als 30 % des Lebergewebes erhalten bleibt

und der Resektionsrand einen Abstand von mindestens 1 cm zum gesunden Gewebe aufweist. Jedoch entwickeln etwa die Hälfte der Patienten innerhalb von 5 Jahren nach Leberresektion ein Rezidiv [61–63]. Patienten mit Leberzirrhose und einem nicht-resektablem HCC innerhalb der Mailand-Kriterien (Tab. 2) können für eine Lebertransplantation in Betracht gezogen werden [60, 64]. Retrospektive Studien konnten zeigen, dass das mittlere Gesamtüberleben von HCC-Patienten bei Lebertransplantation gegenüber der Leberresektion besser ist [65] bzw. vergleichbare Ergebnisse mit beiden Verfahren erreicht werden konnten [66]. Falls aufgrund anderer Erkrankungen weder Resektion noch Transplantation eine Therapieoption darstellen, sind lokalablative Verfahren, wie die Radiofrequenz- sowie Mikrowellenablation (RFA) indiziert, welche die Verkleinerung des Tumorgewebes bzw. die Verhinderung des Tumorwachstums zum Ziel haben. Vergleicht man den Einfluss der Therapieform auf die Drei-Jahres-Überlebensrate, so liegt für chirurgisch therapierte Patienten die Rate bei 81 % und für nicht chirurgische Therapieformen bei 52 % [67]. Im Rahmen der STORM-Studie wurde der Nutzen einer adjuvanten Systemtherapie mit Sorafenib nach Resektion oder lokaler Ablation gegenüber einem Placebo verglichen, jedoch ohne Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen den Untersuchungsgruppen festzustellen [68].

Bei Patienten in einem intermediären Stadium (BCLC B) werden durch transarterielle Chemoembolisation (TACE) über einen in die arterielle Gefäßversorgung des Tumors eingelegten Mikrokatheter Chemotherapeutika oder okkludierende Substanzen eingebracht [69]. Bisher kein Therapiestandard stellt die selektive interne Radiotherapie (SIRT) dar, wobei strahlende Medien im Tumorgewebe angereichert werden.

Das HCC spricht schlecht auf herkömmliche Zytostatika an und gilt als relativ chemotherapieresistent. Als pharmakologische Systemtherapie wird für Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (BCLC C) mit kompensierter Leberzirrhose (Child-Pugh A) als Erstlinientherapie bislang die Applikation des Tyrosinkinase-Inhibitors Sorafenib empfohlen [70], wobei für die adjuvante Applikation nach Resektion keine Empfehlung existiert [68]. Inzwischen konnte den Ergebnissen der Phase-III-Studie „IMbrave150“ zufolge ein Überlebensvorteil der Kombinationstherapie aus PD-L-1-Antikörper Atezolizumab und VEGF-Antikörper Bevacizumab gegenüber der bisherigen Standardtherapie gezeigt werden [71]. In der Phase-III-Studie „REFLECT“ konnte bewiesen werden, dass der Einsatz des

Tyrosinkinase-Inhibitor Lenvatinib gegenüber der Behandlung mit Sorafenib gleichwertig ist [72]. Als Zweitlinientherapie bei erhaltener Leberfunktion und gutem Allgemeinzustand (ECOG 0-1) wird der Einsatz der Multikinaseinhibitoren Regorafenib oder Cabozantinib bzw. die Anwendung des IgG1-Antikörper Ramucirumab empfohlen [73–75]. Im terminalen Stadium (BCLC D) werden supportive palliativmedizinische Maßnahmen angewendet.

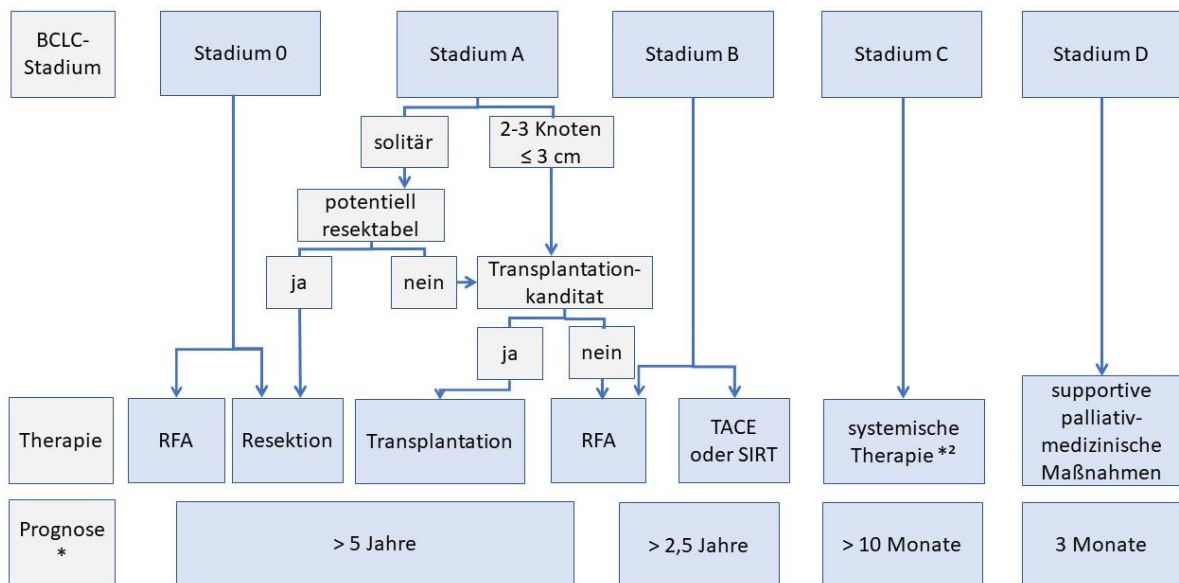


Abbildung 2: Stadiengerechte Therapie des HCCs bei Leberzirrhose, Abb. modifiziert nach „EASL Guidelines“, 2018 [5] *aufgetragen ist die geschätzte Überlebenszeit unter leitliniengerechten Therapiemaßnahmen; *2 systemische Therapie als Erstlinientherapie bei erhaltener Leberfunktion (CHILD A) mit Sorafenib [70], als Zweitlinientherapie bei erhaltener Leberfunktion und gutem Allgemeinzustand (ECOG 0-1) mit Multikinaseinhibitoren (Regorafenib [73] oder Cabozantinib [74]) bzw. IgG1-Antikörper (Ramucirumab [75]); Radiofrequenzablation (RFA), transarterielle Chemoembolisation (TACE), selektive interne Radiotherapie (SIRT)

Aus dem histopathologischen Befund lassen sich prognostisch relevante Faktoren ableiten. Sowohl eine makroskopische wie mikroskopische vaskuläre Invasion stellt einen ungünstigen prognostischen Faktor dar [38, 63, 76–78], ebenso wurde ein negativer Einfluss einer Multizentrität auf die Prognose beschrieben [76, 79]. Zudem sind eine inkomplette Resektion, eine intrahepatische Metastasierung und eine Portalveneninvasion mit einem erniedrigten Gesamtüberleben vergesellschaftet [62, 77, 80].

Anhand der BCLC-Klassifikation können Aussagen bezüglich des medianen Überlebens unter der für das jeweilige Stadium empfohlenen leitliniengerechten Therapie getroffen werden (Abb. 2) [5]. Für leitliniengerecht behandelte Patienten in einem frühen Stadium (BCLC 0/A) liegt die erwartete Überlebensdauer bei über fünf Jahren [5], wobei das natürliche Überleben ohne eine Behandlung bei ca. 36 Monaten

liegt [53]. Die Ein-Jahres-Überlebensrate für unbehandelte HCC-Patienten lag bei Vorliegen des intermediären Stadiums (BCLC B) bei 49,6 %, im fortgeschrittenen Stadium (BCLC) bei 25 % und im palliativen Setting (BCLC D) bei 11 % [81].

Die Leberfunktion von HCC-Patienten unter einer kurativen Therapie kann mithilfe des Albumin-Bilirubin (ALBI) Scores in Grade eingeteilt, wobei zwei Patientengruppen mit signifikant unterschiedlichem Langzeitüberleben identifiziert werden konnten [82, 83]. Ein hoher AFP-Wert (meist definiert ≥ 1000 ng/ml) oder ein rasch steigender AFP-Serumspiegel, meist definiert als monatliche Zunahme > 15 μ g/l, korreliert mit einem erniedrigten posttransplantären Gesamtüberleben und einer erhöhten Tumor-Rezidivrate. Zudem stellt eine erhöhte AFP-Konzentration einen guten präoperativen Surrogatmarker für eine mikrovaskuläre Invasion dar. [76, 78, 84–87]

Das BALAD Scoring-System basiert auf den fünf Serummarkern Bilirubin, Albumin, AFP, AFP-L3 (Lektin reaktives α -Fetoprotein) und DCP (Des- γ -carboxy Prothrombin). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die mit dem BALAD-Score klassifizierten Kategorien das Patientenüberleben reflektieren konnten, jedoch für den klinischen Einsatz eine weitere Validierung in verschiedenen Patientenkollektiven nötig sei [88, 89].

Neben der Aussagekraft verschiedener Scores wurde der Einfluss der Ätiologie auf das Gesamtüberleben untersucht. Während in bestimmten Kollektiven NASH-assoziierte HCC-Patienten ein geminderteres Gesamtüberleben im Vergleich zu HCC-Patientin mit einer anderen Ätiologie aufwiesen [90], konnte in anderen Kollektiven kein Unterschied festgestellt werden [91]. Bège und Koautoren konnten zeigen, dass eine HBV-Infektion einen unabhängigen Faktor für eine postoperativ ungünstige Prognose darstellt [77].

1.2 HILPDA, ein neuer Prognostischer Biomarker

1.2.1 Erstentdeckung, Induktion und Lokalisation von HILPDA

HILPDA (*hypoxia-inducible lipid droplet-associated*) wurde erstmalig im Rahmen eines Screenings von Genen identifiziert, welche durch Sauerstoffmangel in humanen Cervix-Tumorzellen induziert wurden [92]. HIG2 (*hypoxia-inducible gene 2 protein*) ist ein synonym verwendeter Alternativname für HILPDA. Das humane HILPDA Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert und codiert das 7 kDa große HILPDA Protein, welches aus 63 Aminosäuren besteht [93]. Als spezifisches HIF-1 α -Zielgen ließ sich HILPDA ebenfalls in weiteren Tumorzelllinien [94] und Makrophagen [95] durch Sauerstoffmangel induzieren. Es wird zudem eine Regulation durch das Steroidhormon Progesteron in Brustkrebszellen beschrieben [96].

HILPDA ist in Adipozyten, HeLa-Zellen oder Hepatozyten an Lipidtropfen lokalisiert [94, 97–99]. Daneben konnte gezeigt werden, dass HILPDA durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) migriert und an der Seite der Lipidtropfensynthese lokalisiert [95, 98]. Dem widersprechend konnten Gimm und Koautoren anhand von Kofärbungen in HeLa-Zellen zeigen, dass HILPDA weder am ER noch an anderen Zellorganellen wie Mitochondrien, Autophagosomen, Peroxisomen oder dem Golgi-Apparat lokalisiert ist und dementsprechend nicht an sekretorischen oder endozytotischen Transportprozessen beteiligt ist [94]. Nishimura und Koautoren gehen davon aus, dass HILPDA nicht ausschließlich an Lipidtropfen zu finden sei, sondern vielmehr zytoplasmatisch in der Zelle verteilt vorliegt, wie dies beispielsweise im Ovarialkarzinom der Fall ist [100].

1.2.2 Bedeutung von HILPDA im Lipidmetabolismus

Lipidtropfen sind dynamische Zellorganelle bestehend aus einem Kern aus Triglyceriden (TAG) und Cholesterinestern, umgeben von einem Monolayer-Mantel aus Phospholipiden und Lipoproteinen. Mehrere angelagerte Proteine regulieren die Aktivität der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), einem Enzym welches für die Lipolyse von TAG verantwortlich ist [101]. Laut La Rosa Rodriguez und Koautoren [94, 102] kommt HILPDA nicht ubiquitär an allen Lipidtropfen vor, sondern vor allem in einer Subpopulation, welche einem Umbauprozess oder einer Neubildung unterlaufen. Aufgrund von Sequenzanalysen gehen Forscher davon aus, dass HILPDA über eine amphipathische Helix direkt an der Lipidtropfenoberfläche lokalisiert und die hydrophobe Region damit essentiell für die Funktion des Proteins sein könnte [94, 103]. Zu diesen Erkenntnissen passend konnte mittels „Fluoreszenz Lifetime Imaging

Mikroskopie“ (FLIM) eine direkte physikalische Interaktion von HILPDA und ATGL, genauer zwischen der N-terminalen hydrophoben Region (HILPDA) und dem N-terminalen Patatin Domain-containing Segment (ATGL) gezeigt werden [104, 105]. Eine Inhibition der Hydrolasefunktion von ATGL durch HILPDA konnte in verschiedenen Zelltypen, darunter HeLa-Zellen, Adipozyten, Hepatozyten und Makrophagen gezeigt werden [93, 104–106]. In Hepatozyten führte eine Überexpression von HILPDA zur Lipidakkumulation [98, 102]. Eine Herunterregulierung von HILPDA in HCT-116-Zellen, Makrophagen und embryonalen Mausfibroblasten verursachte eine Verringerung der Lipidtropfengröße und des Triglyceridgehalts, was durch eine Inhibition von ATGL verhindert werden konnte [104, 106, 107]. Da durch Herunterregulation von HILPDA in Adipozyten die Expression von Perilipin1 und ATGL signifikant anstieg, vermuten Dijk und Koautoren, dass HILPDA nicht direkt die Adipogenese, sondern Lipid-assoziierte Proteine beeinflussen könnte [97].

HILPDA hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem G0/G1 switch Gen 2 (G0S2), einem bekannten Inhibitor von ATGL [108, 109]. In einem zellfreien Versuchsaufbau war die Interaktion zwischen ATGL und HILDPA jedoch schwächer ausgeprägt als die des Enzyms zu G0S2 [105].

Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) spielen eine wichtige Rolle in der Nährstoffhomöostase mehrerer Organe, indem sie als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren beispielsweise Fettsäuren (FS) binden [110]. Die Aktivierung von PPAR α führt zur Induktion verschiedener Gene, welche im Lipidstoffwechsel involviert sind, indem sie für den Transport, die Lagerung oder die Oxidation von FS verantwortlich sind [111]. Die β -adrenerge Stimulation im Rahmen der Sympathikusaktivierung ist ein wichtiger Signalweg für die Stimulation der Adipozytenlipolyse [109]. Durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ/α [97, 98, 112], sowie unter Noradrenalin-vermittelter β 2-adrenerger Stimulation [97, 113] konnte eine Induktion der HILPDA-Expression erreicht werden (Abb. 3).

Die Expression Lipidtropfen-assoziiierter Proteine in der Leber ist stark vom Ernährungszustand des Individuums abhängig. DiStefano und Koautoren konnten *in vivo* zeigen, dass HILDPA unter hochkalorischer Diät von Mäusen in der Leber induziert wird und zudem ein erhöhter hepatischer TAG-Gehalt messbar war [98]. Ein gleiches Ergebnis ließ sich *in vitro* unter FS-Behandlung von Makrophagen [95] und Hepatozyten [94, 102] erreichen. Gimm und Koautoren vermuteten, dass FS HILPDA

vor dem Abbau bzw. der Degradierung schützen könnten [94]. Laut VandeKopple und Koautoren ist eine Nährstoffmangel-induzierte Autophagie ein Stimulus für die posttranskriptionelle Hochregulation von HILPDA und führt in dessen Folge zur TAG-Akkumulation [103].

Das Enzym DGAT1 (Diacylglycerol-O-Acyltransferase) katalysiert den Geschwindigkeit-limitierenden Schritt der TAG-Synthese aus exogenen, sowie der durch Lipolyse gewonnenen FS [114]. La Rosa Rodriguez und Koautoren gehen davon aus, dass HILPDA das DGAT1 Protein durch eine direkte physikalische Interaktion stabilisiert und dadurch eine verstärkte TAG-Synthese bewirken kann [102] (Abb.3).

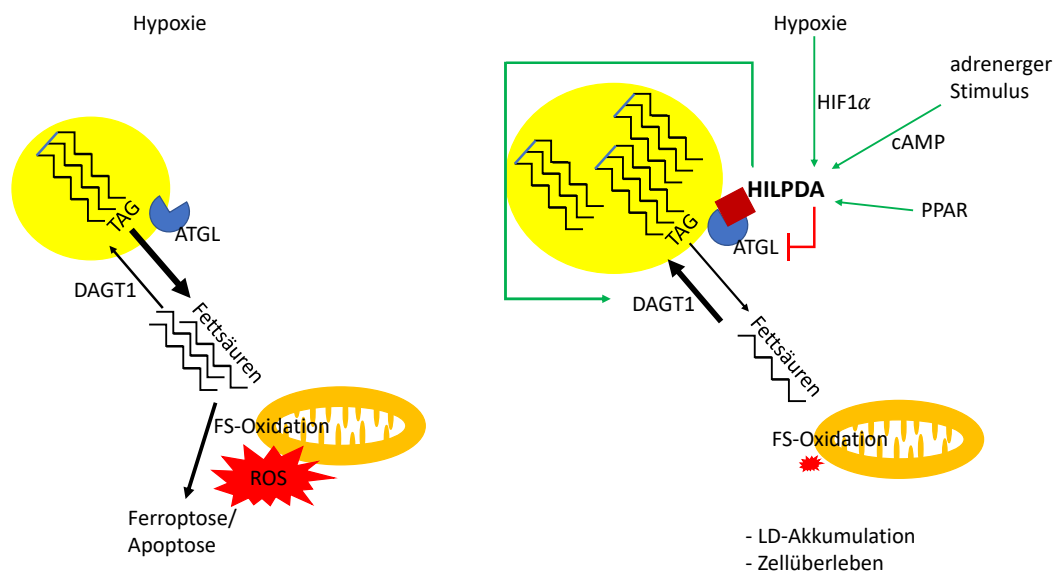


Abbildung 3: Hypothesen zur Rolle von HILPDA im Lipidstoffwechsel. Induktion von HILPDA durch HIF1 α unter Hypoxie [94], adrenerge Stimuli [97, 113] und PPAR [97, 98, 112]. HILPDA hat einen zellprotektiven Einfluss, indem es die TAG-Lipolyse durch direkte Hemmung der ATGL mindert [93, 104–106], wodurch infolgedessen unter Sauerstoffmangel weniger ROS durch FS-Oxidation entstehen kann [104]. Zudem fördert HILPDA durch DAGT1-Stabilisierung die TAG-Synthese [102].

Ebenso führte die adenoviral vermittelte HILPDA-Überexpression zu einem gestiegenen Triglyceridgehalt in der Leber, was laut Mattijssen und Koautoren zum Teil mit einer geringeren Sekretion von VLDL-Triglyceriden („Very Low Density Lipoproteins“) begründet sei [112].

Eine hepatozytenspezifische HILPDA-Defizienz führte *in vivo* zu einer gesteigerten Triglyceridlipolyse und Fettsäureoxidation, sowie gleichzeitig zu einer signifikant gestiegenen Glukosetoleranz [98]. Eine hepatozytenspezifische HILPDA-Deletion bei bereits vorhandener Steatohepatitis (NASH) *in vivo* hatte einen signifikant reduzierten Triglyceridgehalt, sowie in Leberschnitten eine verminderte FS-Akkumulation zur Folge [102]. Bei adipozytenspezifischer HILPDA-Deletion im Mausmodell war

ebenfalls eine verbesserte Glukosetoleranz nachweisbar [99]. Mäuse zeigten bei Ganzkörper-Deletion von HILPDA eine geminderte körperliche Aktivität und einen reduzierten Metabolismus, gemessen am geminderten Sauerstoffbedarf [107].

In HILPDA überexprimierenden HeLa-Zellen konnten Gimm und Koautoren neben der Lipidtropfenvergrößerung eine erhöhte Konzentration an Cytokinen, wie IL-6 ermitteln. Eine Lipidakkumulation in Fett- bzw. Lebergewebe soll den Autoren zufolge mit einer Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen assoziiert sein, was im Rahmen einer Fettlebererkrankung eine pathophysiologische Rolle spielen könnte [94]. Obwohl ein Knockdown von HILPDA in Makrophagen zur verringerten Akkumulation von FS führte, konnten Van Dierendonck und Koautoren beweisen, dass das inflammatorische Geschehen, gemessen anhand der Sekretion von IL-6 bzw. TNF- α , unbeeinflusst blieb [106]. Maier und Koautoren publizierten ferner, dass HILPDA in Makrophagen für die Neutralfettakkumulation, Schaumzell-Entstehung und Prostaglandin-E2-Synthese entscheidend sei und beim Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen ursächlich beteiligt sein könnte [95].

1.2.3 Bedeutung von HILPDA in Malignomen

Der Zusammenhang zwischen der HILPDA-Expression und einem potenziellen Überlebensvorteile für maligne Zellen wurde bereits untersucht, so ist HILPDA im Neuroblastom [115] sowie im Glioblastom [116] mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten assoziiert. HILPDA wird auch in anderen Krebsentitäten, wie dem Nierenzell- [94, 117–119], dem Kolon- [120], dem Pankreas- [121], sowie dem Ovarialkarzinom [100] hochreguliert. Laut Nishimura und Koautoren ist der Einsatz von HILPDA als prädiktiver Marker für das Ovarialkarzinom denkbar, da sich in der Gruppe mit einer erhöhten HILPDA-Expression eine höhere Ansprechrate auf eine Chemotherapie nachweisen ließ [100]. Des Weiteren konnten Y.Zhang et al. zeigen, dass Nasopharynxkarzinomzellen durch HILPDA-vermittelte Umstellung des Lipidmetabolismus eine erhöhte Radiotherapie-Resistenz aufweisen [122].

Denko und Koautoren vermuten, dass die Expression von HILPDA einen Mechanismus der Tumorzelle darstellt, um resistenter gegenüber eines nachteiligen Mikromilieu während Phasen von Hypoxie oder durch Glukoseentzug ausgelösten Stress zu sein [92]. Viele HIF-1 α -Zielgene sind am Wechsel von aerober mitochondrialer ATP-Gewinnung zu anaerober Glykolyse und damit der FS-Akkumulation beteiligt. Unter FS-Oxidation steigert sich die mitochondriale Bildung von

lipid-reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Durch HILPDA konnte nach Lipid-Überladung die ROS-Bildung und damit der Zellschaden minimiert werden [95]. Umgekehrt konnten Zhang und Koautoren feststellen, dass die Apoptoserate nach HILPDA-Knockdown unter Hypoxie anstieg (von 3,37 % auf 14,6 %) und zudem 250 % mehr ROS gebildet wurde als unter Normoxie [104] (Abb. 4).

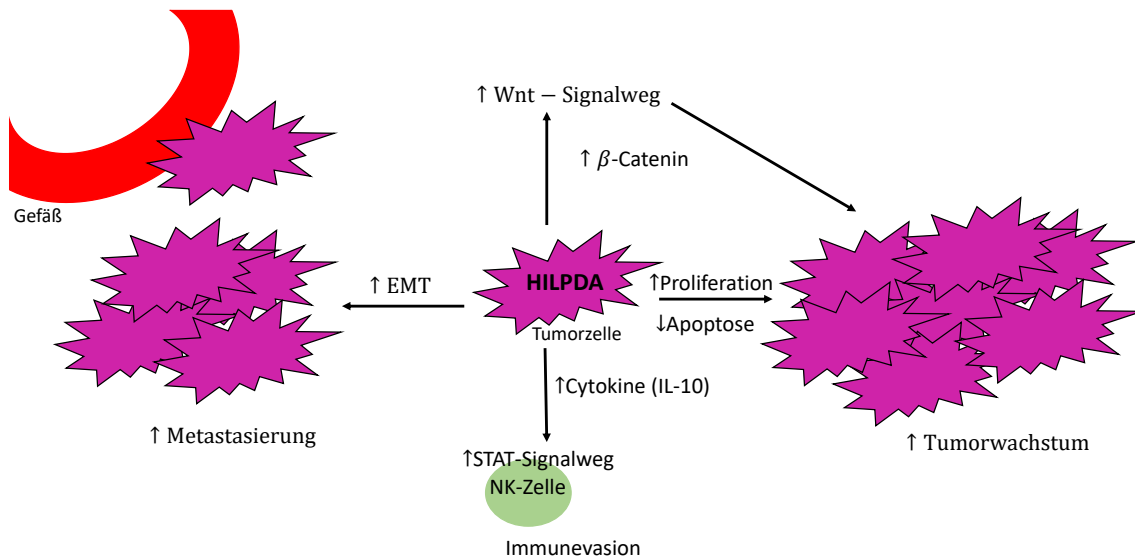


Abbildung 4: Hypothesen zum Einfluss der HILPDA-Expression auf die Tumorzell-Aggressivität. HILPDA induziert das Tumorwachstum durch Förderung der Proliferation, bspw. im Rahmen einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs [123], und Minderung der Apoptoserate [103, 104]. HILPDA entgeht der Immunantwort durch Förderung der Cytokinreisetzung und Aktivierung des STAT-Signalwegs in NK-Zellen [124]. HILPDA induziert die Metastasierungsrate durch erhöhte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) [124].

Durch das Anhäufen von ROS kann es zur Ferroptose kommen, wobei Glutathionperoxidasen (GPX) protektiv wirken. Zou und Koautoren legten einen Zusammenhang zwischen HILPDA und der Vulnerabilität von klarzelligem Nierenzellkarzinomen (ccRCC) für Inhibitoren der GPX4 nahe und erkannten hierbei einen potenziellen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie. [125]

Das Wachstum von Xenograft-Tumoren in Mäusen, welche durch Injektion von HCT116-Zellen entstanden waren, war unter HILPDA-Defizienz langsamer als für die Wildtyp-Zellen. Van de Kopple sowie Zhang und Koautoren führten dies unabhängig voneinander auf ein höheres Apoptose-Niveau, bemessen anhand der cleaved Caspase 3-Konzentration in den KO-Zellen zurück [103, 104] (Abb. 4). Umgekehrt konnten Kim und Koautoren durch Injektion stabil mit HILPDA transfizierter HCT116-Zellen in Kolonwände von Mäusen ein gesteigertes Tumorwachstum, wohl durch eine geringere Apoptoserate, ebenfalls bemessen anhand der Caspase 3-Aktivität, verzeichnen [120].

Während der Embryogenese spielt der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle, hierbei wird phosphoryliertes β -Catenin angereichert und wirkt als Transkriptionsfaktor auf die Zellproliferation. In Tumorzellen kann durch Mutationen der Wnt-Signalweg wieder aktiviert werden. Togashi und Koautoren vermuten, dass HILPDA als autokriner Wachstumsfaktor fungieren könnte, indem das Protein sezerniert und über Bindung an extrazelluläre G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die β -Catenin-Stabilisierung bewirkt und somit den onkogenen Wnt-Signalweg induziert. Togashi und Koautoren stützen sich hierbei darauf, dass *in vitro* eine Induktion von HILPDA das Zellwachstum steigerte und das „Gen-Silencing“ umgekehrt mindern konnte [117]. Da Strukturanalysen zufolge HILPDA N-terminal Signalpeptidsequenzen enthalten soll, welche eine Sekretion des Peptids vermuten lassen gehen Kenny und Koautoren ebenfalls von einer Assoziation mit dem onkogenen Wnt-Signalweg aus [123] (Abb. 4).

Chiou und Koautoren gehen davon aus, dass der Transkriptionsfaktor BLIMP1 die Metastasierung des duktales Pankreas-Adenokarzinoms steigert, indem dieser die Expression von Hypoxie-assoziierten Genen, wie bspw. HILPDA induzieren könnte. Sie sahen diese Kausalität darin bestätigt, dass durch ein HILPDA-Knockdown die Metastasierungsrate reduziert werden konnte [126]. Grachan und Koautoren konnten im Mausmodell zeigen, dass Pankreastumor-Xenografts mit einer HILPDA-Depletion im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Wachstumsrate zeigten [127].

Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung der Expressionsdaten von HCC-Patienten der frei verfügbaren Datenbank TCGA, kam zu dem Ergebnis, dass eine hohe HILPDA-Expression auf RNA-Ebene mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist [128].

Cui und Koautoren untersuchten ein kleines HCC-Kollektiv ($n = 40$) und wiesen im Tumorgewebe in der Mehrheit der Fälle auf mRNA-Ebene eine HILPDA-Expression nach, wobei im Falle einer Lymphknotenmetastasierung bzw. einem höherem TNM-Staging (Stadium III/IV) eine signifikant höhere HILPDA-Expression vorhanden war. *In vitro* kamen die Autoren nach HILPDA-Herunterregulation in HepG2-Zellen zum Ergebnis, dass die Zellmigration und -invasion im Transwell-Assay gemindert war und die Proliferationsrate im CCK-8-Assay sank. [124]

Xu und Koautoren untersuchten ebenfalls das HCC und beschreiben eine Verknüpfung zwischen der Überexpression des Onkogens PVT1 (long noncoding

RNA) und HILPDA, wodurch ein positiver Einfluss auf die Zellproliferation, Migration und Invasion der Tumorzelle entstehen soll [129].

Cui und Koautoren untersuchten im Mausmodell den Einfluss von HILPDA auf die Tumorbildung und Metastasierung. Es zeigte sich ein geringeres Tumolvolumen und eine geringere Anzahl an Lungenmetastasen in Tieren, welche mit HILPDA siRNA transfizierte SMMC-7721 Zell-Injektionen erhielten. Immunhistochemisch war im mit siRNA transfizierten Gewebe E-Cadherin hoch- und Vimentin herunterreguliert. Die Forscher kamen aus diesem Grund zu dem Schluss, dass eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und damit die Metastasen-Entstehung in der siRNA-Gruppe vermindert war. [124] (Abb. 4)

Unter *Silencing* von HILPDA in HepG2- bzw. SMMC-7721-Zellen, welche mit natürlichen Killerzellen (NK) kokultiviert worden waren, war die Apoptoserate durch NK-Zellen verstärkt. Cui und Koautoren gehen davon aus, dass HILPDA über die Freisetzung von IL-10 den STAT3-Signalweg in NK-Zellen aktiviert, wodurch die NK-Zellaktivität abnahm. Dieser Mechanismus könnte laut Cui und Koautoren die Entstehung eines Rezidivs oder einer Metastasierung durch Immunevasion (*immune escape*) erklären. [124] (Abb. 4)

1.3 Zielsetzung

Das HCC stellt weltweit die dritthäufigste Krebstodesursache dar [7] und weist in den letzten Dekaden eine steigende Inzidenz auf [6]. Mithilfe von Tumorklassifikationen, wie beispielsweise der BCLC-Klassifikation, können klinische Entscheidungsprozesse erleichtert und eine recht grobe prognostische Einordnung in Stadien ermöglicht werden. Da nur eine unbefriedigende Einschätzung der Patientenprognose gegeben werden kann, ist es wünschenswert eine Präzision der Aussagekraft etablierter Modelle durch Ergänzung von neuen molekularen Biomarkern für das HCC zu ermöglichen. Ziel dieser Arbeit ist es, mittels Immunhistochemie einen neuen zuverlässigen prognostischen Biomarker für das HCC zu identifizieren.

In Voranalysen wies das HILPDA-mRNA-Expressionsniveau von HCC-Patienten der TCGA-Datenbank vielversprechende Vorhersagen für einen Zusammenhang zwischen Expression und Überlebenszeit auf [130]. Da während der Hepatokarzinogenese gehäuft eine Modifikation des Lipidmetabolismus stattfindet [131], ist es sinnvoll das HCC auf die Dysregulation eines lipidtropfen-assoziierten Proteins hin zu untersuchen. Bis zu diesem Zeitpunkt existieren keine Untersuchungen, welche die Rolle von HILPDA in einem ausreichend großen Kollektiv erforschen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte HILPDA in Gewebeproben von 561 HCC-Patienten mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen und Zusammenhänge zwischen der Färbeintensität und dem Patientenüberleben evaluiert werden. Zudem sollten weitere klinisch relevante Aspekte in die statistische Auswertung einbezogen werden. Um die zugrundeliegende Funktionsweise von HILPDA im HCC aufzuschlüsseln, sollte die HILPDA-Expression in von Hepatozyten abgeleiteten Karzinomzelllinien variiert werden und die Effekte mithilfe von molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden sowie der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Falls sich ein Zusammenhang zwischen der HILPDA-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten beweisen ließe, bestünde die Möglichkeit, mithilfe von Funktionsuntersuchungen *in vitro*, die onkogenen Pathomechanismen zu erforschen, zu verstehen und langfristig gesehen neue zielgerichtete Therapiestrategien für das HCC abzuleiten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3 Geräte und Hersteller

Gerätename	Hersteller
Autostainer plus	Agilent Dako, Santa Clara, United States
CO ₂ Inkubator	BBD622, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	C200, Labortect GmbH, Göttingen, Deutschland
Chemilumineszenzimager Fusion Solo S	Vilber Lourmat, Eberhadzell, Deutschland
Digital Slide Scanner	NanoZoomer-Series, Hamamatsu, Japan
Elektrische Pipettierhilfe PIPETBOY	INTEGRA Biosciences Corp., Hudson, USA
Mirkoskop-Kamera GRYPHAX®	JENOPTIK AG, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Leica DMI6000 B	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Gelelektrophorese Apparatur Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Inc., Kalifornien USA
Heizblock	Thermo Haake® heating circulator, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
	ThermoMixer® C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Homogenisator Precellys® 24	Bertin Technologies, Saint Aubin, Frankreich
Konfokalmikroskop SP8	Leica Biosystems
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems
Lichtmikroskop Eclipse TS100-F	Nikon, Tokyo, Japan
Magnetrührer RETbasic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Netzgerät PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc.

Gerätename	Hersteller
Photometer	Spektralphotometer NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific
	Spektrophotometer Tecan Spark 10M, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Pipetten	Eppendorf AG, Gilson® Inc, Middleton, USA
Quant Studio 3 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Wärmeschrank	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland
pH-Messgerät inoLab®	WTW-a xylem brand, Dinslaken, Deutschland
Sonifikator, Branson SLPe	Marshall Scientific, Hampton,USA
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Vortex-Mixer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wippschüttler CAT ST 5	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Sterilbank HERAsafe KS12	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Zellzählkammammer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
	Centrifuge Z 216 MK, Hermle Labortechnik GmbH, Gosheim, Deutschland
Zentrifugen	Mikrozentrifuge MIKRO 120, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
	Tischzentrifuge Mikro 120, Hettich AG, Hettich AG, Bäch, Schweiz

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Materialname	Hersteller
Chromatographiepapier Whatman™	Thermo Fisher Scientific
Culture-Inserts 2 Well in μ -Dish 35mm	ibdi GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Deckgläser, Menzel Gläser	Thermo Fisher Scientific
Greiner Bio-One™ Kryo-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific
Nitrocellulose Membran	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße, Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter, SafeSeal SurPhob Spitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Precellys® Lysing Kit Ceramic Beads	Bertin Technologies, Saint Aubin, Frankreich
Objektträger, Superfrost Plus (27x75x1,0mm)	Thermo Scientific™
Reaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Plastikware (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific Greiner Bio-One GmbH

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 5 Chemikalien / Lösungen und Hersteller

Substanz / Produktname	Hersteller
Acrylamidstamm-Lösung mit 0,8%, Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH
APS	Carl Roth GmbH
Bradford-Lösung	Bio-Rad Laboratories, Inc.
BSA, Albumin Fraktion V	Carl Roth

Substanz / Produktname	Hersteller
Chemielumineszenzlösung Coumarin (\geq 98.0 %) / Luminol (\geq 97 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cobaltchlorid 0,1 M Lösung	Sigma-Aldrich
DNase / RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
MOWIOL®4-88 Mounting Medium	Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin, Real Dako	Agilent Technologies
Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem GmbH
N, N'-Methylen-bis-acrylamid	Carl Roth
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich
Standardchemikalien	Carl Roth
	Sigma-Aldrich
	Honeywell Research Chemicals, Seelze, Deutschland
	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
	Sigma-Aldrich
Stauosporin S4400	Sigma-Aldrich
SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Trizol / TRI Reagent™ Solution, RNA Isolation Reagent	Invitrogen, Kalifornien, USA
Tricin	Carl Roth
Protease- und Phosphatase Inhibitorcocktail / Halt™	Thermo Fisher Scientific
Proteinstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Puffer und Medien

Die Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt. Um den benötigten pH-Wert einzustellen, wurde mit HCl titriert.

