

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der NF- $\kappa$ B essential modulator als diagnostischer Biomarker in  
der Kanzerogenese

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christine Tarnogrocki geb. Brümman

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Zusammenfassung/Abstract</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 Kanzerogenese	4
2.2 Hepatozelluläres Karzinom	7
2.2.1 Epidemiologie	7
2.2.2 Pathogenese	7
2.2.3 Diagnostik	8
2.2.4 Therapie	10
2.3 Cholangiozelluläres Karzinom	11
2.3.1 Epidemiologie	11
2.3.2 Pathogenese	11
2.3.3 Diagnostik	13
2.3.4 Therapie	14
2.4 Kolorektale Lebermetastasen	15
2.4.1 Epidemiologie	15
2.4.2 Pathogenese	15
2.4.3 Diagnostik	17
2.4.4 Therapie	17
2.5 Der nukleäre Transkriptionsfaktor $\kappa$ B in der Kanzerogenese	18
2.5.1 NF- $\kappa$ B-Signalkaskade	19
2.5.2 NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) - Struktur	20
2.5.2.1 NEMO - Funktionen im NF- $\kappa$ B-Signalweg	21
2.5.2.2 NEMO - NF- $\kappa$ B unabhängige Funktion	22
2.5.2.3 Die Rolle von NEMO in der Kanzerogenese des HCC im Mausmodell	22
2.5.2.4 Die Rolle von NEMO in der Kanzerogenese des humanen HCC	24
2.5.2.5 Die Rolle von NEMO in der Kanzerogenese des CCC und des kolorektalen Karzinoms	25
2.5.3 Feedbackhemmung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade durch das	

Cylindromatosis Gen	25
<b>3. Zielsetzung dieser Dissertation</b>	<b>27</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
4.1 Materialien	28
4.1.1 Geräte	28
4.1.2 Verbrauchsmaterial	29
4.1.3 Chemikalien	29
4.1.4 Lösungen und Puffer	30
4.1.4.1 Extraktion Protein - Puffer	30
4.1.4.2 Western Blot - Lösungen und Puffer	31
4.1.4.3 Western Blot - Gele	31
4.1.4.4 Western Blot - Detektion mittels ECL	32
4.1.5 Kits und Assays	32
4.1.6 Antikörper	33
4.1.7 Humane Gewebeproben	33
4.1.8 Humane Hepatozyten	34
4.2 Methoden	34
4.2.1 Zellbiologische Methoden	34
4.2.1.1 Zellkultur	34
4.2.1.2 Kultivierung von humanen Hepatozyten	34
4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl	35
4.2.1.4 Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$	35
4.2.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden	35
4.2.2.1 Proteinisolierung im Zytosol und Kern	35
4.2.2.2 Extraktion von Protein mittels NucleoSpin <sup>®</sup> RNA/Protein	36
4.2.2.3 Messung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode	36
4.2.2.4 Western Blot	37
4.2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
4.2.2.4.2 Proteintransfer und Antikörperdetektion	38
4.2.3 Molekularbiologische Methoden	39
4.2.3.1 RNA-Isolierung nach Trizol	39

4.2.3.2 Extraktion von totalRNA mittels NucleoSpin® RNA/Protein	40
4.2.3.3 Messung der RNA-Konzentration	40
4.2.3.4 DNase-Verdau	40
4.2.3.5 Synthese der komplementären DNA	41
4.2.3.6 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR)	42
4.3 Datenbanken und Software	43
4.4 Statistische Auswertungen	43
4.4.1 Deskriptive Statistik	43
4.4.2 Kruskal-Wallis-Test / Mann-Whitney-U-Test	43
4.4.3 ROC (Receiver operating characteristic) - Analyse	44
4.4.4 Korrelation nach Spearman	45
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
5.1 Vorversuche	46
5.2 Patientenkollektiv	48
5.3 Expression von NEMO auf mRNA- und Protein-Ebene	50
5.4 NEMO als Marker zur Unterscheidung von Diagnosen	50
5.4.1 NEMO-mRNA-Expression im HCC, CCC und mCRC	50
5.4.2 NEMO-Protein-Expression im HCC, CCC und mCRC	51
5.5 NEMO als Marker zur Analyse der Tumorausdehnung	55
5.5.1 NEMO-mRNA-Expression in den Tumorstadien T1 – T4	56
5.5.2 NEMO-Protein-Expression in den Tumorstadien T1 – T4	56
5.6 NEMO als Marker zur Analyse des Differenzierungsgrades	58
5.6.1 NEMO-mRNA-Expression in den Differenzierungsgraden G1 – G3	58
5.6.2 NEMO-Protein-Expression in den Differenzierungsgraden G1 – G3	61
5.7 NEMO als Marker zur Entwicklung eines Rezidives	65
5.7.1 NEMO-mRNA-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiv- entwicklung	65
5.7.2 NEMO-Protein-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiv- entwicklung	67
5.8 NEMO in der steatotischen Leber	69
5.9 Korrelation zwischen der NEMO-Expression und dem Geschlecht und dem Alter	71

5.10 Korrelation zwischen der NEMO-mRNA-Expression und CYLD	71
<b>6. Diskussion</b>	<b>73</b>
6.1 NEMO als Marker zur Analyse von Diagnosen	73
6.2 NEMO als Marker zur Analyse der Tumorausdehnung	77
6.3 NEMO als Marker zur Analyse des Differenzierungsgrades und der Rezidiventwicklung	78
6.4 NEMO in der steatotischen Leber	83
6.5 CYLD	86
6.6 Ausblick	88
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>103</b>
<b>11. Lebenslauf</b>	<b>104</b>
<b>12. Danksagung</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt sind die im deutschen Sprachgebrauch üblichen Standard-abkürzungen.

5-JÜ	5-Jahresüberlebensrate
A	Absorptionseinheit
A	Amper
AFP	Alpha-Fetoprotein
AKT	Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase
ALT	Alaninaminotransferase
APC	Adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aspartataminotransferase
AUC	area under the curve
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BSA	Bovines Kälberserum
CA19-9	Carboanhydrate-Antigen
CC	Coiled-coil
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CCSA-2	Colon cancer specific antigen
CEA	Carcinoembryonale Antigen
COX-2	Cyclooxygenase 2
CYLD	Cylindromatosis
DCC	Deleted in colorectal cancer
DCP	Des-γ-carboxy-Prothrombin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
FADD	Das assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLOBOCAN	Cancer Incidence and Mortality Worldwide
GOLPH2	Golgi-Phosphoprotein
GPC3	Glypican-3
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HRP	Meerrettichperoxidase
IGF	Insulin-like growth factor

## Abkürzungsverzeichnis

IKK	I $\kappa$ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
I $\kappa$ B $\alpha$	NF- $\kappa$ B Inhibitor
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
KI	Konfidenzintervall
LUBAC	Linear ubiquitin chain assembly complex
LZ	Leucin-Zipper
mCRC	metastasiertes kolorektales Karzinom
MMR-Gen	Mismatch-Repair-Gen
MOD	minimale Oligomerisierungs-Domäne
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NAFLD	Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NBD	NEMO-Bindungsdomäne
NEMO, IKK $\gamma$	NF- $\kappa$ B essential modulator
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor $\kappa$ B
NPV	negativer prädiktiver Wert
OD	optische Dichte
PGE	Prostaglandin
PI	Protease-Inhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPV	positiver prädiktiver Wert
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RIP-1	Rezeptor-interagierendes Protein 1
ROC	Receiver operating characteristics
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAK1	MAP3-kinase TGF $\beta$ -activated kinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRADD	Tumour necrosis factor receptor 1-associated death domain protein
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TSG	Tumorsuppressorgen
UBAN	Ubiquitin binding in Abin und NEMO

## 1. Zusammenfassung

Einleitung: In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression des NF- $\kappa$ B essential modulator NEMO im humanen hepatozellulären Karzinom (HCC) (n = 11), im humanen cholangiozellulären Karzinom (CCC) (n = 12) sowie in humanen kolorektalen Lebermetastasen (mCRC) (n = 12) genauer untersucht. Es ist bereits bekannt, dass der nukleäre Transkriptionsfaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), dessen Aktivität durch NEMO reguliert wird, eine Schlüsselrolle bei der Inflammation, der Antwort auf oxidativen Stress sowie in der Karzinogenese durch die Regulation antiapoptischer und die Zellproliferation fördernder Zielgene spielt. Im Mausmodell hat sich gezeigt, dass NEMO entscheidend die Hepatokarzinogenese beeinflusst. Untersuchungen zur Expression im CCC oder im mCRC liegen derzeit noch nicht vor. Methodik: Die humanen Gewebeproben, die in dieser Dissertation analysiert wurden, wurden im Rahmen von Hemihepatektomien entnommen und die NEMO-Expression mittels Real-Time-PCR und mittels Western Blot bestimmt. Ergebnisse: Da aktuell für die untersuchten Tumorarten noch keine hochsensitiven und hochspezifischen Tumormarker für die Früherkennung existieren, wurde zunächst ermittelt, ob sich Expression von NEMO in den untersuchten Tumoren unterscheidet. In allen Tumorgewebe wurde NEMO auf mRNA-Ebene vermindert und auf Protein-Ebene vermehrt exprimiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorgruppen. Die Werte für die Sensitivität und Spezifität, die mittels ROC-Analyse ermittelt wurden, befanden sich im mittleren Bereich (HCC: Sensitivität: 73-82%, Spezifität: 63-71%; CCC: Sensitivität: 75%, Spezifität: 61-79%; mCRC: nicht signifikant). Die Analyse des Einflusses von NEMO auf klinisch-pathologische Parameter zeigte, dass sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene mit steigender TumorgroÙe bzw. Ausdehnung im Trend höhere Expressionswerte gemäß der Literatur gemessen wurden.