Tabelle 6 Puffer und Medien, sowie ihre Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge / Konzentration
6-fach SDS Proteinladepuffer	Tris-HCl pH= 6,8	350 mM
	SDS	10,28% (w/v)
	Glycerin	36% (v/v)
	DTT	600 mM
	Bromphenolblau	0,036 g
10-fach Semidry- Blotpuffer (pH= 9,0)	Tris	480 mM
	Glycin	390 mM
	SDS	10% (w/v)
Semidry-Blotpuffer	10x Semidry-Blotpuffer	10% (v/v)
	Methanol	20% (v/v)
20-fach TBS (pH= 7,6)	Tris	200 mM
	NaCl	1,38 M
TBST	20x TBS	10% (v/v)
	Tween 20	0,05% (v/v)
10-fach Laufpuffer für Gelelektrophorese (pH= 8,3)	Tris	250 mM
	Glycin	1,9 M
	SDS	1% (w/v)
AB 3 Puffer	Acrylamid	48% (w/v)
	Bis-Acrylamid	1,5% (w/v)
AB 6 Puffer	Acrylamid	47% (w/v)
	Bis-Acrylamid	3% (w/v)
Anodenlaufpuffer für Gelelektrophorese (pH= 8,9)	Tris	0,1 M
	HCl	22,5 mM
„Co-IP“-Puffer (pH=8,0)	Tris	50 mM
	NaCl	100 mM
	EGTA	15 mM
	Triton X-100	1% (v/v)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge / Konzentration
ECL-Lösung	Tris-HCl, pH= 8,5	10 ml (0,1 M)
	Luminol	50 µl (250 mM)
	Cumarinsäure	25 µl (90 mM)
	H ₂ O ₂	4 µl (30%ig)
Kathodenlaufpuffer für Gelelektrophorese (pH= 8,25)	Tris	0,1 M
	Tricin	0,1 M
	SDS	0,1% (w/v)
PEI Stammlösung (pH= 6,5)	PEI	100 mM
Schläggel Puffer (pH= 8,45)	Tris	3 M
	SDS	0,3% (w/v)
SDS-Sammelgelpuffer (pH= 6,8)	Tris	500 mM
SDS-Trenngelpuffer (pH= 8,8)	Tris	1,5 mM
Stripping Puffer 1 (pH= 2,8)	Glycin	200 mM
	NaCl	500 mM
Stripping Puffer 2 (pH= 2,2)	Glycin	200 mM
	NaCl	500 mM

2.1.5 Zellkultur

Tabelle 7 Zellkulturmaterialien

Substanz	Hersteller
Accutase® solution	Sigma-Aldrich
„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“ DMEM mit 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine und Pyruvate	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum FCS, Zugabe von 10 % nicht hitzeinaktiviertem FCS zum DMEM F7524	Sigma-Aldrich
Geneticin (G418)	Invitrogen
Lipofectamine®2000 Reagent	Thermo Fisher Scientific

OPTI-MEM I GlutaMAX™, Gibco 51985-026	Thermo Fisher Scientific
„Phosphate Buffered Saline Buffer“ (PBS)	AppliChem GmbH
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
Penicillin / Streptomycin Antibiotika-Lösung, Zugabe von 1% Penicillin/ Streptomycin Lösung zum DMEM	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich

2.1.6 Kits und Assays

Tabelle 8 verwendete Kits, sowie Assays und ihre Bezugsquelle

Kit / Assay	Hersteller
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific
Rec-Protein G-Sepharose® 4B Conjugate	Invitrogen
CytoTox 96® NonRadioactive Cytotoxicity Assay Protocol	Promega Corporation, Madison, USA
GenElut™HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich
CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega Corporation

2.1.7 Immunhistochemie

Tabelle 9 Immunhistochemische Substanzen

Substanz	Hersteller
EnVision™ FLEX Antibody Diluent	Agilent Dako, Santa Clara, USA
EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827)	
Entellan	VWR (Merck) International GmbH
EnVision™ FLEX Hematoxylin (DM826)	Agilent Dako
EnVision™ FLEX/HRP (DM822)	
EnVision™ FLEX+Mouse (Linker) (DM824)	
EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM821)	
EnVision™ FLEX+Rabbit (Linker) (DM825)	
EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM823)	

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution
(DM828)

EnVision™ FLEX Wash Buffer (DM831)

2.1.8 Antikörper

Tabelle 10 Primärantikörper

Protein	Spezies	Artikelnr.	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung	
				IF/IHC	WB
Aktin	Maus, monoklonal	MAB1501 Clone C4	Merck KGaA		1:10.00 0
Adipophilin/ Perilipi2	Meerschwein- chen, polyklonal	GP40 602191	Progen	1:25	
FLAG-Tag	Maus, monoklonal	M2 F3165	Sigma-Aldrich	1:250	1:1.000
HIF- 1-alpha	Hase, monoklonal	EP1215Y Ab51608	abcam		1:1.000
HIF- 1-alpha	Maus, monoklonal	H1α67 Sc-53546	Santa Cruz Biotechnology		1:1.000
HIF- 1-alpha	Maus, monoklonal	54HIF-1α 610959	BD Biosciences		1:1.000
HILPDA	Hase, polyklonal	HPA010515	Atlas- Antibodies AB	1:150	1:1.000
Phospho- Histon H3	Hase, polyklonal	Ser10 #06-570	Merck Millipore	1:250	1:1.000
GFP	Hase, polyklonal	Sc-8334	Santa Cruz Biotechnology	1:100	
HA-Tag	Maus, monoklonal	6E2 #2367	Cell Signaling Technology		1:3.000
HIG2	Maus, monoklonal	G2 Sc-376704	Santa Cruz Biotechnology	1:50- 150	1:1.000
Ki67	Maus,	IR629	Dako	einsatz-	

Protein	Spezies	Artikelnr.	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung	
				IF/IHC	WB
	monoklonal			bereit	
PLIN 1	Meerschweinchen, polyklonal	GP29 604201	Progen	1:50	
Vimentin	Hase, monoklonal	MA5-14564	Thermo Fisher Scientific	1:100	

Tabelle 11 Sekundärantikörper

Name	Tier-spezies	Artikelnr.	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Anti-Maus	Ziege	170-6515	Bio-Rad Laboratories, Inc	1:3.000
Anti-Maus IgG hochgradig adsorbiert	kreuz-Ziege	A16078	Invitrogen	1:3.000
Anti-Kaninchen	Ziege	170-6516	Bio-Rad Laboratories, Inc	1:3.000

Tabelle 12 Immunfluoreszenzantikörper

Abkürzung	Bezeichnung	Darstellung	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
BODIPY	<i>boron-dipyrrromethene</i>	Lipide in Lipidtropfen	Thermo Fisher Scientific	1:250
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	DNA in Zellkernen	Sigma-Aldrich	1:10.000
Lipid Spot™ 610		Lipide in Lipidtropfen	Biotium	1:1.000
Mito view™ 633		Mitochondrien	Biotium	100nM (Live cell staining)

Tabelle 13 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Spezies	Fluorophor	Artikelnr.	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Ziege Anti-Maus	Alexa Fluor® 488	A11029	Invitrogen	1:100
Ziege Anti-Hase	Alexa Fluor® 488	A11008	Invitrogen	1:100
Ziege Anti-Maus	Alexa Fluor® 546	A11030	Invitrogen	1:100
Ziege Anti-Hase	Alexa Fluor® 546	A11010	Invitrogen	1:100
Ziege Anti-Meerschweinchen	Alexa Fluor® 555	A-21435	Thermo Fisher	1:100
Ziege Anti-Hase	Alexa Fluor® 635	A31577	Invitrogen	1:100
Ziege Anti-Maus	Alexa Fluor® 635	A31575	Invitrogen	1:100

2.1.9 Oligonukleotid-Sequenzen

2.1.9.1 Primer-Sequenzen

Oligonukleotid-Primer für die quantitative Real-Time PCR wurden mit Hilfe des online Programms Primer-BLAST designt und durch die Firma Sigma-Aldrich synthetisiert (siehe Tab. 14). Es wurden Stocklösungen mit einer Konzentration von 100µM angesetzt. Die 100µM Stocklösung wurde 1:20 mit Wasser verdünnt, wobei *for* und *rev* Primer bereits vermischt wurden (z.B. 180µl H₂O + 10µl *for* + 10µl *rev*).

Tabelle 14 Primer-Sequenz

Gen	Sequence (5'→3')	R²	Effizienz [%]
HILPDA	<i>for</i> GGTGTGGTACTGACCCTACTC <i>rev</i> AGGCGATGGGCTCTCTAGTA	0.987	107.929

2.1.9.2 siRNA

Die siRNA (Silencer® Select Pre-designed and Validated siRNA, *In vitro* Ready Ambion®) wurde von der Firma Ambion bezogen (siehe Tab. 15). Die siRNA wurde getrocknet geliefert und mit sterilem nukleasefreiem Wasser ein 20 µM Stock angesetzt und bei -20°C gelagert. Für die Negativkontrolle wurde ein Pool aus vier siRNAs (ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool, Dharmacon) verwendet. Der getrocknete siRNA Pool wurde mit 1x siRNA Puffer (60 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7.5 und 0.2 mM MgCl₂) zu einem 20 µM Stock verdünnt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 15 siRNA

Gen	siRNA ID#	Bindestelle	siRNA-Sequenz 5'→3'
Hypoxia-Inducible Protein 2	S26711	469-487	CUGUCUAACUGGAUGCUCAtt
		583-601	GACAGAUUGACCUACGAGUtt
	S26709	201-219	CCAUCUUCGUUAGAGUGAUtt
		315-333	GGUAGAAGCAAUCUCACUAtt
ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool	D-001810-1020		UGGUUUACAUGUCGACUAA ACCAAUGUACAGCUGAUU UGGUUUACAUGUUGUGUGA ACCAAUGUACAACACACU UGGUUUACAUGUUUUCUGA ACCAAUGUACAAAAGACU UGGUUUACAUGUUUCCUA ACCAAUGUACAAAAGGAU

2.1.10 Vektoren und Plasmide

Der Ursprungsvektor pcDNA3 wurde jeweils von Thermo Fisher (Invitrogen) bezogen.

1. pcDNA3 HILPDA-FLAG, Größe: 5592 bp

Die kodierende Sequenz des FLAG-Epitops wurde zuvor über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *XbaI* in die *multiple cloning site* des pcDNA3 Vektors inseriert. Die vollständige cDNA von HILPDA (ohne das Stopcodon) wurde mittels PCR amplifiziert und in pcDNA3 FLAG über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XhoI* inseriert. Die Sequenz von HILPDA ist hierbei *in frame* mit dem FLAG-Tag. Es entsteht ein Fusionsprotein aus HILPDA und dem FLAG-Tag.

2. pcDNA3 HILPDA-EGFP, Größe: 6278 bp

Die kodierende Sequenz des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) wurde zuvor über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *XbaI* in die *multiple cloning site* des pcDNA3 Vektors inseriert. Die vollständige cDNA von HILPDA (ohne das Stopcodon) wurde mittels PCR amplifiziert und in pcDNA3 EGFP über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XhoI* inseriert. Die Sequenz von HILPDA ist hierbei *in frame* mit der Sequenz von EGFP. Es entsteht ein Fusionsprotein aus HILPDA und EGFP.

2.1.11 Humanes Lebergewebe

Kryokonserviertes, sowie Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) humanes Lebergewebe wurde von der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt und in Übereinstimmung mit den Regularien der Gewebe-Biobank und dem Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (837.146.17 (10980), sowie dem Nachtrag 2018-13857_1, Antragssteller: Dr. Dirk Ridder und Prof. Dr. Beate Straub) verwendet. Das Kryogewebe wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die klinischen Daten der HCC-Patienten entstammen aus einer prospektiven klinischen Datenerhebung von PD Dr. Arndt Weinmann (1. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz) und Prof. Dr. med. Stefan Heinrich (Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsmedizin Mainz) [132]. Relevante klinische und pathologische Daten der verwendeten Lebertumorproben sind in Tab. 16 aufgeführt. Die verwendeten Patientendaten wurden vor der Analyse anonymisiert. Soweit verfügbar wurden mehrere Herdbefunde, Normalgewebe, Rezidive, Metastasen, tumoröse Gefäßeinbrüche und dysplastische Knoten mitgestanzt. Auf 19 TMAs wurden insgesamt über 3200 Proben von 561 Patienten, welche sich zwischen 1997 bis 2018 an der Universitätsmedizin Mainz einer Tumorresektion bzw. einer Lebertransplantation unterzogen, zusammengetragen. Die mittlere Nachbeobachtungszeit belief sich auf 55,2 Monate.

Tabelle 16 Charakterisierung des HCC-Kollektivs

	Kategorie	Absolute Patientenanzahl (prozentualer Anteil)
Gesamtzahl (N)		561 (100%)
Durchschnittsalter in Jahren (Reichweite)		64,6 (56,4 – 70,7)
Geschlecht	männlich	436 (78 %)
	weiblich	125 (22 %)
Ätiologie	Alkoholabusus	172 (31 %)
	HCV (Z.n. HCV)	114 (20 %)
	HBV (Z.n. HBV)	106 (19 %)
	NASH	42 (7,5 %)
	Hämochromatose	25 (4,5 %)
BCLC-Stadien	A	104 (19 %)
	B	356 (63 %)
	C	63 (11 %)
	D	38 (6,8 %)
ECOG-Stadien	0	399 (69,8 %)
	1	137 (24,0 %)
	2	12 (2,2 %)
	3	6 (1,1 %)
	4	7 (1,3 %)
Leberzirrhose	diagnostiziert	365(65 %)
	nicht diagnostiziert	196(35 %)
Child-Pugh-Score	A	208 (53 %)
	B	144 (37 %)
	C	65 (12 %)
Grading	G1	100 (17,5 %)
	G2	265 (46,4 %)
	G3	116 (20,3 %)
tumoröse Gefäßinvasion	nicht vorhanden	369 (66 %)
	mikroskopisch	110 (20 %)
	makroskopisch	82 (15 %)

Kategorie	Absolute Patientenanzahl (prozentualer Anteil)
Portalveneninvasion (PVT)	65 (12 %)

Legende: Sofern vorhanden wurden die klinischen Angaben aufgelistet. Angegeben wurde die absolute Anzahl, sowie der prozentuale Anteil am Gesamtkollektiv.

2.1.12 Zelllinien

Tabelle 17 verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Kultiviermedium
HEK293T	Embryonale Nierenepithelzellen	DMEM 4,5g Glucose
Huh7	Hepatozelluläres Karzinom	DMEM 4,5g Glucose
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	DMEM 4,5g Glucose

2.1.13 Bakterienkultur

Der kommerziell erhältliche Escherichia coli Top10 Stamm One Shot™ Top10 chemically competent E.coli (#C404003, Invitrogen) wurde verwendet.

2.1.14 Software

Tabelle 18 Software

Programm	Herausgeber
Adobe® Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporation, San José, Kalifornien
Citavi 6	Swiss Academic Software, Zürich, Schweiz
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, CA
HALO®IMAGE ANALYSIS PLATFORM	Indica Labs Corrales, NM, USA
Image J (64 bit) 1.43	Wayne Rasband (NIH), Maryland, USA

Microsoft® Office Professional 2010, tools Excel, PowerPoint and Word	Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Deutschland
Primer-BLAST	NCBI (National Center for Biotechnology Information)
QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4	Thermo Fisher Scientific
QuPath, Quantitative Pathology & Bioimage Analysis	University of Edinburgh
Sparkcontrol Version 2.1	Tecan Group, Männedorf, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Mikroskopische Techniken

2.2.1.1 Immunhistochemie

Die in dieser Arbeit verwendeten Tissue Microarrays (TMA) wurden durch das Pathologische Institut der Universitätsmedizin Mainz (Dr. Dirk Ridder und Prof. Dr. Beate Straub) hergestellt. Anhand Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbter Gewebeschnitte, wurden relevante Bereiche ausgewählt und doppelt gestanzt, um eine repräsentative Aussage machen zu können.

Bevor Gewebeschnitte automatisiert mit dem Autostainer (Agilent Dako) gefärbt wurden, wurden diese zuvor entparaffiniert und rehydriert. Die Gewebeschnitte wurden bei 60 °C im Brutschrank für 20 Min. inkubiert, damit überschüssiges Paraffin vom Schnitt ablaufen konnte, und im Anschluss auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Die Gewebeschnitte wurden dann mit einer absteigenden Alkoholreihe behandelt, wobei drei Mal für 10 Min. mit Xylol, zwei Mal für 10 Min. mit 100 % Alkohol, zwei Mal für 10 Min. mit 90 % Alkohol und zwei Mal mit 50 % Alkohol entparaffiniert wurde. Anschließend wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gestellt. In Abhängigkeit des zu färbenden Antigens wurden unterschiedliche Vorbehandlungen („Antigen Retrieval“) durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden entweder in Citratpuffer bei pH 6,1 für 35 Min. (EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, Low pH) oder in Tris/EDTA-Puffer bei pH 9 für 20 Min. (EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, High pH) RS mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen) im Dampfgerar bei 97 °C gekocht. Anschließend wurde die Küvette mit dem Gewebe für 7 Min. unter fließendem Wasser gekühlt und für 4 Min. in Dako-Waschpuffer gestellt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in

das Autostainer Gerät überführt und der Lauf des Dako EnVision™ FLEX-Nachweissystems gestartet. Die Gewebeschnitte wurden anschließend für 3 Min. gewässert. Die Gewebeschnitte wurden dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (vgl. oben) entwässert und abschließend mit Entellan eingedeckt.

Die TMA der Immunhistochemischen Färbungen wurden digitalisiert (NanoZoomer-Series Slide Scanners). Die Immunhistochemie wurde manuell mit dem Immunreaktivem Score (IRS) ausgewertet (Tab.19). Die Färbeintensität wurde in drei Grade eingeteilt und mit dem Punktwert für den prozentualen Anteil der positiven Zellen multipliziert (Abb. 5). Bei der Auswertung wurden Galle pigmentierte Hepatozyten und Lipofuscin nicht gewertet. Nur Hepatozyten bzw. Tumorzellen wurden berücksichtigt und Bindegewebe, Gefäße oder Entzündungszellen nicht in die Auswertung mit einbezogen. Um für die Auswertung die Patienten anhand ihrer Expressionsdaten in zwei Gruppen aufteilen zu können, wurde eine Trenngrenze mithilfe der Charité Cut-off Finder Funktion gezogen [133].

Tabelle 19 Immunreaktiver Score (Remmele und Stegner 1987)

Färbeintensität Häufigkeit pos. Zellen	keine = 0 Pkt.	schwache = 1 Pkt.	mäßige = 2 Pkt.	starke = 3 Pkt.
neg. = 0 Pkt.	0	0	0	0
<10% = 1 Pkt.	0	1	2	3
10-50% = 2 Pkt.	0	2	4	6
51-80% = 3 Pkt.	0	3	6	9
>80% = 4 Pkt.	0	4	8	12

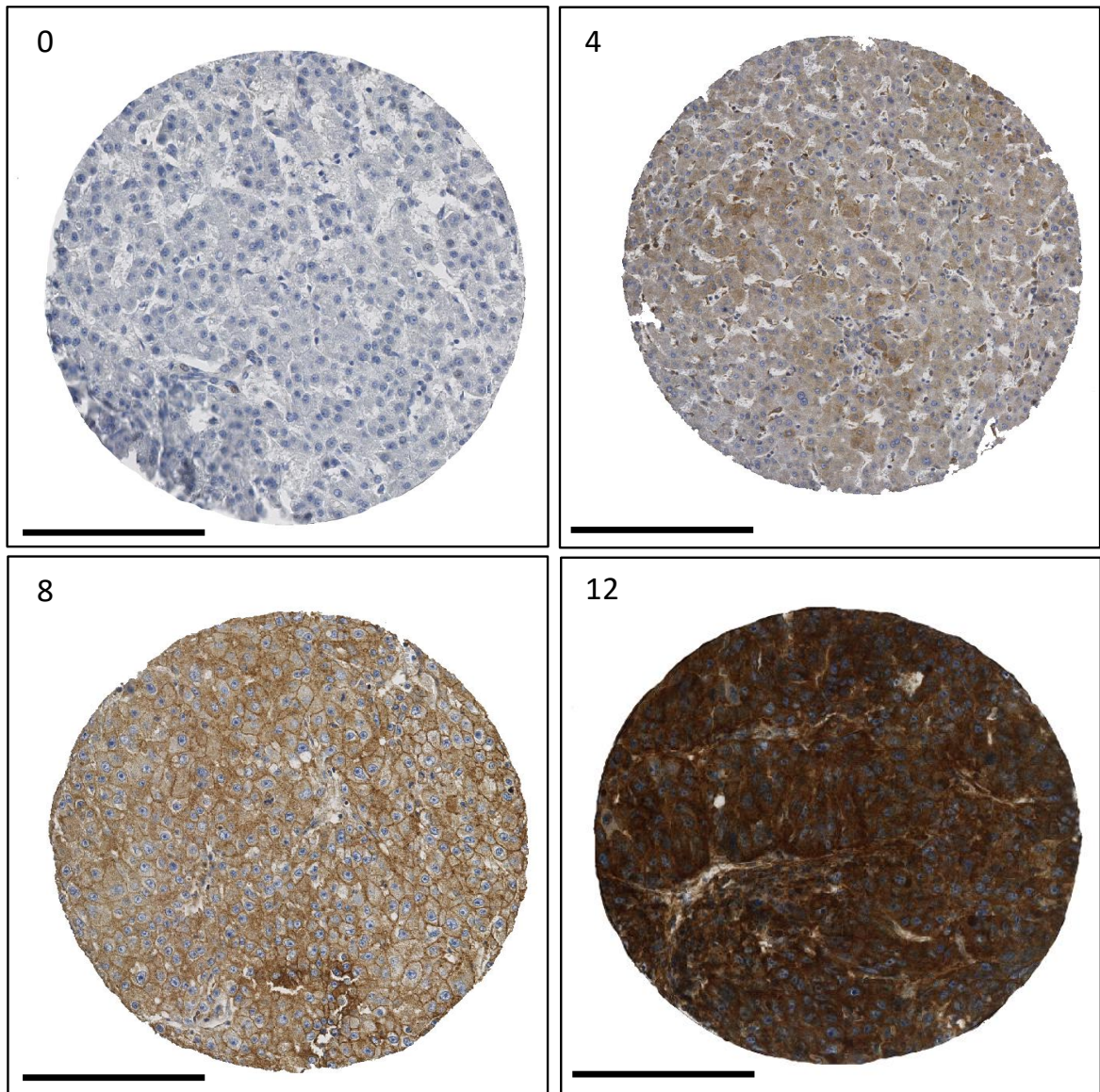


Abbildung 5 Intensitätsgrade der immunhistochemischen Färbung von HILPDA.

Dargestellt sind beispielhaft vier verschiedene TMA-Gewebespots einer HILPDA-Immunhistochemie. IRS-Score links oben. Messbalken jeweils 200 µm

Parallel zur manuellen Auswertung wurde eine automatisierte Bildanalyse mithilfe der Software HALO® (Indica Labs) durchgeführt. Hierzu wurde der Bereich der Schnitte eingegrenzt, welcher ausgewertet werden sollte („*Annotation*“), und Bereiche von der Analyse ausgeschlossen, wie beispielsweise Färbeartefakte oder Bindegewebsareale. Für jede Färbung war es notwendig die Analyseeinstellungen neu festzulegen („*Analysis*“ „*Settings*“). Mit „*Nuclear Stain*“ wurde ein Zellkern markiert, um die Blaufärbung der mit Hämalaun angefärbten Zellkerne zu definieren. Mit „*Positive Stain*“ wurde das mit DAB angefärbte Protein einer positiven Zelle markiert. Unter „*Nuclear Size*“, „*Minimum Nuclear Roundness*“ oder „*Minimum Nuclear OD*“ wurden Parameter

so variiert, dass die erkannte Zellkernzahl der tatsächlichen Zellzahl im Schnitt entsprach. Mit „*Stain 1 Minimum OD*“ wurde die Färbeintensität der Immunhistochemie in drei verschiedene Intensitätsgrade eingeteilt. Mit „*Real Time tuning*“ wurde ein ausgewählter Bereich analysiert und anhand dessen die Einstellungen angepasst.

2.2.1.2 Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellkultur und Gewebe

Zellkulturzellen wurden zunächst mit einem Plasmid (1 µg pcDNA) transient transfiziert und in der Regel 48 h nach der Transfektion fixiert. Die in einer 12-Well Platte, auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 10 mm ausgebrachten Zellen, wurden zunächst mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden pro Well 500 µl einer in PBS verdünnten 3,7%ige Formaldehydlösung (FA) für 10 Min. bei RT verwendet. Es folgten drei Waschschrte mit 500 µl PBS für jeweils 5 min. Die Zellen wurden bei 4 °C bis zur Färbung aufbewahrt.

Zur Anfärbung von Zellkulturzellen wurden zunächst unspezifische Bindestellen blockiert und permeabilisiert. In jedes Well wurde 500 µl Blockierlösung (10 % Serum und 0,1 % Triton in PBS) gegeben und die Zellen für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. 50µl Primärantikörperverdünnung wurden als Tropfen auf ein vorbereitetes Stück Parafilm gegeben. Die auf Glasplättchen in Wells gewachsenen Kulturzellen wurden trocken getupft und mit den Zellen nach unten auf den Primärantikörper gegeben. Bevor das gleiche Vorgehen mit dem Fluoreszenz-gelabelten Sekundärantikörper wiederholt wurde, wurden die Zellen gewaschen, indem das Plättchen vorsichtig fünfmal in eine Waschlösung (0,1 % Triton X-100 in PBS) getaucht wurde. Die Sekundärantikörper wurden mit 1 % Serum und 0,1 % Triton X-100 in PBS verdünnt. Nun wurden die Glasplättchen erneut fünfmal in die Waschlösung getaucht und abgetupft. Schließlich wurden die gefärbten Zellen mit 30 µl Mowiol eingedeckt und über Nacht bei 4 °C ausgehärtet.

Für die Vitalmikroskopie von Mitochondrien erfolgte 48h nach transients Transfektion von Kulturzellen die Anfärbung der Mitochondrien mittels *Live Cell Staining*. Das Medium von vitalen Kulturzellen wurde entfernt und durch vorgewärmtes Medium, in das 100 nM Mito view™ 633 (Biotium, Verwendung nach Herstellerangaben) gegeben wurde, ersetzt und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Es folgte die bereits beschriebene Fixierung und Färbung der Zellen (vgl. oben). Bei dem weiteren Vorgehen musste insbesondere darauf geachtet werden, lichtgeschützt zu arbeiten.

Für Kryogewebeschnitte wurde mit einem Kryostat 5µm dicke Gewebsschnitte hergestellt, auf Objektträger (Superfrost) überführt und entweder bei -80 °C gelagert oder weiter prozessiert. Zur Fixierung wurde eine 3,7%ige Formaldehydlösung verwendet und die Gewebeschnitte wurden für 15 Min. bei RT inkubiert (Fixiermethode 1). In einem alternativen Protokoll (Fixiermethode 2) wurden die Gewebeschnitte mit, bei -20 °C gelagertem Aceton für 10 Min. inkubiert und anschließend getrocknet oder zuerst mit Methanol und anschließend mit Aceton (ebenfalls bei -20 °C gelagert) für jeweils 5 Min. behandelt und ebenfalls getrocknet. Danach schlossen sich bei allen verwendeten Fixiermethoden vier 5 Min. Waschschritte mit PBS an.

Gewebsschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und für 5 Min. mit 10 % Serum und 0,1 % Triton in PBS permeabilisiert und blockiert (Protokoll 1) oder mit 0,05 % Triton in PBS permeabilisiert (Protokoll 2). Im Anschluss folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Primärantikörper, verdünnt in 10 % Serum und 0,1 % Triton in PBS (Protokoll 1) oder verdünnt in PBS (Protokoll 2). Das Gewebe wurde zwei Mal für 5 Min. mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe für 45 Min. mit dem Sekundantikörper in PBS inkubiert. Erneut folgten zwei 5-minütige Waschschritte mit PBS, sowie ein 10-minütiger Waschschritt mit Aqua dest. Die gefärbten Gewebsschnitte wurden mit Mowiol eingedeckt.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivieren und Passagieren

Die verwendeten Zellkulturen wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Zelldichte jeweils kontrolliert. Bei einer annähernd 100 % konfluenten 10 cm Schale wurden die verwendeten Zelllinien drei Mal in der Woche gesplittet (HEK293T 1:10, Huh7 und HepG2 1:5). Hierfür wurden die Zellen mit 3 ml PBS ohne Calcium gewaschen. Um die Zellen von der Platte zu lösen, wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und gut über den gesamten Zellteppich verteilt und für 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Der Vereinzlungsprozess wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Der Verdau wurde mit ausreichend Medium gestoppt, die Zellen mit dem Medium von der Platte gewaschen und mithilfe einer Pipette vereinzelt. In einer neuen 10 cm Schale wurden 9 ml Medium vorgelegt und 1 ml Zellsuspension zugegeben. Die Zellsuspension wurde gut durchmischt und in den Inkubator zur weiteren Kultur überführt.

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 µl der hergestellten Zellsuspension (siehe 2.2.2.1.) verwendet. Nachdem die vier äußersten Quadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt waren, wurde der Mittelwert errechnet. Das Ergebnis wurde mit 1000 multipliziert und somit die Zellzahl pro ml Zellsuspension ermittelt. Falls die errechnete Zellkonzentration der gewünschten Konzentration an Zellen im Medium übertraf, konnte mit weiterem Medium die Zellsuspension verdünnt werden. Falls die Zellkonzentration zu gering war, wurde die Zellsuspension bei max. 1.000 - 1.200 Umdrehungen/Min (U/min) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium resuspendiert und die Zellsuspension mit gewünschter Zelldichte neu ausgebracht.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um Zelllinien langfristig zu Lagern wurden diese bei -80°C gefroren. Hierzu wurde eine annähernd 100 % konfluente 10 cm Platte trypsiniert, die Zellen in 2 ml eines Kulturmediums mit 20 % FCS und 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Es wurde ein Einfrierbehälter, welcher das Abkühlen der Zellen um je 1 °C pro Min. bis auf -80 °C ermöglichte, verwendet, und am Folgetag die Zellen für eine langfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum schonenden Auftauen wurde gewärmtes 1ml Medium auf die gefrorenen Zellen gegeben. Nach dem Adhären der Zellen nach ca. 45 Min. wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

2.2.2.4 Transfektion

Um ein bestimmtes Protein in Zellen Überzuexpressieren wurden mittels PEI-Transfektion oder einer Transfektion mittels Lipofektamin Expressionsplasmide in die Zelle einbringen. Polyethylenimin (PEI) ist ein kationisches Polymer, welches aufgrund der Hydrophilität auf der DNA kondensiert und Polyplexe bildet. Den DNA-PEI-Komplex nehmen Zellen mittels Endozytose ins Zytoplasma auf. Während eines Mitosezyklus kann die DNA nun in den Zellekern gelangen und abgelesen werden.

Zunächst wurde eine definierte Anzahl an Zellen 1d vor geplanter Transfektion ausgebracht. Die Zelldichte lag bei 70 % Konfluenz (für Huh 7 Zellen $0,5 \cdot 10^6$ und für Hek293T $2 \cdot 10^6$). In ein steriles Reaktionsgefäß wurde die benötigte Menge an PBS ohne Calcium sowie Plasmid-DNA vorgelegt und gemischt (Tab. 20). Die PEI-PBS Lösung wurde zunächst für 10 Sek. gemischt und anschließend die benötigte Menge in die DNA-PBS-Lösung pipettiert. Nachdem das Gemisch durch Pipettieren vermischt wurde, wurde es für 5 Sek. gevortext und für 5 Min. bei RT inkubiert. Nach

der Inkubationszeit wurden die PEI-PBS-DNA Präzipitate zum Medium auf die Zellen gegeben und durch Schwenken der Platte homogen verteilt. Nach Inkubation für 48h im Brutschrank inkubiert wurden ist das überexprimierte Protein ausreichend in der Zelle vorhanden.

Tabelle 20 PEI-PBS Transfektionsschema

Format	DNA (µg)	PBS (µl)	1,67mM PEI in PBS (µl)
10 cm Schale	10	180	216
6 cm Schale	4	72	86,4
6 Well Platte	2	36	43,2
12 Well Platte	1	18	21,6

Bei der Lipofektion bilden Lipide im wässrigen Milieu Mizellen oder Liposomen, welche mit der DNA in Abwesenheit von Serum komplexieren. Diese Komplexe werden endozytotisch durch die Zellen aufgenommen. Die transiente Transfektion mit siRNA wurde mit Lipofectamine® 2000 durchgeführt. Hierfür wurde die siRNA in einer Konzentration von 5nM verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen so ausgebracht, dass eine Zelldichte von 70 % für die Transfektion gegeben war. Pro Ansatz wurde 0,75 ml OPTI-MEM Medium in zwei Gefäße vorgelegt. Anschließend wurde in einem Gefäß 0,75 µl (1nM) bzw. 3,75 µl (5nM) des 2 µM siRNA-Stock und im anderen Gefäß 6 µl Lipofectamin verdünnt. Beide Lösungen wurden gemischt und bei RT für 10 Min. inkubiert. Das OPTI/Lipofectamin Gemisch wurde zum OPTI/siRNA Gemisch gegeben und erneut gemischt, sowie für 20 Min. bei RT inkubiert und mit PBS gewaschen. Der Transfektionsansatz wurde dann für 5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 1,5 ml Nährlösung aufgefüllt. Die Knock-down Effizienz wurde nach 48 bzw. 72 h mittels Real-time PCR überprüft.

2.2.2.5 Hypoxie-Assays

Hypoxische Kulturbedingungen durch Kultivierung in einem Inkubator bei 1 % Sauerstoffgehalt erzeugt. Hierbei wurden die Zellen 1 d vor Behandlung ausgesät und die Zellen bis zu 48 h der Behandlung ausgesetzt. Die Kontrollzellen wurden bei Normalsauerstoffgehalt von 21 % inkubiert

2.2.2.6 Proliferations-Assays

Die Phosphorylierung des Serins von Histon H3 während der Mitose ist ein gängiger Marker für sich teilende Zellen. Auf Glasplättchen ausgebrachte Zellen wurden

zunächst transfiziert und nach einer Dauer von 48 h nach Überexpression mit einem Plasmid, bzw. nach einem Zeitraum von 72 h nach Herunterregulation mit siRNA auf Glasplättchen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (2.2.1.2). Als Primärantikörper diente hierbei ein Anti-Phosphohiston H3 Antikörper. Neben phosphoryliertem Histon H3 wurde HILPDA und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. 10 Bilder von zufällig ausgewählten Bereichen wurden in 6,3x Gesamtvergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000 B) aufgenommen. Die Auswertung der Versuchsbilder erfolgte mithilfe des Programms Image J (64 bit) 1.43. Anschließend wurde ermittelt, welcher prozentuale Anteil bezogen auf die Gesamtzellzahl für Phosphohiston H3 positive Zellkerne aufwies.

2.2.2.7 Migrations-Assays

Um das Migrationsverhalten transfizierter Zellen zu untersuchen, wurden Zellen zunächst mit den gewünschten Plasmiden transfiziert. Hierzu wurden Inserts verwendet, die aus zwei benachbarten Kammern bestehen und auf eine 12-Well Platte gegeben. Am Folgetag der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und in die beiden Kammern ausgebracht. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass am folgenden Tag eine 100 % konfluente Schicht aus Zellen innerhalb der Kammern erzeugt wurde. Nach 1 d wurde das Insert entfernt, wodurch in jedem Ansatz ein zellfreier Spalt definierter Breite (500 µm) innerhalb der zellulären Einzelschicht entstanden war. Direkt nach dem Entfernen des Inserts wurde in 40 x Vergrößerung ein Bild vom Spalt gemacht, um die Ausgangsgesamtfläche des Spalts zu ermitteln. Anschließend wurde das Migrationsverhalten der sich am Rande des zellfreien Spalts befindlichen Zellen beobachtet. Die Zellen migrieren so lange bis sich stabile Zell-Zell Kontakte ausbilden. Zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten wurde erneut ein Bild vom Spalt gemacht. Zu beachten ist hierbei, dass die Zeitpunkte so gewählt wurden, dass der Spalt noch nicht geschlossen war (für Huh7 0h, 9h und 23h, für HEK293T 0 h, 3 h, 6 h und 9 h). Für die Auswertung wurde die noch zellfreie Fläche des Spalts gegen die Zeit aufgetragen. Mithilfe der Geradenfunktion konnte der Zeitpunkt ermittelt werden, zu welchem 50 % der Fläche mit Zellen bedeckt war.