Eine signifikante Verminderung von NEMO ließ sich in schlecht differenzierten Tumoren (G3) nachweisen (mRNA: p-Wert = 0,0004; HCC: p-Wert = 0,006; CCC: p-Wert = 0,008). In der Gruppe mCRC war die Expression im G3-Tumor zwar vermindert, jedoch nicht signifikant (p-Wert = 0,416). Bei einem Cut-Off-Wert von 42% (HCC) bzw. 40,5% (CCC), d.h. einer relativen mRNA-Erniedrigung im Tumorgewebe, wurden die Proben insbesondere in der Gruppe HCC hochsensitiv (100%) und hochspezifisch (100%) (CCC: Sensitivität: 75%, Spezifität: 87,5%) dem Differenzierungsgrad zugeordnet. Auf Proteinebene zeigte sich insgesamt eine Verminderung der relativen Protein-

## 1. Zusammenfassung/Abstract

Expression im G3-Tumor im Vergleich zum nichtmalignen Referenzgewebe (p-Wert = 0,001; HCC: p-Wert = 0,008; CCC: p-Wert = 0,062; mCRC: p-Wert = 0,112). In der Gruppe HCC wurden alle Differenzierungsgrade anhand des NEMO-Protein-Levels erkannt. Der Test war zu 100% sensitiv und spezifisch.

Für einen direkten Zusammenhang zwischen NEMO und der humanen Steatoseentwicklung wie sie sich im Mausmodell zeigte, gibt es in dieser Studie keinen Anhaltspunkt.

Schlussfolgerung: Insgesamt zeigt diese Studie, dass NEMO weder tumorspezifisch exprimiert wird noch zur Tumorfürerkennung als Biomarker geeignet ist. Dennoch spielt NEMO eine zentrale Rolle in der Tumordifferenzierung, die initial mit einem erhöhten Entzündungsprozess sowie erhöhtem oxidativen Stress einhergeht. Schlecht differenzierte Tumoren haben möglicherweise ihren Metabolismus an diese Umgebung adaptiert und weisen aus diesem Grund eine verminderte NEMO-Expression auf. Inwieweit Mechanismen eine Rolle spielen, die bereits im Mausmodell auf ein mögliches Zusammenspiel zwischen einer Verminderung von NEMO und der Hepatokarzinogenese hindeuten, wie die proapoptotische Caspasenaktivität und die FADD- sowie die TAK1-Expression, muss in Folgestudien genauer analysiert werden.

### **Abstract**

Introduction: This dissertation examines the gene expression of the NF- $\kappa$ B essential modulator NEMO in human hepatocellular carcinoma tissue (HCC) (n = 11), in human cholangiocellular carcinoma tissue (CCC) (n = 12) and liver metastases from colorectal cancer (mCRC) (n = 12). The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is an inducible transcription factor that plays a critical role in many biological processes, including the regulation of inflammation, the response to oxidative stress and immune response. In addition NF- $\kappa$ B has an effect on carcinogenesis due to regulation of anti-apoptotic and proliferative target genes. NEMO is essential for the activation of the NF- $\kappa$ B pathway.

Recently, a role in hepatocarcinogenesis has been attributed to NEMO using knockout mice. Currently there are no studies investigating the influence of NEMO on carcinogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma and liver metastases from colorectal cancer. Methods: The human tissue samples analyzed in this dissertation were obtained in the course of hemihepatectomies, and NEMO expression was determined by real-time PCR and Western Blot analysis. Results: Since there is currently no highly sensitive and highly specific tumor marker for early detection of the kinds of tumors I

## 1. Zusammenfassung/Abstract

investigated, I first determined whether expression of NEMO varied in the tumors that were studied. NEMO expression was reduced at the mRNA level and increased at the protein level in all of the tumor tissues. No significant differences were determined between the tumor groups. The levels of sensitivity and specificity obtained through ROC analysis were in the medium range (HCC: sensitivity: 73-82%, specificity: 63-71%; CCC: sensitivity: 75%, specificity 61-79%; mCRC: not significant). The analysis of the influence of NEMO on clinical-pathological parameters showed that mRNA and protein expression were higher in larger tumors and extended tumor mass as measured in the literature. Poorly differentiated tumors (G3) showed a significant decrease in NEMO (mRNA: p-value = 0.0004; HCC p-value = 0.006; CCC: p-value 0.008). In the mCRC group, the expression in G3 tumors was reduced, but not to a significant degree (p-value = 0.416). At a cut-off value of 42% (HCC) or 40.5% (CCC), that is, a relative decrease of mRNA in the tumor tissues, particularly the samples in the HCC group were highly sensitive (100%) and highly specific (100%) (CCC: sensitivity 75%, specificity 87.5%) as classified by degree of differentiation. Overall, at the protein level, there was a reduction in relative protein expression in G3 tumors in comparison to non-malignant reference tissues (p-value = 0.001; HCC: p-value = 0.008; CCC: p-value = 0.062; mCRC: p-value = 0.112). In the HCC group, all degrees of differentiation were detected based on the NEMO protein levels. The test was 100% sensitive and specific.

There was no indication in this study of a direct relationship between NEMO and the development of human steatosis as has been shown in the mouse model.

Conclusion: Overall, this study showed that NEMO is not expressed in a tumor-specific manner, nor is it suitable as a biomarker for early tumor detection. However, NEMO plays a central role in tumor differentiation, which is initially associated with an increased inflammatory process as well as increased oxidative stress. Poorly differentiated tumors may have adapted their metabolism to this environment and, for this reason, show reduced expression of NEMO. The extent to which the same mechanisms are involved that have suggested a potential interaction between reduced NEMO and hepatic carcinogenesis in the mouse model, such as pro-apoptotic caspase activity, FADD and TAK1 expression, remains to be analyzed in subsequent studies.

## 2. Einleitung

### 2.1 Kanzerogenese

Laut dem 2011 von der WHO veröffentlichten Projekt GLOBOCAN (Cancer Incidence and Mortality Worldwide) sind im Jahr 2008 weltweit schätzungsweise 12,7 Millionen Krebsfälle und 7,6 Millionen durch Krebs verursachte Todesfälle registriert worden. Damit ist das Krebsleiden die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislaufkrankungen <sup>1</sup>. Die Tumorentstehung ist multifaktoriell und noch nicht abschließend geklärt. In nichtmalignen Zellen reguliert ein Kontrollmechanismus die zellulären Vorgänge Zelldifferenzierung, -proliferation und -tod. Zudem wird das Überschreiten von Organ- und Gewebegrenzen verhindert. Die Regulation erfolgt u.a. durch Zellzykluskontrollpunkte, DNA-Reparaturmechanismen (z.B. Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur) und den programmierten Zelltod (Apoptose). Tumorzellen weisen genetische Veränderungen auf, die diese Mechanismen unterdrücken oder zu Fehlfunktionen führen <sup>2</sup>. Diese können erworben (somatische Mutationen) oder ererbt (Keimbahnmutationen) sein. Begünstigt wird das Tumorwachstum durch die entstehende genetische bzw. chromosomale Instabilität. Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts beschrieb der Biologe Theodor Boveri (1862 – 1915) seine Hypothese „zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“. Ihm zufolge sei die Basis für das Tumorwachstum ein bestimmter, unrichtig kombinierter Chromosomenbestand. „Dieser ist die Ursache für die Wucherungstendenz, die auf alle Abkömmlinge der Urzelle [...] übergeht“ <sup>3</sup>. Dass eine mögliche Ursache der Tumorentstehung eine Veränderung der Chromosomen und damit der DNA ist, konnte im Laufe des letzten Jahrhunderts durch zahlreiche experimentelle und klinische Studien bestätigt werden <sup>4</sup>.

Tabelle 2.1: Beispiele für Onkogene

<b>Gen</b>	<b>Genfunktion</b>	<b>Tumorarten, in denen eine Mutation in diesem Gen typischerweise vorliegt</b>
Ras	GTP-bindendes Protein, beteiligt an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, die Wachstumsprozesse steuern	u.a. Kolon-CA (K-Ras), CCC (K-Ras) <sup>5;6</sup>
β-Catenin	Zell-Zell-Adhäsion, Transkriptionsfaktor	HCC, Kolon-CA <sup>5;7</sup>

Im Wesentlichen zeigen sich die genetischen Veränderungen in Protoonkogenen und

## 2. Einleitung

Tumorsuppressorgenen. Onkogene (Beispiele siehe Tab. 2.1), mutierte Protoonkogene, kodieren eine Vielzahl verschiedener Proteine, die als Proteinkinasen, Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren agieren. Sie produzieren durch eine unregelte, permanente Aktivität Wachstumssignale. Dies hat eine dauerhafte Zellproliferation zur Folge<sup>7,8</sup>. Tumorsuppressorgene (TSG, Beispiele siehe Tabelle 2.2), die das Zellwachstum und die -proliferation kontrollieren, können die physiologische Wachstumshemmung durch Mutationen verlieren. Das Resultat ist eine unkontrollierte Zellteilung und infolgedessen das Tumorwachstum<sup>8</sup>.

Tabelle 2.2: Beispiele für Tumorsuppressorgene

Gen	Genfunktion	Tumorarten, in denen eine Mutation in diesem Gen typischerweise vorliegt
P53	Regulation der Expression von Genen, die u.a. für die Zellzykluskontrolle und die Induktion der Apoptose kodieren („Wächter des Genoms“)	u.a. Kolon-CA, HCC, CCC <sup>5,7,9</sup>
APC	Kontrolle der Zellproliferation	Kolon-CA <sup>10</sup>
RB1	Kontrolle der Zellproliferation, Zellzykluskontrolle	u.a. HCC <sup>7</sup>

Laut Hanahan und Weinberg<sup>11</sup> weist eine Tumorzelle durch die Änderungen im Erbgut sechs verschiedene charakteristische Eigenschaften auf, die sie von einer normalen Zelle unterscheiden (siehe Abb. 2.1): Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumssignalen, Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose), unbegrenztes Teilungspotential, Infiltration anderer Gewebe und die Fähigkeit zur Metastasierung sowie die Fähigkeit zur Angiogenese.