2.2.2.8 Herstellung von Zytoblöcken

Zur Immunhistochemie von Kulturzellen wurden Zell- oder Zytoblöcke hergestellt. Die Zellen wurden dafür in 10 cm Schalen ausgebracht und ggf. 48 h vor der Herstellung transfiziert. Die konfluenten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Accutase® für 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 3,5 ml

PBS von der Platte gespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 U/min und 4 °C für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 4ml kaltem PBS gewaschen. Es schloss sich ein Zentrifugierschritt bei 1200 U/min und 4 °C für 5 Min. an. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 2 ml 3,7%iges Formalin resuspendiert und für 15 Min. bei 37 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen bei 1200 U/min und 4 °C für 5 Min. zentrifugiert, in 5 ml PBS resuspendiert und erneut bei 1200 U/min und 4 °C für 5 Min. zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 100 % Ethanol resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die in Ethanol gelösten Zellen wurden mit 200 µl 30 % FCS in PBS versetzt und durch Invertieren gut durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 5000 U/min und RT für 5 Min wurde der Überstand abgekippt und das Reaktionsgefäß zum Abtropfen umgekehrt auf ein Papiertuch gestellt. Das Zellpellet wurde vorsichtig mit einem Spatel aus dem Gefäß herausgeholt, mittig auf ein wassergetränktes Stück Vlies platziert, mit 5 µl Hämalaun beträufelt und in das Vlies eingeschlagen. Das eingepackte Zellpellet wurde in eine Einbettkapsel gelegt und in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 *Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe*

Von einer 100 % konfluenten 6 cm Schale wurde das Medium abgesaugt, die Zellen durch Zugabe von 1000 µl Trizol lysiert und gleichzeitig die RNA vor dem Abbau geschützt. Anschließend wurde die Trizol-Zellsuspension in ein DNase/RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Für alle weiteren Schritte wurden die Zellen auf Eis gelagert. Es wurde 200µl Chlorophorm hinzugegeben, für 15 Sek. gevortext und das Reaktionsgefäß für 5 Min. auf Eis gestellt, wodurch sich zwei Phasen bildeten. In der oberen weißen und wässrigen Phase befinden sich Proteine, DNA und RNA und in der unteren roten und hydrophoben Phase befinden sich die übrigen organischen Zellbestandteile. Um die RNA von Proteinen und DNA zu trennen, folgte eine 15 Min. Zentrifugation bei 11200 U/min und 4 °C. DNA und Proteine befanden sich nun in der Interphase zwischen wässriger und hydrophober Phase. Um ein Vermischen der entstanden drei Phasen zu verhindern, wurde das Reaktionsgefäß sehr sorgfältig behandelt. Die oberste wässrige Phase wurde nun in ein neues 400-500 µl fassendes Reaktionsgefäß überführt. Zum Ausfällen der RNA wurde ein ebenso großes Volumen Isopropanol hinzugefügt, durch Invertieren gut gemischt und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Durch die Zentrifugation bei 11200 U/min bei 4 °C für 10 Min. präzipitierte die RNA. Das entstandene Sediment wurde 2 x mit 500 µl 80 % Ethanol

gewaschen und bei 8800 U/min für 5 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf der Heizplatte bei 56 °C getrocknet. Zu beachten war, dass das Zellpellet nicht vollständig getrocknet sein darf, damit die RNA lösbar bleibt. Das Zellpellet wurde mit 30-40 µl RNase/DNase-freies Wasser zurückgelöst und für 15 Min. bei 55 °C inkubiert.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA bzw. DNA wurde fotometrisch mittels Spektralphotometer (NanoDrop) durchgeführt.

2.2.3.3 cDNA-Synthese bzw. reverse Transkription

Da RNAs sehr anfällig für Degradation sind, wird die einzelsträngige RNA mittels reverser Transkription in die wesentlich stabilere doppelsträngige cDNA umgeschrieben.

Zunächst wurde ein Master Mix hergestellt, indem die Substanzen wie im Folgenden (Tab. 21) beschrieben pipettiert wurden. In die Real-Time-PCR Tubes wurde 10 µl des Master Mix vorgelegt und 2 µg der RNA-Probe dazupipettiert. Abschließend wurde das Volumen mit DNase und RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Durch Auf- und Abpipettieren wurde der Reaktionsansatz gemischt und anschließend zentrifugiert. Die Reaktion wurde im ThermoCycler mit folgendem Programm durchgeführt (25 °C 10 Min; 37 °C 129 min; 85 °C 5 min). Die synthetisierte cDNA wurde 1:4 mit DNase/ RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 21 Pipettierschema des High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit

Substanz	Volumen (µl)
10x RT Puffer	2
10x RT Random Primer	2
25x dNTP Mix	0,8
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1

2.2.3.4 Primervalidierung

Um zu ermitteln, welche Primerpaare geeignet sind, wurden diese folgendermaßen validiert: Für jedes Primerpaar wurde eine Standardkurve mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000) einer ausgewählten cDNA-Probe erstellt. Die Steigung der Geraden gibt Auskunft über die Effizienz der

Amplifikationsreaktion. Im Rahmen der Primervalidierung zeigte sich, dass das Primerpaar (2.1.9.1) mit einer Effizienz von 107.929 % für die weiteren Untersuchungen mittels *real time* PCR geeignet war

2.2.3.5 *Semiquantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Für die quantitative Untersuchung der Expression eines bestimmten Gens wurde das Quant Studio 3 Real-Time PCR System verwendet. Als endogene Kontrolle diente das Haushaltsgen 18s ribosomale RNA, das unbeeinflusst von den durchgeführten Experimenten exprimiert wird. Wie bei jeder PCR findet eine Vervielfältigung der an die Primer bindenden cDNA statt. Während der Amplifikationsreaktion interkaliert SYBR®Green in die doppelsträngige DNA und emittiert ein Fluoreszenzsignal, welches nach jedem PCR-Zyklus gemessen wird.

Der CT-Wert gibt Auskunft darüber, ab welchem Zyklus die Fluoreszenzintensität erstmals die Fluoreszenzintensität des Hintergrunds übersteigt. Dies ist der Zeitpunkt, ab welchem die Amplifikation exponentiell stattfindet. Der Startzeitpunkt der exponentiellen Phase ist wiederum abhängig von der Ausgangskopienzahl des PCR-Edukts. Mittels CT-Wert können somit Umrechnungen in relative Mengeneinheiten stattfinden.

Mittels Schmelzkurvenanalyse wird bestätigt, dass die Primer spezifisch binden. Jedes PCR-Produkt besitzt eine Schmelztemperatur, bei welcher das Produkt zur Hälfte doppel- und zur anderen Hälfte einzelsträngig vorliegt. Falls die Schmelzkurve einen einzigen, schmalen Gipfel aufweist, kann man davon ausgehen, dass die Primer spezifisch gebunden haben.

Die unter 2.1.9.1 aufgeführten Primerpaare (*forward* und *reverse*) wurden 1:20 mit DNase und RNase-freiem Wasser verdünnt. Für den PCR-Ansatz wurde das Pipettierschema aus Tab. 22 verwendet. Zunächst wurde in die 96-Well-Reaktionsplatte 9µl Master-Mix ohne cDNA vorgelegt. Die cDNA-Probe wurde anschließend in jedes Well pipettiert. Um Pipettierfehler zu ermitteln, wurden die Proben in Duplikaten gemessen. Außerdem wurde eine Wasserprobe als Negativprobe gemessen, um auszuschließen, dass das Wasser kontaminiert ist.

Tabelle 22 Pipettierschema eines Ansatzes für die real-time PCR

Substanz	Volumen (μl)
SYBR-Green	5
Primer	0,5
DNase/RNase-freies Wasser	3,5
cDNA	1

Die weiteren Schritte folgten nun automatisiert im QuantStudio real-time PCR-Gerät. Im initialen Stadium wird die Probe für 3 Min. auf 50 °C temperiert und anschließend für 10 Min. auf 95 °C erhitzt. Im PCR-Stadium erfolgt in jedem Replikationszyklus für 15 Sek. eine Erhitzung auf 95°C, gefolgt von 1 Min. bei 60 °C. Das Fluoreszenzlevel wird nach jedem Zyklus gemessen. Während der Schmelzkurve erfolgen nacheinander für 15 Sek. eine Erhitzung auf 95 °C, für 1 Min. das Abkühlen auf 60 °C und abschließend erneut eine Erhitzung für 15 Sek. bei 95 °C. Alle Temperaturänderungen wurden mit einer Geschwindigkeit von 1,6 °C pro Sek. gesteuert.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Volllysaten aus Kulturzellen und Gewebe

Um Zellen abzulösen, wurde das Medium abgesaugt und 5ml PBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die Zellen vorsichtig mit einem Silikonspatel von der Platte geschabt, die Zellsuspension wurde in ein Flacon überführt und für 5 Min. bei 1.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet bei -20 °C gelagert.

Für die Zelllyse wurde das Zellpellet in Abhängigkeit von der Größe in 100-200 μl Lysispuffer (ColP mit 1 % Triton x-100 und 1:100 Protease- und Phosphataseinhibitor) resuspendiert. Nun konnte die Lyse mittels Sonifikator (Branson SLPe) für 10 Sek. bei 10.000 Joule auf Eis erfolgen. Anschließend wurde für 1 Min. bei 1.000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die löslichen Proteine von den Zelltrümmern zu separieren, folgte ein letzter Zentrifugationsschritt für 5 Min. bei 12.000 U/min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Mit einem Kryotom wurden 50 \times 5 μm dünne Kryogewebeschnitte angefertigt und in ein Homogenisatorgefäß überführt. Das gewonnene Material wurde abhängig von der

Menge mit 500-900 µl Lysispuffer (CoIP-Puffer mit 1 % Triton und 1 % Proteaseinhibitor) verdünnt und mittels Homogenisator bei höchster Stufe bei 6.800 U/min zerkleinert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 Min. bei 12.000 U/min und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Zellpellet wurde verworfen.

2.2.4.2 Denaturierende Lyse mit Harnstoff Lämmli Puffer

Das geschnittene Gewebe bzw. das geerntete Zellkulturpellet wurde mit verschiedenen Lysispuffern versetzt. Puffervariante 1 bestand aus einem CoIP-Puffer mit 1 % Triton x-100, 8 M Urea, sowie 1:100 Protease- und Phosphataseinhibitor. Puffervariante 2 setzte sich aus 6 x SDS-Ladepuffer in CoIP-Puffer mit 1 % Triton x-100 zu einem 2 x Ladepuffer, sowie 1:100 Protease- und Phosphataseinhibitor zusammen. Anschließend folgte der Zellaufschluss mittels Sonifikator (Zellkultur) bzw. Homogenisator (Gewebe). Da die Gelelektrophorese der Proben ohne Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte, wurden verschiedene Volumina geladen, bspw. 20 µl, 10 µl, 5 µl und 2,5 µl. Um in jede Tasche das gleiche Volumen zu laden, wurde jeweils mit CoIP-Puffer aufgefüllt.

2.2.4.3 Co-Immunpräzipitation

Bei der Co-Immunpräzipitation wurde ein Protein mit einem spezifischen Antikörper aus einem Zelllysats angereichert. 500µg Protein des Zelllysats wurden mit CoIP-Puffer (0,1% Triton x-100, 1:100 Protease- und Phosphataseinhibitor) auf ein Gesamtvolumen von 500 µl eingestellt. Das Lysat wurde mit 1 µg Antikörper versetzt und über Nacht auf dem Wippschüttler bei 4 °C inkubiert. In dieser Zeit fand die Bindung des Antikörpers an das entsprechende Protein statt. Zur Äquilibration wurde zu 25 µl der Beads (Rec-Protein G-Sepharose® 4B Conjugate) 1 ml CoIP-Puffer pipettiert, das Gemisch gut invertiert und bei 1.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Lysat-Antikörper-Lösung auf die Beads gegeben. Es folgt eine Inkubationszeit von 4 h bei 4 °C auf dem Wippschüttler, in welcher der konstante Fc-Teil des Antikörper-Antigen-Komplexes durch die Beads gebunden wurde. Ungebundene Proteine wurden entfernt, indem fünf Mal mit 1 ml CoIP-Puffer gewaschen wurde. Die Elution der an die Beads gebundenen Proteine erfolgte mittels Gelelektrophorese, dafür wurde 30 µl 2-fach SDS-Ladepuffer zu den Beads gegeben und das gesamte Gemisch für 10 Min. bei 95 °C gekocht. Anschließend wurde das gesamte Gemisch auf das Gel geladen. Als Ladekontrolle diente 10 % der für die IP eingesetzten Proteinmenge (50 µg des Lysats), welche mit 2-fach SDS-Ladepuffer und

ColP-Puffer versetzt wurde. Im Anschluss erfolgten SDS-PAGE und Immunblot. Hierbei ist zu beachten, dass neben der spezifischen Proteinbande auch die schwere und leichte Kette des eingesetzten IgG Antikörpers detektierbar ist.

2.2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 3 µl Lysat in 1 ml verdünnter Bradford-Lösung (1:5 mit H₂O) pipettiert. Eine Eichreihe (0 µl, 2,5 µl, 5 µl, 7,5 µl, 10 µl und 15 µl) wurde mit dem Eichprotein Rinderserumalbumin (BSA) bekannter Konzentration (1 µg/µl) pipettiert. Da der Versuch eine zeitabhängige Reaktion mit Farbumschlag ist, wurde 1.000 µl der Bradfordlösung möglichst zeitgleich zu jeder Proteinprobe gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde 200 µl des Gemischs in eine 96-Well Platte überführt und mit dem Microplate-Reader Spark (Tecan) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Durch die Messpunkte der Eichreihe wurde eine lineare Regressionsgerade gelegt und deren Funktion bestimmt. Mithilfe der Geradengleichung und der Absorption der Proben wurde die zugehörige Konzentration errechnet.

2.2.4.5 Herstellung von Polyacrylamidgelen sowie Tris-Tricin Gelen

In Abhängigkeit des Molekulargewichts bzw. des Migrationsverhaltens des zu detektierenden Proteins wird die entsprechende Prozentigkeit des Gels gewählt. Generell gilt, je kleiner das Protein, desto höher sollte die Prozentigkeit sein.

Zunächst wurde eine plane Platte und eine Platte mit Abstandshalter in eine Gelgießvorrichtung eingespannt und die Dichtigkeit des Systems überprüft. Die für das Trenngel verwendeten Substanzen wurden, wie in Tab. 23 aufgeführt pipettiert. Die radikalische Polymerisation erfolgte erst nach Zugabe von APS (10 %) und TEMED. Die Mischung wurde zwischen die beiden Glasplatten pipettiert, wobei das Trenngel ca. $\frac{3}{4}$ des Gesamtgels ausmachen sollte. Um Blasenbildung zu vermeiden und eine gerade Oberfläche des Sammelgels zu erhalten, wurde diese mit Isopropanol überschichtet. Nach 1 h war das Trenngel fest und das Sammelgel konnte angesetzt werden (siehe Tab. 23). Das Isopropanol wurde abgegossen und die Oberfläche mit Filterpapier getrocknet. Das restliche Volumen zwischen den Glasplatten wurde mit Sammelgel gefüllt und abschließend der Kamm von einer Seite ausgehend in das Polyacrylamidgel geschoben. Nachdem auch das Sammelgel fest geworden war, wurde das fertige Polyacrylamidgel bis zum Einsatz feucht gehalten und bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 23 Volumina der pipettierten Substanzen für ein Polyacrylamidgel

Substanz	Sammelgel	Trenngel			
		8 %	10 %	15 %	16 %
Reinstwasser (ml)	1,15	2,3	2	1,2	0,7
1,5 M Tris-HCl; pH 8,8 (ml)		1,3	1,3	1,3	1,3
0,5M Tris-HCl; pH 6,8 (ml)	0,5				
30 % Acrylamid Mix (ml)	0,33	1,3	1,7	2,5	3
10 % SDS (µl)	20	50	50	50	50
10 % APS (µl)	20	50	50	50	50
TEMED (µl)	2	3	2	2	1

Für die Auftrennung von Proteinen mit einem sehr niedrigen Molekulargewicht, wurden Tris-Tricin-Gele verwendet. Hierbei lag die Besonderheit darin, dass ein vom bisherigen Protokoll abweichendes Verhältnis von Acrylamid- und Bisacrylamidpulver verwendet wurde (Tab. 24). Außerdem wurde für die Auftrennung ein empfindliches Puffersystem aus Anoden- und Kathodenpuffer verwendet. Es wurde ebenfalls mit dem Trenngel begonnen und dafür AB-6 Puffer, Schläggel-Puffer und Reinstwasser gemischt. Anschließend wurde die nötige Menge Harnstoff in der Mischung gelöst. Zum Quervernetzen wurde wieder APS (10 %) und TEMED hinzugefügt und gemischt. Das Gel sollte ebenfalls $\frac{3}{4}$ der Gesamtlänge ausmachen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 1,5 h war das Trenngel fest. Für das Sammelgel wurden AB-3 Puffer, Schläggel-Puffer und Reinstwasser verwendet. Schließlich wurden APS (10 %) und TEMED hinzugefügt.

Tabelle 24 Volumina der pipettierten Substanzen für vier Tris-Tricin Gele

Substanz	Sammelgel	Trenngel
Harnstoff (g)		10,8
AB-6 Puffer (ml)		10
AB-3 Puffer (ml)	1	
Schläggel-Puffer (ml)	3	10
Reinstwasser (ml)	8	10
TEMED (μ l)	9	10
APS (μ l)	90	100

2.2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Semi-dry Blotting

Mithilfe einer Gelelektrophorese wurden Proteinlysate von humanem Gewebe oder Zellkulturzellen dem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Um vergleichbare Ausgangskonzentrationen zwischen den Proben zu schaffen, wurde eine definierte Gesamtproteinkonzentration mit Lysispuffer auf ein gleiches Volumen eingestellt und anschließend 6 x SDS-Ladepuffer zum Gemisch pipettiert. Damit die Proteine ausschließlich nach dem Molekulargewicht aufgetrennt werden können, überdeckt das SDS die Eigenladung der Proteine. Die Proben wurden für 10 Min. bei 95 °C erhitzt, um die Tertiär- und Quartär-Struktur der Proteine zu zerstören. Zudem reduziert das DTT im 6x Ladepuffer die intramolekularen Disulfidbrücken der Proteine. Die Polyacrylamid-Gele wurden in die Laufkammer eingesetzt und der Tank mit SDS-Page Laufpuffer befüllt. Nachdem die Geltaschen ausgespült waren, wurden diese mit den Proben sowie einem Größenmarker beladen. Nun erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 50-60 Volt (Netzteil) die vertikale Elektrophorese. Zunächst wurden die Proben bei 50-60 Volt (0,01 Ampere) an der Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert. Anschließend konnte die Spannung auf 100-120 Volt erhöht werden. Nun wurden die Proteine ihrer molekularen Masse nach im Trenngel aufgetrennt, wobei kleinere Proteine schneller durch das Gel migrieren. Nachdem die Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war, wurde der Lauf gestoppt, das Polyacrylamidgel aus der Laufkammer entnommen und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde in eine Schale mit Semidry-Blot Puffer gelegt.

Für den Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran wurde das mit Transferpuffer befeuchtete Gel direkt luftblasenfrei auf die ebenfalls befeuchtete Nitrocellulosemembran gegeben. Membran

und Gel wurden zwischen jeweils drei Lagen mit Transferpuffer befeuchtetem Filterpapier gelegt und zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden gespannt. Nun erfolgte der Transfer durch eine senkrecht zum Gel für 30 Min. angelegte Spannung von 25 Volt. Die Proteine migrieren Richtung Anode und somit auf die Membran zu. Anschließend wurden die Proteinbanden mittels Ponceau Rot sichtbar gemacht, um die Auftrennung der Proteine, sowie die Qualität des Transfers zu beurteilen. Die Membran wurde dann mit TBST (TBS + 0,05% Tween 20) entfärbt.

2.2.4.7 Immunblot (Immunblot)

Die zu analysierenden Proteine wurden nun mit einem spezifischen Antikörper detektiert, um Aussagen über deren molekulare Masse respektive deren Migrationsverhaltens, sowie der relativen Quantität treffen zu können. Die Membran wurde über Nacht in TBST mit 5 % w/v Milchpulver bei 4 °C auf einen Wippschüttler inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Die Primäantikörper wurden in TBST mit 5 % Milchpulver verdünnt. Die Membran wurde mit 5ml Primäantikörperlösung versetzt und für 1h auf einem Plattformschütter bei RT inkubiert. Daraufhin folgten drei Waschschrte für jeweils 10 Min. mit 10 ml TBST bei RT, um schwach und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Der Sekundäantikörper wurde mit TBST + 5 % Milchpulver verdünnt. Der Sekundäantikörper bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers. Nach 1h Inkubation mit 5 ml Sekundäantikörperlösung folgten erneut drei Waschschrte mit 10 ml TBST für 10 Min. bei RT.

An den sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Chemolumineszenzreaktion (ECL). Für die Detektion wurde folgende Lösung angesetzt:

Tabelle 25 Ansatz der ECL-Lösung für die Entwicklung einer Membran

Substanz	Volumen
Tris-HCl	10 ml
Luminol	50 µl
Cumarinsäure	25 µl
H ₂ O ₂	4 µl

Die Reaktion wurde mit der Zugabe von H₂O₂ gestartet. Die Lösung wurde gemischt und homogen auf die Membran verteilt. Die Membran wurde für 1 Min. im Dunkeln

inkubiert, wobei nach der Hälfte der Zeit nochmals die ECL-Lösung homogen verteilt wurde. Die Lumineszenz wurde mithilfe eines Biolumineszenz-Gerätes detektiert.

2.2.4.8 Entfernung gebundener Antikörper von Nitrocellulosemembranen

Um bereits entwickelte Membranen erneut mit weiteren Antikörpern entwickeln zu können, wurden die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper von der Nitrocellulosemembran entfernt. Dies wurde mittels saurem pH, welcher zur Denaturierung der gebundenen Antikörper führte, umgesetzt. Hierbei inkubierte man die Membran für 10 Min. bei RT mit dem Stripping Puffer 1 (pH = 2,8) und anschließend bei RT für weitere 10 Min. mit dem Stripping Puffer 2 (pH = 2,2). Anschließend wurde die Membran für 10 Min. in TBST bei RT gewaschen. Nun konnte die Membran erneut mit Milch blockiert werden.

2.2.5 Statistische Methoden

Die Versuchsergebnisse in Zellkultur sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Prüfung der Signifikanz wurde mithilfe der *GraphPad Prism software* (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*) der gepaarte t-Test mit unabhängigen Variablen durchgeführt. Ein Ereignis mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ ($p < 0.05$) wurde als statistisch signifikant und ein p-Wert von $p \leq 0,001$ als hoch signifikant betrachtet (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$). Alle statistischen Berechnungen bezüglich der Patientenkohorte wurden mithilfe der Programmiersprache R (*R Foundation for Statistical Computing, Wien*) durchgeführt [134]. Mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde getestet, ob die zentralen Tendenzen zweier gepaarter Stichproben sich unterscheiden. Durch den Kruskal-Wallis-Test wurde analysiert, ob zwei unabhängige Stichproben hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable einer gemeinsamen Population entstammen. Um die Patienten anhand ihrer Expressionsdaten in zwei Gruppen aufteilen zu können, wurde eine Trenngrenze mithilfe der Charité Cut-off Finder Funktion gezogen [133]. Mittels „*Cut off finder*“ wurde ein IRS-Wert von 3.21 als Grenzwert zwischen hoher und niedriger Färbeintensität festgelegt. Als Gesamtüberleben wurde das Intervall zwischen dem Zeitpunkt der Erstdiagnose und dem Todeszeitpunkt unabhängig von der Ätiologie bzw. der letzten Verlaufsbeobachtung definiert. Die Überlebensanalysen wurden nach der Kaplan-Meier-Methode ermittelt. Der Vergleich der Überlebensraten der Patientengruppen mit hoher bzw. niedriger Expression von HILPDA wurde mit dem Log-Rank-Test durchgeführt (Funktion *coxph* des R package *survival*; Version 3.2.13, R Foundation

for Statistical Computing, Vienna, Austria). Uni- und Multivariate Cox-Analysen wurden mit dem Cox-Regressions-Modell berechnet [135].

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Proteinexpression von HILPDA *in situ*

Für die vorliegende Arbeit wurde ein klinisch und pathologisch gut charakterisiertes Kollektiv von HCC-Patienten mit über 3200 Proben von 561 Patienten mithilfe eines TMA immunhistochemisch untersucht [136]. Bei der Erstellung des 19 Paraffinblöcke umfassenden TMAs wurden neben einem oder mehreren HCCs das umgebende nicht-neoplastische Lebergewebe, HCC-Rezidive, HCC-Metastasen, tumoröse Gefäßeinbrüche und dysplastische Knoten mitgestanzt (für einen weiteren Überblick über die Patientenkohorte vgl. Tab. 16, [136]). Mithilfe eines polyklonalen Antikörpers (*Atlas-Antibodies AB, HPA010515*) wurde HILPDA in den Gewebeproben immunhistochemisch angefärbt, um die klinische und prognostische Relevanz des Proteins in einem repräsentativen HCC-Kollektiv zu untersuchen und die differentielle HILPDA-Proteinexpression in den HCC-Proben mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert. Mittels immunhistochemischer Färbung ließ sich HILPDA im Zytoplasma nachweisen (Abb. 6). Für die semiquantitative Auswertung der HILPDA-Expression wurde der IRS verwendet (vgl. Tab. 19).

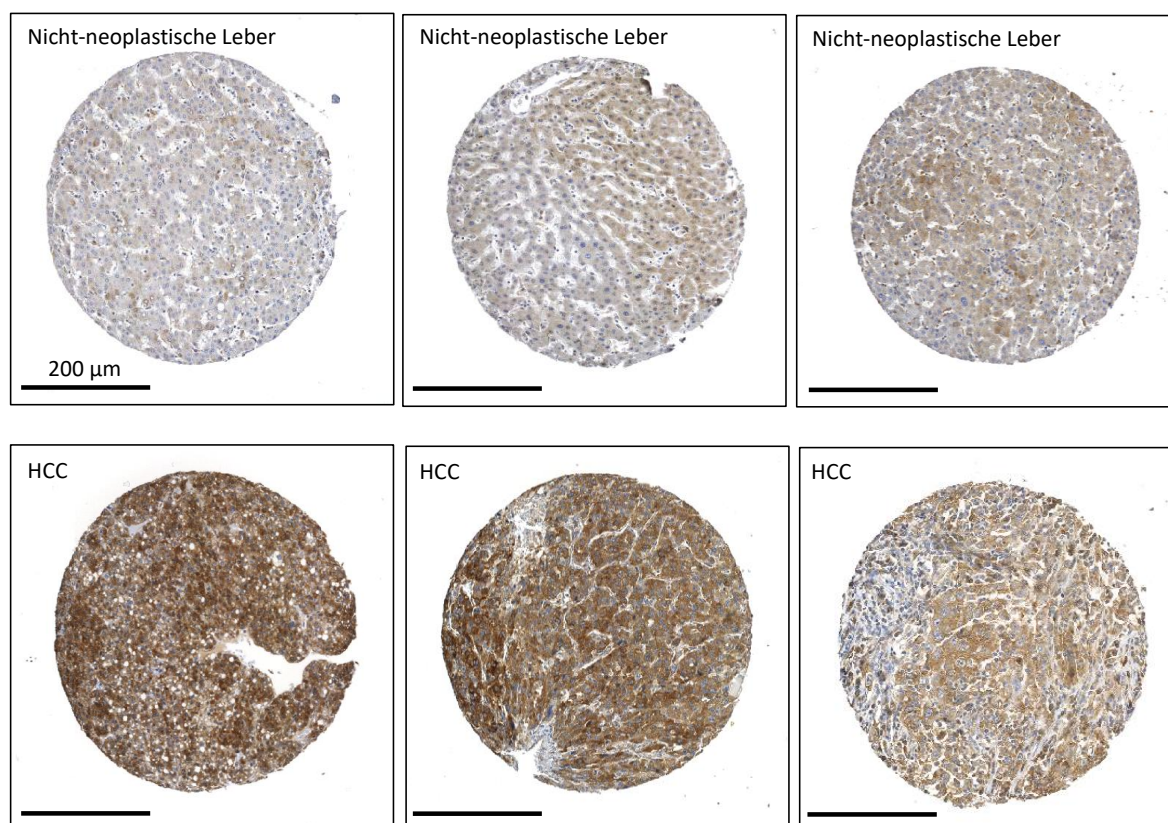


Abbildung 6: HILPDA-Immunhistochemie im TMA mit humanen HCC- und respektiven, nicht-neoplastischen Lebergewebeproben. Gezeigt sind exemplarische Aufnahmen der immunhistochemischen Anfärbung von HILPDA in Stanzungen aus dem Paraffinmaterial verschiedener Patienten der Kohorte.

5% der HCCs zeigten keine HILPDA-Immunreaktivität (IRS = 0), wohingegen 65 % eine schwache (IRS = 1-4), 25 % eine intermediäre (IRS = 5-8) und 5% eine starke (IRS = 9-12) HILPDA-Expression (Methoden, Abb. 5) zeigten. Ein IRS-Wert von 3.21 wurde als Grenzwert zwischen hoher (blau; HILPDA > 3.21) und niedriger (gelb; HILPDA ≤ 3.21) Färbeintensität definiert (vgl. 2.2.1, [133]). Um den Zusammenhang zwischen der Gesamtüberlebenszeit der HCC-Patienten und dem Immunreaktiven Score für HILPDA zu beleuchten, wurde die Überlebenszeit mittels Kaplan-Meier-Verfahren analysiert (Abb. 7). Die mittlere Dauer der Nachbeobachtungszeit belief sich in dieser Kohorte auf 55,2 Monate. Mithilfe Log-rank-Tests konnten die Überlebenszeiten der beiden Gruppen verglichen werden. Die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der HCC-Patienten, welche eine hohe HILPDA-Expression aufwiesen, war signifikant niedriger als die der Patienten mit einer niedrigen HILPDA-Expression ($p = <0.01$). Auch in der unabhängigen Patientenkohorte des „Cancer Genome Atlas“ (TCGA) zeigte sich eine Assoziation von hoher HILPDA-Expression auf mRNA-Ebene mit einer kürzeren Überlebensdauer der Patienten (Abb. 8).

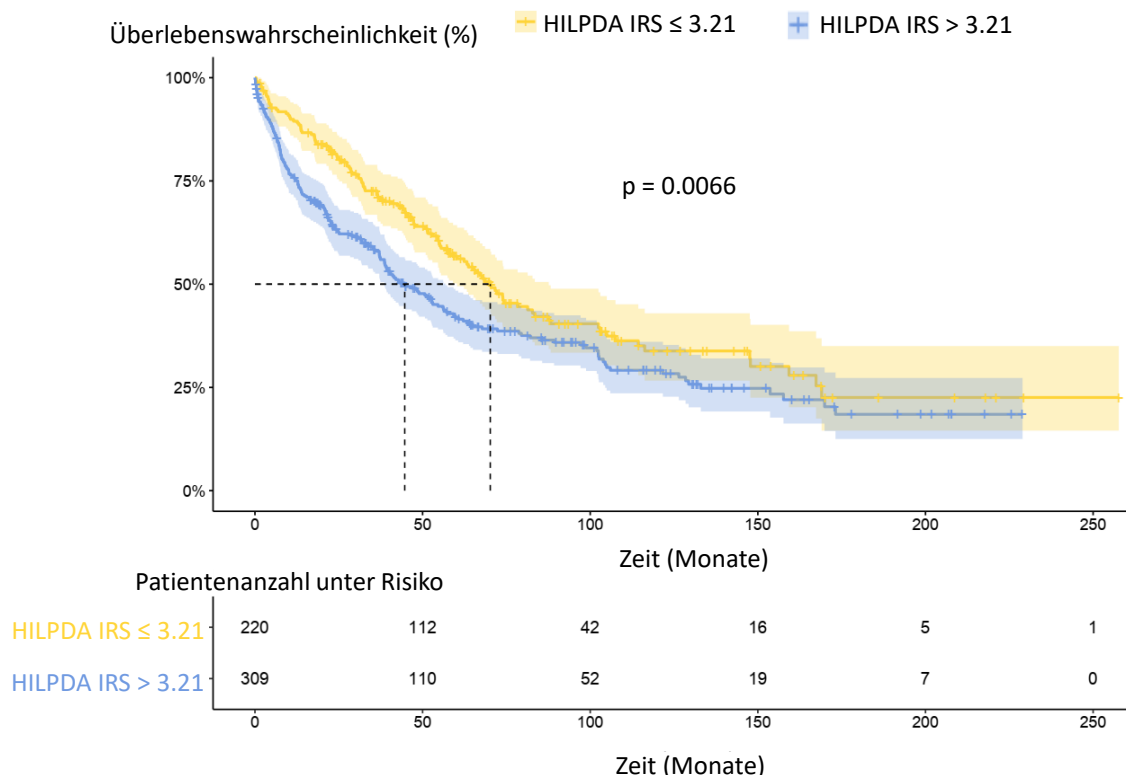


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse der HILPDA-Expression im HCC. Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve in Bezug auf eine hohe (blaue Kurve; IRS > 3.21) bzw. niedrige (gelbe Kurve; IRS ≤ 3.21) HILPDA-Expression im HCC. Eine hohe HILPDA-Expression im HCC ist mit einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert. Aufgetragen ist die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Studienteilnehmer (%) gegen die Überlebenszeit (Monate). Als Startzeitpunkt wurde der Zeitpunkt der

Erstdiagnose und als Ereigniszeitpunkt der Tod der Patienten definiert. HR 1,37; 95%-KI 1,09 bis 1,72; Log-rank 0,0066

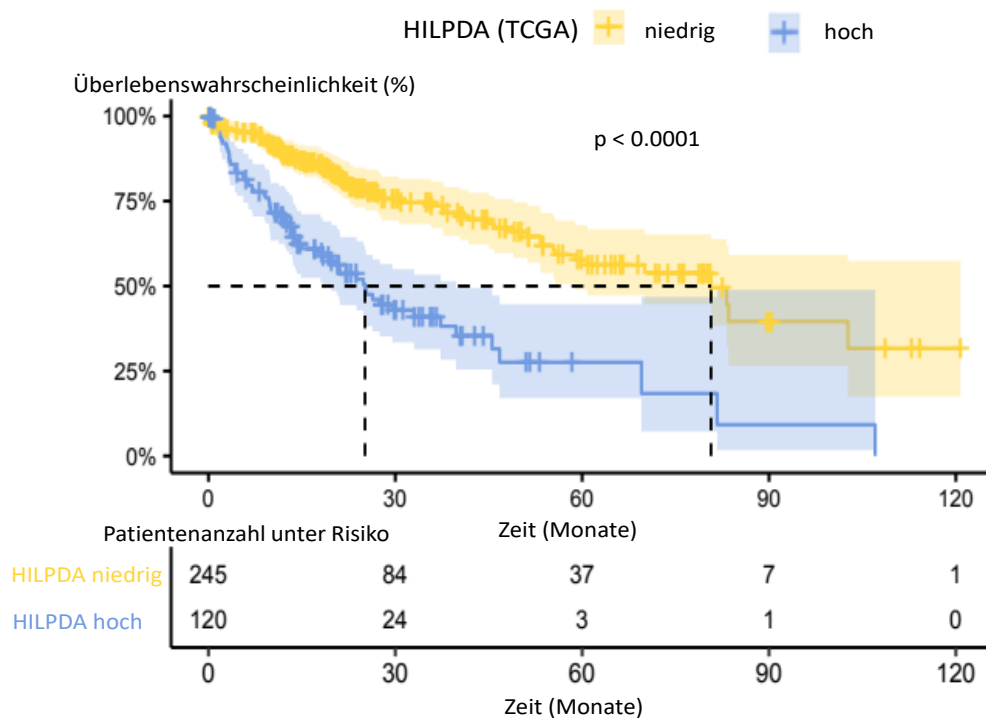


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse der HILPDA-Expression in HCC-Patienten der TCGA-Datenbank. Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve in Bezug auf eine hohe (blaue Kurve) bzw. niedrige (gelbe Kurve) HILPDA-Expression auf mRNA-Ebene im HCC. Eine hohe HILPDA-Expression im HCC ist mit einem kürzerem Gesamtüberleben der HCC-Patienten der TCGA-Datenbank assoziiert. Aufgetragen ist die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Studienteilnehmer (%) gegen die Überlebenszeit (Monate). Log-rank $p < 0.0001$.