Der Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle liegen mehrere Schritte zugrunde, die im Detail noch nicht abschließend geklärt sind. Ein gängiges Modell der Kanzerogenese ist das lineare

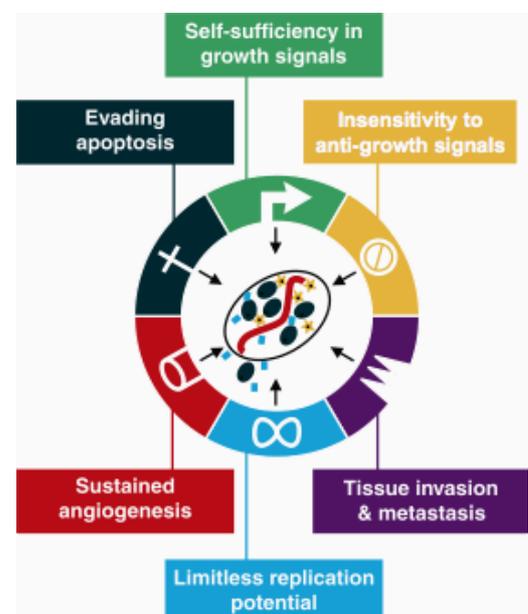


Abb. 2.1<sup>11</sup>: Eigenschaften einer Tumorzelle, die sie von einer nichtmalignen Zelle unterscheiden

## 2. Einleitung

Mehrstufenmodell, das sich in die folgenden Stufen unterteilt: die Initiation, die Promotion und die Progression<sup>12</sup>. Als Auslöser für die Initiation werden u.a. erbliche Faktoren oder äußere Einflüsse wie chemische Noxen, Strahlung oder Viren verantwortlich gemacht. Diese führen zu irreversiblen Änderungen der DNA, insbesondere in Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen. In der darauf folgenden sogenannten Promotionsphase proliferiert die initiierte Zelle (klonale Expansion) durch verschiedene Wachstumsstimuli (u.a. Hormone, Karzinogene), die als Tumorpromoter agieren<sup>13</sup>. Tumorpromotoren wirken proliferationsfördernd, ohne selbst ein genotoxisches Potential aufzuweisen. Es entsteht eine präneoplastische Zellpopulation. Während in der Initiationsphase eine einzige Exposition zur Schädigung der DNA ausreicht, so muss die Zelle dem Tumorpromoter über einen längeren Zeitraum (Latenzphase) ausgesetzt sein. Die zunehmende genetische Instabilität durch weitere Mutationen führt in der sogenannten Progressionsphase zur Umwandlung der Präneoplasien in maligne Tumore. Nach zahlreichen Zellteilungen entsteht eine Tumormasse, die sich schrittweise entdifferenziert und andere Eigenschaften als das Muttergewebe aufweist<sup>12</sup>.

Der Prozess der Metastasierung ist für den Verlauf der Krebserkrankung und die Wahl der Therapie mitentscheidend. Das in dieser Dissertation untersuchte kolorektale Karzinom wächst überwiegend zirkulär und metastasiert zunächst in die perikolischen Lymphknoten. Voraussetzung ist zunächst die Auflösung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Einzelne Zellen lösen sich aus dem Primärtumor und wandern in das umgebende Gewebe und das Lymph- bzw. Blutgefäßsystem (Intravasation). Die Zellen zirkulieren in der Embolisationsphase im Kreislauf. Einzelne Tumorzellen, die ein höheres Malignitätspotential aufweisen, überleben diese Phase (ca. 0,1%) und sind in der Lage die Bildung von Metastasen zu induzieren<sup>14</sup>. Diese Zellen werden von den Zellen des Immunsystems nicht als fremd erkannt, da sie körpereigene zelluläre Mechanismen nutzen. Z.B. werden sie in den Blutgefäßen durch die Interaktion mit Fibrin eingeschlossen. Die Tumorzellen durchdringen Endothel, Basalmembran und die äußeren Gefäßwandschichten (Extravasation). Im Gewebe proliferieren sie zu Mikrometastasen (> 0,2 mm und ≤ 2 mm), deren Entwicklung und Wachstum von einer adäquaten Blutversorgung abhängt. Das kolorektale Karzinom metastasiert auf hämatogenem Wege hauptsächlich über die Vena portae in das Kapillarnetz der Leber. Es gibt verschiedene Ansätze, die den Grund für diese organspezifische Metastasierung erklären können. Sehr wahrscheinlich ist, dass der venöse Abfluss über

## 2. Einleitung

die V. portae aus dem Gastrointestinaltrakt die hepatische Metastasierung begünstigt. Zudem scheinen zusätzlich molekulare Mechanismen involviert zu sein. Hierzu zählen u.a. Chemokine und ihre Rezeptoren. Studien zufolge besteht eine Interaktion zwischen Chemokin-Rezeptoren, die von Krebszellen exprimiert werden, und entsprechenden Chemokinen in den Zielorganen. Diese fördern die Tumorzelladhäsion an der Gefäßwand und erleichtern die Extravasation. Des Weiteren werden Adhäsionsmoleküle sowie Gene, die mit einer Metastasierung in Zusammenhang stehen, für die organspezifische Tumorabsiedelung in Betracht gezogen <sup>15</sup>.

## 2.2 Hepatozelluläres Karzinom

### 2.2.1 Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Lebertumor (etwa 85-90%) <sup>16</sup>. Es zählt weltweit zu den häufigsten Neoplasien und ist die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Man geht von ca. 750000 Neuerkrankungen und von 695.900 krebsbedingten Todesfällen im Jahr 2008 aus <sup>1</sup>. Während in Nordamerika, Nordeuropa und Australien die jährliche Inzidenz bei etwa 5/100.000 liegt, beträgt sie in Endemiegebieten (v.a. Ostasien und Subsahara-Afrika) über 30/100.000. Dem zugrunde liegt am ehesten die geographische Verteilung der Risikofaktoren <sup>1</sup>.

### 2.2.2 Pathogenese

Die Hepatokarzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess (siehe Abb. 2.2). In etwa 70-90% der Fälle ist die Basis ein chronischer Inflammationsprozess, der über eine Leberzirrhose zur Entstehung eines HCC führt <sup>16</sup>. Das Leberparenchym wird zunächst durch verschiedene Faktoren (u.a. chronische Hepatitiden, Alkoholabusus (in Kombination mit Nikotin additiver Effekt), NAFLD (non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease), hereditäre Stoffwechselerkrankungen) geschädigt <sup>16-20</sup>. Es folgt die Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen im Bereich der Portalfelder, insbesondere mit Kupfferzellen, den lokalen Gewebsmakrophagen der Leber. Die darauffolgende Ausschüttung von proinflammatorisch wirkenden Interleukinen, Interferonen, Wachstumsfaktoren und des Tumornekrosefaktors-(TNF)- $\alpha$  resultiert in einer Gewebedestruktion <sup>21</sup>. Zellnekrose und -apoptose sind die Folge. Durch die Gewebeschädigung proliferieren die Zellen kompensatorisch. Das Gewebe wird bindegewebig umgebaut („liver remodeling“). Im Verlauf bilden sich dysplastische Regeneratknoten, in denen klonale, atypische Zellnester entstehen. Diese werden als direkte Vorstufe des HCC angesehen <sup>22,23</sup>.

## 2. Einleitung

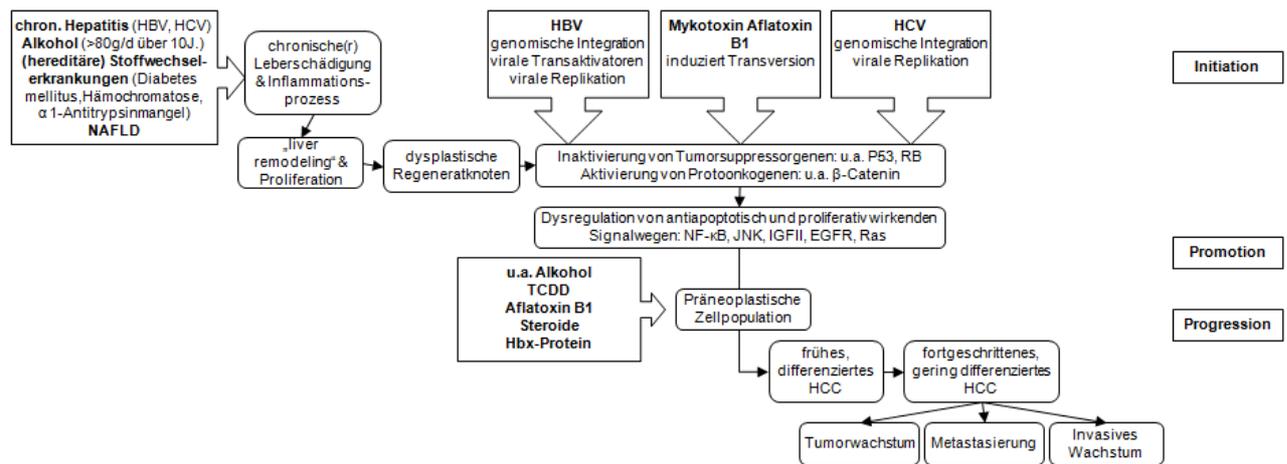


Abb. 2.2 (modifiziert)<sup>24</sup>: Schematische Darstellung der Hepatokarzinogenese

Die Atypie der Zellnester wird u.a. durch genetische Veränderungen bedingt. Allelverluste („Loss of heterozygosity“) oder Mikrosatelliteninstabilität führen zu einer Dysregulation von Protoonkogenen (Aktivierung; u.a.  $\beta$ -Catenin) und Tumorsuppressorgenen (TSG; Funktionsverlust; u.a. P53). Auch DNA-Methylierungen resultieren in einem Funktionsverlust der TSG. Das Resultat der wachsenden genetischen Instabilität und der Aktivierung einer Vielzahl von intrazellulären wachstumssimulierenden Signalkaskaden (u.a. NF- $\kappa$ B, IGFII, EGFR) ist die Entstehung des Karzinoms<sup>7</sup>. Es existieren zudem noch weitere Pathomechanismen, die unabhängig vom Inflammationsprozess die Hepatokarzinogenese initiieren. So dient das Hepatitis-B-Virus-(HBV)-Hbx-Protein direkt als Transkriptionsfaktor für verschiedene intrazelluläre Proteine wie das antiapoptotisch wirkende NF- $\kappa$ B und andere zelluläre Wachstumsfaktoren<sup>17</sup>. Zudem kann es direkt mit P53 interagieren. Dies trifft auch für das Mykotoxin Aflatoxin B1 zu<sup>18</sup>. Das Core-Protein des Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein starkes Signal für verschiedene Signalkaskaden wie NF- $\kappa$ B, Ras oder JNK (c-Jun N-terminale Kinasen)<sup>17</sup>.