Im HCC-Gewebe war eine signifikant höhere HILPDA-Expression im Vergleich zum umgebenden nicht-neoplastischen Lebergewebe nachweisbar (vgl. Abb. 9A). In einer gepaarten Analyse, die sich auf die Fälle beschränkte, für die auch Gewebe von HCC-Rezidiven bzw. HCC-Metastasen verfügbar war, konnte herausgefunden werden, dass die HILPDA-Expression im Rezidiv und in Lymphknotenmetastasen jeweils im Vergleich zum entsprechenden HCC-Primarius signifikant höher war (vgl. Abb. 9B und C). Zudem konnte eine Tendenz zu einer erhöhten HILPDA-Expression in Fernmetastasen im Vergleich zum Primarius nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9D, $p = 0.1$).

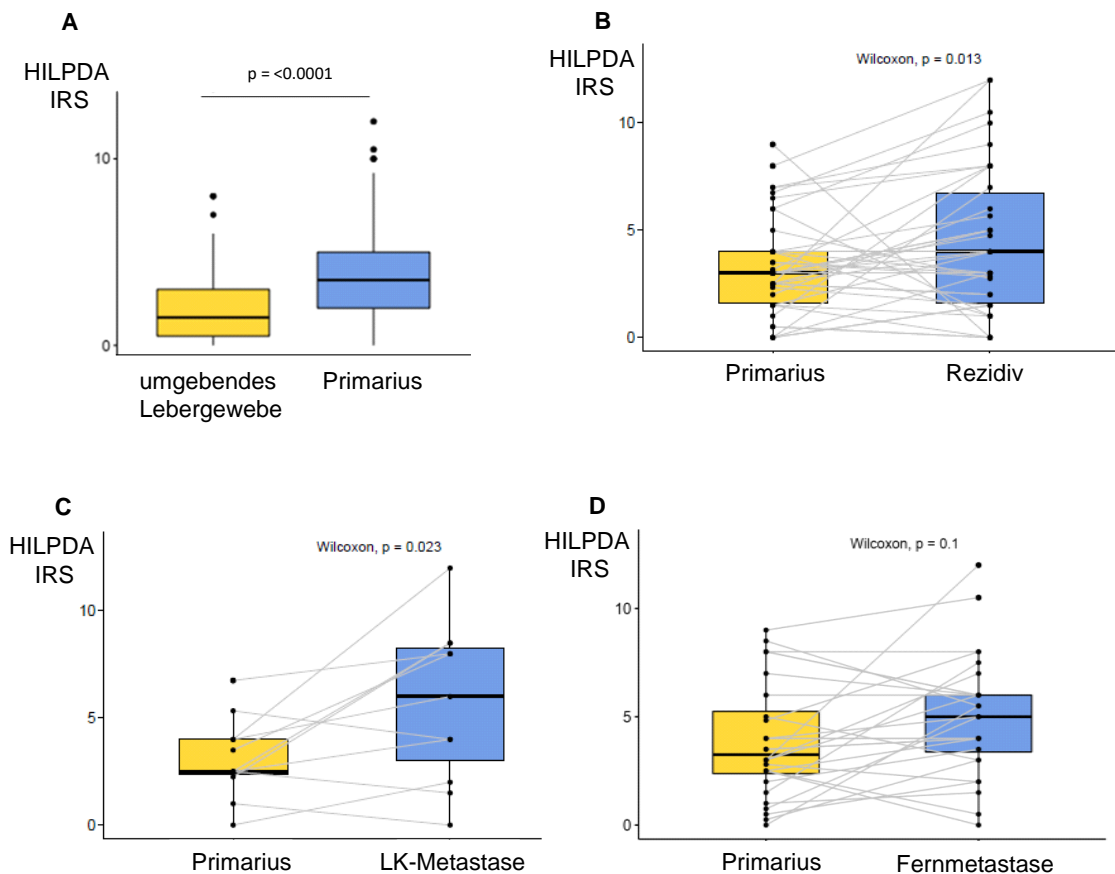


Abbildung 9: Induktion von HILPDA in der Hepatokarzinogenese A) Semi quantitative Analyse der HILPDA-Expression im HCC-Primärtumor (Primarius, n = 529) im Vergleich zum angrenzenden nicht-neoplastischen Lebergewebe (n = 534) mittels Immunhistochemie. HILPDA ist im HCC im Vergleich zum respektiven nicht-neoplastischen Lebergewebe signifikant induziert ($p < 0.0001$, Wilcoxon-Test). B/C/D) Semi quantitative Analyse der HILPDA-Expression von primären HCCs im Vergleich zu HCC-Rezidivtumoren (B), Lymphknotenmetastasen (C) und Fernmetastasen (D). Rezidive und Lymphknotenmetastasen wiesen eine signifikant höhere Expression als der jeweilige Primarius auf (B und C $p < 0.05$, gepaarter Wilcoxon-Test). Fernmetastasen zeigten einen Trend zu höherer Expression im Vergleich zum jeweiligen primären HCC (D, $p = 0.1$, gepaarter Wilcoxon-Test).

Ob bestimmte klinische Parameter einen Einfluss auf die HILPDA-Expression haben, wurde im Folgenden untersucht (vgl. Abb. 10). Sowohl im Primarius als auch im nicht-neoplastischen Lebergewebe konnten keine signifikanten Unterschiede der HILPDA-Expression zwischen Patienten mit und Patienten ohne nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) festgestellt werden (vgl. Abb. 10A/B). Lediglich eine Tendenz zu einer erniedrigten HILPDA-Expression im Lebergewebe von Patienten mit einer NASH war nachzuweisen. Die HILPDA-Expression im HCC-Gewebe und Lebergewebe von HCV-Patienten war signifikant höher als bei Patienten ohne eine HCV-Infektion (vgl. Abb. 10C/D). Hämochromatose-Patienten zeigten im umliegenden Lebergewebe eine niedrigere HILPDA-Expression (vgl. Abb. 10E). Vorerkrankungen wie Leberzirrhose oder Diabetes mellitus, sowie andere potenzielle Einflussfaktoren

wie das Geschlecht, der BCLC-Status oder Alkohol- und Nikotinabusus hatten keine Auswirkung auf die HILPDA-Expression im HCC-Gewebe.

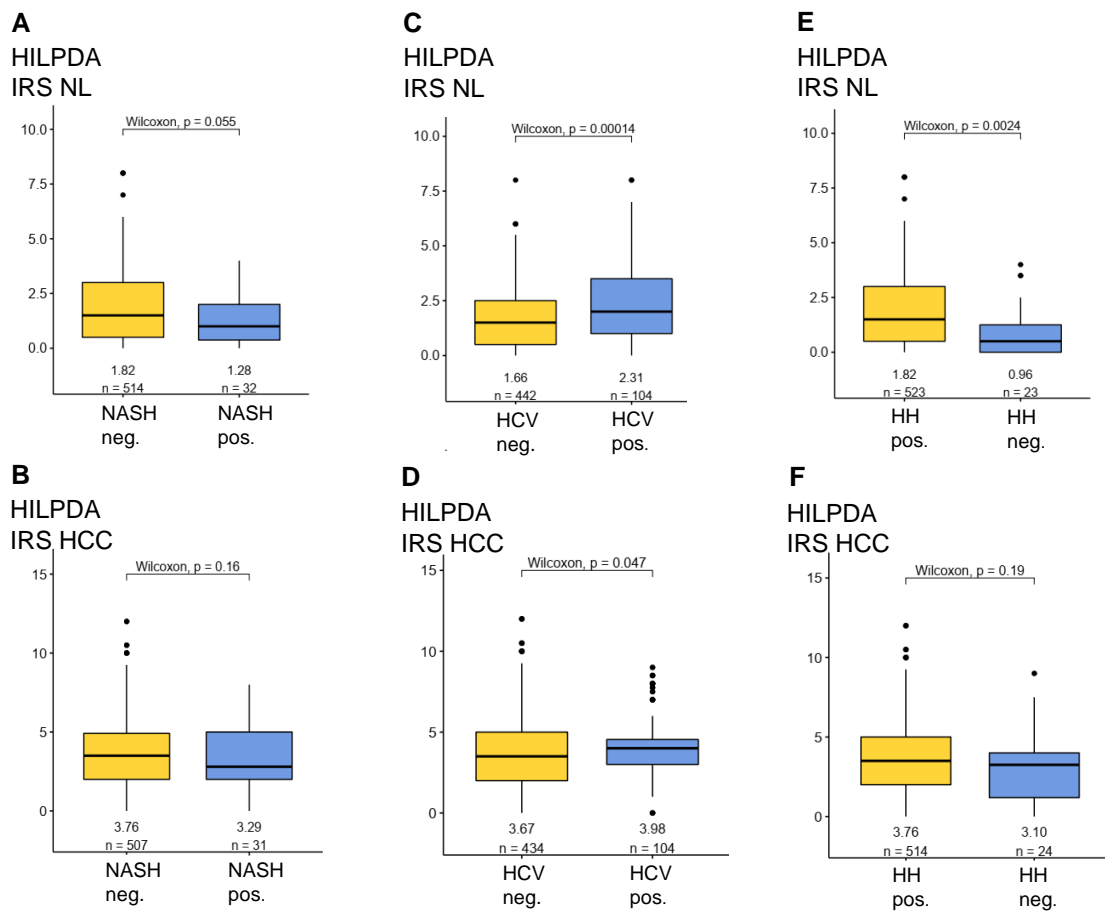


Abbildung 10: Assoziation von chronischen Lebererkrankungen mit der HILPDA-Expression. Semiquantitative Analyse der HILPDA-Expression in primären HCCs und im angrenzenden nicht-neoplastischen Lebergewebe (NL) in Bezug auf das Vorliegen unterschiedlicher chronischer Lebererkrankungen (Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH; A/B), Infektion mit Hepatitis-C-Virus (HCV; C/D) hereditäre Hämochromatose (HH, E/F)). Die entsprechenden Fallzahlen (n), der verwendete statistische Test und der entsprechende p-Wert sind in den einzelnen Abbildungen dargestellt.

Die HILPDA-Expression im HCC-Gewebe wurde nun unter dem Aspekt prognostisch relevanter pathologischer Kriterien untersucht (vgl. Abb. 11). Eine hohe Expression des Enzyms Glutaminsynthetase, einem Surrogatmarker für eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs, ging mit einem signifikant niedrigeren Immunreaktiven HILPDA-Score einher (A, $p \leq 0.01$). Passend dazu konnte auch in der TCGA-Kohorte auf mRNA-Ebene eine erhöhte HILPDA-Expression in TP53- mutierten HCCs, sowie eine erniedrigte HILPDA-Expression in CTNNB1-mutierten HCCs gefunden werden (vgl. Abb. 12). Schlecht differenzierte HCCs (G3) wiesen im Vergleich zu gut (G1) und mäßig (G2) differenzierten HCCs eine signifikant höhere HILPDA-Expression auf (B, $p \leq 0.001$).

Auch Tumoren mit einer mikro- (V1) oder makroskopischen (V2) Gefäßinvasion zeigten eine signifikant höhere HILPDA-Expression (C, $p \leq 0.01$).

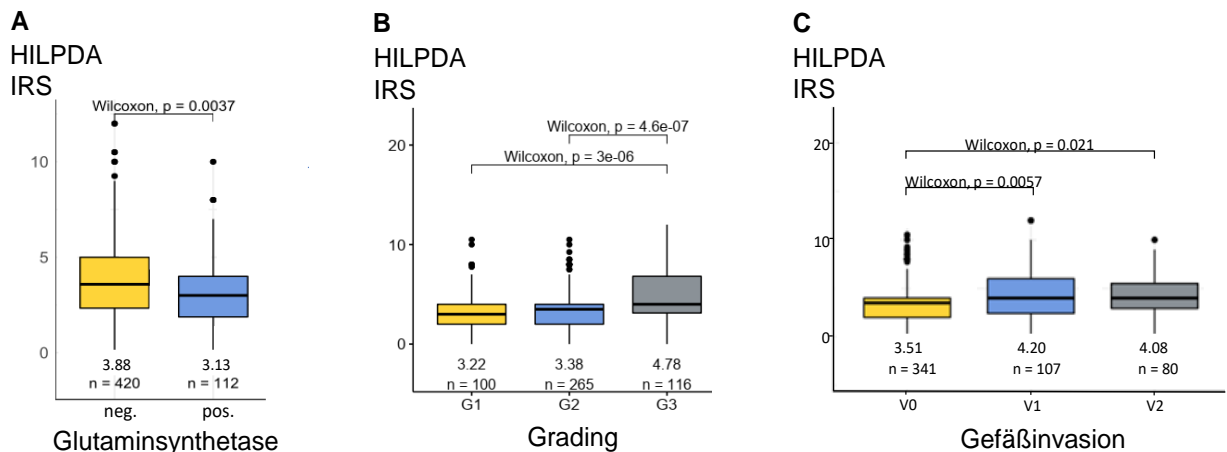


Abbildung 11: Assoziation von pathologisch relevanten Kriterien mit der HILPDA Expression. Eine hohe HILPDA-Expression geht im HCC mit einer niedrigeren Glutaminsynthetase-Expression (A), einem höheren Tumorgrading (B) und dem Auftreten einer Gefäßinvasion (C) einher. A) Quantitative Analyse der HILPDA-Expression in Relation zur Glutaminsynthetase-Überexpression (GS neg.: $n = 420$, pos.: $n = 112$). B) Quantifizierung der HILPDA-Expression in HCCs verschiedener Tumorgradings (G1: $n = 100$, G2: $n = 265$, G3: $n = 116$). C) Quantifizierung der HILPDA-Expression in Bezug zur Gefäßinvasion (V0: $n = 341$, V1: $n = 107$, V2: $n = 80$).

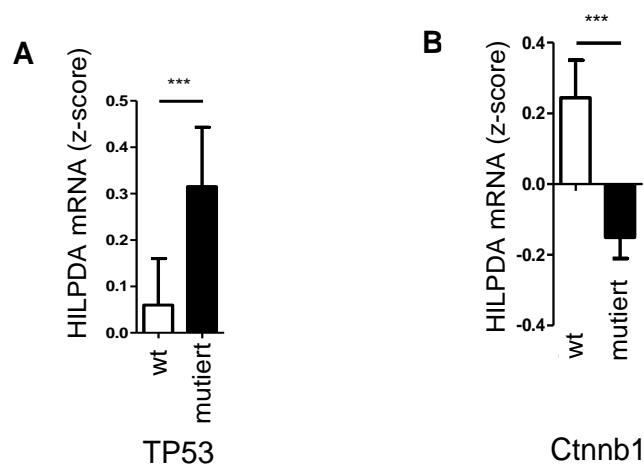


Abbildung 12: HCCs mit TP53-Mutation zeigen eine erhöhte und HCCs mit CTNNB1-Mutation eine niedrigere HILPDA-Expression in der TCGA-Kohorte. Analyse der HILPDA-mRNA-Expression im HCC-Gewebe der TCGA-Kohorte im Zusammenhang mit TP53 und CTNNB1-Mutationen im Vergleich zu HCCs mit dem jeweiligen Wildtyp-Allel (wt). ($p < 0.001$, Wilcoxon-Test).

3.2 Nachweis von HILPDA *in vitro*

Um HILPDA *in vitro* zu untersuchen, war es eine notwendige Voraussetzung, einen HILPDA-Antikörper zu identifizieren, welcher zuverlässig das zu erforschende Protein binden konnte. Zur Validierung der verschiedenen HILPDA-Antikörper wurden Immunblot-Analysen durchgeführt. Zum Nachweis von endogenem HILPDA *in vivo*,

wurden Lysate aus nicht-neoplastischem Leber-, HCC- und HCA-Gewebe hergestellt. Der polyklonale HILPDA-Antikörper von *Atlas-Antibodies AB (HPA010515)* wurde verwendet, der ebenfalls für die immunhistochemischen Färbungen der TMAs eingesetzt worden war. Im Immunblot konnte jedoch keine Proteinbande mit dem erwarteten Molekulargewicht (~7 kDa) detektiert werden (vgl. Abb. 13A). Parallel dazu wurden Huh7- und Hek293T-Zellen mit einem neu kreierte HILPDA-FLAG-Plasmid transfiziert und Zelllysate gewonnen. Durch transiente Transfektion wurde das FLAG-markierte HILPDA-Protein in den Zellkulturlinien exprimiert und bei 10 kDa *in vitro* nachgewiesen (vgl. Abb. 13B). Auch eine vierstündige Hypoxie führte in Zellkultur nicht zu einer im Immunblot nachweisbaren Induktion des endogenen HILPDA-Proteins.

Um einen zweiten, monoklonalen HILPDA-Antikörper (*Santa Cruz Biotechnology, G2 Sc-376704*) zu validieren, wurden Gewebeschnitte immunhistochemisch mit beiden Antikörpern gefärbt, sowie vergleichende Immunblot-Analysen unternommen. Es zeigte sich sowohl im Immunblot als auch in der Immunhistochemie, dass beide Antikörper das Protein HILPDA spezifisch binden, weshalb die folgenden Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper (*G2 Sc-376704*) angestellt werden konnten (vgl. Abb. 13C und D).

Neben dem bereits erwähnten HILPDA-FLAG-Plasmid wurde ein weiteres Plasmid konstruiert, pcDNA-HILPDA-EGFP, zur fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle. Beide Plasmide regulierten durch transiente Transfektion in Huh7-Zellen die HILPDA-Expression hoch und konnten das Expressionsprodukt mithilfe des monoklonalen Antikörpers bei 10kDa (HILPDA-FLAG) bzw. bei 35kDa (HILPDA-EGFP) spezifisch nachweisen (vgl. Abb. 13E und F).

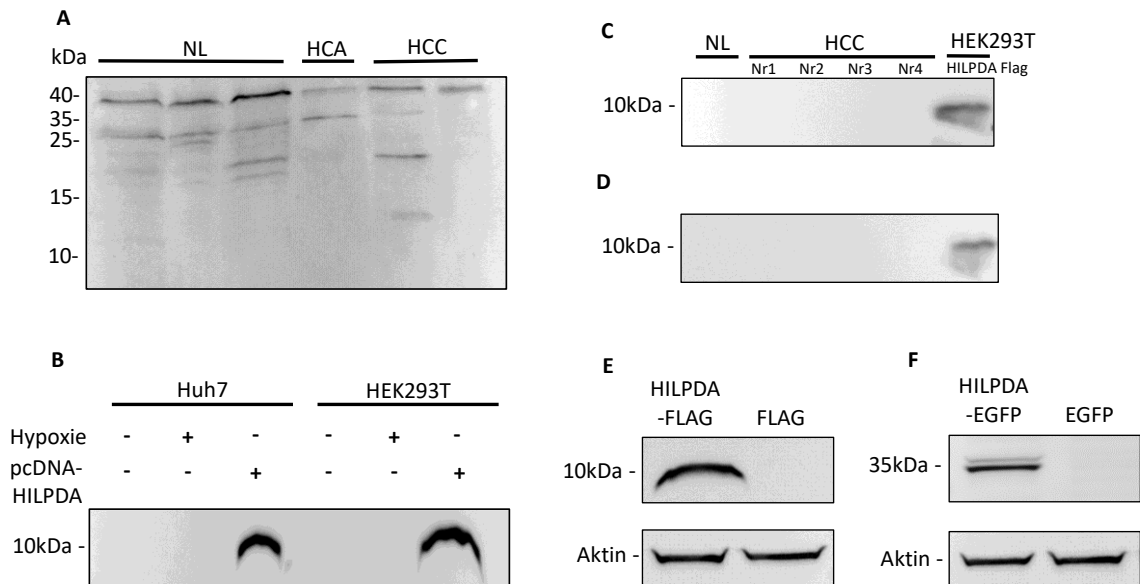


Abbildung 13 HILPDA-Detektion mittels Immunblot.

A) Immunblotanalyse von HILPDA (polyklonaler AK, Atlas-Antibodies AB, HPA010515 (1:2000)) in nicht-neoplastischem Lebergewebe (NL), in einem Hepatozellulärem Adenom (HCA) und Hepatozellulären Karzinomen (HCC). 75 µg Proteinlysate wurden auf ein 18%iges SDS-Gel geladen. B) Immunblotanalyse von HILPDA (monoklonaler Antikörper) in 4 h unter Normoxie oder Hypoxie kultivierten Huh7- und HEK293T-Zellen, sowie mit pcDNA-HILPDA-FLAG transfizierten Huh7- und HEK293T-Zellen. 40 µg Proteinlysate wurden auf ein Tris-Tricin Gel geladen. C/D) Immunblotanalyse von HILPDA (C: polyklonaler AK, Atlas-Antibodies AB, HPA010515 (1:1500) und D: monoklonaler AK, Santa Cruz Biotechnology, G2 Sc-376704 (1:1000)) in nicht-neoplastischem Lebergewebe, vier verschiedenen HCC-Proben, sowie einer Probe mit pcDNA-HILPDA-FLAG transfizierten HEK293T-Zellen. Es wurde 30 µg Proteinlysate auf ein Tris-Tricin-Gel geladen. E/F) Immunblotanalyse von HILPDA (monoklonaler Antikörper) in mit pcDNA-HILPDA-FLAG und pcDNA-FLAG (E) bzw. pcDNA-HILPDA-EGFP und pcDNA-EGFP (F) transfizierten Huh7 Zellen (50 µg Proteinlysate Tris-Tricin-Gel). Aktin diente als Ladekontrolle.

Um das Expressionsniveau von HILPDA auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden 14 HCC-Proben und 15 Proben respektives nicht-neoplastisches Lebergewebes verwendet. Die mRNA-Expression von HILPDA im HCC wies größere Schwankungen auf als die mRNA-Expression im Lebergewebe. Um einen statistischen Vergleich zu ziehen, wurde ein Mittelwert aus den mRNA-Expressionsdaten der Einzelproben eines Gewebetyps genommen (Abb. 14). Es zeigte sich ein starker Trend zu einer höheren Expression von HILPDA auf mRNA-Ebene in den HCC-Proben im Vergleich zum umliegenden nicht-neoplastischen Lebergewebe, wenngleich das Signifikanzniveau von <0.05 nicht erreicht wurde.

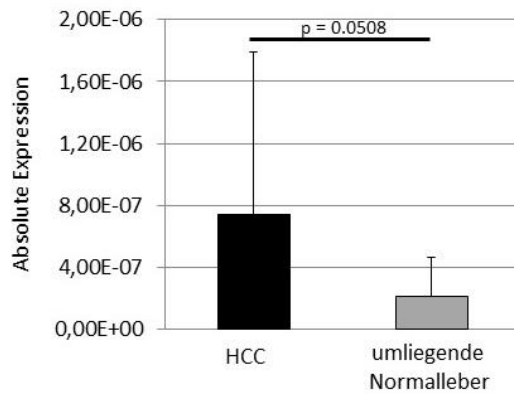


Abbildung 14: HILPDA-mRNA weist eine Tendenz zu höherer Expression in HCC-Proben im Vergleich zum umliegenden nicht-neoplastischen Lebergewebe auf. Semiquantitative real-time PCR der HILPDA-mRNA in humanen HCC-Proben (n = 14), sowie den dazugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe (n = 15). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den absoluten. Die Messung der einzelnen Proben erfolgte jeweils in Triplikaten.

Um zu untersuchen, ob in den Proben ein hohes Expressionsniveau auf mRNA-Ebene mit einer hohen HILPDA-Proteinkonzentration korrelierte, wurden Immunblot-Untersuchungen angestellt. Die HCC-Proben mit dem höchsten Expressionsniveau von HILPDA auf mRNA-Ebene wurden mit verschiedenen Protokollen einer denaturierenden Lyse mit Harnstoff- und Lämmli-Puffer ausgetestet (*siehe 2.2.4.2*). Trotz Variation der Aufbereitung ließ sich endogenes HILPDA-Protein im Immunblot nicht nachweisen.

3.3 Induktion von HILPDA durch Hypoxie

Die Steuerung der HILPDA-Expression unterliegt unterschiedlichen Mechanismen, darunter im Rahmen einer Hypoxie [94]. Im HCC-Kollektiv der TCGA-Patientenkohorte ließ sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der HILPDA-mRNA im HCC und dem Winter Hypoxie-Score, der auf der Expression verschiedener Hypoxie-regulierter Gene basiert, feststellen [137] (vgl. Abb. 15A). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun zu zeigen, dass durch ein hypoxisches Milieu die HILPDA-Expression in den HCC-Zelllinien Huh7 und HepG2 induziert werden kann. Dafür wurden Huh7- und HepG2-Zellen in einem Inkubator mit einem Sauerstoffgehalt von 1 % kultiviert und mittels Immunblot HIF1 α , der wichtigste Marker für Hypoxie und Faktor bei der hypoxievermittelten Induktion von HILPDA analysiert. Im Immunblot ließ sich in den unter Hypoxie kultivierten Zellproben HIF1 α auf der Höhe von 130 kDa nachweisen, jedoch wurde das Expressionsmaximum von HIF1 α in HepG2- und Huh7-

Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht (vgl. Abb. 15B). HepG2- und Huh7-Zellen wurden für 25 h in hypoxischem Milieu kultiviert, jedoch war sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie HILPDA mit Immunblot nicht nachweisbar (vgl. Abb. 15C). Auch mittels Immunopräzipitation mit einem anti-HILPDA-Antikörper konnte HILPDA nicht angereichert und damit nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15D).

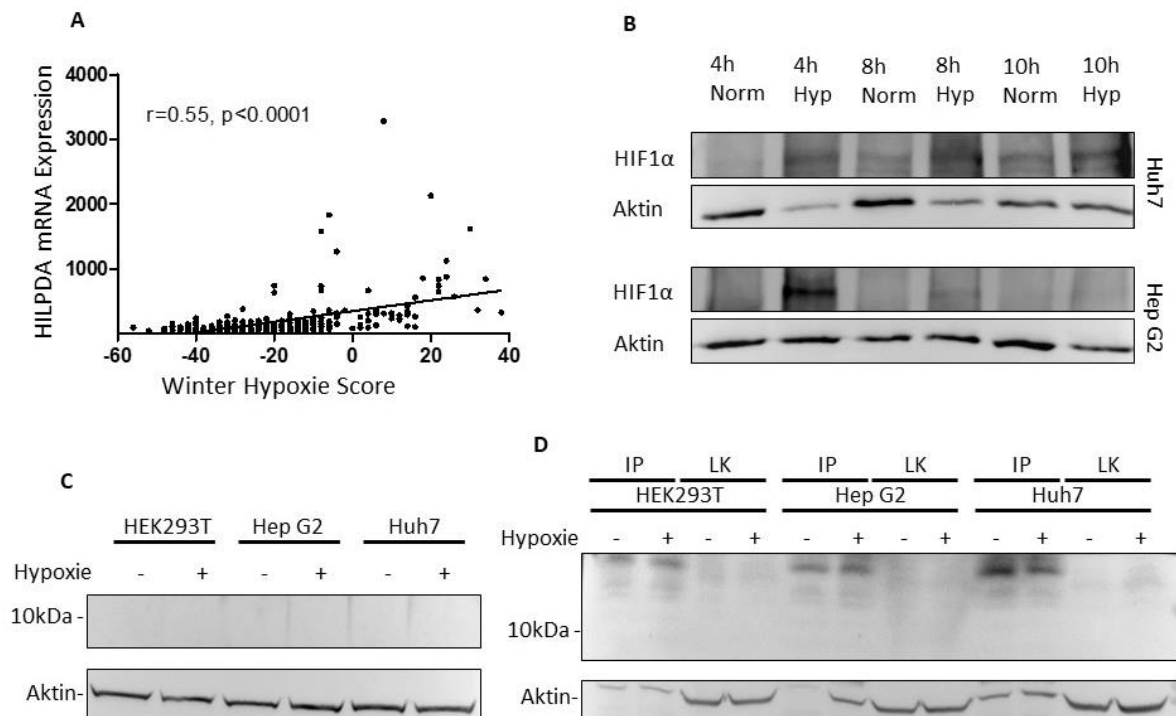


Abbildung 15: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der HILPDA-Expression und Hypoxie in HepG2-, HEK293T- und Huh7-Zellen

A) Streudiagramm des Winter Hypoxie Scores (x-Achse) und der HILPDA mRNA-Expression (y-Achse) in HCCs des TCGA-Kollektivs ($r = 0.55, p < 0.0001$). B) Immunblotanalyse von HIF1 α (Antikörper ab51608) in für 4 h, 8 h und 10 h bei Normalsauerstoffgehalt von 21 % (Norm) oder in einem hypoxischen Milieu mit 1 % Sauerstoffgehalt (Hyp) kultivierten Huh7- und HepG2-Zellen. Jeweils 30 μ g Proteinlysate wurde auf Tris-Tricin Gele geladen. C) Immunblotanalyse von HILPDA (monoklonaler AK, Santa Cruz Biotechnology, G2 Sc-376704) in HEK293T-, HepG2- und Huh7-Zellen, welche für 25h bei Normalsauerstoffgehalt von 21 % (-) oder in einem hypoxischem Milieu bei 1 % Sauerstoffgehalt (+) kultiviert wurden. Es wurde jeweils 40 μ g Proteinlysate auf ein Tris-Tricin Gel geladen. D) Immunblotanalyse von HILPDA (monoklonaler AK, Santa Cruz Biotechnology, G2 Sc-376704) in HEK293T-, HepG2- und Huh7-Zellen, welche für 25 h bei Normalsauerstoffgehalt von 21 % (-) oder in einem hypoxischem Milieu mit 1 % Sauerstoffgehalt (+) kultiviert wurden. Durch Co-Immunpräzipitation (IP) wurde HILPDA mithilfe eines spezifischen Antikörpers aus den Zellysaten angereichert und auf ein Tris-Tricin Gel geladen. Als Kontrolle (LK) diente 10 % der für die IP eingesetzten Proteinmenge (50 μ g des Lysats). Aktin diente jeweils (B, C, D) als Ladekontrolle

Da mittels Immunblot-Analysen keine Induktion von HILPDA durch Hypoxie nachweisbar war, wurde das HILPDA-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer *real-time* PCR untersucht. Um herauszufinden zu welchem Zeitpunkt die Induktion maximal war, wurden Huh7- und HepG2-Zellen für 21h, 24h und 27h bei 1% Sauerstoffgehalt inkubiert. Das Induktionsmaximum für HILPDA lag für HepG2-

und Huh7-Zellen bei 27 h unter hypoxischen Bedingungen. In HepG2-Zellen vervielfachte sich die HILPDA-mRNA Konzentration um den Faktor 3 und in Huh7-Zellen um den Faktor 5 im Vergleich zu Kontrollzellen. Das Ergebnis wurde in HepG2- und Huh7-Zellproben in Triplikaten für 27 h unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen validiert (vgl. Abb. 16). Die Zellen zeigten unter hypoxischen Kulturbedingungen in Vergleich zu Normoxie ein signifikant höheres HILPDA-mRNA-Expressionsniveau.

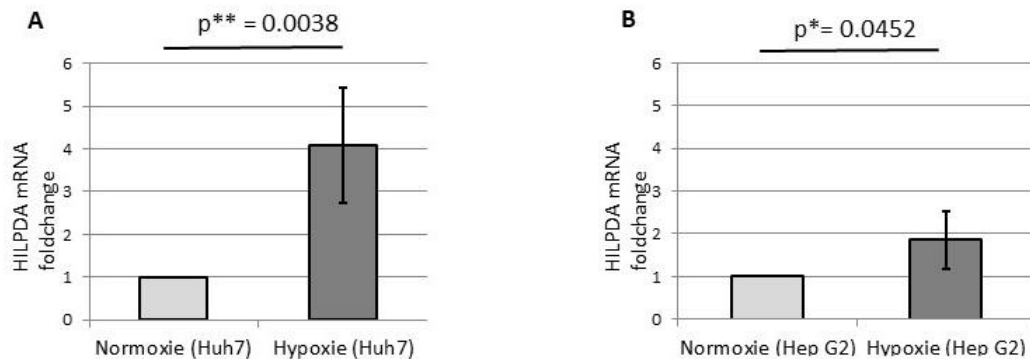


Abbildung 16: Semiquantitative real-time PCR von HILPDA auf mRNA-Ebene in Zellen der Linien Huh7 (A) sowie HepG2 (B) unter Hypoxie-Bedingungen im Vergleich zu zur Kultivierung unter Normoxie-Bedingungen. Die relative Änderung (foldchange) der HILPDA mRNA-Menge unter Hypoxie (1 % O₂) im Verhältnis zur Kultivierung unter Normoxie (21 % O₂). Die Zellen wurden in Triplikaten für 27 h kultiviert in Triplikaten gemessen. t-Test, ** p<0,001, * p<0.05

Um den Einfluss von Sauerstoffmangel auf die Morphologie hepatozellulärer Zellen zu veranschaulichen, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen nach 24h sowie 48h bei 1% Sauerstoffgehalt im Vergleich zu 21% Sauerstoff angefertigt. Die Zellen der Linien Huh7 und HepG2 zeigten unter Hypoxie eine geminderte Zelldichte im Vergleich zu Kontrollzellen bei Normoxie. Nach 48h adhärten keine vitalen Huh7-Zellen mehr auf der Platte (vgl. Abb. 17 und 18).

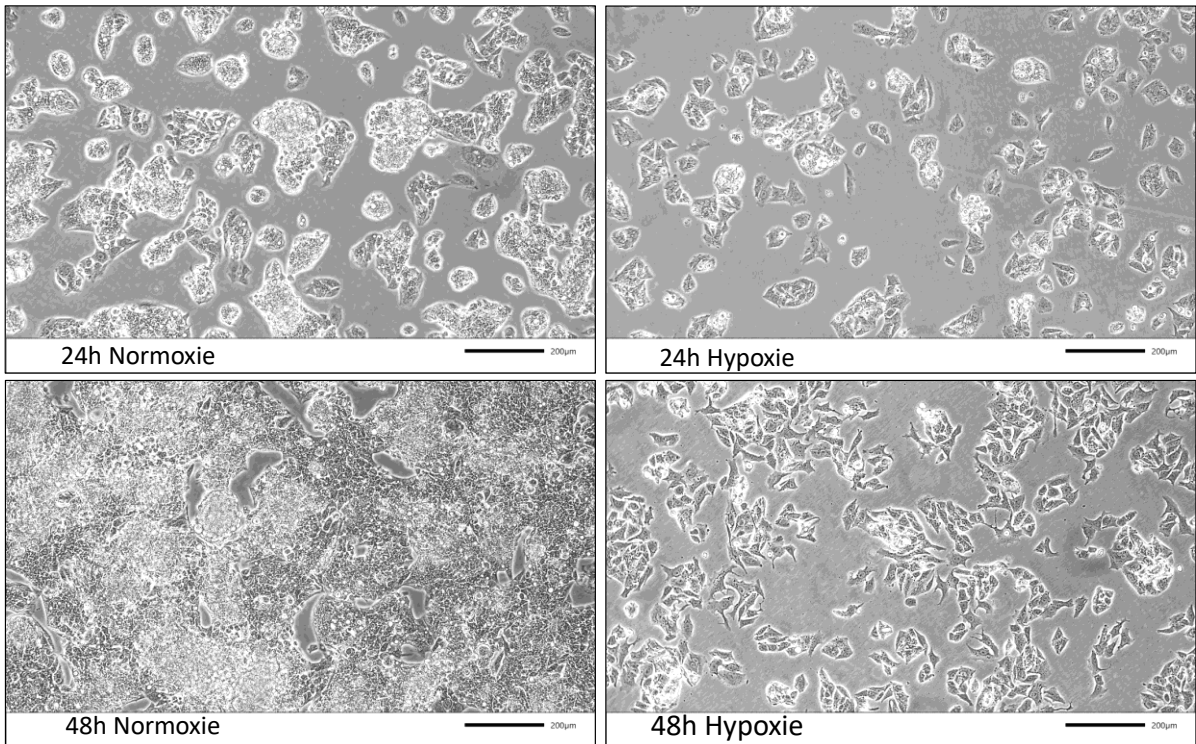


Abbildung 17: Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie von Zellen der Linie HepG2. Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von HepG2-Zellen nach Kultivierung für 24 h und 48 h bei einem normalen Sauerstoffgehalt von 21 % (Normoxie), sowie bei einem Sauerstoffgehalt von 1 % (Hypoxie). Maßstab: 200 µm.

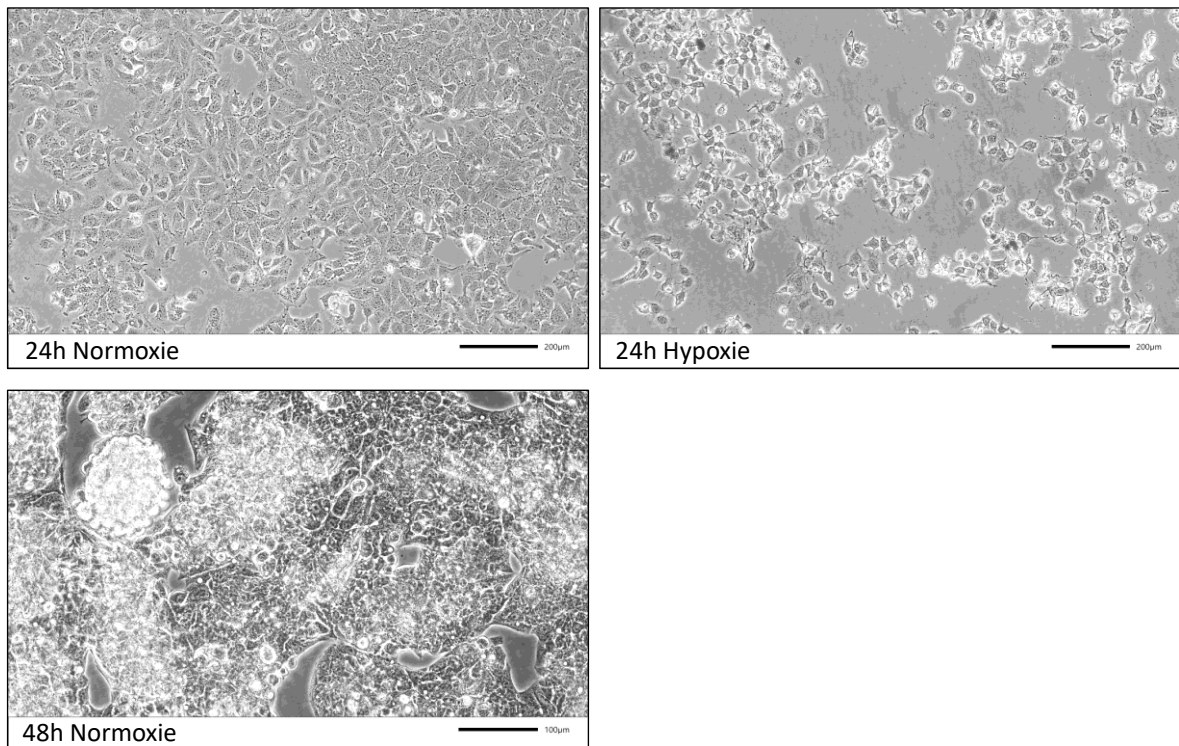


Abbildung 18: Einfluss von Hypoxie auf die Morphologie von Zellen der Linie Huh7. Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von Huh7-Zellen nach Kultivierung bei Normalsauerstoffgehalt von 21 % (Normoxie), sowie bei einem Sauerstoffgehalt von 1 % (Hypoxie) für 24 h und 48 h. Nach 48 h unter Hypoxie lösten sich die Huh7-Zellen von der Platte ab. Maßstab: 200µm.

3.4 Lokalisation von HILPDA *in vivo* und *in vitro*

HILPDA lokalisiert vor allem an Lipidtropfen in Adipozyten, Hepatozyten sowie Zellen der Linie HeLa [94, 97–99]. Um die Lokalisation von HILPDA in Zellen der Linien Huh7, HEK293T und HepG2 zu visualisieren, wurde das Protein mittels Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie sichtbar gemacht. Dafür wurde anhand der Zelllinie Hek293T, welche sich besonders effizient transfizieren ließ, die Bedingungen der Färbemethode optimiert. Im Anschluss wurden die humanen HCC-Zell-Linien Huh7 und HepG2 verwendet. Mithilfe eines HILPDA-GFP-Plasmids wurde eine transiente Überexpression erreicht. HILPDA-GFP war hierbei an Lipidtropfen angelagert und zusätzlich im Zytoplasma nachweisbar (vgl. Abb. 19).

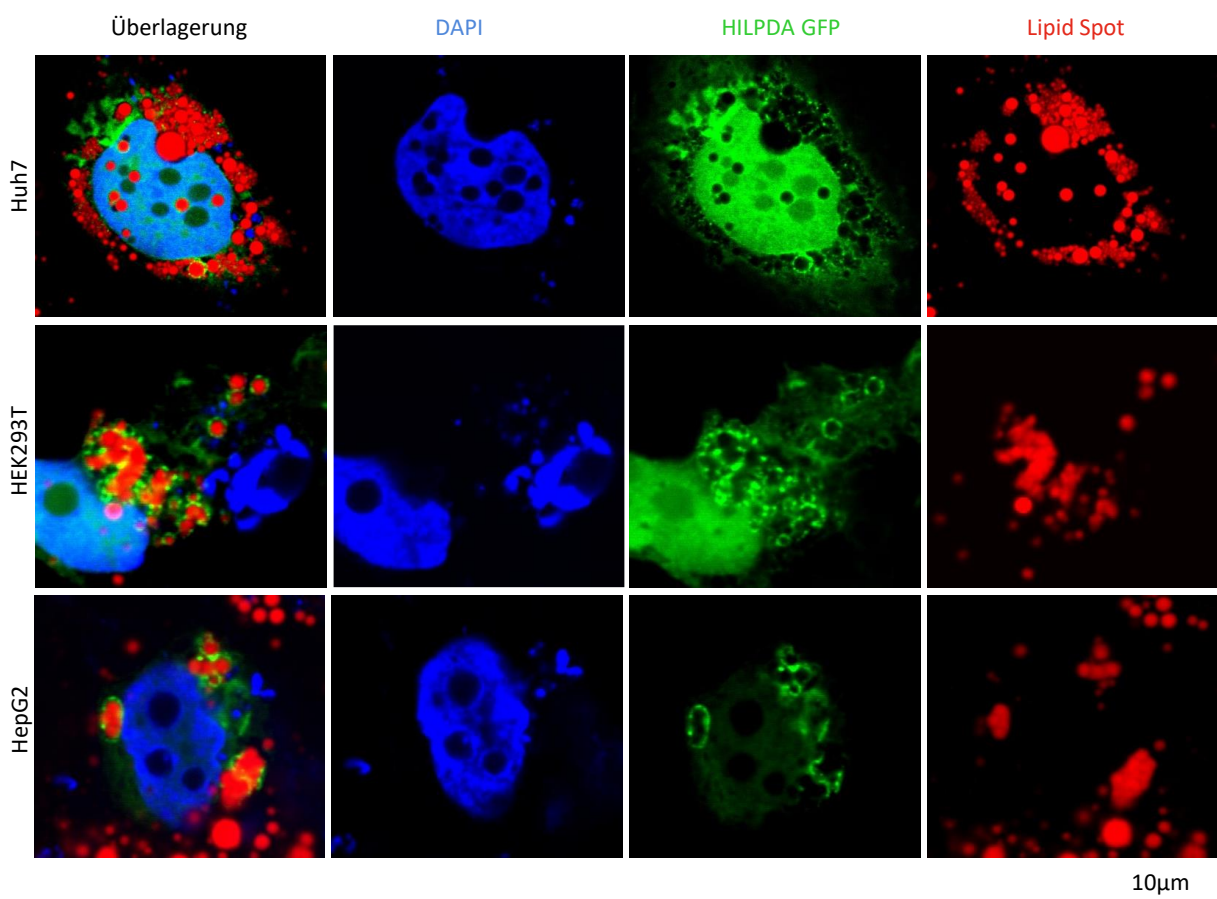


Abbildung 19: Konfokale Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskopie der HILPDA-GFP-Überexpressionskonstrukte und von Lipidtropfen in Zellen der Linien Huh7, HEK293T und HepG2. (DAPI: Zellkerne; Lipid Spot: grün, Lipidtropfen HILPDA: grün (Alexa Fluor 546)). Maßstab: 10 μm.

Um endogenes HILPDA immunhistochemisch anzufärben, wurden Zellblöcke hergestellt. In HepG2-Zellen schien die Konzentration an endogenem HILPDA höher zu sein als in den Huh7- und HEK293T-Zellen. HILPDA wies in HepG2-Zellen ein

zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf. Der Gehalt an endogenem HILPDA schien zwischen den einzelnen Zellen zu variieren (vgl. Abb. 20).

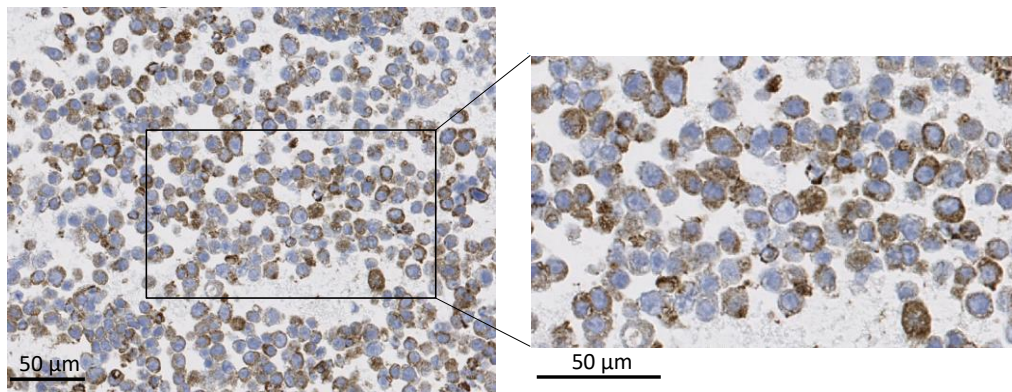


Abbildung 20: Immunhistochemie von endogenem HILPDA in Zellen der Linie HepG2. monoklonaler Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, G2 Sc-376704) 1:150, bei pH 6, Herstellung von Formalin-fixierten-Paraffin-eingebetteten Zellpellets. Maßstab: 50 µm.

Da die Lokalisation von überexprimierten und getaggten Proteinen in Zellkultur nicht der Lokalisation endogener Proteine entsprechen muss, da durch die Transfektion die Verteilung in der Zelle beeinflusst werden könnte, wurde das Verteilungsmuster des endogen vorkommenden HILPDA im humanen HCC-Gewebe mittels IF untersucht. Um HILPDA auch *in vivo* zu lokalisieren, wurden Kryogewebeschnitte von HCCs hergestellt, die auf mRNA-Ebene einen hohen HILPDA-Gehalt aufgewiesen hatten hergestellt. Hierbei wurden verschiedene Fixier- und Permeabilisierungsschritte getestet. Endogenes HILPDA war zytoplasmatischen, sowie ein intensiviertes HILPDA-Signal um Lipidtropfen verschiedener Größe nachweisbar (vgl. Abb. 21).

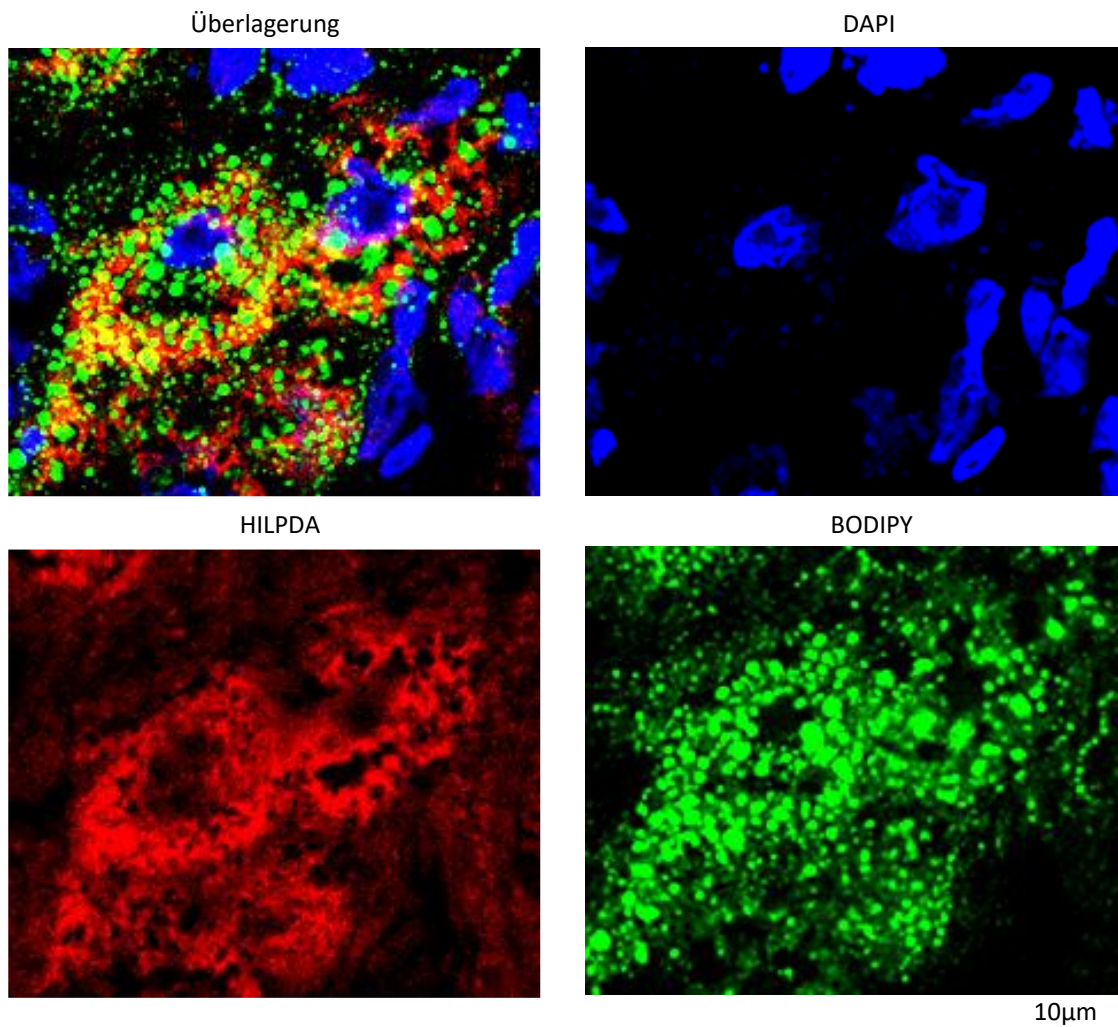


Abbildung 21: Konfokale Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskopie von endogenem HILPDA und Lipidtropfen im humanen HCC-Gewebe. Das Gewebe wurde mit 3,7%ige Formaldehydlösung fixiert (Protokoll 1) und anschließend mit einer Lösung aus 10 % Serum / 0,1 % Triton permeabilisiert (Protokoll 1 (2.2.1.2.)). (DAPI: Zellkerne; BODIPY: grün, Lipidtropfen; HILPDA: rot (Alexa Fluor 635)). Maßstab: 10µm.

Da HILPDA nicht ausschließlich an Lipidtropfen assoziiert, wurden weitere Kolokalisationsstudien durchgeführt. Hierbei wurde mittels Mehrfach-Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, inwieweit HILPDA mit Mitochondrien kolokalisiert, jedoch war keine Kolokalisation mit mitochondrialen Markern (Mito View) nachweisbar (vgl. Abb. 22).

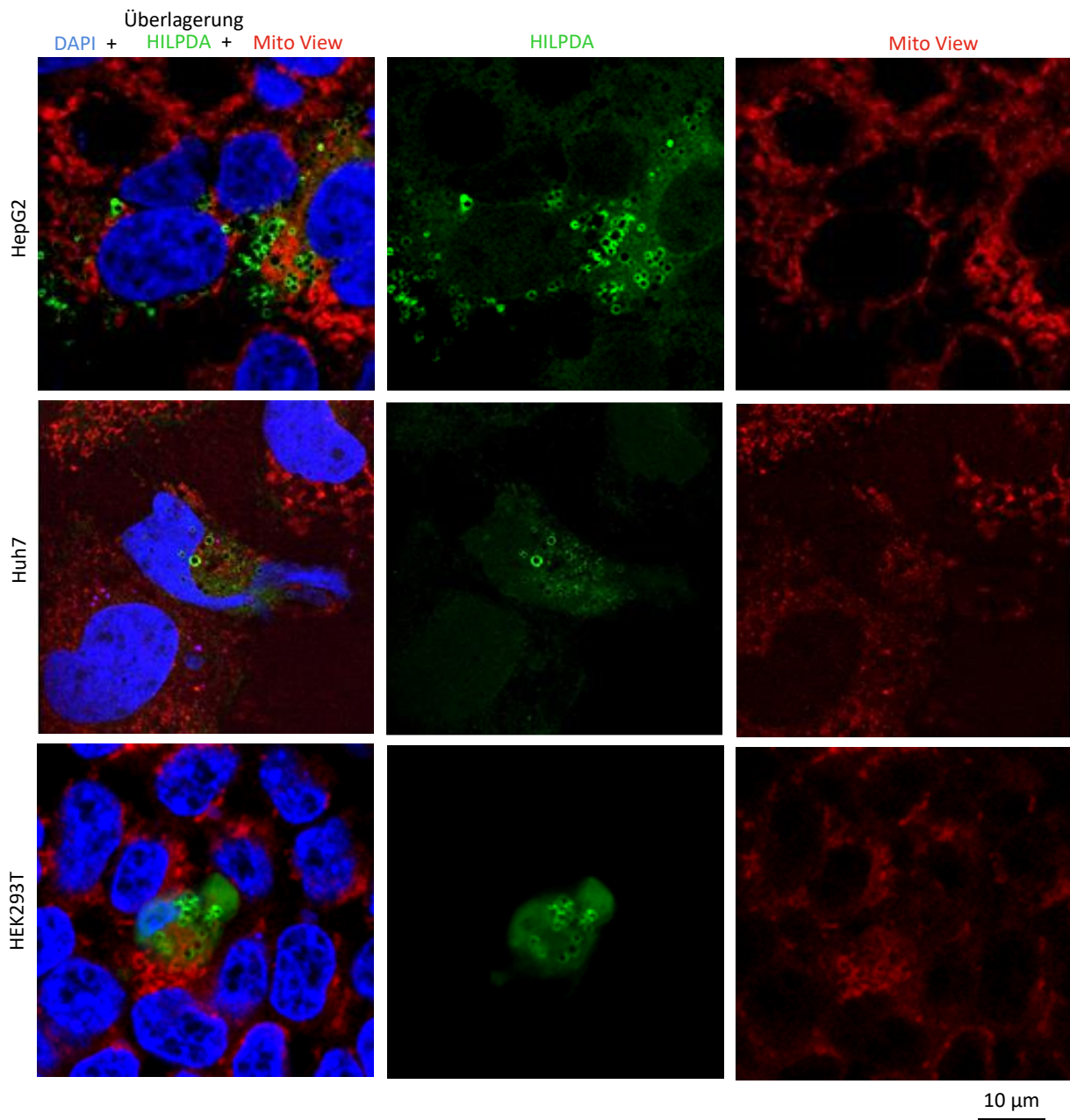


Abbildung 22: Konfokale Laserscanning-Immunfluoreszenzmikroskopie von HILPDA und Mitochondrien nach Überexpression von HILPDA-FLAG in Zellen der Linien Huh7, HEK293T und HepG2. Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie nach Überexpression von HILPDA-FLAG in Huh7-, HEK293T- und HepG2-Zellen (DAPI: Zellkernen; Mito View: rot, Mitochondrien; HILPDA: grün (Alexa Fluor 488)). Maßstab: 10 µm.

Zudem wurde in HCC-Gewebe HILPDA mit dem in Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommende Zytoskelettprotein Vimentin angefärbt, um herauszufinden, in welchem Zelltyp HILPDA vorkommt. HILPDA war nicht in Vimentin-positiven Zellen erhöht und entsprechend in Vimentin-negativen Karzinomzellen exprimiert (vgl. Abb. 23).

Um die Interaktion von HILPDA mit Lipidtropfen-assoziierten Proteinen zu untersuchen, wurden HILPDA und PLIN1 (PLIN1) in HCC-Gewebe über

Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. HILPDA und PLIN 1 waren partiell an Lipidtropfen kolokalisiert (vgl. Abb. 24).

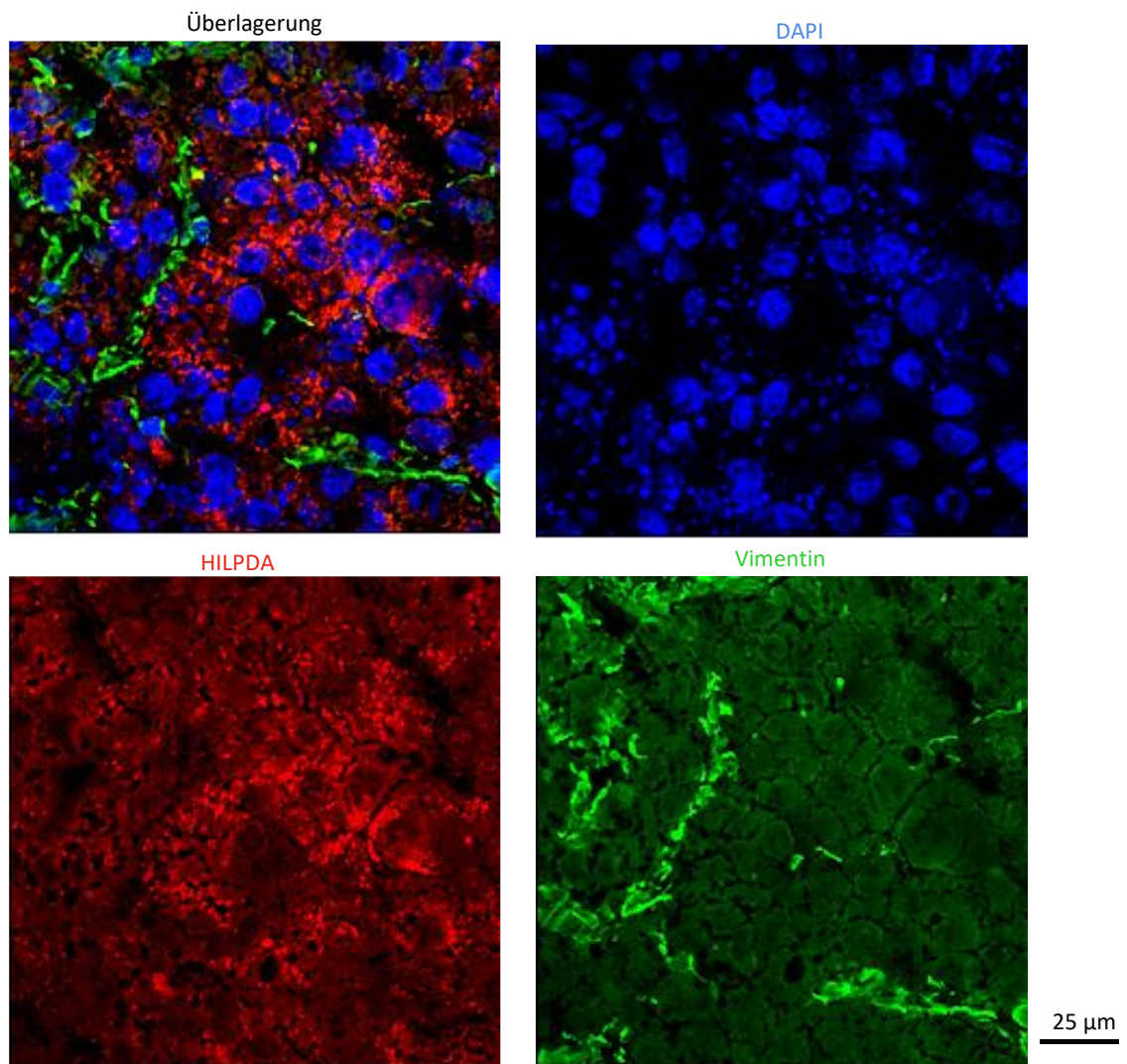


Abbildung 23: Konfokale Laserscanning-Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie von HILPDA und Vimentin in HCC-Gewebe. Das Gewebe wurde mit 3,7%ige Formaldehydlösung fixiert (Protokoll 1) und anschließend mit einer Lösung aus 10 % Serum / 0,1 % Triton permeabilisiert (Protokoll 1 (2.2.1.2.)). (HILPDA: rot (Alexa Fluor 546) und Vimentin: grün (Alexa Fluor 488); DAPI: Zellkerne) Maßstab: 25 µm.

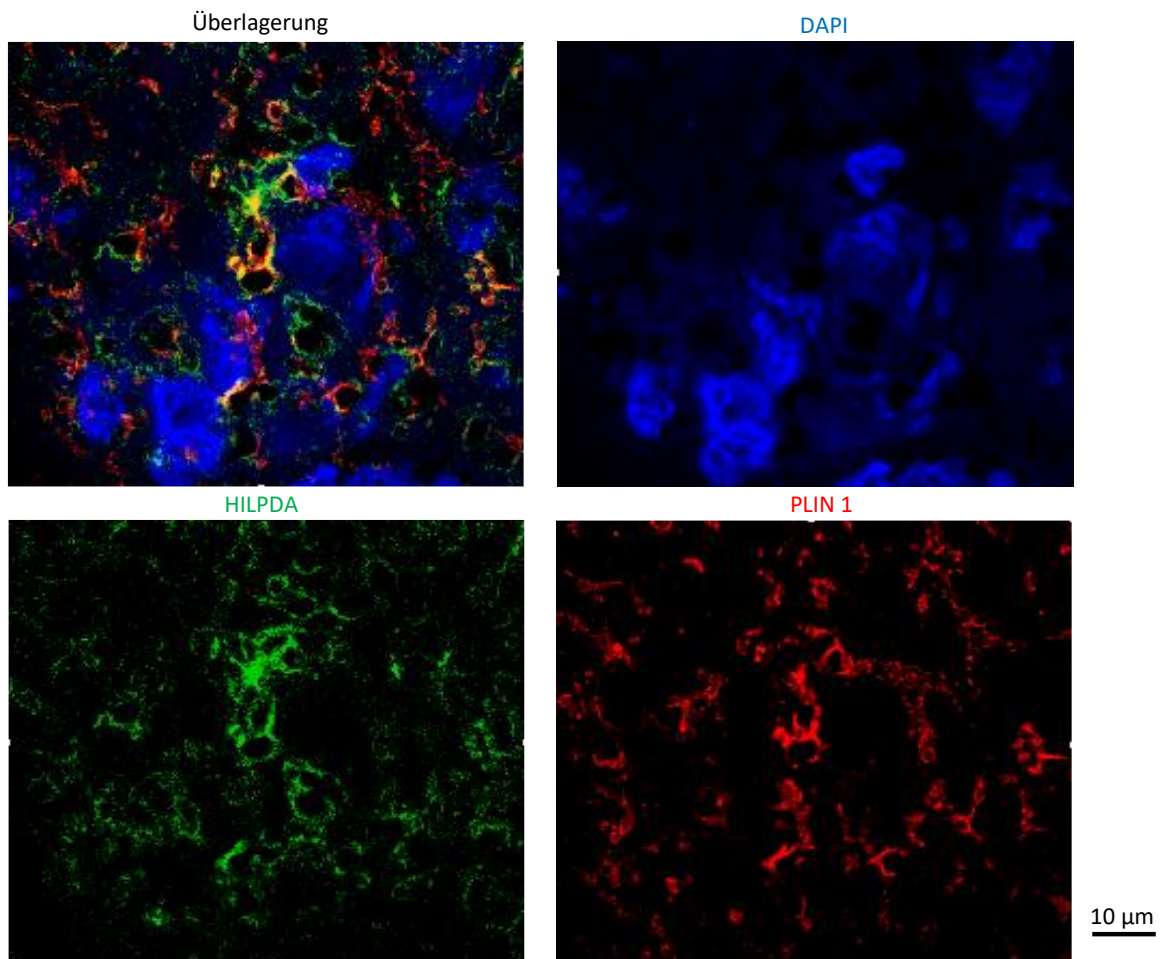


Abbildung 24: Konfokale Laserscanning-Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie mit Anfärbung von HILPDA und PLIN1 im HCC. Das Gewebe wurde mit 3,7%ige Formaldehydlösung fixiert (Protokoll 1) und anschließend mit einer Lösung aus 10 % Serum / 0,1 % Triton permeabilisiert (Protokoll 1 (2.2.1.2.)). (HILPDA: grün (Alexa Fluor 488) und PLIN 1: rot (Alexa Fluor 555); DAPI: Zellkerne). Maßstab: 10 µm.

3.5 Funktionsanalyse der Überexpression von HILPDA *in vitro*

Ziel der folgenden *in vitro* Versuche war es ein Erklärungskonzept dafür zu entwickeln, weshalb die Überlebenswahrscheinlichkeit der HCC-Patienten, welche eine hohe HILPDA-Expression aufwiesen, signifikant niedriger war als die der Patienten mit einer geringeren HILPDA-Expression. Zur Frage des Einflusses von HILPDA *in vitro* wurden verschiedene Funktionsanalysen durchgeführt. Um die Funktionalität des HILPDA-Überexpressionskonstrukts nachzuweisen, wurde zunächst untersucht, ob der bereits durch La Rosa Rodriguez und Koautoren beschriebene Einfluss der Überexpression von HILPDA auf den zellulären Lipidhaushalt in HepG2-Zellen bestätigt werden konnte [102]. Anschließend wurden Assays etabliert, die das Migrationsverhalten und die Proliferationsrate nach einer Transfektion mit dem HILPDA-Plasmid untersuchen. Um zu überprüfen, welchen Einfluss das endogen vorhandene HILPDA hat, erfolgte schließlich ein *Gene Silencing* mittels *small interfering RNA* (siRNA).

3.5.1 Quantifizierung der Lipidtropfengröße unter HILPDA-Überexpression in HepG2-Zellen

La Rosa Rodriguez und Koautoren konnten durch Überexpression von HILPDA mittels Adenovirus und 8-stündige Ölsäurebehandlung eine signifikante Zunahme der Lipidtropfengröße feststellen [102]. Nach einer Transfektion mit pcDNA HILPDA-FLAG bzw. Leervektor wurden HepG2-Zellen mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie beurteilt und die durchschnittliche Lipidtropfengröße quantifiziert (Abb. 25A). HepG2-Zellen, die HILPDA überexprimierten, zeigten signifikant größere Lipidtropfen im Vergleich zu den Kontroll- HepG2-Zellen (Abb. 25B; $p \leq 0.001$). Das Überexpressionskonstrukt kann also in die Vorgänge des Zellstoffwechsels eingreifen und ist also funktionell aktiv.

Neben der Zunahme der Lipidtropfengröße war durch die transiente Transfektion mit dem HILPDA-Plasmid auch die Zell-Kernmorphologie stark verändert. Um herauszufinden, ob die Effekte auf den Zellkern damit in Zusammenhang standen, wie lange HILPDA in den Zellen überexprimiert wurde die Expressionsdauer des Transfektionsprodukts auf 24 h halbiert und die Zellen identisch untersucht. Das beobachtete Phänomen ließ sich auch bei Variation der Expressionszeit reproduzieren (Abb. 26A). Eine Überexpression von HILPDA hatte auch in Huh7-Zelllinie, einen Einfluss auf die Morphologie des Zellkerns (Abb. 26B), woraus man schließen kann, dass dieser Effekt generell und unabhängig von der verwendeten Zelllinie ist.

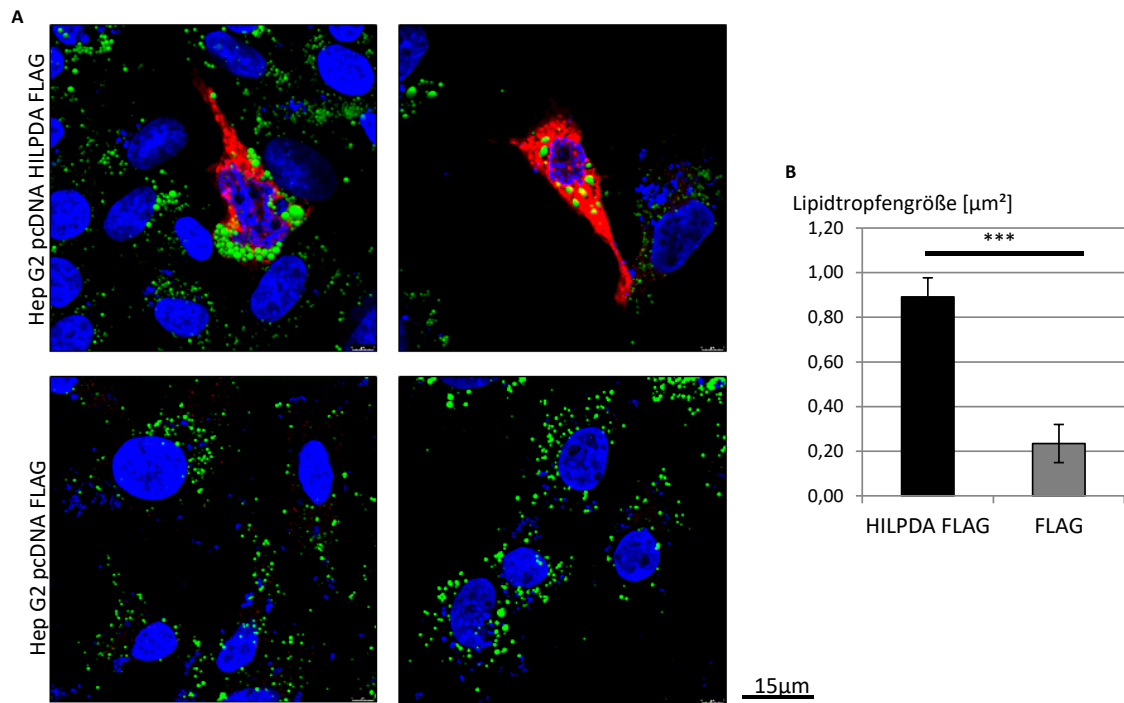


Abbildung 25: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf die Lipidtropfengröße von HepG2-Zellen. A) Konfokale Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie von HepG2-Zellen nach Überexpression von HILPDA-FLAG für 48 h (obere Zeile), sowie nach Transfektion mit pcDNA-FLAG als Kontrolle (untere Zeile) (HILPDA: rot (Alexa Fluor 546); DAPI: Zellkerne; BODIPY: grün, Lipidtropfen). Maßstab: 15 μm . B) Die mittlere Lipidtropfengröße in μm^2 einer HepG2-Zelle ist dargestellt. Zellen wurden verglichen, die mit pcDNA-HILPDA-FLAG (links), sowie dem Kontrollplasmid pcDNA-FLAG transfiziert wurden. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen betrug $n = 13$. t-Test, *** $p < 0.0001$

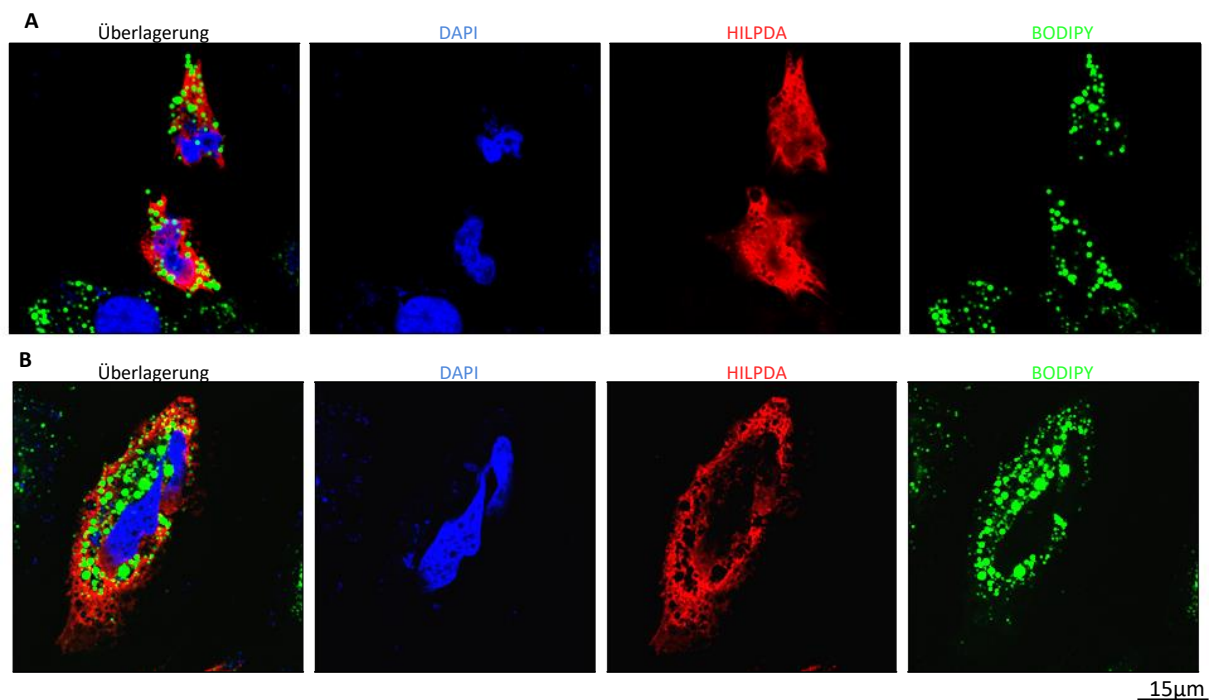


Abbildung 26: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf die Zellkernmorphologie von HepG2- und Huh7-Zellen. A) Konfokale Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie von HepG2-Zellen nach Überexpression von HILPDA-FLAG für 24 h. (HILPDA: rot (Alexa Fluor 546); DAPI: Zellkerne; BODIPY: grün, Lipidtropfen). B) Konfokale Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie von Huh7-Zellen nach Überexpression von HILPDA-FLAG für 48 h (HILPDA: rot (Alexa Fluor 546); DAPI: Zellkerne; BODIPY: grün, Lipidtropfen). Maßstab: 15 μm .