### 2.2.3 Diagnostik

Das HCC ist ein sehr aggressiver Primärtumor, der durch seine Invasivität, seine schlechte Prognose und die beschränkten therapeutischen Möglichkeiten charakterisiert ist. Es ist durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet<sup>25</sup>. Zurückzuführen ist dies insbesondere darauf, dass das HCC häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium (in ca. 70% der Fälle) diagnostiziert wird, da es zuvor klinisch nicht auffällig ist. Die Symptome sind unspezifisch. So treten u.a. ein reduziertes Allgemeinbefinden, Gewichtsverlust oder Oberbauchbeschwerden auf. Die Diagnostik des HCC basiert auf

## 2. Einleitung

der serologischen und sonographischen Untersuchung (ggf. mit Feinnadelpunktion)<sup>25,26</sup>. Der einzige etablierte Serummarker ist das Alpha-Fetoprotein (AFP) (siehe Tab. 2.3). Dieser wird neben der Diagnostik zur Früherkennung bei Patienten mit einer Prädisposition eingesetzt<sup>26</sup>.

Tabelle 2.3: Biochemische Marker HCC

Marker	erhöht in % der Fälle	Sensitivität	Spezifität	Bemerkungen
AFP <sup>25,27</sup>	60-70%	39-64%	76-91%	hoch verdächtig: >200 ng/ ml, klinischer Einsatz
DCP <sup>28</sup>	59- 84%	48-62%	81-98%	
GPC3 <sup>29</sup>	70%	77%	96%	möglicher Tumormarker, Studien folgen

Aktuelle Studien betrachten die Rolle von AFP in der Diagnostik des HCC kritisch. So ist die Konzentration von AFP abhängig von der Tumorgroße, so dass kleine Tumoren u.U. nicht entdeckt werden. Es hat sich zudem gezeigt, dass auch eine aktive Hepatitis oder eine Leberzirrhose ohne Vorliegen eines Tumors zu einem erhöhten AFP-Serumspiegel führen<sup>25-27</sup>. Der Einsatz zur Früherkennung hat sich in vielen Studien als unzureichend herausgestellt. Wenn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine starke Erhöhung vorliegt, scheint AFP allerdings einen prognostischen Wert zu haben. Nach der Behandlung eines AFP-positiven Tumors kann es zudem als Marker für das Voranschreiten bzw. die Entwicklung des Tumors eingesetzt werden<sup>27</sup>. Andere Serummarker wie z.B. das Des- $\gamma$ -carboxy-Prothrombin (DCP) oder das Glypican-3 (GPC3) sind potentiell einsetzbar. DCP wird von malignen Hepatozyten produziert und weist eine höhere Spezifität (siehe Tab. 2.3) als AFP auf<sup>28</sup>. Bei kleinen Tumoren sinkt die Sensitivität. Insgesamt wirken sich Lebererkrankungen weniger stark auf die Produktion aus. Ein falsch-positives Ergebnis zeigt sich dennoch bei der Einnahme von Medikamenten wie Phenprocoumon, bei einem Ikterus und einer intrahepatischen Cholestase<sup>30</sup>. Das Protein GPC3 ist im Serum von gesunden Spendern nicht detektierbar. Im neoplastischen Lebergewebe zeigt sich eine Überexpression und im Serum eine Erhöhung des GPC3-Spiegels. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um den Einsatz als möglichen Tumormarker des HCC zu untersuchen<sup>29</sup>. Aktuell ist ein Einsatz beider in der Früherkennung noch fraglich<sup>26</sup>.

Aktuell werden zudem weitere potentielle Biomarker erforscht, die sich durch eine höhere Spezifität und Sensitivität auszeichnen sollen. Ein Beispiel ist das Golgi-

## 2. Einleitung

Phosphoprotein (GOLPH2), ein Protein des Golgiapparates. Die genaue Funktion ist bislang unklar. In immunhistochemischen Untersuchungen zeigt sich eine geringe GOLPH2-Expression in nichtmalignem Leber- und Gallengangsgewebe. Eine hohe Expression lässt sich bei 71% der HCC-Gewebe nachweisen<sup>31,32</sup>. Ein signifikant erhöhter GOLPH2-Serumwert wurde zudem bei Patienten mit einem HCV-induzierten HCC festgestellt<sup>33</sup>. Für den klinischen Alltag wurde ein GOLPH2-enzyme-linked-immunosorbent-assay-(ELISA)-Test entwickelt. In weiteren Studien mit einer größeren Patientenzahl wird sich zukünftig zeigen, inwieweit das GOLPH2 ein geeigneter Marker ist.

### 2.2.4 Therapie

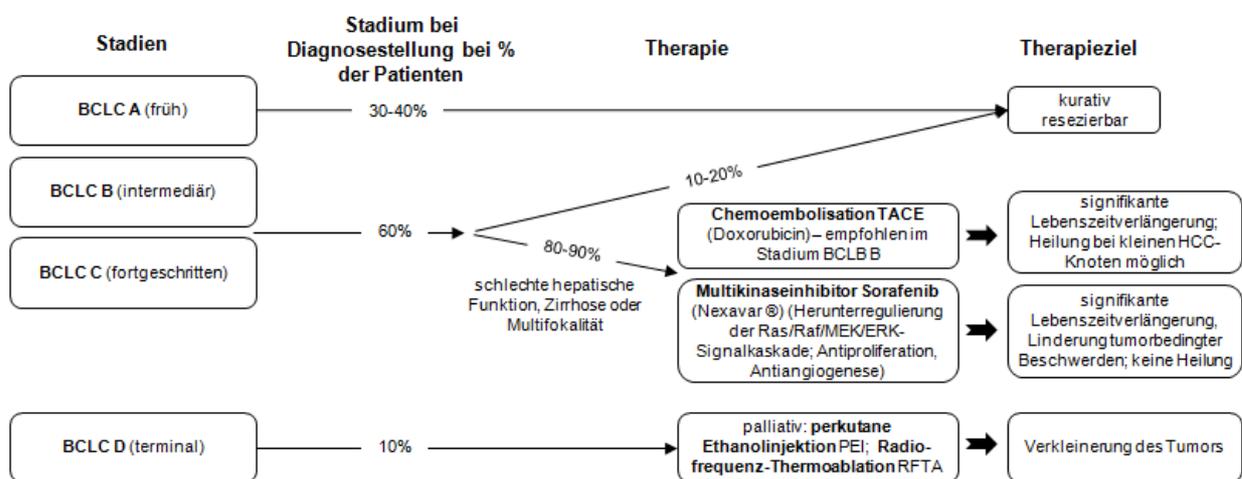


Abb. 2.3: Therapie des HCC in den Tumorstadien BCLC A-D<sup>1,34-41</sup>

Die Wahl der Therapie nach der Diagnosestellung hängt von der Tumorgöße, der Gefäßinfiltration, der Anzahl der möglichen Metastasen, der Leberfunktion und dem Allgemeinzustand des Patienten ab. Abbildung 2.3 zeigt mögliche Therapien in den verschiedenen Tumorstadien BCLC A-D (Barcelona Clinic Liver Cancer)<sup>36</sup>. So ist eine kurative Therapie mittels operativer Resektion nur im Frühstadium (BCLC A) bzw. in 10-20% der Fälle im intermediären Stadium möglich. Ist keine kurative Resektion durchführbar, so erreicht man mit einer Chemoembolisation oder einer Therapie mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib eine signifikante Lebenszeitverlängerung<sup>37,38</sup>. Die palliative Verkleinerung des Tumors erfolgt im terminalen Stadium BCLC D<sup>39-41</sup>.

## 2.3 Cholangiozelluläres Karzinom

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC; Cholangiokarzinom) ist ein vom Gallengangsepithel ausgehendes Malignom und der zweithäufigste primäre Lebertumor nach dem hepatozellulären Karzinom. 10–15% der hepatobiliären Malignitäten lassen sich auf das CCC zurückführen. Es macht etwa 3% aller gastrointestinalen Tumoren aus <sup>42</sup>.

### 2.3.1 Epidemiologie

In den USA tritt das CCC mit einer Inzidenz von 8-9/1.000.000 Einwohner pro Jahr im Vergleich zum hepatozellulären Karzinom (HCC) relativ selten auf <sup>43</sup>. Die Inzidenz und die Mortalitätsrate, v.a. bei intrahepatischen CCC, steigen weltweit <sup>42</sup>.

Die häufigste Form (50-60%) ist das extrahepatische perihiläre CCC (Klatskin-Tumor). Intrahepatische oder distal liegende extrahepatische CCC treten jeweils in 20-25% der Fälle auf <sup>44</sup>. Die Einteilung des Klatskin-Tumors (nach Bismuth) erfolgt aufgrund unterschiedlicher Therapiestrategien (siehe Abb. 2.4): Typ I-Tumoren beschränken sich auf den Ductus hepaticus communis distal der Hepatikusgabel, Typ II-Tumoren treten auf Höhe der Hepatikusgabel auf, Typ IIIa-Tumoren weisen zudem eine Infiltration des rechten, Typ IIIb-Tumoren des linken Hauptgallenganges auf. Werden außerdem die Segmentgallengänge infiltriert, so liegt ein Tumor vom Typ IV vor <sup>45</sup>.

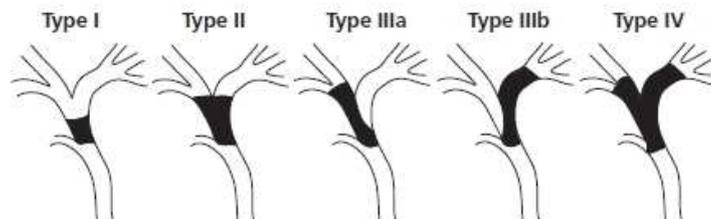


Abb. 2.4 <sup>45</sup>: Einteilung des Klatskin-Tumors nach Bismuth

### 2.3.2 Pathogenese

Es gibt mehrere Faktoren, die die Entstehung eines CCC begünstigen. In der Literatur werden u.a. eine genetische Disposition und verschiedene Risikofaktoren diskutiert <sup>43</sup>. Zu den Risikofaktoren zählen v.a. in asiatischen Ländern parasitäre Infektionen, hervorgerufen durch Leberegel wie *Clonorchis sinensis* und *Opisthorchis viverrini*, welche vorwiegend durch Lebensmittel übertragen werden. Diese siedeln sich in den Gallengängen an und induzieren chronische Entzündungen. Als weitere Präkanzerose gilt die primäre sklerosierende Cholangitis (PSC), eine langsam progrediente idiopathische chronische Lebererkrankung, die ebenfalls mit entzündlichen Veränderungen des Gallengangsystems einhergeht <sup>46</sup>. Des Weiteren kann die

## 2. Einleitung

Entstehung eines CCC auch in Verbindung mit einer Hepatolithiasis, angeborenen Fehlbildungen oder Virusinfektionen (u.a. HCV) auftreten<sup>43,47</sup>. Auch ungesunde Lebensgewohnheiten wie Rauchen oder Alkohol, die chronische nicht-alkoholische Fettlebererkrankung NAFLD, Adipositas oder Diabetes können die Entstehung eines intrahepatisch liegenden CCC begünstigen<sup>42,48</sup>.

Die Karzinogenese des CCC besteht aus mehreren Stufen („multistep carcinogenesis“) (siehe Abb. 2.5)<sup>6</sup>. Zunächst führen die ausgelöste chronische Inflammation des Gallengangsystems und Cholestase zu einer Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen (u.a. Interleukin-6, TNF- $\alpha$ ). Interleukin-6 führt über die Hochregulation der Stickstoffmonoxid-Synthase iNOS zu einem Anstieg von reaktiven Sauerstoffradikalen. Das Resultat sind Zellschäden und ein Verlust der Gleichgewichte zwischen DNA-Schäden und -Reparatur. Über die Aktivierung von TNF- $\alpha$  proliferieren die Zellen. Es folgt eine Hyperplasie des Gallengangepithels. Die maligne Transformation erfolgt durch verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen.

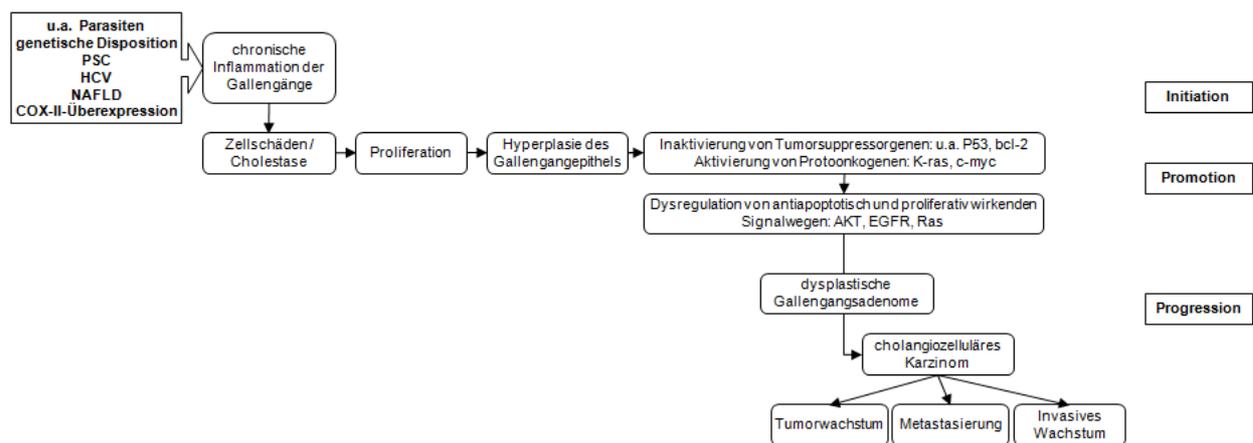


Abb. 2.5 (modifiziert)<sup>6</sup>: Cholangiokarzinogenese

Die Arbeitsgruppe Wang (2009) untersuchten die Vielfalt an Genen, die zur Entstehung eines CCC beitragen und zeigten, dass es sich hier um einen multifaktoriellen Tumor handelt<sup>49</sup>. Über die Expression der COX-(Cyclooxygenase)-2, ausgelöst durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an den EGFR (epidermal growth factor receptor), wird ein entscheidender Schritt für die Onkogenese begonnen<sup>50</sup>. Die Arbeitsgruppen um Han und Wu bestätigen die direkte Rolle von COX-2 in der Wachstumskontrolle und Angiogenese. Die gesteigerte Expression der COX-2 erhöht die Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Zellen des CCC. Dies sichert die Überlebensfähigkeit der Tumorzellen durch Hemmung des Immunsystems (Feedback-Mechanismus). Durch

## 2. Einleitung

den umfangreichen Einfluss der COX-2 auf das Tumorstadium korreliert das Auftreten mit einem schlechten Erkrankungsverlauf. Neben der COX-2-Aktivierung werden zudem der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (AKT)-Signalweg und K-Ras induziert<sup>50-52</sup>. Die Inaktivierung von P53 im CCC (10-61%) kann durch Substitution, Insertion oder Deletion erfolgen. Die Deletion ist häufig assoziiert mit dem Verlust der Heterozygotie. Dies zeigt sich in den unterschiedlichen CCC-Typen in gleichem Maße<sup>9</sup>. In schlecht differenziertem Gewebe liegt zu einem späten Zeitpunkt der Tumorentwicklung eine Überexpression des EGFR vor. Sie dient als wichtige Ausgangsstelle für das Tumorstadium und verbessert die Überlebensfähigkeit der Tumorzellen durch Verhinderung der Apoptose<sup>53</sup>.

### 2.3.3 Diagnostik

Der Verlauf dieser Tumorerkrankung ist langsam progredient und wird erst spät durch die zunehmende Gallenwegsobstruktion klinisch auffällig. Bei Diagnosestellung sind die CCC dementsprechend weit fortgeschritten. Der Ikterus, unspezifische Oberbauchbeschwerden, lokale Cholangitiden und bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf ausgeprägter Juckreiz, Verdauungsstörungen in Form von Steatorrhoe und Gewichtsabnahme bis hin zur Tumorkachexie gehören zu den charakteristischen Symptomen. Erhöhte Werte der  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase, der alkalischen Phosphatase und des Bilirubins können auf ein Karzinom deuten, liegen jedoch auch bei einer Cholestase vor. Die Lebertransaminasen bleiben meist im Normbereich<sup>54</sup>. Wichtig für die Verlaufskontrolle ist v.a. der Tumormarker CA19-9 (Carbohydrate-Antigen)<sup>44</sup>. Erhöhte Werte des Markers sind mit einer geringeren Überlebensdauer assoziiert. Für die Früherkennung eignet sich CA19-9 nicht. Der klinische Einsatz ist kritisch zu betrachten<sup>55</sup>. So zeigt sich eine Erhöhung bei verschiedenen anderen Malignitäten (v.a. Pankreas-CA) sowie bei Cholangitiden, Zirrhose, Pankreatitis, rheumatoider Arthritis und beim Verschlussikterus. Variablen wie das Geschlecht, die ethnische Zugehörigkeit und die medizinische Vorgeschichte machen die Interpretation des CA19-9-Levels schwierig<sup>55</sup>. Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) dient ebenfalls nur der Verlaufskontrolle nach der Detektion des Tumors. Zur Früherkennung ist er aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität (siehe Tab 2.4) nur bedingt einsetzbar<sup>56</sup>. CEA kann bei verschiedenen Tumoren (u.a. Kolon-CA, Mamma-CA, Pankreas-CA) eine Erhöhung aufweisen. Auch bei einer Pneumonie, bei Rauchern oder einer Hepatitis ist CEA erhöht im Serum vorhanden<sup>57</sup>. Auch andere Marker wie CA 125, IL-6 oder CA-50 konnten sich in der Diagnostik eines CCC bislang nicht durchsetzen<sup>58</sup>.

## 2. Einleitung

Tabelle 2.4: Biochemische Marker CCC

Marker	Sensitivität	Spezifität	Bemerkungen
CA19-9	89 % (53%)	86 %	> 100 U/L; Patienten mit PSC (ohne PSC)
CEA	55%	80%	Patienten mit PSC

Wie beim HCC werden aktuell neue mögliche Tumormarker untersucht. Bei der Detektion des CCC bietet sich ebenfalls das GOLPH2 an. Es zeigt sich eine Assoziation zwischen dem Tumorgrad, der Expression des Proteins und dem Überleben. Eine multivariate Analyse lässt die Schlussfolgerung zu, dass GOLPH2 sich als prognostischer Marker für das Überleben anbietet<sup>31</sup>. Weitere Marker, u.a. Cancer-Testis-Antigene, Periostin und CD24 werden aktuell auf ihren klinischen Nutzen untersucht<sup>59,60</sup>.