3.5.2 Migrationsversuche

Im Folgenden wurde das Migrationsverhalten von transient HILPDA-überexprimierenden Zellen untersucht. Der Migrations-Assay wurde zunächst mithilfe in HEK293T-Zellen etabliert (Abb. 27A). Der Zeitpunkt wurde jeweils kalibriert, zu welchem 50% der Spaltfläche durch Migration der HEK293T-Zellen geschlossen worden war (Abb. 27B). Transient mit HILPDA transfizierte HEK293T-Zellen schlossen statistisch signifikant im Vergleich zur scheintransfizierten Kontrollgruppe bereits früher die Hälfte der Spaltfläche ($p \leq 0,01$), wie durch drei unabhängig durchgeführte und identisch geplante Versuche gezeigt werden konnte. In der nicht transfizierten Kontrollgruppe zeigte sich jedoch auch, dass die Transfektion allein bereits einen hemmenden Einfluss auf die Migration hatte.

Die Migrationsversuche wurden mit Zellen der Linie Huh7 wiederholt (Abb. 28A). Durch HILPDA-Überexpression konnte im Vergleich zur mit Leervektor transfizierten Kontrollgruppe in Huh7-Zellen ein förderlicher Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit verzeichnet werden (Abb. 28B; $p \leq 0.05$).

Um zu untersuchen, ob auch endogenes HILPDA einen Effekt auf das Migrationsverhalten hat, wurde HILPDA mittels siRNA in Huh7-Zellkulturen herunterreguliert, was zu einer signifikant verlangsamten Migration führte (Abb. 29B, $p \leq 0,01$). Für den dargestellten Migrationsversuch wurde eine Verminderung des Expressionsniveaus um 65,6 % erzielt (Abb. 29C).

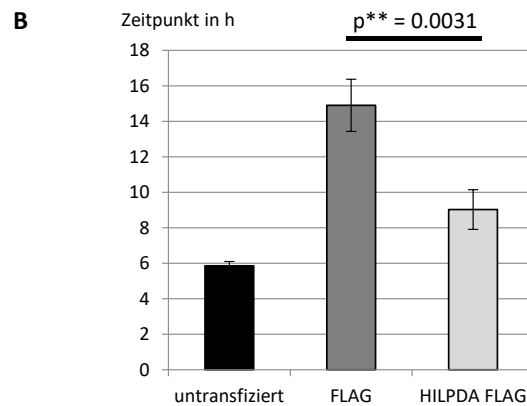
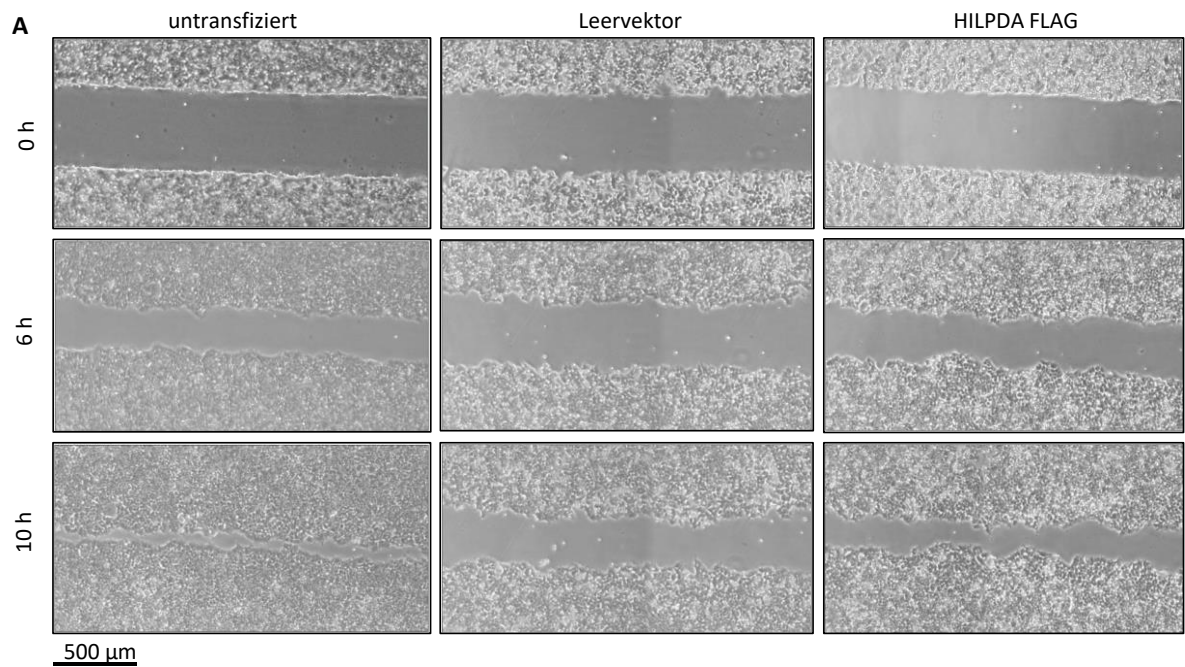


Abbildung 27: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf das Migrationsverhalten von HEK293T-Zellen. A) Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des Migrationsversuchs von mit HILPDA-FLAG oder FLAG-Leervektor transfizierten, sowie untransfizierten HEK293T-Zellen 0 h, 6 h und 10 h nach Entfernung des Inserts, gemessen nach 0 h, 3 h, 6 h, 8 h und 10 h. Maßstab: 500 μ m. B) Der Zeitpunkt ist dargestellt zu welchem 50 % der Ausgangsfläche durch Zellen bedeckt worden war. Verglichen wurde der Mittelwert aus jeweils drei Versuchsansätzen. t-Test, $**p < 0.01$

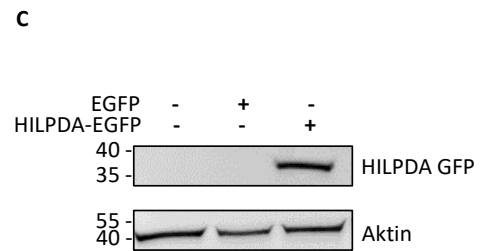
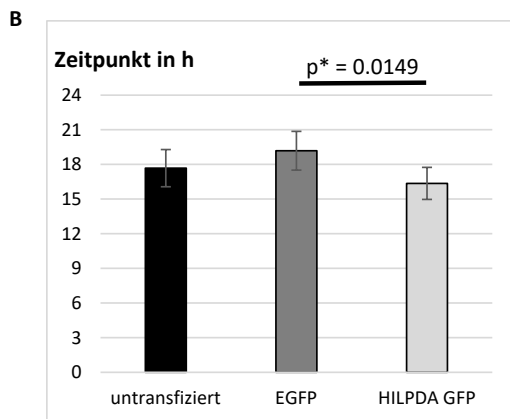
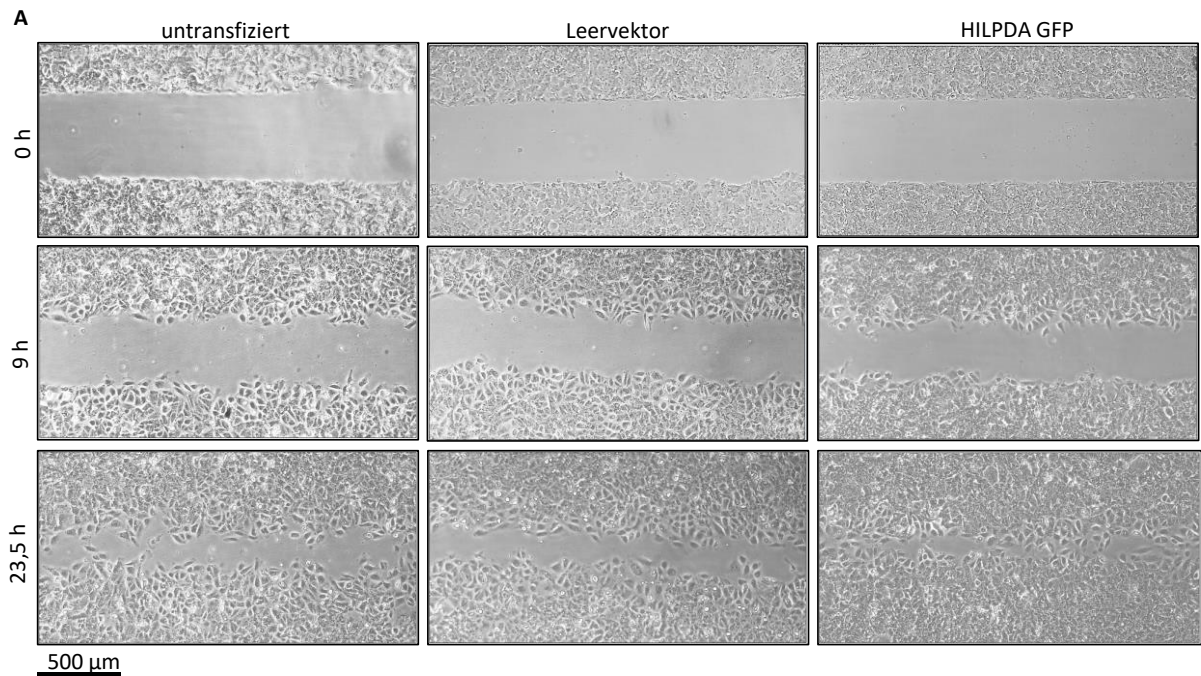


Abbildung 28: Einfluss der Überexpression von HILPDA auf das Migrationsverhalten von Huh7-Zellen. A) Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des Migrationsversuchs von mit HILPDA-EGFP oder dem EGFP-Leervektor transfizierten, sowie untransfizierten Huh7-Zellen 0 h, 9 h und 23,5 h nach Entfernung des Inserts. Maßstab: 500 μ m. B) Schematische Darstellung des Zeitpunkts in Stunden, zu welchem 50 % der Ausgangsfläche durch Zellen bedeckt wurde. Der Mittelwert aus jeweils sechs Versuchsansätzen wurde verglichen. t-Test, $*p < 0.05$ C) Immunblotanalyse von HILPDA (HIG2 AK) in Huh7-Zellen, 40 μ g Protein wurde jeweils auf ein Tris-Tricin-Gel geladen. Ladekontrolle: Aktin. Größenmarker auf der linken Seite in kDa.

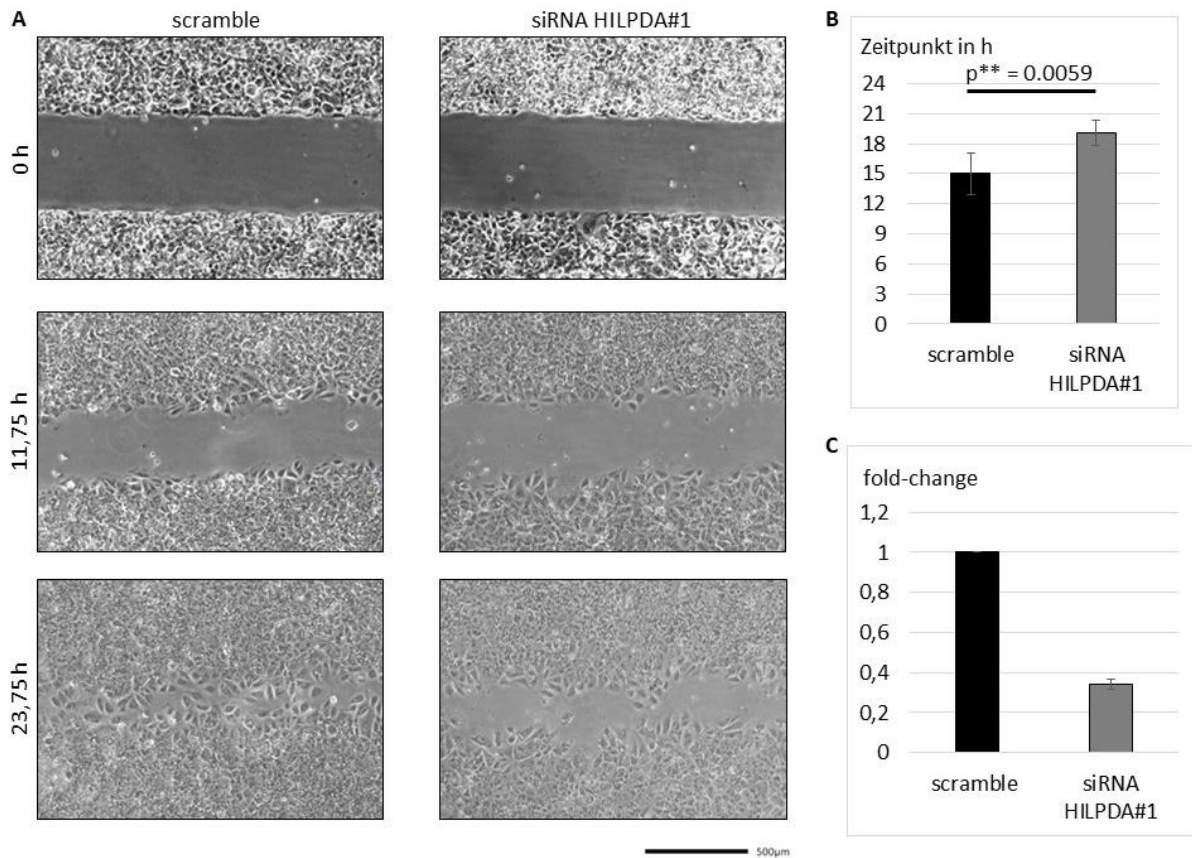


Abbildung 29: Einfluss einer HILPDA-Expressionsminderung mittels siRNA auf das Migrationsverhalten von Huh7-Zellen. A) Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des Migrationsversuchs nach Transfektion von Huh7-Zellen mit siRNA HILPDA#1 und Negativkontrolle „scramble“ siRNA. 0 h, 11,75 h und 23,7 h nach Entfernung des Inserts (Messzeitpunkte: 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 11,75 h und 23,5 h). Maßstab: 500 μ m. B) Schematische Darstellung des Migrationsversuchs mit dem Zeitpunkt in Stunden, zu welchem 50 % der Ausgangsfläche durch Zellen bedeckt worden war. Der Mittelwert aus jeweils fünf Versuchsansätzen wurde verglichen. t-Test, $^{**}p < 0.01$ C) Mittels semiquantitativer real-time PCR wurde die relative Änderung der HILPDA-mRNA-Expression durch siRNA HILPDA#1 in Bezug auf die Transfektion mit „scramble“ siRNA ermittelt. Die RNA-Proben wurden 51 h nach der Transfektion mit den siRNAs isoliert, um zu zeigen, wie stark HILPDA während des Migrationsversuchs auf mRNA-Ebene herunterreguliert werden konnte.

3.5.3 Proliferationsversuche

Um den aggressiveren klinischen Verlauf von HCCs mit hoher HILPDA-Expression zu untersuchen, wurde im Patientenkollektiv die Ki67-Proliferationsrate immunhistochemisch bestimmt. Eine mäßige, positive Korrelation bestand zwischen der HILPDA-Menge und der Ki67-Proliferationsrate (Abb. 30; $R = 0.36$; $p < 0.001$). Deswegen wurde die Wirkung von HILPDA auf das Proliferationsverhalten in den HCC-Zellen der Linien HepG2 und Huh7 untersucht.

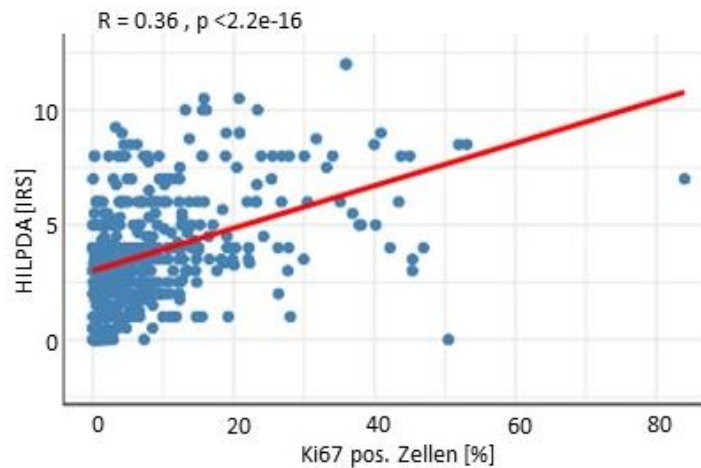


Abbildung 30: Hohe HILPDA-Expression korreliert im HCC positiv mit hoher Proliferationsrate. Im Streudiagramm wurde die HILPDA-Expression (y-Achse) mit dem prozentualen Anteil der für den Proliferationsmarker Ki67 pos. Zellen (x-Achse) im HCC-Kollektiv korreliert. ($R = 0.36$, $p < 0.0001$)

Da der monoklonale Antikörper Ki67 in den verwendeten proliferationsaktiven Zelllinien auch unter basalen Bedingungen nahezu alle Zellen anfärbte, wurde zur Quantifizierung der Proliferation mittel Immunfluoreszenzfärbung der alternative Zellteilungsmarker Phosphohiston H3 (PHH3) verwendet. Die folgenden Proliferationsassays wurden mithilfe eines polyklonalen Antikörpers (Merck Millipore, Ser10 #06-570) für PHH3 durchgeführt, welcher das phosphorylierte Histon H3 spezifisch während der Mitose-Phase des Zellzyklus nachweisen konnte. Der prozentuale Anteil von PHH3-positiven Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl wurde bestimmt, wie anhand HEK293T-Zellen etabliert (Abb. 31), anschließend wurde die Proliferation von Huh7-Zellen unter dem Einfluss der HILPDA-Überexpression untersucht (Abb. 32). Der Mittelwert aus jeweils sieben bis acht Versuchsaufnahmen für die einzelnen Versuchsbedingungen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen HILPDA-überexprimierenden Zellen, und Kontrollzellen in beiden Zelllinien gezeigt werden. Transient pcDNA HILPDA-FLAG transfizierte HEK293T-Zellen zeigten in Bezug zur basalen Proliferationsrate der Leervektor-transfizierten Kontrollzellen einen um durchschnittlich 35 % gestiegenen Anteil an PHH3-Positivität (von 5,4 % auf 7,3 %, $p \leq 0.001$; Abb. 31B), wie durch drei unabhängig durchgeführte und identisch geplante Versuche reproduziert. Unter dem Einfluss der HILPDA-Expression in Huh7-Zellen zeigte sich bezogen auf den durchschnittlichen Anteil an PHH3-positiven Zellen in der Kontrollprobe ein Anstieg der PPH3-Proliferationsrate um 130 % (von 1,8 % auf 4,2 %, $p \leq 0.001$ Abb. 32B), wie durch drei unabhängig durchgeführte Versuche ermittelt. Parallel wurde mittels Immunblot PPH3 spezifisch

im Bereich des erwarteten Molekulargewichts von 17 kDa detektiert. Die Induktion der Proliferation war durch Quantifizierung im Immunblot jedoch nicht erkennbar (Abb. 31C bzw. 32C).

Abschließend wurde untersucht, ob im Umkehrschluss die Herunterregulation von HILPDA mittels siRNA einen hemmenden Einfluss auf die Proliferationsrate aufweist. Hierfür wurden zwei verschiedene HILPDA siRNAs (siRNA HILPDA#1; siRNA HILPDA#2) für das „Gene Silencing“, sowie eine Negativkontrolle („scramble“) verwendet, um den Erfolg der Expressionsminderung mittels real-time PCR zu messen. Während die Herunterregulation von HILPDA mithilfe siRNA HILPDA#2 19,2 % betrug, konnte mittels siRNA HILPDA#1 eine Halbierung des Expressionsniveaus von HILPDA erreicht werden (Abb. 33C). Durch die Herunterregulation von HILPDA reduzierte sich der prozentuale Anteil an PHH3- positiven Zellen bezogen auf die basale Proliferationsrate um ca. 50 % (Abb. 33B; von 3,0 % auf 1,6 %, $p \leq 0.05$), wie auch durch zwei unabhängige Versuchsansätze ermittelt.

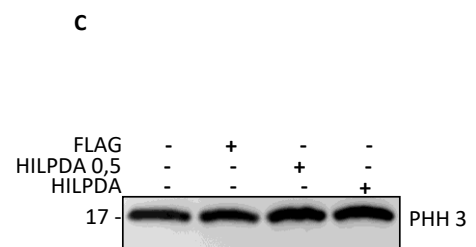
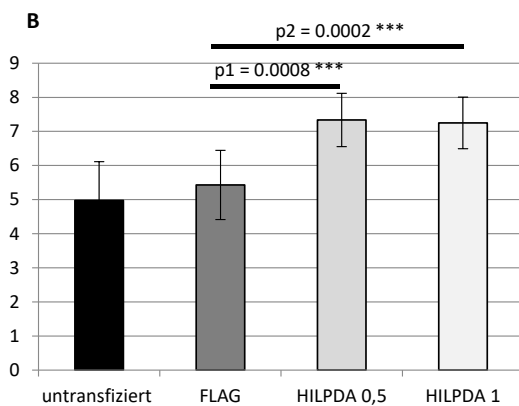
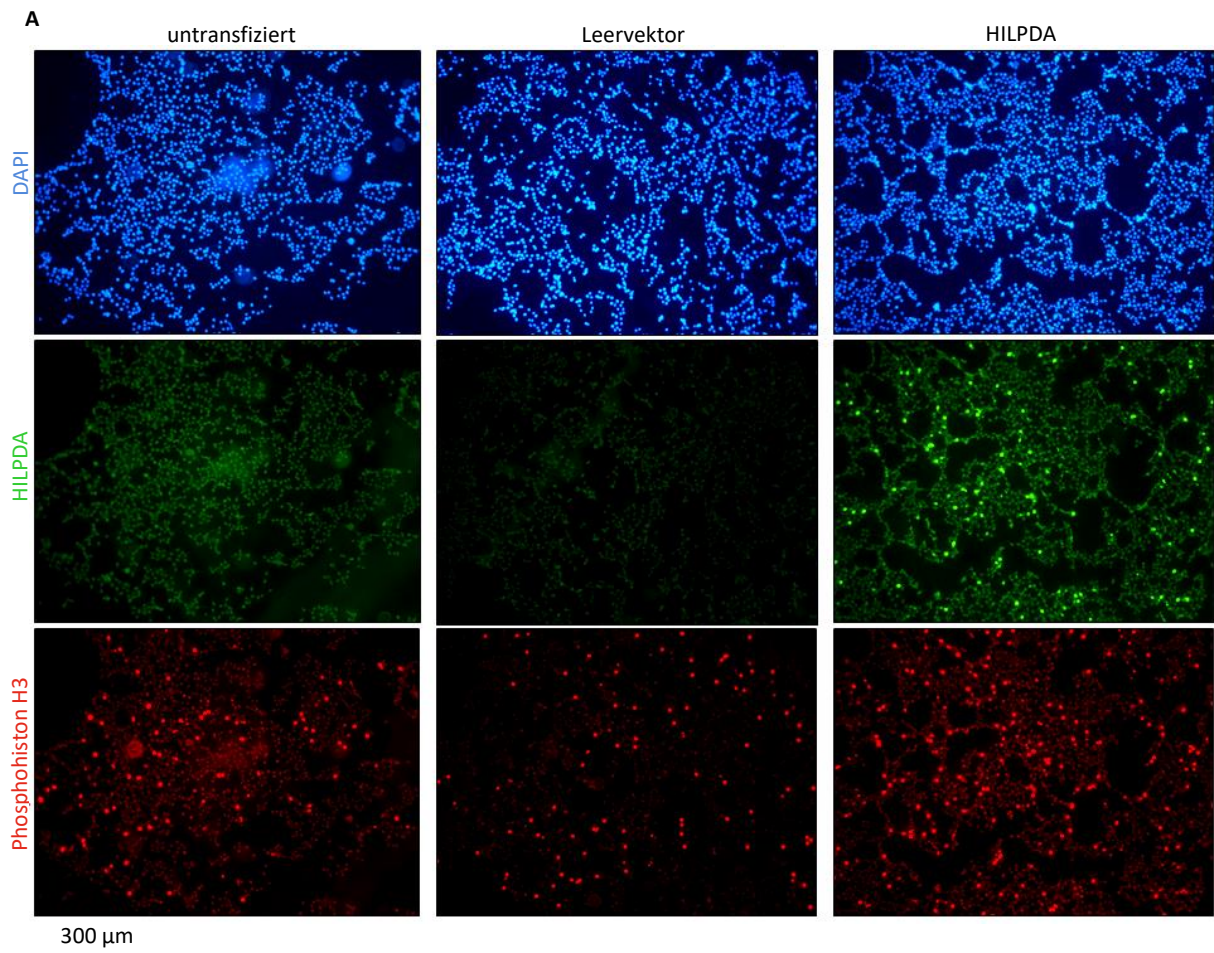


Abbildung 31: Auswirkung der Überexpression von HILPDA auf die Proliferation von HEK293T-Zellen. A) Immunfluoreszenzmikroskopie nach Transfektion von HEK293T-Zellen mit pcDNA-HILPDA-FLAG oder pcDNA- FLAG (10 µg) bzw. pcDNA-HILPDA-FLAG 0,5 (5 µg), sowie ohne Transfektion. (HILPDA: grün (sek. AK Alexa Fluor 488); Phosphohiston H3: rot (sek. AK Alexa Fluor 594), DAPI: Zellkerne). Die dargestellten Aufnahmen wurden repräsentativ für den Versuch ausgewählt. Maßstab: 300 µm. B) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil PHH3-positiver Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl. Verglichen wurde der Mittelwert aus jeweils sieben Versuchsaufnahmen. Drei unabhängig durchgeführte und identisch geplante Versuche zeigten gleich gerichtete Ergebnisse. t-Test, ***p < 0.001 C) Immunblotanalyse von Phosphohiston H3 in HEK293T- Zellen des Versuchs aus Abb. 31A/B 48 h nach Transfektion. 40 µg Proteinlysate wurde auf ein Tris-Tricin-Gel geladen. Größenmarker auf der linken Seite in kDa.

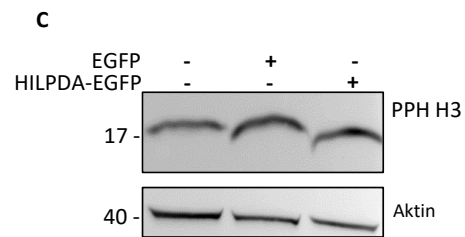
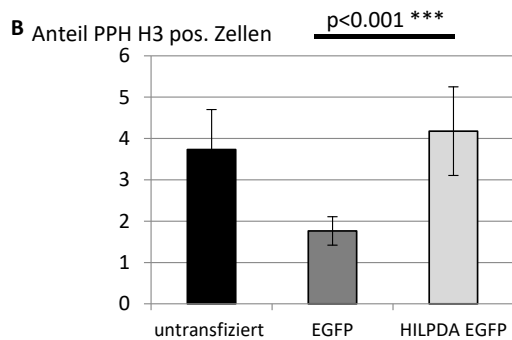
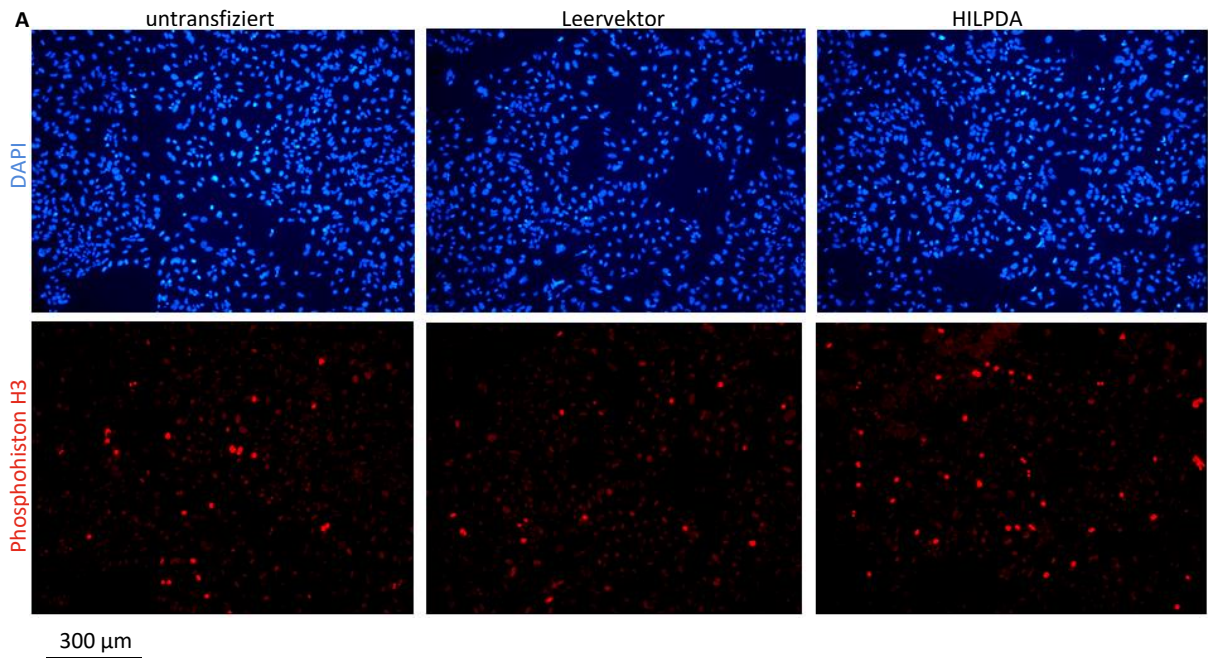


Abbildung 32: Auswirkung der Überexpression von HILPDA auf die Proliferation von Huh7-Zellen. A) Immunfluoreszenzmikroskopie nach Transfektion von Huh7-Zellen mit pcDNA-HILPDA-EGFP, Leervektor pcDNA-EGFP oder ohne Transfektion. (Phosphohiston H3: rot (sek. AK Alexa Fluor 594); DAPI: Zellkerne). Maßstab: 300 µm. B) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil PPH3 positiver Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl (Mittelwert aus jeweils acht Versuchsaufnahmen). Drei unabhängig durchgeführte und identisch geplante Versuche zeigten gleich gerichtete Ergebnisse. t-Test, *** $p < 0.001$ C) Immunblotanalyse von Phosphohiston H3 in den Zellen des Versuchs aus Abb. 32 A 48 h nach der Transfektion. 40 µg Proteinlysate wurden auf ein Tris-Tricin-Gel geladen. Ladekontrolle: Aktin. Größenmarker auf der linken Seite in kDa.

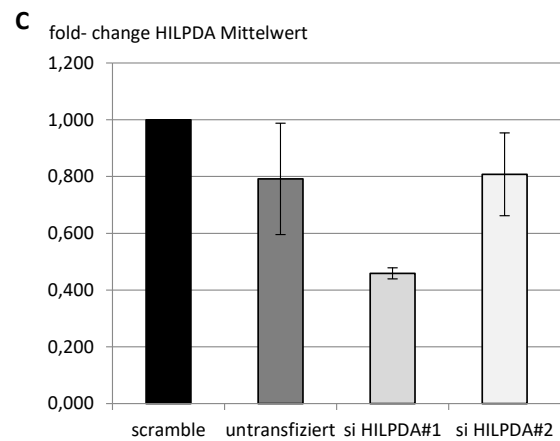
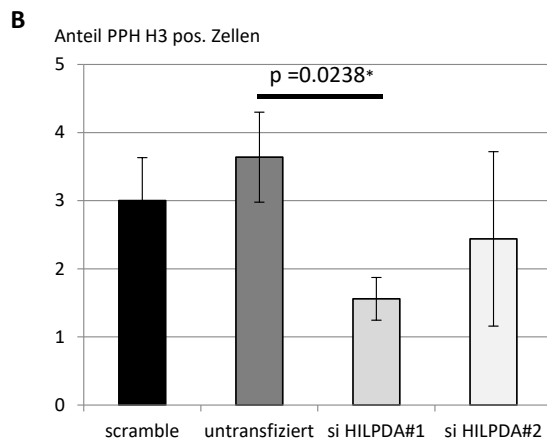
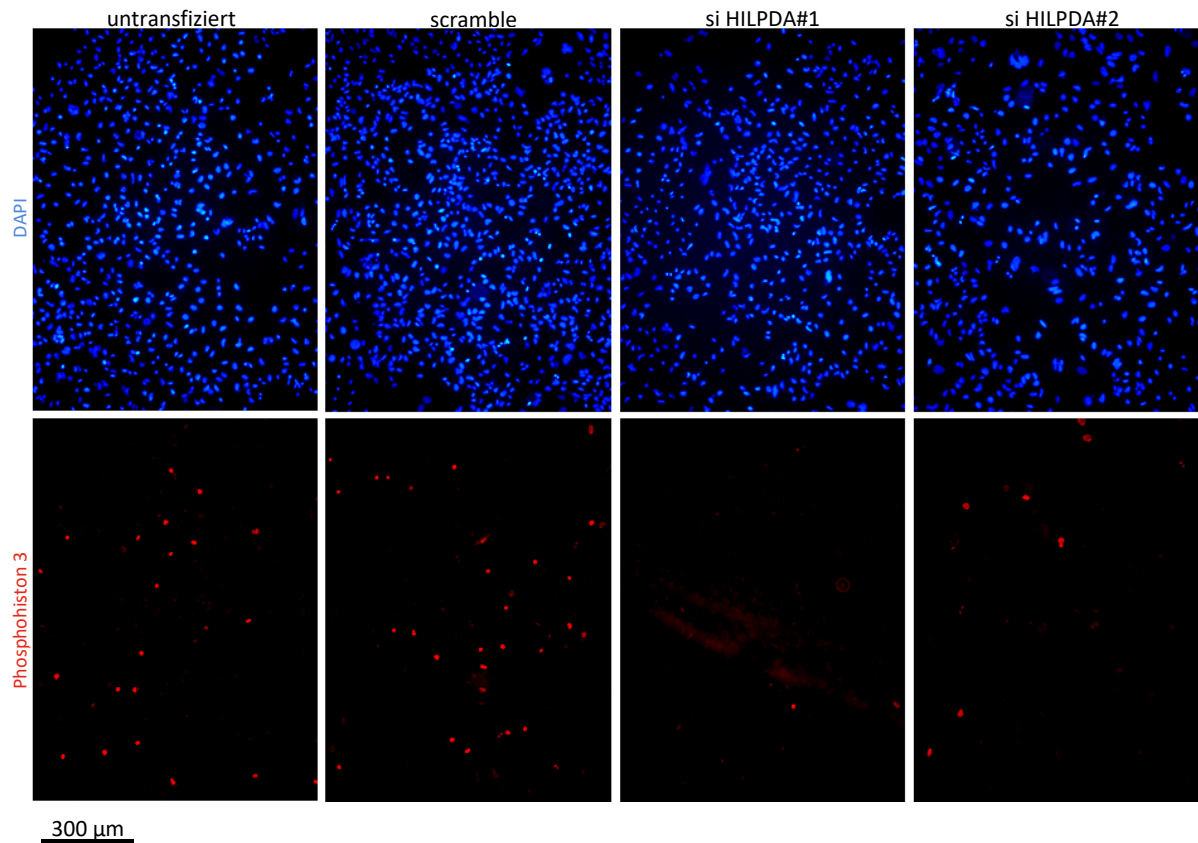


Abbildung 33: Auswirkung der Herunterregulation von HILPDA auf die Proliferation von Huh7-Zellen. A) Immunfluoreszenzmikroskopie nach siRNA-mediierter Herunterregulation von HILPDA in Huh7-Zellen (siRNA-HILPDA#1 und siRNA-HILPDA#2), Transfektion mit „scramble“-siRNA, sowie ohne Transfektion (Phosphohiston H3: rot (sek. AK Alexa Fluor 594); DAPI: Zellkerne). Maßstab: 300 µm. B) Schematische Darstellung des prozentualen Anteils PPH3-positiver Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl (Mittelwert aus jeweils sechs Versuchsaufnahmen der drei Versuchsansätze). Drei unabhängig durchgeführte und identisch geplante Versuche zeigten gleich gerichtete Ergebnisse. t-Test, * $p < 0.05$ C) Schematische Darstellung der HILPDA-mRNA-Expression mittels semiquantitativer real-time PCR 72 h nach Transfektion von Huh7-Zellen mit siRNA-HILPDA#1, siRNA-HILPDA#2, „scramble“-siRNA und ohne Transfektion (Messung in Triplikaten).