### 2.3.4 Therapie

Eine kurative Behandlung erreicht man nur durch eine vollständige chirurgische Resektion. Diese wird nur in etwa 50-60% der Eingriffe erzielt<sup>61</sup>. Die schlechte Prognose des Cholangiokarzinoms ist durch eine frühzeitige Invasion in das periduktale Gewebe und die dadurch fortschreitende Ausbreitung entlang der Gallenwege bedingt<sup>62</sup>. So wird in bis zu 80% der entnommenen Tumoren histologisch eine Infiltration der Perineuralscheiden nachgewiesen und in 36-50% der Fälle stellt sich eine regionale Lymphknotenmetastasierung heraus<sup>63,64</sup>. Eine Studie mit 127 CCC-Patienten, die sich einer chirurgischen Resektion unterzogen haben, zeigt, dass die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜ) von Patienten mit adjuvanter Chemotherapie 47% und ohne adjuvante Chemotherapie 36% betrug. Die Resektion im Gesunden in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie kann die 5-JÜ folglich verbessern<sup>65</sup>. Eine weitere Studie dokumentiert, dass die Aussicht in der Gruppe der Patienten mit orthotopischer Lebertransplantation in Kombination mit neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie innerhalb von 5 Jahren kein Rezidiv zu entwickeln signifikant höher ist. Ein schlechtes Outcome haben Patienten mit einem hilären Karzinom oder perineuraler Invasion<sup>66</sup>. Bei fortgeschrittenem bzw. metastasiertem CCC verbessert die Kombination Cisplatin/Gemcitabin im Vergleich mit Gemcitabin signifikant das Gesamtüberleben und die progressionsfreie Zeit<sup>67</sup>.

## 2.4 Kolorektale Lebermetastasen

### 2.4.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist die dritt- (männlich) bzw. zweithäufigste (weiblich) primäre Tumorerkrankung weltweit. Man geht von ca. 1,2 Millionen Neuerkrankungen und von 608.700 krebsbedingten Todesfällen im Jahr 2008 aus <sup>1</sup>.

### 2.4.2 Pathogenese

Als Risikofaktoren für die Karzinogenese eines kolorektalen Karzinoms gelten u.a. fetthaltige und ballaststoffarme Ernährung, Bewegungsmangel, Rauchen, Alkohol und Adipositas <sup>1</sup>. Endogen können das Vorliegen von Adenomen, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa; Morbus Crohn) oder eine positive Familienanamnese bzw. eine genetische Prädisposition (Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom HNPCC; familiäre adenomatöse Polyposis FAP) von Bedeutung sein <sup>68,69</sup>. In etwa 85%-90% der Fälle tritt der Tumor sporadisch (d.h. ohne genetische Disposition) auf.

Es existieren mehrere Pathomechanismen, die zur Karzinogenese von kolorektalen Karzinomen führen können. Die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome (ca. 85% der sporadischen Tumoren) entsteht in einem mehrstufigen Prozess aus gutartigen Vorstufen (villöse und tubuläre Adenome) (siehe Abb. 2.6) <sup>10</sup>. Die maligne Transformation erfolgt durch verschiedene genetische Veränderungen, die v.a. Tumorsuppressor- und Protoonkogene betreffen. Initiiert wird der Prozess durch eine Mutation im APC-(adenomatous polyposis coli)-Gen, die zu einer chromosomalen Instabilität (CIN) der Zellen führt. Das Resultat ist eine übermäßige Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkernen an der Basis der Dickdarmkrypten. Die daraus folgende permanente Stimulation des Wnt-Signalweges führt zu einer Hyperproliferation des Kolonepithels <sup>10</sup>. Tumorpromotoren sind u.a. IGF-1 (insulin-like growth factor), Gallensäuren (Desoxycholsäure) und das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) <sup>70-72</sup>. Eine mögliche genotoxische Wirkung von polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), die u.a. in geräucherten Fleischwaren vorkommen können, wird ebenfalls diskutiert <sup>73</sup>. Bei Patienten mit einer FAP ist das APC-Gen bereits in den Keimzellen auf einem Allel mutiert <sup>10</sup>. Ein weiterer wesentlicher Faktor für dieses Modell der Tumorgenese ist eine Mutation des K-Ras-Protein, das schon in frühen Tumorstadien beobachtet wird <sup>74</sup>. Die Mutation wird mit einer schnellen und aggressiven Metastasierung des kolorektalen Karzinoms in Verbindung gebracht <sup>75</sup>. Weist das Chromosom 18q einen Allelverlust auf,

## 2. Einleitung

so ist häufig das Tumorsuppressorgen DCC (deleted in colorectal cancer) betroffen. Eine Deletion resultiert in einer Störung der Zelladhäsion. Liegt eine solche Deletion vor, so hat dies eine Bedeutung für spätere Stadien der Tumorentwicklung. Bei mehr als 75% der kolorektalen Karzinome ist das Chromosom 17p deletiert<sup>5</sup>.

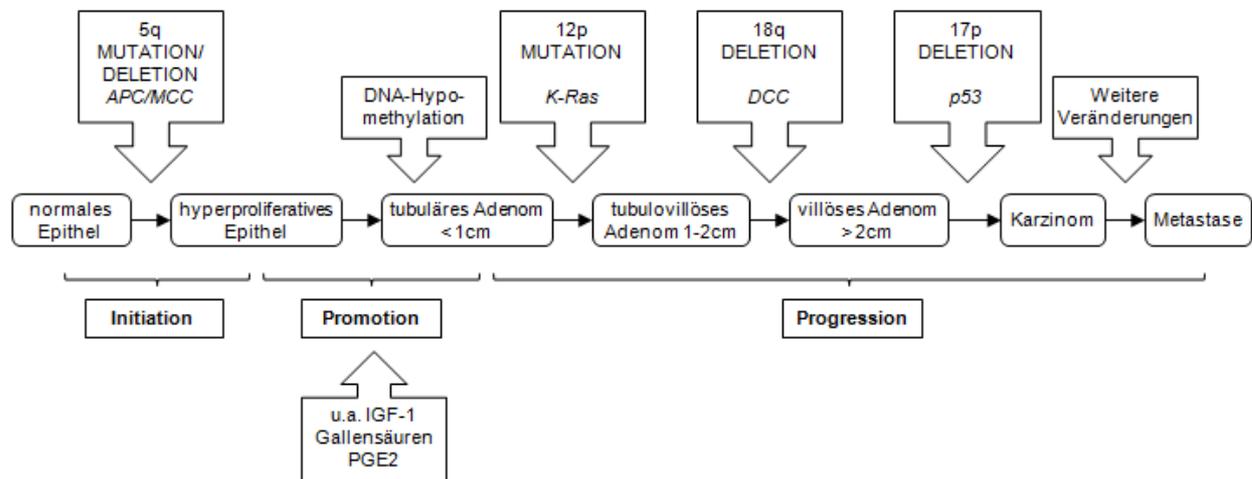


Abb. 2.6 (modifiziert)<sup>5</sup>: Tumorprogressionsmodell (Adenom-Karzinom-Sequenz)

Ein weiterer Pathomechanismus beruht auf der Mikrosatelliteninstabilität (MSI), die häufig bei HNPCC-Tumoren auftritt. Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen, die im gesamten Genom vorhanden und sehr fehleranfällig sind. Ist das DNA-Reparatur-System einer Zelle intakt, werden auftretende Fehler erkannt und repariert. Beim HNPCC-Syndrom liegen Keimbahnmutationen der DNA-Reparaturgene (Mismatch-repair-(MMR)-Gene) vor. Auftretende Fehler im Aufbau der Mikrosatelliten können nicht erkannt und folglich nicht korrigiert werden. In der neu replizierten DNA häufen sich Mutationen. Vergleicht man DNA-Sequenzen aus gesundem Gewebe mit DNA-Sequenzen aus dem Tumorgewebe so unterscheidet sich die Länge der Mikrosatelliten. Dies wird als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet. In 15% der Fälle tritt die MSI auch in sporadischen Tumoren auf<sup>76</sup>.

Die verschiedenen Pathomechanismen können im weiteren Verlauf zur Metastasierung führen. Dies ist einer der Hauptfaktoren, die zu der hohen Mortalität der Patienten führt (3-Jahresüberlebensrate von 12%, unbehandelt < 6 Monate)<sup>77</sup>. Zum Zeitpunkt der Diagnose werden in 15% der Fälle Lebermetastasen festgestellt. Weitere 50% der Erkrankten entwickeln diese in der Folgezeit<sup>78</sup>. Die Verdopplungszeit der Zellen der Lebermetastasen variiert von 50 – 95 Tagen. Sie wachsen etwa achtmal schneller als die Zellen des Primärtumors<sup>79</sup>. Studien zeigen, dass der Eintritt der Tumorzellen in das

## 2. Einleitung

hepatisches Blutssystem zu einer schnellen, proinflammatorischen Antwort führt. Es lässt sich eine erhöhte lokale TNF- $\alpha$ -Produktion durch Kupferzellen nachweisen<sup>80</sup>.

### 2.4.3 Diagnostik

Die Symptome bei kolorektalen Lebermetastasen sind wie bei einem kolorektalen Karzinom in der Regel unspezifisch. Es können Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit oder Fieber sowie Druckschmerzen im rechten Oberbauch auftreten. Die Metastasen können in einem späteren Stadium einen Ikterus initiieren. Der Tumor wird dementsprechend oft erst spät entdeckt und kann erst im fortgeschrittenen Stadium therapiert werden<sup>54</sup>. Tumormarker, die eine Früherkennung möglich machen, gibt es derzeit in der Praxis nicht. Als prognostischer Marker und in der Tumorverlaufskontrolle dient v.a. das Carcinoembryonale Antigen CEA. Die vermehrte Expression dieses Glykoproteins geht einher mit einem erhöhten metastatischen Potential. Zudem hat CEA eine Funktion beim Schutz der Tumorzellen vor Anoikis und bietet damit der Tumorzellen einen Vorteil beim Überleben im Kreislauf<sup>81,82</sup>. Die Sensitivität für das kolorektale Karzinom liegt bei 4% (Stadium I) bis ca. 65% (Stadium IV). Ein falsch-positiver Befund findet sich u.a. bei Rauchern oder malignen oder benignen Erkrankungen der Leber<sup>82</sup>. Ein aktuell in Studien untersuchter Marker ist das CCSA-2 (colon cancer specific antigen), das sich durch eine hohe Sensitivität (88,8%) und Spezifität (84,2%) auszeichnet. Die Annahme ist derzeit, dass sich CCSA-2 als Biomarker zur Früherkennung eignet. Dies muss in Folgestudien bestätigt werden<sup>83</sup>.

### 2.4.4 Therapie

Die Abbildung 2.7 zeigt aktuelle Therapieschemata für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms in den verschiedenen UICC-(Union internationale contre le cancer)-Stadien. Nach der Diagnosestellung eines kolorektalen Karzinoms ist ein Staging indiziert. Dies beinhaltet einen transabdominalen Ultraschall und eine Röntgenuntersuchung des Thorax sowie ab dem Tumorstadium III eine Computertomographie von Thorax und Abdomen. Von dem Ergebnis hängt die Wahl der Therapie ab (u.a. Chemotherapie, Resektion, Transplantation)<sup>84</sup>. Eine Rolle spielen zudem vorangegangene Therapien, das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten und die Leberfunktion<sup>85,86</sup>. Diese Faktoren beeinflussen ebenso die OP-Fähigkeit.

## 2. Einleitung

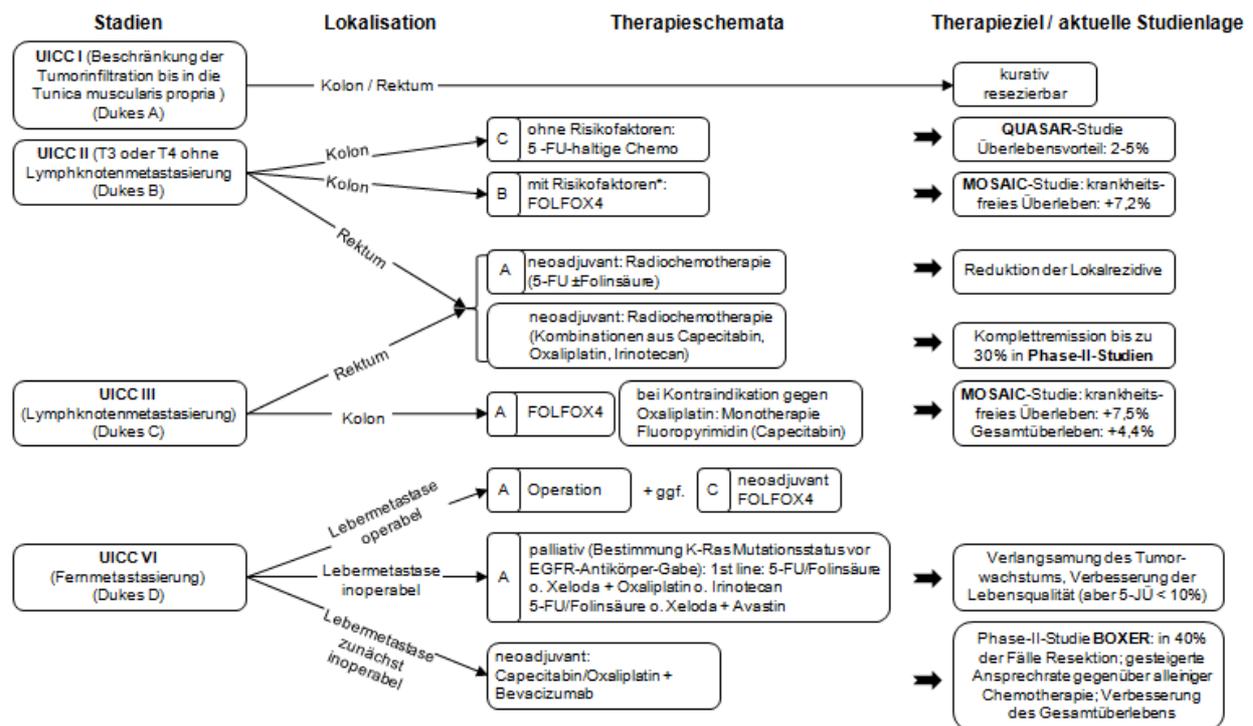


Abb. 2.7: Therapieschema für die Behandlung eines kolorektalen Karzinoms UICC I – IV (Empfehlungsgrade: A = „soll“, B = „sollte“, C = 0 = „kann“; \*Risikofaktoren: T4, Tumorperforation/-einriss, Operation unter Notfallbedingungen, Anzahl untersuchter Lymphknoten zu gering); wenn nicht anders vermerkt: adjuvante Chemotherapie bei R0-Resektion) <sup>87-91</sup>.

## 2.5 Der nukleäre Transkriptionsfaktor $\kappa$ B in der Kanzerogenese

Der chronische Inflamationsprozess des Leber- bzw. des Gallenganggewebes eine mögliche Basis der Kanzerogenese. Im Rahmen der Entzündungsreaktion werden durch Bakterien, Viren, nekrotische Zelltrümmer oder apoptotische Zellen Gewebemakrophagen aktiviert, die proinflammatorische Zytokine produzieren. Eine mögliche Folge ist die rezeptorvermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B stellt ein Schlüsselprotein in der Regulation von essentiellen zellulären Funktionen dar. Die Literatur beschreibt mehr als 500 Zielgene, die u.a. für Zytokine, Adhäsionsproteine, Akute-Phase-Proteine und inflammatorische Proteine kodieren und in Differenzierungsprozessen, bei der Zellproliferation und Apoptose von Bedeutung sind <sup>92,93</sup>. Der Organismus kann durch die vorübergehende Aktivierung von NF- $\kappa$ B gezielt auf pathogene oder stressinduzierte Stimuli reagieren. Ohne Stimulation der Zelle von außen liegt es durch die Interaktion mit dem Inhibitor I $\kappa$ B im Zytosol inaktiv vor <sup>94</sup>. In nichtmalignen Zellen lässt sich aufgrund dessen keine oder eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachweisen. Bei einer Vielzahl von Tumoren (u.a. kolorektales Karzinom,

## 2. Einleitung

HCC, Mamma-Karzinom) zeigt sich eine erhöhte und konstitutive Freisetzung<sup>95,96</sup>. Dies wird auch bei chronischen Lebererkrankungen, Cholestase oder einer virusbedingten Hepatitis B und C beobachtet<sup>16</sup>. Die aberrante NF- $\kappa$ B-Aktivierung resultiert in einer erhöhten Expression mehrerer Kanzerogenese-fördernder Gene (siehe Abb. 2.8).

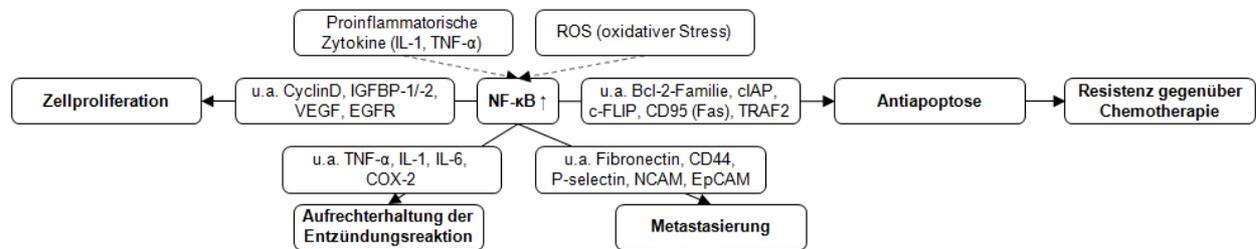


Abb. 2.8: Die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Kanzerogenese<sup>93,97-99</sup>

### 2.5.1 NF- $\kappa$ B-Signalkaskade

Die rezeptorvermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird durch die Bindung proinflammatorischer Zytokine (u.a. TNF- $\alpha$ , IL-1) an einen TNF-/IL-1/Toll-like-Rezeptor initiiert. Die darauf folgende Trimerisierung des Rezeptors führt zur Rekrutierung des Adaptermoleküls TRADD (Tumour necrosis factor receptor 1-associated death domain protein) (siehe Abb. 2.9)<sup>100-102</sup>. TRADD ermöglicht die weitere Signalübertragung durch die Bildung von Molekülkomplexen. Für die Aktivierung der klassischen NF- $\kappa$ B-Signalkaskade, die in dieser Dissertation relevant ist, ist die Komplexbildung von TRADD mit TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAF2) und dem Rezeptor-interagierenden Protein-1 (RIP1) von Bedeutung. RIP1 ist eine Kinase, dessen Kinase-Aktivität bei der klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung keine Bedeutung hat. TRAF-Proteine fördern die Ubiquitinierung (K63-Polyubiquitinierung) von RIP1 sowie die Autopolyubiquitinierung weiterer TRAF-Proteine. Das modifizierte RIP1 ist essentiell für den Ablauf der Aktivierungskaskade, da es durch die Ubiquitin-Markierung weitere Proteine rekrutiert. Zum Einen wird der I $\kappa$ B Kinase Komplex (IKK-Komplex) rekrutiert, der als zentraler Steuerungsmechanismus bzw. Aktivator von NF- $\kappa$ B agiert. Die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, der NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO; IKK $\gamma$ ), bindet hochaffin an K63-verknüpfte Polyubiquitinketten und ermöglicht die Verknüpfung des IKK-Komplexes an RIP1<sup>100,102-104</sup>. Zum Anderen wird die zur Aktivierung des rekrutierten IKK-Komplexes erforderliche Kinase TAK-1 (MAP3-kinase TGF $\beta$ -activated kinase) rekrutiert. Die TAK1-bindenden Proteine-(TAB)-2/3, die mit TAK1 als Komplex vorliegen, weisen ebenfalls eine hohe Affinität zu K63-

## 2. Einleitung

Polyubiquitinketten auf und binden über ihre Ubiquitin-Bindungsdomäne an RIP1 bzw. NEMO. TAK1 wird durch diese Bindung aktiviert und kann in der Folge insbesondere IKK $\beta$ , eine katalytische Untereinheit des IKK-Komplexes, phosphorylieren. IKK $\alpha$ , die zweite katalytische Untereinheit, und IKK $\beta$  phosphorylieren den NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ , der im nicht-phosphorylierten Zustand die Translokation der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p65 und p50 durch Komplexbindung in den Zellkern verhindert. I $\kappa$ B $\alpha$  wird proteosomal degradiert. Die in der Folge freiliegenden NF- $\kappa$ B-Dimere p50 und p65 translozieren in den Zellkern und initiieren die Expression der Zielgene<sup>100-102</sup>.