4 Diskussion

4.1 Stärken und Limitationen der Studie

Die experimentelle Variabilität der immunhistochemischen HILPDA-Färbung konnte mittels *Tissue Microarray* minimiert werden, da die Gewebeproben unter vergleichbaren Versuchsbedingungen gleichzeitig angefärbt wurden. Die semiquantitative Auswertung des IRS erfolgte durch einen Untersucher über eine limitierte Zeitperiode. Trotzdem kann eine manuelle Auswertung der IHC-Färbung kritisch hinterfragt werden, da durch den Untersucher intraindividuelle Schwankungen abhängig von Konzentrationsfähigkeit, Tageszeit, Ermüdung und körperlichem Befinden möglich sind. Eine automatisierte Auswertungssoftware hat den Vorteil, dass eine Färbung konstant anhand eines einprogrammierten Grenzwertes ausgewertet werden kann. Hierbei existieren allerdings im Lebergewebe mögliche Confounder durch Galle oder falsche Wertung von Zellen wie Gallengangsepithelien, Immunzellen, Kupffer Sternzellen oder Gefäßendothelien.

Die größte Stärke des vorliegenden Studiendesigns besteht in der hohen Anzahl an Patientenproben ($n = 561$). Es erfolgte eine populationsbasierte klinische Datenerhebung, indem als Fall-Stichproben konsekutiv alle während des Zeitraums zwischen 1997-2018 in der UMM chirurgisch behandelten HCC-Patienten rekrutiert wurden. Dementsprechend liegt eine retrospektive Kohortenstudie vor, wobei die Datenerhebung unbeeinflusst von Zielen der späteren Analysen des Kollektivs ablaufen konnte und damit der Selektionsbias minimiert werden konnte.

Die im Kollektiv nachweisbare Prädisposition für das männliche Geschlecht von 77,8 % an einem HCC zu erkranken, spiegelt das generelle Verteilungsmuster in der Gesellschaft wider. Es besteht eine Geschlechterprädisposition mit einem geschätzten Verhältnis zwischen Männern und Frauen von 2,7:1 [7] vor, an einem HCC zu erkranken. Eine Ursache hierfür liegt in der geschlechtstypischen Exposition gegenüber Risikofaktoren, wie Alkohol und Hepatitisviren. Das mediane Alter bei Diagnosestellung des HCC in unserer Studie lag bei 64,6 Jahren. Die Mehrheit der HCC-Patienten in der vorliegenden Studie wies als Ätiologie eine ASH (31 %) bzw. eine chronische HCV-Infektion (20 %) auf und nur eine geringe Zahl an Patienten eine NASH (7,5 %). In Deutschland sind ebenfalls als häufigste Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC eine chronische HCV-Infektion und das Vorliegen einer Alkoholischen Steatohepatitis (ASH) beschrieben [21]. Es ist davon auszugehen, dass

in USA und Europa eine NAFLD oder NASH einen zunehmenden Risikofaktor für die HCC-Entstehung darstellen wird [22, 23].

Im HCC-TMA wurde HCC-Gewebe von Patienten verwendet, die eine operative Therapie erhielten, da durch Leberblindpunktion gewonnenes Gewebe zur Erstellung eines TMA in der Regel nicht ausreicht. Dementsprechend besaß die Mehrheit der Patienten in unserem TMA-Kollektiv einen intermediären BCLC-Score B (62,3 %), bei gleichzeitig gutem Allgemeinzustand (ECOG 0 (69,8 %)). Die Repräsentativität auf die Gesamtheit aller Patienten mit einem HCC ist jedoch damit eingeschränkt, insbesondere in Bezug auf Patienten mit fortgeschrittenem HCC-Stadium und palliativ-systemischer Therapie. Die HILPDA-Expression in HCC-Proben aller Tumorstadien mit Bezug zu anderen Therapieformen konnte damit nicht untersucht werden. Ebenso konnte nicht einbezogen werden, ob sich durch die Operation Komplikationen mit Einfluss auf das Überleben ergaben. Im Ovarialkarzinom korrelierte gemäß Nishimura und Koautoren eine HILPDA-Überexpression mit einem besseren Ansprechen auf eine Chemotherapie, entsprechend einem prädiktiven Marker. Ein Zusammenhang zwischen HILPDA-Expression und Gesamtüberleben stellte sich in dieser Studie jedoch nicht dar. [100]

4.2 Differenzielle Expression von HILPDA im HCC und Validierung als prognostischer immunhistochemischer Marker

Das Mainzer HCC-Kollektiv bot als großes Populationskollektiv aufgrund der hohen Anzahl an Patientenproben (n = 561) ideale Bedingungen, um neue Biomarker auf ihre prognostische und klinische Relevanz hin zu testen. Mittels Immunhistochemie ließ sich HILPDA zytoplasmatisch in den HCCs nachweisen, wobei 5 % der HCCs keine HILPDA-Expression, 65 % eine schwache, 25 % eine mäßig starke und 5 % eine starke HILPDA-Expression aufwiesen. Der für die immunhistochemischen Färbungen verwendete polyklonale Antikörper (*Atlas-Antibodies AB, HPA010515*), sowie der für die Zellkulturversuche verwendete monoklonale Antikörper (*Santa Cruz Biotechnology, G2 Sc-376704*) konnte im Immunblot tatsächlich HILPDA bei 10 kDa spezifisch detektieren, so dass die Auswertung der HILPDA-Färbeintensität validiert werden konnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine hohe HILPDA- Expression im HCC (IRS>3.21) mit einer signifikant reduzierten Gesamtüberlebenszeit der Patienten assoziiert ist. Dieses Ergebnis konnte in der

unabhängigen TCGA-Patientenkohorte durch uns, sowie Wang und Koautoren [128] bestätigt werden. Demnach kann HILPDA als prognostischem Marker den klinischen Verlauf von HCC-Patienten vorhersagen. Die 50-Monats-Überlebensrate liegt für die Gruppe mit niedriger HILPDA-Expression bei 50,9 % und mit hoher HILPDA-Expression bei 35,6 %. Da andere Forschergruppen einen gleich gerichteten Zusammenhang im Nierenzell- [117], Ovarial- [100] und Kolonkarzinom [120], sowie im Neuro- [115] und Glioblastom [116] feststellen konnten, kann angenommen werden, dass die Dysregulation von HILPDA einen universell vorkommenden Pathomechanismus in vielen Tumorentitäten darstellt. HILPDA könnte möglicherweise ein vielseitig einsetzbarer prognostischer Marker für verschiedene weitere Krebsentitäten sein. Neben dem immunhistochemischen Nachweis von HILPDA [120] wurde bereits die HILPDA-Expression auf mRNA-Ebene [119], sowie die Konzentration von HILPDA in Serumproben untersucht [117].

Die zweite wichtige Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass im HCC im Vergleich zum nicht-neoplastischen Lebergewebe eine signifikante HILPDA-Hochregulation vorliegt. Kim und Koautoren konnten gleiche Ergebnisse in Kolorektalen Karzinomen feststellen [120]. Das endogen exprimierte HILPDA konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings in humanem HCC-Gewebe nur immunhistochemisch und über real-time PCR, jedoch nicht mittels Immunblot nachgewiesen werden. In den HCC-Proben des kleinen, für die RNA-Isolation verwendeten HCC-Kollektivs war im Vergleich zum nicht-neoplastischen Lebergewebe ebenfalls ein starker Trend zu einer höheren mRNA-Expression von HILPDA vorhanden. Cui und Koautoren konnten in einem kleinen HCC-Kollektiv (n = 40) in 35 Proben auf mRNA-Ebene eine Expression von HILPDA im HCC-Gewebe zeigen [124]. Mittels TMA ist die Färbemethode konstant und damit die Vergleichbarkeit zwischen den Proben gewährleistet, gleichzeitig wird nur ein kleiner Tumor-Anteil untersucht. Für zukünftige Untersuchungen wäre interessant, ob innerhalb eines HCCs eine heterogene HILPDA-Expression besteht.

4.3 Assoziation der HILPDA-Expression mit prognostisch ungünstigen klinischen Faktoren und histopathologischen Parametern

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass das HILPDA-Expressionsniveau in Rezidivtumoren bzw. Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum HCC-Primarius signifikant erhöht ist. Ebenso ist in HCC-Fernmetastasen eine tendenziell höhere HILPDA-Expression im Verhältnis zum primären HCC erkennbar. Dieses Ergebnis erreicht wahrscheinlich aufgrund der geringen Anzahl an verfügbaren Proben von

Fernmetastasen (n = 14) nicht das Signifikanzniveau. Ein Tumorprogress in Form von Tumorrezidiven, einer Fernmetastasierung oder einer Lymphknoteninvasion geht mit einer Tendenz zur erhöhten HILPDA-Expression einher. Dies deckt sich mit den Aussagen von Cui und Koautoren, die in einem kleineren HCC-Kollektiv zeigten, dass Patienten mit einer Lymphknotenmetastasierung und einem höheren *TNM-Staging* eine signifikant höhere HILPDA-Expression besitzen [124]. Wang und Koautoren untersuchten HCC-Patienten mithilfe der TCGA-Datenbank und kamen zu dem Erkenntnis, dass eine Assoziation zwischen HILPDA-Expression und T-Status existiert [128]. Zudem sind intrahepatische Metastasierung und Portalveneninvasion mit einem erniedrigten Gesamtüberleben der Patienten vergesellschaftet [77, 80]. Chiou und Koautoren konnten zeigen, dass durch HILPDA-*knockdown* die Metastasierungsrate von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas reduziert werden konnte [126]. Cui und Koautoren konnten beweisen, dass ein „Gensilencing“ von HILPDA mit einer reduzierten Vimentin-Expression und einer verstärkten E-Cadherin-Expression in der Immunhistochemie einherging, im Sinne einer Hemmung der sogenannten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Im Mausmodell war ein geringeres Tumolvolumen und eine geringere Anzahl an Lungenmetastasen in Tieren vorhanden, welche mit HILPDA-siRNA transfizierte SMMC 7721-Zell-Injektionen erhielten [124]. Ob HILPDA bei der Metastasierung von HCCs eine funktionale Rolle spielt und ob hierbei die EMT beteiligt ist, bleibt jedoch offen. Auch sind die molekularen Mechanismen, die zu der Hochregulation von HILPDA im HCC führen bislang nicht geklärt.

Wie wir zeigen konnten, geht eine zunehmende Entdifferenzierung von HCCs mit einer höheren HILPDA-Expression einher. Schlecht differenzierte HCCs (G3) weisen im Vergleich zu gut (G1) oder mäßig (G2) differenzierten HCCs eine signifikant höhere HILPDA-Expression auf. Der Differenzierungsgrad von HCCs wird im Wesentlichen anhand der Kernmorphologie bestimmt (Fuhrman-Klasse). Interessanterweise konnten wir in den *in vitro*-Untersuchungen zeigen, dass sich durch transiente HILPDA-Transfektion die Kernmorphologie verändert. Ähnlich wie in gering differenzierten HCCs zeigen HILPDA überexprimierende HCC-Zellen in Kultur vergrößerte und entrundete Zellkerne. Das beobachtete Phänomen lässt sich auch nach Variation der Expressionszeit reproduzieren und ist unabhängig von der Zelllinie in Huh7- und HepG2-Zellen nachweisbar. Möglicherweise ruft HILPDA durch eine lipidakkumulierende Wirkung eine Lipotoxizität in Zellen hervor. Auch die Rolle der gesteigerten Proliferationsrate, sowie der Kernveränderungen bleibt hierbei offen.

Des Weiteren ist eine hohe HILPDA-Expression mit dem Vorliegen von Gefäßinvasionen assoziiert. Tumoren mit mikro- oder makroskopischer Gefäßinvasion weisen eine signifikant höhere HILPDA-Expression auf als HCCs ohne Gefäßinvasion. Eine gesteigerte Aggressivität eines HCC könnte mit der Fähigkeit von HCCs in Gefäße einzubrechen erklärt werden, welche wiederum mit einer erhöhten HILPDA-Expression assoziiert ist. Sowohl eine makroskopische als auch eine mikroskopische Gefäßinvasion stellen eindeutig ungünstige prognostische Faktoren dar [38, 76–78]. Eine mikrovaskuläre Tumorinvasion ist laut einer Studie ebenfalls mit schlechterem Outcome und früherem Tumorrezidiv assoziiert [70].

Glutaminsynthetase (GS) wird neben HSP70 und Glypican immunhistochemisch zur Unterscheidung von HCCs von dysplastischen Knoten verwendet und die Überexpression von Glutaminsynthetase gilt als immunhistochemischer Surrogatparameter einer Wnt/ β -Catenin-Aktivierung [138]. In unserer Studie zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher GS- und niedrigerer HILPDA-Expression. Der Nachweis einer Wnt/CTNN β 1-aktivierenden Mutation identifiziert eine Subgruppe von HCAs, die 15 % aller HCAs ausmacht und ein besonders hohes Entartungsrisiko zu einem gut-differenzierten HCC besitzen [138]. In der Fachwelt ist umstritten, ob HILPDA als autokriner Wachstumsfaktor an einem G-Protein gekoppelten Rezeptor wirkt und damit über eine β -Catenin-Anreicherung eine Wnt-Aktivierung erreicht [94, 117, 123]. Während Togashi und Koautoren diese Hypothese für das klarzellige Nierenzellkarzinom aufstellten [117, 123], widersprechen Gimm und Koautoren diesem Ansatz und sehen keinen Zusammenhang zwischen HILPDA-Expression und Wnt-Aktivierung [94].

Verschiedene, weit verbreitete genetische Mutationen im TERT-Promoter, genauer im TP53- oder im CTNNB1-Gen wurden identifiziert, welche als onkogene Treiber-Mutationen (*oncogenic driver*) zur Hepatokarzinogenese beitragen. In der TCGA-Kohorte war auf mRNA-Ebene in TP53-mutierten HCCs eine erhöhte HILPDA-Expression und in Tumoren mit einer CTNNB1-Mutation eine niedrigere HILPDA-Expression nachweisbar. Laut Calderaro und Koautoren lässt sich in CTNNB1-mutierten HCCs in der Regel eine Wnt/ β -Catenin-Aktivierung feststellen. Mutationen im TP53- und im CTNNB1-Gen schließen sich gegenseitig aus und definieren phänotypisch Subgruppen. CTNNB1-mutierte HCCs sind gemäß Calderaro und Koautoren groß, gut differenziert, und mikrotrabekulär, wohingegen TP53-mutierte HCCs eher schlecht differenziert, kompakt sowie makrotrabekulär sind und häufig mit

einer Gefäßinvasion einhergehen. Der makrotrabekulär-massive HCC-Subtyp geht mit einer TP53-Mutation, sowie einem schlechteren Gesamtüberleben einher. [47]

Dazu passend konnten wir im Mainzer Kollektiv feststellen, dass eine erhöhte HILPDA-Expression vor allem in gering bis entdifferenzierten HCCs (G3-G4) vorhanden war, so dass ein Zusammenhang mit einer TP53-Mutation bestehen könnte, der aber im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet wurde.

4.4 Einfluss der Ätiologie auf die HILPDA-Expression im HCC

Sowohl im HCC-Gewebe als auch im nicht-neoplastischen Lebergewebe konnten keine signifikanten Unterschiede in der HILPDA-Expression zwischen Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) oder anderer Ätiologie festgestellt werden. In der Literatur findet man widersprüchliche Aussagen dazu, ob Patienten mit einem NASH-assoziierten HCC ein gemindertetes Gesamtüberleben im Vergleich zu HCC-Patienten mit anderer Ätiologie aufweisen [90], oder kein Unterschied feststellbar ist [91].

Auch in HCC-Gewebe bei Leberzirrhose oder Nicht-Zirrhose, Diabetes mellitus, Alkohol- oder Nikotinabusus, oder unterschiedlichen Geschlecht oder BCLC-Status konnte kein Unterschied in der HILPDA-Expression ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass HILPDA weitgehend unabhängig von der Ätiologie mit einer schlechteren Prognose verbunden ist.

Im HCC und nicht-neoplastischen Lebergewebe zeigte sich ein Zusammenhang zwischen chronischer Hepatitis C und erhöhter HILPDA-Expression. In kürzlich publizierten Studien konnte experimentell *in vitro* durch eine Überexpression von HCV Core Protein in Huh7-Zellen eine Stabilisierung von HIF1 α erreicht werden [139], HIF-1 α soll an der Regulation der HILPDA-Expression beteiligt sein [94]. Interessanterweise spielen Lipidtropfen bei der Replikation infektiöser HCV-Partikel eine wichtige Rolle [140]. *In vitro* nahm die Lipidtropfengröße in unserer Studie durch HILPDA-Überexpression signifikant zu.

Im umliegenden nicht-neoplastischen Lebergewebe von Hämochromatose-Patienten (HH) konnte eine signifikant niedrigere HILPDA-Expression nachgewiesen werden. Die Akkumulation von Eisen gilt als Zellgift, welches die zytotoxische Wirkung von ROS erhöht. HH-Patienten akkumulieren Eisen in Hepatozyten und haben ein 200-fach erhöhtes Risiko, ein HCC zu entwickeln [141]. Hagist und Koautoren identifizierten

unter anderem HILPDA als ein durch Eisen reguliertes Gen in Patienten mit Eisenüberlastung infolge HH oder chronischer Hepatitis C [142].

4.5 HILPDA als potenzieller Mediator einer vermehrten Tumoraggressivität

Tumorhypoxie wird als ein unabhängiger prognostischer Faktor gesehen, hierbei spielen neben dem vergleichsweise schlechten chemotherapeutischen Ansprechen aufgrund einer mangelhaften Blutversorgung fundamentale biologische Veränderungen im Tumorgewebe selbst eine Rolle, welche es zu untersuchen gilt [143]. In einem schnell wachsenden Tumor kann durch eine mangelhafte Gefäßversorgung ein chronischer Sauerstoffmangel entstehen. Durch Hypoxie wird HIF1 α stabilisiert, wodurch wiederum VEGF gebildet wird, dass die Neoangiogenese induziert [144]. Daten einer Metaanalyse zufolge ist eine hohe VEGF-Konzentration (*vascular endothelial growth factor*) im Serum oder im Gewebe von HCC-Patienten mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert [145]. Llovelt und Koautoren konnten zeigen, dass eine erhöhte Serumkonzentrationen von Ang2 (Angiopoietin 2) und VEGF einen unabhängigen Prädiktor für ein schlechteres Überleben darstellt [146]. Zudem gilt HIF-1 α im HCC als prognostischer Marker für ein schlechteres Überleben [143, 147].

Denko und Koautoren stellen die These auf, dass Tumorzellen die Expression von HILPDA steigern, um resistenter gegen den durch Hypoxie ausgelösten Zellstress zu werden [92]. Gimm und Koautoren bewiesen bereits, dass sich durch HIF-1 α -Knock-down die HILPDA-Expression reduzieren ließ [94]. Anhand der mRNA-Expression im HCC-Kollektiv der TCGA-Datenbank konnten wir eine Korrelation zwischen dem Winter Hypoxie Score und HILPDA zeigen. In HepG2- und Huh7-Zellen konnte demonstriert werden, dass die Ziellinien sensibel auf Hypoxie reagierten und nach einer für den Zelltyp spezifischen Zeit eine erhöhte Menge des Transkriptionsfaktors und Hypoxiemarkers HIF-1 α nachweisbar war. In der *real-time* PCR-Untersuchung gelang es nach 27 Stunden Hypoxie eine um das drei- bis fünffach höhere HILPDA mRNA-Konzentration als in nicht hypoxischen Kontrollzellen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte HILPDA unter Sauerstoffmangel in verschiedenen Tumorzelllinien (Hep3B, HeLa, Caki-1) [92, 94] sowie Makrophagen [95] induziert werden. Eine Hochregulation von HILPDA unter Hypoxie erscheint in einer Phase der Tumorigenese plausibel, in welcher die zur Verfügung stehende Versorgung mit sauerstoffreichem Blut dem extensiven Tumorwachstum nicht mehr ausreicht. Für

zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, ob innerhalb eines Tumors in Bereichen mit höherer Hypoxie eine verstärkte HILPDA-Expression nachzuweisen ist.

Des Weiteren findet durch Hypoxie eine Veränderung des Stoffwechsels in der Tumorzelle statt, indem als Antwort auf einen Sauerstoffmangel durch eine gesteigerte HIF1 α -Aktivität die Triglyceridakkumulation gesteigert wird [148]. Dies ist ein effektiver Mechanismus, da für die Fettsäureoxidation eine große Menge an Sauerstoff benötigt wird, während gleichzeitig unter Hypoxie die mitochondriale Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ansteigt [149]. Eine erhöhte ROS-Konzentration führt zur Lipidperoxidation der Zellmembran, Proteindenaturierung mit Funktionsverlust von Enzymen und schlussendlich zur Apoptose [104]. Hierbei sind Zellen durch Herunterregulation der Lipolyse und Fettsäureoxidation, bei gleichzeitiger Steigerung der Lipideinlagerung während Phasen von Sauerstoffmangel gegenüber der ROS-Überproduktion geschützt [148]. Durch eine HILPDA-induzierte Lipidakkumulation konnte ebenfalls der durch ROS verursachte Zellschaden bzw. die Apoptoserate minimiert werden [95, 104, 125].

In Übereinstimmung mit den bisher veröffentlichten Lokalisationsstudien [94, 97–99] konnten wir mittels Immunfluoreszenzfärbung HILPDA als Überexpressionsprodukt in den transient transfizierten Zelllinien Huh7 und HepG2, sowie das endogene HILPDA-Protein im HCC-Gewebe verstärkt an Lipidtropfen verschiedener Größe und zusätzlich zytoplasmatisch verteilt nachweisen. Die Kolokalisation von HILPDA an Lipidtropfen ist in Übereinstimmung mit beschriebenen Verteilungsmuster einer Subpopulation von Lipidtropfen die einem Umbauprozess unterlaufen [94, 102]. Weitere Forscher gehen davon aus, dass HILPDA nicht ausschließlich an Lipidtropfen zu finden ist, sondern zytoplasmatisch in der Zelle verteilt vorliegt, wie dies beispielsweise im Ovarialkarzinom der Fall ist [100]. HILPDA soll gemäß Maier, sowie DiStefano und Koautoren durch das endoplasmatische Retikulum (ER) migrieren und an der Seite der Lipidtropfensynthese lokalisieren [95, 98]. Gimm und Koautoren gehen hingegen anhand von Ko-Färbungen in HeLa-Zellen davon aus, dass HILPDA weder am ER noch an weiteren Zellorganellen wie Autophagosomen, Peroxisomen und Mitochondrien lokalisiert [94]. Wir konnten keine Kolokalisation von HILPDA mit dem mitochondrialen Marker in den untersuchten Zelllinien erkennen.

Unseren Untersuchungen zufolge zeigen HILPDA und das Lipidtropfen-assoziierte Protein Perilipin1 eine partielle Kolokalisation in Lipidtropfen. Perilipin1 ist eines an der Kontrolle der zellulären Lipolyse beteiligtes Protein [150]. Gimm und Koautoren

konnten eine Kollokalisierung von HILPDA und Perilipin2, bzw. überexprimiertem Perilipin3 und endogenem HILPDA an der Lipidtropfenoberfläche in Huh7-Zellen feststellen [94]. HILPDA könnte damit als Lipidtropfen-assoziiertes Protein an der Kontrolle von Lipidakkumulation und Lipolyse beteiligt sein. Da HILPDA partiell an Lipidtropfen lokalisiert, stellt sich die Frage, ob HILPDA eine Rolle im HCC-Fettstoffwechsel spielt. Unseren Versuchsergebnissen zufolge hatten HepG2-Zellen, welche HILPDA überexprimierten, signifikant größere Lipidtropfen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnten Gimm und Koautoren durch eine Hypoxie-induzierte HILPDA-Expressionssteigerung eine Vergrößerung der Lipidtropfen in Huh7-Zellen messen [94], siehe auch [98, 102]. Im Umkehrschluss konnte durch eine hepatozytenspezifische Deletion von HILPDA im Mausmodell ein signifikant reduzierter Triglyceridgehalt detektiert werden [102]. Daraus kann man folgern, dass HILPDA entweder einen hemmenden Einfluss auf die Lipolyse in HCC-Zellen hat oder eine Lipidakkumulation durch Förderung der Synthese hervorruft.

La Rosa Rodriguez und Koautoren vertreten die Ansicht, dass HILPDA das Enzym DGAT1 durch direkte physikalische Interaktion stabilisieren kann und damit die Synthese von Triglyceriden fördert [102]. Da das *Silencing* von HILPDA in Adipozyten die Expression von Perilipin1 und PNPLA2/ATGL ansteigen ließ, kommen Dijk und Koautoren in ihrer Arbeit zu dem Schluss, dass HILPDA die Expression von Lipid-assoziierten Proteinen beeinflusst [97]. Mattijssen und Koautoren vertreten die Meinung, dass der durch eine HILPDA-Überexpression hervorgerufene gestiegene Triglyceridgehalt der Leber in einer Verringerung der Sekretion von VLDL-Triglyceriden begründet liegt [112].

HILPDA kann die lipolytische Aktivität des Enzyms ATGL inhibieren und eine direkte physikalische Interaktion zwischen HILPDA und ATGL konnte mittels *FLIM* demonstriert werden [104, 105]. In verschiedenen Zelllinien konnte eine Inhibition von ATGL die durch eine Herunterregulation von HILPDA ausgelöste Verringerung der Lipidtropfengröße und des Triglyceridgehalts verhindern [104, 106, 107]. Neben einer gesteigerten Fettsäureoxidation konnte in Mäusen mit einer hepatozytenspezifischen Deletion von HILPDA eine signifikant gestiegene Glukosetoleranz gezeigt werden [98].

Im Rahmen der Lipidakkumulation im Lebergewebe spielt die Aktivierung inflammatorischer Signalwege eine pathophysiologisch entscheidende Rolle im Entstehungsprozess einer NASH. Während Gimm und Koautoren durch Überexpression von HILPDA eine erhöhte Konzentration an Cytokinen, wie z.B. IL-6,

in HeLa-Zellen nachweisen konnten [94], stellten Van Dierendonck und Koautoren nach HILPDA-Knockdown in Makrophagen keinen Einfluss auf die Sekretion von Cytokinen fest [106]. Da HILPDA in Makrophagen durch Lipidakkumulation und Prostaglandin-E2-Synthese die Schaumzellantstehung fördert, schreiben Meier und Koautoren HILPDA eine Rolle im Progress der Atherosklerose zu [95]. Da im Mainzer Kollektiv zwischen HILPDA-Expression und einer NASH kein Zusammenhang ermittelt werden konnte, bleibt unklar, ob HILPDA eine Rolle in inflammatorischen Prozessen im Rahmen der NASH spielt.

Um einen Erklärungsansatz dafür zu finden, weshalb im untersuchten Kollektiv Patienten mit einer höheren HILPDA-Expression im HCC ein kürzeres Überleben zeigten, untersuchten wir HILPDA-überexprimierende Zellen auf ihr Migrations- und Proliferationsverhalten. Zellmigration spielt im Rahmen eines malignen Krankheitsgeschehens bei beispielsweise Gefäßinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle. Durch die Überexpression von HILPDA in Huh7-Zellen konnte eine signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit verzeichnet werden. Passend dazu verminderte sich die Migrationsgeschwindigkeit von Huh7-Zellen nach Herunterregulation von HILPDA signifikant. Cui und Koautoren konnten einen identischen Einfluss auf Zellmigration und Invasion im Transwell-Assay in HepG2-Zellen zeigen [124]. Infolge eines Knockdown des potenziellen Onkogens PVT1 in HepG2-Zellen konnten Xu und Koautoren eine geminderte HILPDA-Expression, sowie eine Inhibition der Migration und Invasion der Zellen nachweisen [129].

HILPDA stimuliert das Tumorwachstum in Kolonkarzinomen, bei gleichzeitig geminderter Apoptoserate [120]. Dieser stimulierende Einfluss auf das Tumorzellwachstum könnte im HCC ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. In der Tumorpathologie spielt die Messung von Proliferationsraten im Tumorgewebe eine relevante Rolle für die Kategorisierung der Aggressivität einer malignen Entartung. Im HCC-Kollektiv konnte ein mittelstarker positiv gerichtete Zusammenhang zwischen der Expression von HILPDA und Ki67, einem Marker für sich teilende Zellen, detektiert werden. Unter dem Einfluss der HILPDA-Überexpression zeigte sich in Huh7-Zellen eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate um 130%. Passend dazu führte eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von HILPDA zu einer Halbierung des Anteils der PHH3-positiven, proliferierenden Zellen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ermittelten Cui sowie Mao und Koautoren ebenfalls eine Proliferationsminderung (CCK-8 Assay) unter direkter [124] oder indirekter

Expressionsminderung von HILPDA durch Knockdown eines Onkogens [124, 129]. *In vivo* konnte durch HILPDA-Defizienz ein gemindertetes Tumorstadium gemessen werden, wobei Zhang sowie VandeKopple und Koautoren dieses Ergebnis mit einer erhöhten Apoptoserate erklärten [103, 104].

Eine Limitation unserer Arbeit besteht darin, dass der Einfluss einer Überexpression nur in einer in Monokultur gehaltenen Zelllinie untersucht werden kann und damit nicht der pathophysiologische Einfluss von HILPDA *in vivo* in einem Zellverband mit Einfluss des körpereigenen Immunsystems abgebildet werden kann. Eine kürzlich durch Cui und Koautoren publizierte Arbeit untersuchte Tumorzellen in Kokultur mit natürlichen Killerzellen. Die Autoren stellen die Theorie auf, dass Tumorzellen der zellulären Immunabwehr entgehen (*immune escape*), indem die HILPDA-Expression eine Freisetzung von IL-10 bewirkt und damit die Aktivität von Natürlichen Killerzellen unterdrückt wird [124].

Passend dazu korrelierte die HILPDA-Expression in einer Analyse der TCGA-Daten positiv mit einer Tumor-assoziierten Makrophagen-Infiltration (TAM), sowie der Expression von immunsuppressiven Genen wie PD-L1. Hierdurch könnte ein immunsuppressives Tumormikromilieu erzeugt werden, welches den Tumor möglicherweise aggressiver machen könnte [151]. Wenngleich solch ein das Tumorstadium fördernder Effekt durch Interaktion von HILPDA mit dem Immunsystem denkbar ist, konnten wir zeigen, dass HILPDA auch einen funktionellen Einfluss auf die Tumorzelle selbst hat, indem das Protein die Zellproliferation und Migration steigert. HILPDA übt also einen zellautonomen Effekt aus. Ebenso konnten wir durch eine Herunterregulation von HILPDA mithilfe von siRNA beweisen, dass das endogen in HCC-Zellen vorhandene Protein ebenfalls eine Wirksamkeit besitzt.

4.6 Fazit und Ausblick

Im Hinblick auf die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit lässt sich festhalten, dass eine erhöhte HILPDA-Expression mit einer ungünstigeren Gesamtprognose im HCC einhergeht und HILPDA somit einen neuen prognostischen Biomarker für das HCC darstellen könnte. Die Dysregulation von HILPDA scheint ein universell vorkommender Pathomechanismus in verschiedenen Tumorentitäten darzustellen. Zu dieser Erkenntnis passend ist ein Tumorprogress in Form eines Tumorrezidivs, einer Metastasierung oder einer Lymphknoteninvasion mit einer erhöhten HILPDA-Expression assoziiert. Dass HILPDA mit prognostisch ungünstigen

histopathologischen Faktoren wie einem niedrigen Differenzierungsgrad, dem Vorhandensein einer Gefäßinvasion und einer geringen GS-Expression assoziiert ist, macht es verständlich, dass HILPDA in der multivariaten Regressionsanalyse keinen unabhängigen prognostischen Marker darstellt. Mutationen im HILPDA-Gen sind im HCC bislang nicht beschrieben worden [130]. Wir konnten bestätigen, dass durch HILPDA als Lipidtropfen-assoziiertes Protein im Rahmen der Hepatokarzinogenese eine Modifikation des Lipidmetabolismus erfolgt und die HILPDA-Expression unter Hypoxie über eine HIF1 α -Stabilisierung induziert wird. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten die onkogenen Pathomechanismen der HILPDA-Dysregulation beleuchtet werden, indem herausgefunden wurde, dass das endogene HILPDA-Protein einen funktionellen Einfluss auf die Tumorzelle selbst nimmt, indem es die Migrationsgeschwindigkeit und Proliferationsrate steigert. Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass durch eine zielgerichtete Inhibition der HILPDA-Expression im HCC die Proliferationsrate und Migrationspotenz der Tumorzellen eingeschränkt werden und damit beispielsweise einem frühen Tumorrezidiv, einer Lymphknoteninvasion und einer Metastasenbildung entgegengewirkt werden könnte.

Als Ausblick sollen im Folgenden neue zielgerichtete Therapiestrategien für das HCC erläutert und der therapeutische Einsatz von HILPDA diskutiert werden. Unter der Annahme, dass HILPDA ausschließlich im klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC) und embryonalen Nierenzellen exprimiert wird, plädierten Togashi et al für den Einsatz eines humanisierten monoklonalen Anti-HILPDA AK. Da HILPDA jedoch nicht ausschließlich im RCC-Gewebe, sondern auch im nicht-neoplastischen Gewebe exprimiert wird, ist bei dieser Therapieform mit Nebenwirkungen zu rechnen. Da HILPDA als autokriner Wachstumsfaktor im RCC agiert, beschrieben Togashi und Koautoren des Weiteren den möglichen therapeutischen Einsatz eines Rezeptor-Antagonisten. [117]

Um mögliche Behandlungsansätze zu entwickeln, kann die Kenntnis über die Anpassungsmechanismen von Krebszellen an ein hypoxisches Milieu und damit dem Tumorprogress helfen. Da HIFs eine Rolle in der Zellproliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung von HCCs spielen, wird erwartet, dass HIFs ein vielversprechendes therapeutisches Ziel im HCC sein werden [143, 152]. Indirekt würde damit auch die Expression von HILPDA beeinflusst werden. Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, ist ein vielversprechendes adjuvantes

Therapeutikum im Glioblastom, wobei bestimmte Patienten eine Anti-VEGF-Resistenz zeigen [153]. Der Einsatz von Bevacizumab in Kombination mit Atezolizumab, einem Anti-PD-L1 Antikörper, bietet im Vergleich zur Therapie mit Sorafenib einen Überlebensvorteil im HCC [154]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass HILPDA in späten Phasen einer Anti-VEGF-Therapie induziert wird und mit einem Tumorprogress assoziiert ist, weshalb Mao und Koautoren für eine Kombination von Bevacizumab mit einem potenziellen HILPDA-Inhibitor plädieren, um die Resistenz der Tumoren zu überwinden [116]. Zou und Koautoren erkannten in den protektiv gegen ROS wirkenden Glutathionperoxidasen im ccRCC einen potenziellen Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie. HILPDA könnte hierbei als prädiktiver Biomarker dazu dienen, Patienten zu identifizieren, welche von einer Therapie mit GPX4-Inhibitoren profitieren [125].

Die gewonnenen Erkenntnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass es sich lohnt die mechanistischen Hintergründe der HILPDA-Regulation genauer zu verstehen. Um Gene zu identifizieren, welche nach einer HILPDA-Überexpression differenziell überexprimiert werden, wurden in der Arbeitsgruppe ergänzend RNA-Sequenzierungen geplant. Abschließend lässt sich festhalten, dass HILPDA sowohl als prognostischer molekularer Biomarker in der histopathologischen Routinediagnostik, als auch für eine zielgerichtete molekulare Therapie als Zielstruktur vorstellbar ist.

5 Zusammenfassung

Das HCC wird häufig erst in einem späten Krankheitsstadium diagnostiziert, besitzt insgesamt eine ungünstige Gesamtprognose [56] und stellt weltweit damit die dritthäufigste Krebstodesursache dar [7]. Obwohl mithilfe von Tumorklassifikationen wie der BCLC-Klassifikation klinische Entscheidungsprozesse erleichtert und eine prognostische Einordnung ermöglicht werden kann, ist es aufgrund der in den letzten Dekaden steigenden Inzidenz des HCC [6] wünschenswert, eine Präzision der Aussagekraft von etablierten Klassifikationen durch neue immunhistochemische Marker für das HCC zu ermöglichen.

HILPDA (*hypoxia-inducible lipid droplet-associated Protein*) ist ein Lipidtropfen-assoziiertes Protein, welches einen hemmenden Einfluss auf das lipolytische Enzym ATGL besitzt und durch Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF) reguliert wird. Die Rolle von HILPDA wurde bereits in verschiedenen Krebsentitäten untersucht, jedoch noch nicht endgültig entschlüsselt.

Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen eines 561 Patienten umfassenden Gewebekollektivs, bestehend aus HCCs sowie dem jeweils zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe, konnte gezeigt werden, dass HILPDA im Tumorgewebe induziert wird und eine erhöhte HILPDA-Expression signifikant mit einer ungünstigeren Gesamtprognose einhergeht. Im Rahmen der Analyse der HILPDA-Expression auf mRNA-Ebene von HCC-Patienten der TCGA-Datenbank ließ sich ein gleichgerichteter Zusammenhang zwischen erhöhter Expression und verkürzter Überlebenszeit nachweisen. Ein Tumorprogress in Form eines Tumorrezidivs, einer Fernmetastasierung oder einer Lymphknotenmetastasierung sind mit einer erhöhten HILPDA-Expression assoziiert. Dazu passend geht eine hohe HILPDA-Expression mit einem höheren Tumorgrading und tumorösen Gefäßinvasionen einher. Nach der erfolgreichen HILPDA-Überexpression *in vitro* konnte HILPDA auf Proteinebene spezifisch nachgewiesen werden. Die Funktionalität des HILPDA-Überexpressionskonstruktes konnte in HCC-Zelllinien gezeigt werden, da sich nach HILPDA-Überexpression intrazellulär ein signifikant gestiegenes Lipidtropfenvolumen messen ließ. In den HCC-Zelllinien Huh7 und HepG2 konnte durch Hypoxie die HILPDA-Expression induziert werden. Mit Immunfluoreszenzmikroskopie ließ sich nachweisen, dass endogenes HILPDA im HCC diffus zytoplasmatisch sowie verstärkt an Lipidtropfen assoziiert ist und teilweise mit Perilipin1 kolokalisiert. Nach HILPDA-Überexpression steigerte sich *in vitro* die Migrationsgeschwindigkeit und

Proliferationsrate, sodass HILPDA ein Mediator vermehrter Tumoraggressivität im HCC sein könnte. Da sich diese Effekte durch eine Herunterregulation von HILPDA mittels siRNA umkehren ließen, zeigte dies, dass auch das endogen in den HCC-Zellen vorhandene HILPDA eine Wirksamkeit besitzt.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass HILPDA ein möglicher prognostischer molekularer Biomarker in der histopathologischen Routinediagnostik, sowie auch für eine zielgerichtete molekulare Therapie als Ziel vorstellbar wäre. Aus unseren Ergebnissen ergibt sich, dass HILPDA in der Karzinogenese und dem Tumorprogress von HCCs relevant sein könnte. Weiterführend wurden durch die Arbeitsgruppe Straub RNA-Sequenzierungen durchgeführt, um Gene zu identifizieren, welche nach einer HILPDA-Überexpression differenziell überexprimiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.
2. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7:6. doi:10.1038/s41572-020-00240-3.
3. Altekruse SF, Devesa SS, Dickie LA, McGlynn KA, Kleiner DE. Histological classification of liver and intrahepatic bile duct cancers in SEER registries. *J Registry Manag.* 2011;38:201–5.
4. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD). Krebs in Deutschland für 2017/2018. 20. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c22_leber.pdf?__blob=publicationFile.
5. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;69:182–236. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019.
6. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 2017;3:1683–91. doi:10.1001/jamaoncol.2017.3055.
7. International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. Cancer today-Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020. 2020. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Accessed 19 Feb 2021.
8. Onkologie H.: S3-Leitlinie hepatozelluläres Karzinom-Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms: AWMF-Registernummer: 032/053OL. Version 1.0 – Mai 2013.
9. Stefan Silbernagel FL. Taschenatlas Pathophysiologie. 4th ed.: Thieme; 2013.
10. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:938-45, 945.e1-4. doi:10.1016/j.cgh.2007.02.039.
11. Fattovich G, Pantalena M, Zagni I, et al. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort study of 297 patients. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2886–2895.

12. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology*. 2006;43:1303–10. doi:10.1002/hep.21176.
13. Kanwal F, Kramer JR, Asch SM, Cao Y, Li L, El-Serag HB. Long-Term Risk of Hepatocellular Carcinoma in HCV Patients Treated With Direct Acting Antiviral Agents. *Hepatology*. 2020;71:44–55. doi:10.1002/hep.30823.
14. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127:S35-50. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.014.
15. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132:2557–76. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061.
16. Liaw Y-F, Sung JJY, Chow WC, Farrell G, Lee C-Z, Yuen H, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med*. 2004;351:1521–31. doi:10.1056/NEJMoa033364.
17. Papatheodoridis G, Dalekos G, Sypsa V, Yurdaydin C, Buti M, Goulis J, et al. PAGE-B predicts the risk of developing hepatocellular carcinoma in Caucasians with chronic hepatitis B on 5-year antiviral therapy. *J Hepatol*. 2016;64:800–6. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.035.
18. World HO. Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017 - Recommendations. *Vaccine*. 2019;37:223–5. doi:10.1016/j.vaccine.2017.07.046.
19. El-Serag HB, Kanwal F, Richardson P, Kramer J. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2016;64:130–7. doi:10.1002/hep.28535.
20. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011;365:1118–27. doi:10.1056/NEJMra1001683.
21. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: The Effect of Lifetime Intake and Hepatitis Virus Infections in Men and Women. *American Journal of Epidemiology*. 2002:323–31.
22. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015;148:547–55. doi:10.1053/j.gastro.2014.11.039.

23. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* 2012;56:1384–91. doi:10.1016/j.jhep.2011.10.027.
24. Weiß J, Rau M, Geier A. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111:447–52. doi:10.3238/arztebl.2014.0447.
25. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14:124-31.e1. doi:10.1016/j.cgh.2015.07.019.
26. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology.* 2010;51:1820–32. doi:10.1002/hep.23594.
27. Ertle J, Dechêne A, Sowa J-P, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer.* 2011;128:2436–43. doi:10.1002/ijc.25797.
28. Schlesinger S, Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Fedirko V, Trepo E, et al. Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort. *Ann Oncol.* 2013;24:2449–55. doi:10.1093/annonc/mdt204.
29. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Noda M, Tsugane S. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med.* 2006;166:1871–7. doi:10.1001/archinte.166.17.1871.
30. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet.* 2003;362:1907–17. doi:10.1016/S0140-6736(03)14964-1.
31. Malek NP, Schmidt S, Huber P, Manns MP, Greten TF. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111:101–6. doi:10.3238/arztebl.2014.0101.
32. Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, et al. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29:iv238-iv255. doi:10.1093/annonc/mdy308.
33. Lee YJ, Lee JM, Lee JS, Lee HY, Park BH, Kim YH, et al. Hepatocellular carcinoma: diagnostic performance of multidetector CT and MR imaging-a

- systematic review and meta-analysis. *Radiology*. 2015;275:97–109.
doi:10.1148/radiol.14140690.
34. Voesch S, Bitzer M, Blödt S, Follmann M, Freudenberger P, Langer T, et al. S3-Leitlinie: Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome – Version 2.0 – Juni 2021, AWMF-Registernummer: 032-053OL. [Not Available]. *Z Gastroenterol*. 2022;60:e131-e185. doi:10.1055/a-1589-7585.
 35. Christian Wittekind. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 8th ed.: Wiley-VHC-Verlag; 2017.
 36. *Digestive system tumours*. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019.
 37. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver. A study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954;7:462–503. doi:10.1002/1097-0142(195405)7:3<462::AID-CNCR2820070308>3.0.CO;2-E.
 38. Lang H, Sotiropoulos GC, Brokalaki EI, Schmitz KJ, Bertona C, Meyer G, et al. Survival and recurrence rates after resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers. *J Am Coll Surg*. 2007;205:27–36.
doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.03.002.
 39. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*. 2009;49:658–64. doi:10.1002/hep.22709.
 40. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morenghi E, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology*. 2007;45:725–34.
doi:10.1002/hep.21531.
 41. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol*. 2019;71:616–30.
doi:10.1016/j.jhep.2019.06.001.
 42. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149:1226-1239.e4. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.061.
 43. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68:6779–88. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0742.
 44. Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, Chan JA, Brunet J-P, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of

- human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2009;69:7385–92.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1089.
45. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 2017;169:1327-1341.e23. doi:10.1016/j.cell.2017.05.046.
46. Ziol M, Poté N, Amaddeo G, Laurent A, Nault J-C, Oberti F, et al. Macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma: A distinctive histological subtype with clinical relevance. *Hepatology.* 2018;68:103–12.
doi:10.1002/hep.29762.
47. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc J-F, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol.* 2017;67:727–38.
doi:10.1016/j.jhep.2017.05.014.
48. Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology.* 2006;49:138–51. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02468.x.
49. Miltiados O, Sia D, Hoshida Y, Fiel MI, Harrington AN, Thung SN, et al. Progenitor cell markers predict outcome of patients with hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria undergoing liver transplantation. *J Hepatol.* 2015;63:1368–77. doi:10.1016/j.jhep.2015.07.025.
50. Lee J-S, Heo J, Libbrecht L, Chu I-S, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med.* 2006;12:410–6. doi:10.1038/nm1377.
51. Salomao M, Yu WM, Brown RS, Emond JC, Lefkowitz JH. Steatohepatic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1630–6. doi:10.1097/PAS.0b013e3181f31caa.
52. Mayo SC, Mavros MN, Nathan H, Cosgrove D, Herman JM, Kamel I, et al. Treatment and prognosis of patients with fibrolamellar hepatocellular carcinoma: a national perspective. *J Am Coll Surg.* 2014;218:196–205.
doi:10.1016/j.jamcollsurg.2013.10.011.
53. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16018.
doi:10.1038/nrdp.2016.18.

54. Boyault S, Rickman DS, Reyniès A de, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007;45:42–52. doi:10.1002/hep.21467.
55. Lachenmayer A, Alsinet C, Savic R, Cabellos L, Toffanin S, Hoshida Y, et al. Wnt-pathway activation in two molecular classes of hepatocellular carcinoma and experimental modulation by sorafenib. *Clin Cancer Res*. 2012;18:4997–5007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2322.
56. Krebs - Leberkrebs. 19.02.2021.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leberkrebs/leberkrebs_node.html. Accessed 19 Feb 2021.
57. Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology*. 2005;41:707–16. doi:10.1002/hep.20636.
58. Cillo U, Bassanello M, Vitale A, Grigoletto FA, Burra P, Fagiuoli S, et al. The critical issue of hepatocellular carcinoma prognostic classification: which is the best tool available? *J Hepatol*. 2004;40:124–31. doi:10.1016/j.jhep.2003.09.027.
59. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19:329–38. doi:10.1055/s-2007-1007122.
60. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334:693–9. doi:10.1056/NEJM199603143341104.
61. Cherqui D, Laurent A, Mocellin N, Tayar C, Luciani A, van Nhieu JT, et al. Liver resection for transplantable hepatocellular carcinoma: long-term survival and role of secondary liver transplantation. *Ann Surg*. 2009;250:738–46. doi:10.1097/SLA.0b013e3181bd582b.
62. Abdel-Wahab M, El-Husseiny TS, El Hanafy E, El Shobary M, Hamdy E. Prognostic factors affecting survival and recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver. *Langenbecks Arch Surg*. 2010;395:625–32. doi:10.1007/s00423-010-0643-0.
63. Faber W, Sharafi S, Stockmann M, Denecke T, Sinn B, Puhl G, et al. Long-term results of liver resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver. *Surgery*. 2013;153:510–7. doi:10.1016/j.surg.2012.09.015.

64. Mazzaferro Vincenzo, Regalia Enrico, Doci Roberto, Andreola Salvatore, Pulvirenti Andrea, Bozzetti Federico, et al. Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis.
65. Yang A, Ju W, Yuan X, Han M, Wang X, Guo Z, et al. Comparison between liver resection and liver transplantation on outcomes in patients with solitary hepatocellular carcinoma meeting UNOS criteria: a population-based study of the SEER database. *Oncotarget*. 2017;8:97428–38. doi:10.18632/oncotarget.22134.
66. Krenzien F, Schmelzle M, Struecker B, Raschzok N, Benzing C, Jara M, et al. Liver Transplantation and Liver Resection for Cirrhotic Patients with Hepatocellular Carcinoma: Comparison of Long-Term Survivals. *J Gastrointest Surg*. 2018;22:840–8. doi:10.1007/s11605-018-3690-4.
67. Vitale A, Saracino E, Boccagni P, Brolese A, D'Amico F, Gringeri E, et al. Validation of the BCLC prognostic system in surgical hepatocellular cancer patients. *Transplant Proc*. 2009;41:1260–3. doi:10.1016/j.transproceed.2009.03.054.
68. Bruix J, Takayama T, Mazzaferro V, Chau G-Y, Yang J, Kudo M, et al. Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16:1344–54. doi:10.1016/S1470-2045(15)00198-9.
69. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37:429–42. doi:10.1053/jhep.2003.50047.
70. Wörns MA, Koch S, Niederle IM, Marquardt JU, Nguyen-Tat M, Gamstätter T, et al. The impact of patient and tumour baseline characteristics on the overall survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Dig Liver Dis*. 2013;45:408–13. doi:10.1016/j.dld.2012.10.010.
71. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020;382:1894–905. doi:10.1056/NEJMoa1915745.
72. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2018;391:1163–73. doi:10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
73. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment

- (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;389:56–66. doi:10.1016/S0140-6736(16)32453-9.
74. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;379:54–63. doi:10.1056/NEJMoa1717002.
75. Zhu AX, Kang Y-K, Yen C-J, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, et al. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20:282–96. doi:10.1016/S1470-2045(18)30937-9.
76. Dupont-Bierre E, Compagnon P, Raoul J-L, Fayet G, Lajarte-Thirouard A-S de, Boudjema K. Resection of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: analysis of risk factors for survival. *J Am Coll Surg*. 2005;201:663–70. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2005.06.265.
77. Bège T, Le Treut YP, Hardwigsen J, Ananian P, Richa H, Campan P, Garcia S. Prognostic factors after resection for hepatocellular carcinoma in nonfibrotic or moderately fibrotic liver. A 116-case European series. *J Gastrointest Surg*. 2007;11:619–25. doi:10.1007/s11605-006-0023-9.
78. Bruix J, Cheng A-L, Meinhardt G, Nakajima K, Sanctis Y de, Llovet J. Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies. *J Hepatol*. 2017;67:999–1008. doi:10.1016/j.jhep.2017.06.026.
79. Laurent C, Blanc JF, Nobili S, Sa Cunha A, Le Bail B, Bioulac-Sage P, et al. Prognostic factors and longterm survival after hepatic resection for hepatocellular carcinoma originating from noncirrhotic liver. *J Am Coll Surg*. 2005;201:656–62. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2005.05.027.
80. N. Nagasue. Prognostic factors and survival after hepatic resection for hepatocellular carcinoma without cirrhosis. *British Journal of Surgery*. 2001:515–22.
81. Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51:1274–83. doi:10.1002/hep.23485.
82. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, et al. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new

- evidence-based approach-the ALBI grade. *J Clin Oncol*. 2015;33:550–8. doi:10.1200/JCO.2014.57.9151.
83. Toyoda H, Lai PBS, O'Beirne J, Chong CC, Berhane S, Reeves H, et al. Long-term impact of liver function on curative therapy for hepatocellular carcinoma: application of the ALBI grade. *Br J Cancer*. 2016;114:744–50. doi:10.1038/bjc.2016.33.
84. Berry K, Ioannou GN. Serum alpha-fetoprotein level independently predicts posttransplant survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2013;19:634–45. doi:10.1002/lt.23652.
85. Yao FY, Mehta N, Flemming J, Dodge J, Hameed B, Fix O, et al. Downstaging of hepatocellular cancer before liver transplant: long-term outcome compared to tumors within Milan criteria. *Hepatology*. 2015;61:1968–77. doi:10.1002/hep.27752.
86. Hameed B, Mehta N, Sapisochin G, Roberts JP, Yao FY. Alpha-fetoprotein level 1000 ng/mL as an exclusion criterion for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria. *Liver Transpl*. 2014;20:945–51. doi:10.1002/lt.23904.
87. Duvoux C, Roudot-Thoraval F, Decaens T, Pessione F, Badran H, Piardi T, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a model including α -fetoprotein improves the performance of Milan criteria. *Gastroenterology*. 2012;143:986-94.e3; quiz e14-5. doi:10.1053/j.gastro.2012.05.052.
88. Toyoda H, Kumada T, Osaki Y, Oka H, Urano F, Kudo M, Matsunaga T. Staging hepatocellular carcinoma by a novel scoring system (BALAD score) based on serum markers. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:1528–36. doi:10.1016/j.cgh.2006.09.021.
89. Fox R, Berhane S, Teng M, Cox T, Tada T, Toyoda H, et al. Biomarker-based prognosis in hepatocellular carcinoma: validation and extension of the BALAD model. *Br J Cancer*. 2014;110:2090–8. doi:10.1038/bjc.2014.130.
90. Weinmann A, Alt Y, Koch S, Nelles C, Düber C, Lang H, et al. Treatment and survival of non-alcoholic steatohepatitis associated hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2015;15:210. doi:10.1186/s12885-015-1197-x.
91. Jessica Dyson. Hepatocellular cancer: The impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol*. 2014;60:1–2. doi:10.1016/j.jhep.2013.10.003.

92. Denko, N., Schindler, C., Koong, A., Laderoute, K., Green, C., and Giaccia, A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research*. 2000:480–7.
93. La Rosa Rodriguez MA de, Kersten S. Regulation of lipid droplet homeostasis by hypoxia inducible lipid droplet associated HILPDA. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865:158738. doi:10.1016/j.bbali.2020.158738.
94. Gimm T, Wiese M, Teschemacher B, Deggerich A, Schödel J, Knaup KX, et al. Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB J*. 2010;24:4443–58. doi:10.1096/fj.10-159806.
95. Maier A, Wu H, Cordasic N, Oefner P, Dietel B, Thiele C, et al. Hypoxia-inducible protein 2 Hig2/Hilpda mediates neutral lipid accumulation in macrophages and contributes to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *FASEB J*. 2017;31:4971–84. doi:10.1096/fj.201700235R.
96. Bray JD, Jelinsky S, Ghatge R, Bray JA, Tunkey C, Saraf K, et al. Quantitative analysis of gene regulation by seven clinically relevant progestins suggests a highly similar mechanism of action through progesterone receptors in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97:328–41. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.06.032.
97. Dijk W, Mattijssen F, La Rosa Rodriguez M de, Loza Valdes A, Loft A, Mandrup S, et al. Hypoxia-Inducible Lipid Droplet-Associated Is Not a Direct Physiological Regulator of Lipolysis in Adipose Tissue. *Endocrinology*. 2017;158:1231–51. doi:10.1210/en.2016-1809.
98. DiStefano MT, Danai LV, Roth Flach RJ, Chawla A, Pedersen DJ, Guilherme A, Czech MP. The Lipid Droplet Protein Hypoxia-inducible Gene 2 Promotes Hepatic Triglyceride Deposition by Inhibiting Lipolysis. *J Biol Chem*. 2015;290:15175–84. doi:10.1074/jbc.M115.650184.
99. DiStefano MT, Roth Flach RJ, Senol-Cosar O, Danai LV, Virbasius JV, Nicoloso SM, et al. Adipocyte-specific Hypoxia-inducible gene 2 promotes fat deposition and diet-induced insulin resistance. *Mol Metab*. 2016;5:1149–61. doi:10.1016/j.molmet.2016.09.009.
100. Nishimura S, Tsuda H, Ito K, Takano M, Terai Y, Jobo T, et al. Differential expression of hypoxia-inducible protein 2 among different histological types of epithelial ovarian cancer and in clear cell adenocarcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20:220–6. doi:10.1111/IGC.0b013e3181ca1e16.

101. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 2006;3:309–19. doi:10.1016/j.cmet.2006.03.005.
102. La Rosa Rodriguez MA de, Deng L, Gemmink A, van Weeghel M, Aoun ML, Warnecke C, et al. Hypoxia-inducible lipid droplet-associated induces DGAT1 and promotes lipid storage in hepatocytes. *Mol Metab* 2021. doi:10.1016/j.molmet.2021.101168.
103. VandeKopple MJ, Wu J, Auer EN, Giaccia AJ, Denko NC, Papandreou I. HILPDA regulates lipid metabolism, lipid droplet abundance and response to microenvironmental stress in solid tumors. *Mol Cancer Res* 2019. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-1343.
104. Zhang X, Saarinen AM, Hitosugi T, Wang Z, Wang L, Ho TH, Liu J. Inhibition of intracellular lipolysis promotes human cancer cell adaptation to hypoxia. *Elife* 2017. doi:10.7554/eLife.31132.
105. Padmanabha Das KM, Wechselberger L, Liziczai M, La Rosa Rodriguez M de, Grabner GF, Heier C, et al. Hypoxia-inducible lipid droplet-associated protein inhibits adipose triglyceride lipase. *J Lipid Res.* 2018;59:531–41. doi:10.1194/jlr.M082388.
106. van Dierendonck XAMH, La Rosa Rodriguez MA de, Georgiadi A, Mattijssen F, Dijk W, van Weeghel M, et al. HILPDA Uncouples Lipid Droplet Accumulation in Adipose Tissue Macrophages from Inflammation and Metabolic Dysregulation. *Cell Rep.* 2020;30:1811-1822.e6. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.046.
107. VandeKopple MJ, Wu J, Baer LA, Bal NC, Maurya SK, Kalyanasundaram A, et al. Stress-responsive HILPDA is necessary for thermoregulation during fasting. *J Endocrinol.* 2017;235:27–38. doi:10.1530/JOE-17-0289.
108. Cerk IK, Salzburger B, Boeszoermenyi A, Heier C, Phillip C, Romauch M, et al. A peptide derived from G0/G1 switch gene 2 acts as noncompetitive inhibitor of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem.* 2014;289:32559–70. doi:10.1074/jbc.M114.602599.
109. Yang X, Lu X, Lombès M, Rha GB, Chi Y-I, Guerin TM, et al. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab.* 2010;11:194–205. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.003.

110. Sander Kersten, Be atrice Desvergne & Walter Wahli. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*;2000:421–4.
111. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812:1007–22. doi:10.1016/j.bbadis.2011.02.014.
112. Mattijssen F, Georgiadi A, Andasarie T, Szalowska E, Zota A, Kronen-Herzig A, et al. Hypoxia-inducible lipid droplet-associated (HILPDA) is a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target involved in hepatic triglyceride secretion. *J Biol Chem*. 2014;289:19279–93. doi:10.1074/jbc.M114.570044.
113. Petkevicius K, Bidault G, Virtue S, Jenkins B, van Dierendonck XAMH, Dugourd A, et al. Norepinephrine promotes triglyceride storage in macrophages via beta2-adrenergic receptor activation. *FASEB J*. 2021;35:e21266. doi:10.1096/fj.202001101R.
114. Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in lipid research*. 2004;43:134–76. doi:10.1016/s0163-7827(03)00051-1.
115. Applebaum MA, Jha AR, Kao C, Hernandez KM, DeWane G, Salwen HR, et al. Integrative genomics reveals hypoxia inducible genes that are associated with a poor prognosis in neuroblastoma patients. *Oncotarget*. 2016;7:76816–26. doi:10.18632/oncotarget.12713.
116. Mao X-G, Wang C, Liu D-Y, Zhang X, Wang L, Yan M, et al. Hypoxia upregulates HIG2 expression and contributes to bevacizumab resistance in glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7:47808–20. doi:10.18632/oncotarget.10029.
117. Togashi A, Katagiri T, Ashida S, Fujioka T, Maruyama O, Wakumoto Y, et al. Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res*. 2005;65:4817–26. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0120.
118. van der Mijn JC, Fu L, Khani F, Zhang T, Molina AM, Barbieri CE, et al. Combined Metabolomics and Genome-Wide Transcriptomics Analyses Show Multiple HIF1 -Induced Changes in Lipid Metabolism in Early Stage Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Transl Oncol*. 2020;13:177–85. doi:10.1016/j.tranon.2019.10.015.

119. Zhao H, Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T, Tibshirani R, Brooks JD. Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS Med.* 2006;3:e13. doi:10.1371/journal.pmed.0030013.
120. Kim S-H, Wang D, Park Y-Y, Kato H, Margalit O, Sheffer M, et al. HIG2 promotes colorectal cancer progression via hypoxia-dependent and independent pathways. *Cancer Lett.* 2013;341:159–65. doi:10.1016/j.canlet.2013.07.028.
121. Bai R, Rebelo A, Kleeff J, Sunami Y. Identification of prognostic lipid droplet-associated genes in pancreatic cancer patients via bioinformatics analysis. *Lipids Health Dis.* 2021;20:58. doi:10.1186/s12944-021-01476-y.
122. Zhang Y, Pang C, Zhang C, Wang Y, Wang P, Chen Y, et al. HILPDA-mediated lipidomic remodelling promotes radiotherapy resistance in nasopharyngeal carcinoma by accelerating mitophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2023;80:242. doi:10.1007/s00018-023-04891-9.
123. Kenny PA, Enver T, Ashworth A. Receptor and secreted targets of Wnt-1/beta-catenin signalling in mouse mammary epithelial cells. *BMC Cancer.* 2005;5:3. doi:10.1186/1471-2407-5-3.
124. Cui C, Fu K, Yang L, Wu S, Cen Z, Meng X, et al. Hypoxia-inducible gene 2 promotes the immune escape of hepatocellular carcinoma from nature killer cells through the interleukin-10-STAT3 signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38:229. doi:10.1186/s13046-019-1233-9.
125. Zou Y, Palte MJ, Deik AA, Li H, Eaton JK, Wang W, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. *Nat Commun.* 2019;10:1617. doi:10.1038/s41467-019-09277-9.
126. Chiou S-H, Risca VI, Wang GX, Yang D, Grüner BM, Kathiria AS, et al. BLIMP1 Induces Transient Metastatic Heterogeneity in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 2017;7:1184–99. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0250.
127. Grachan JJ, Kery M, Giaccia AJ, Denko NC, Papandreou I. Lipid droplet storage promotes murine pancreatic tumor growth. *Oncol Rep* 2021. doi:10.3892/or.2021.7972.
128. Wang X, Zou A, Zhang J, Gao G, Shan W, Li J, Liu X. High expression of HILPDA is an adverse prognostic prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2023;102:e33145. doi:10.1097/MD.00000000000033145.
129. Xu Y, Luo X, He W, Chen G, Li Y, Li W, et al. Long Non-Coding RNA PVT1/miR-150/ HIG2 Axis Regulates the Proliferation, Invasion and the Balance

- of Iron Metabolism of Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49:1403–19. doi:10.1159/000493445.
130. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* 2017. doi:10.1126/science.aan2507.
131. Sangineto M, Villani R, Cavallone F, Romano A, Loizzi D, Serviddio G. Lipid Metabolism in Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020. doi:10.3390/cancers12061419.
132. Weinmann A, Koch S, Niederle IM, Schulze-Bergkamen H, König J, Hoppe-Lotichius M, et al. Trends in epidemiology, treatment, and survival of hepatocellular carcinoma patients between 1998 and 2009: an analysis of 1066 cases of a German HCC Registry. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48:279–89. doi:10.1097/MCG.0b013e3182a8a793.
133. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS ONE*. 2012;7:e51862. doi:10.1371/journal.pone.0051862.
134. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> n.d.
135. Venables WN, Ripley BD. Modern Applied Statistics with S. In: Venables WN, Ripley BD, editors. *Modern Applied Statistics with S*: New York, NY: Springer.
136. Ridder DA, Schindeldecker M, Weinmann A, Berndt K, Urbansky L, Witzel HR, et al. Key Enzymes in Pyrimidine Synthesis, CAD and CPS1, Predict Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021. doi:10.3390/cancers13040744.
137. Winter SC, Buffa FM, Silva P, Miller C, Valentine HR, Turley H, et al. Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers. *Cancer Res*. 2007;67:3441–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3322.
138. Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C, Blanc J-F, Saric J, Sa Cunha A, et al. Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. *Hepatology*. 2007;46:740–8. doi:10.1002/hep.21743.
139. Zhu C, Liu X, Wang S, Yan X, Tang Z, Wu K, et al. Hepatitis C virus core protein induces hypoxia-inducible factor 1 α -mediated vascular endothelial growth

- factor expression in Huh7.5.1 cells. *Mol Med Rep.* 2014;9:2010–4.
doi:10.3892/mmr.2014.2039.
140. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology.* 2007;9:1089–97. doi:10.1038/ncb1631.
141. Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127:S79-86. doi:10.1016/j.gastro.2004.09.019.
142. Hagist S, Sülthmann H, Millonig G, Hebling U, Kieslich D, Kuner R, et al. In vitro-targeted gene identification in patients with hepatitis C using a genome-wide microarray technology. *Hepatology.* 2009;49:378–86. doi:10.1002/hep.22677.
143. Lin D, Wu J. Hypoxia inducible factor in hepatocellular carcinoma: A therapeutic target. *World J Gastroenterol.* 2015;21:12171–8.
doi:10.3748/wjg.v21.i42.12171.
144. Chen L, Endler A, Shibasaki F. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med.* 2009;41:849–57. doi:10.3858/emm.2009.41.12.103.
145. Schoenleber SJ, Kurtz DM, Talwalkar JA, Roberts LR, Gores GJ. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2009;100:1385–92.
doi:10.1038/sj.bjc.6605017.
146. Llovet JM, Peña CEA, Lathia CD, Shan M, Meinhardt G, Bruix J. Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2290–300. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2175.
147. Méndez-Blanco C, Fernández-Palanca P, Fondevila F, González-Gallego J, Mauriz JL. Prognostic and clinicopathological significance of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α in hepatocellular carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Ther Adv Med Oncol.* 2021;13:1758835920987071.
doi:10.1177/1758835920987071.
148. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, Peck B, Lord S, Collins JM, et al. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep.* 2014;9:349–65.
doi:10.1016/j.celrep.2014.08.056.

149. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006;91:807–19. doi:10.1113/expphysiol.2006.033506.
150. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017;1862:1221–32. doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.009.
151. Liu C, Zhou X, Zeng H, Wu D, Liu L. HILPDA Is a Prognostic Biomarker and Correlates With Macrophage Infiltration in Pan-Cancer. *Front Oncol.* 2021;11:597860. doi:10.3389/fonc.2021.597860.
152. Guo Y, Xiao Z, Yang L, Gao Y, Zhu Q, Hu L, et al. Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep.* 2020;43:3–15. doi:10.3892/or.2019.7397.
153. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370:699–708. doi:10.1056/NEJMoa1308573.
154. Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, Maini MK, Mazzaferro V, Pinato DJ, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19:151–72. doi:10.1038/s41571-021-00573-2.
155. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5:649–55.
156. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg.* 1964;1:1–85.

7 Anhang

Tabelle 26 ECOG-Status zur Beurteilung des Allgemeinzustands (Eastern Cooperative Oncology Group) nach Oken et al., 1982 [155]

ECOG	Allgemeinzustand
0	normale uneingeschränkte Aktivität
1	deutliche Minderung der Belastbarkeit, selbstständige Versorgung
2	gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig
3	begrenzte Selbstversorgung, > 50% der Wachheit an Bett oder Stuhl gebunden
4	pflegebedürftig ohne Selbstversorgung, völlig an Bett oder Stuhl gebunden
5	tot

Tabelle 27 Child-Pugh-Klassifikation, nach Child und Turcotte, 1964 [156]

Punkte	1	2	3
Albuminkonzentration im Serum [g/dl]	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Bilirubinkonzentration im Serum [mg/dl]	<2,0	2,0-3,0	>3,0
Quick- Wert [%]	>70	40-70	<40
Aszites (sonografisch)	kein	mäßig	viel
Hepatische Enzephalitis	Keine	Grad I-II	>Grad III

Child A: 5-6 Pkt., Child B: 7-9 Pkt., Child C: 10-15 Pkt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlich allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Als Institutsleiter danke ich ..., für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit am Pathologischen Institut der Universitätsmedizin Mainz. Ich bedanke mich herzlich bei meiner Doktormutter ... dafür, dass Sie es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit im Rahmen dieses Projektes zu schreiben und mir jederzeit unterstützend zur Seite stand.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer ..., für das spannende und herausfordernde Thema dieser Arbeit, die gute Betreuung und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich ... dafür danken, dass er mir das wissenschaftliche Handwerk beigebracht hat und jederzeit rat- und tatkräftig im Labor zur Seite stand. Ferner danke ich ... für das aufwendige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt den weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises ..., die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen und mich herzlich ins Team aufnahmen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Laborleiterin ... und dem gesamten Arbeitskreis für die freundliche Aufnahme, das harmonische Arbeitsklima und natürlich die Ermöglichung der Durchführung meiner Doktorarbeit in den Laborräumlichkeiten. Des Weiteren danke ich ... für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Immunhistochemie und ... für das Anfertigen der statistischen Auswertung.

Ich möchte mich bei ... aus der I. Medizinischen Klinik sowie ... aus der Viszeralchirurgie für die zur Verfügung gestellten klinische Daten und die wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke dem Institut für Translationale Onkologie Mainz (TRON) für den wissenschaftlichen Austausch und die Einarbeitung in die Herstellung eines Tris-Tricingels zur Auftrennung von Proteinen mit geringem Molekulargewicht.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, sowie insbesondere meinem Ehemann, für ihre bedingungslose moralische Unterstützung während meines Studiums und während dieser Promotionsarbeit.

Lebenslauf