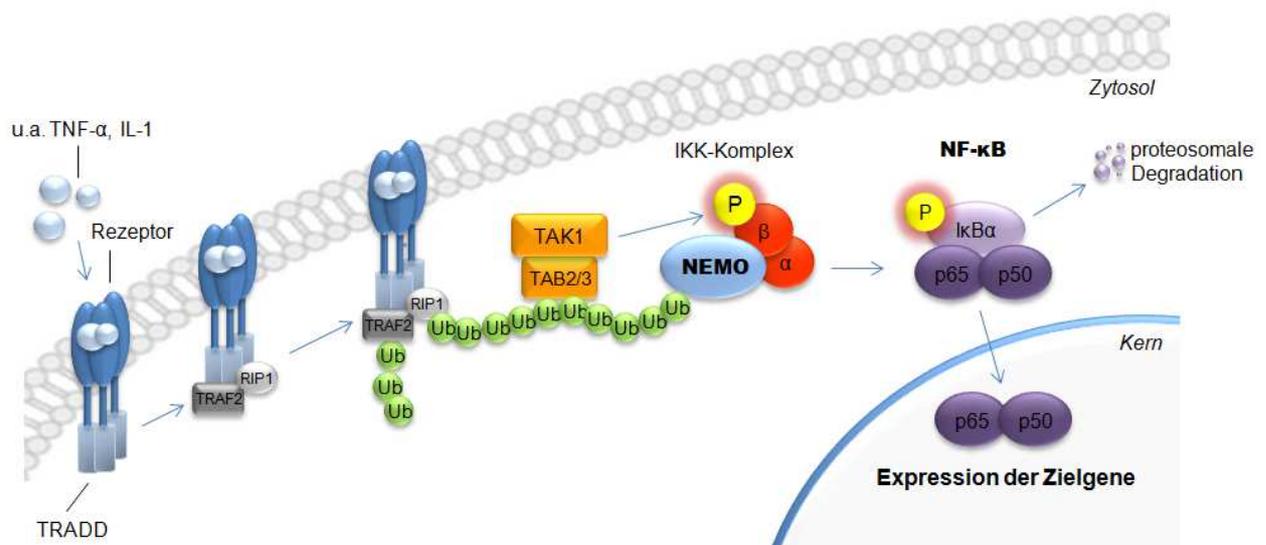


Abb. 2.9 (modifiziert)<sup>102</sup>: Aktivierung der klassischen NF- $\kappa$ B-Signalkaskade

### 2.5.2 NF- $\kappa$ B essential modulator - Struktur

Das NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) - Gen ist auf dem X-Chromosom (Xq28) lokalisiert. Es besteht aus 10 Exons und erstreckt sich über 23 Kilobasenpaare (kb) im menschlichen Genom<sup>105</sup>. Das Gen kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 48 Kilodalton (kDa), das aus 419 Aminosäuren besteht und mehrere funktionelle Abschnitte aufweist (siehe Abb. 2.10)<sup>105,106</sup>. Die  $\alpha$ -helikale ( $\alpha$ -H1) Region und die Coiled-coil Domäne 1 (CC1) binden am C-terminalen Ende der Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , der sog. NEMO-Bindungsdomäne (NBD), und stellen so die Verbindung zum IKK-Komplex her. Die Coiled-coil Domäne 2 (CC2) und der Leucin-Zipper (LZ) agieren als minimale Oligomerisierungs-Domäne (MOD) von NEMO<sup>107-109</sup>. Hier liegt zudem die Ubiquitin-Bindungs-Domäne UBAN (Ubiquitin binding in Abin and NEMO)<sup>110</sup>.

## 2. Einleitung

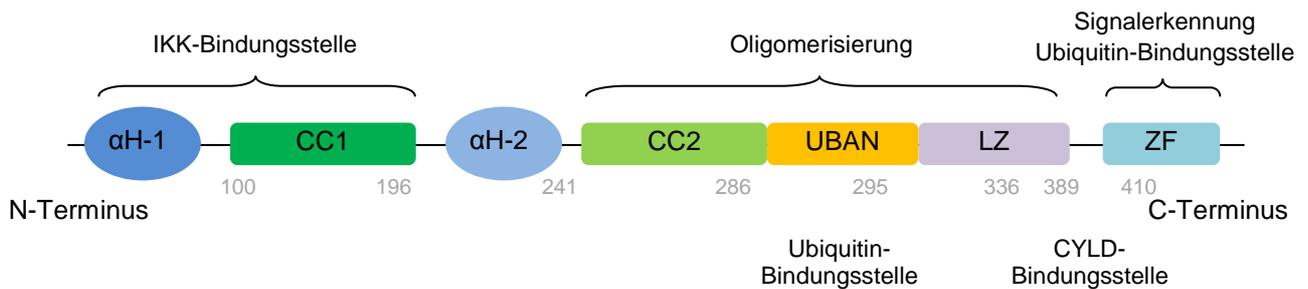


Abb. 2.10 (modifiziert): Struktur NEMO (human) <sup>106</sup>

Der C-Terminus dient der Signalerkennung und ermöglicht die Rekrutierung von ubiquitinierten Proteinen und von CYLD. Fehlt die C-terminale Zink-Finger-Domäne kommt es zu einem Verlust der NF- $\kappa$ B-Aktivierung <sup>106</sup>.

### 2.5.2.1 NF- $\kappa$ B essential modulator – Funktionen im NF- $\kappa$ B-Signalweg

Die Literatur zeigt, dass NEMO als regulatorischer Bestandteil des IKK-Komplexes von zentraler Bedeutung für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist. Die Interaktion von NEMO mit IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  dient als Voraussetzung für die Aktivierung des IKK-Komplexes. Fehlt diese Interaktion, ist der NF- $\kappa$ B-Signalweg gehemmt <sup>108,111</sup>.

Der Oligomerisierungsstatus von NEMO spielt bei der Bildung sowie der Aktivierung des IKK-Komplexes eine wichtige Rolle. Er ist von zentraler Bedeutung für die strukturelle Stabilität des dynamischen IKK-Protein-Komplexes <sup>100,112-114</sup>. Eine verstärkte NEMO-vermittelte Oligomerisierung des IKK-Komplexes nach Zellstimulation mit TNF- $\alpha$  resultiert in einer Aktivierung des IKK-Komplexes und damit in einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Der NEMO-Oligomerisierungsstatus wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die meisten Studien gehen davon aus, dass eine NEMO-Trimerisierung über die MOD am C-Terminus vermittelt wird. IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ -Dimere können über ihre NBD mit einem NEMO-Trimer assoziieren. Aus der Interaktion der Domänen entsteht eine stabile pseudo-hexamere Struktur <sup>115</sup>. Weitere Studien berichten von einer NEMO-Tetramerisierung, an der neben dem C-Terminus auch der N-Terminus beteiligt ist <sup>114,116</sup>. In der Folge können zwei Kinase-Dimere an NEMO assoziieren. Dieser als „proximity-induced“ bezeichnete Prozess fördert die Autophosphorylierung beider Kinasen. Die Autophosphorylierung stellt neben der bereits erwähnten Phosphorylierung der Kinasen durch TAK1 - vermittelt durch NEMO über K63-verknüpfte Polyubiquitinketten - einen weiteren möglichen IKK-Aktivierungsmechanismus dar <sup>117-119</sup>.

## 2. Einleitung

NEMO bindet über die UBAN-Region neben K63-Polyubiquitinketten auch lineare Ubiquitinketten. Nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  wird zur Stabilisierung des Komplexes aus TRADD, TRAF2 und RIP1 die E3-Ligase LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) rekrutiert. E3-Ligasen übertragen im letzten Schritt der Ubiquitinierung das Ubiquitin an spezifische Lysin-Reste, in diesem Fall an die CC2-LZ-Domäne von NEMO. Inhibiert man die Funktion des LUBAC unterbricht die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade durch Verminderung der Aktivität des IKK-Komplexes und TAK1 (MAP3-kinase TGF- $\beta$ -activated kinase 1) <sup>120,121</sup>. Auch diese Ubiquitinierung ist somit essentiell für die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade. Wu et al. (2011) sahen hier einen möglichen Ansatzpunkt für die Chemotherapie. Die gezielte Aufhebung der linearen Ubiquitinierung von NEMO ging ihrer Studie zufolge mit einer deutlich erhöhten genotoxisch-induzierten Apoptose und einer erhöhten Empfindlichkeit von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika einher <sup>121</sup>.

Neben der Ubiquitinierung wurden bereits weitere posttranslationale Modifikationen von NEMO identifiziert <sup>102,118,122</sup>. Während die Ubiquitinierung und die Sumoylierung zunehmend verstanden werden, ist über die Phosphorylierung von NEMO nur wenig bekannt. Die Sumoylierung sowie die Phosphorylierung spielen bei DNA-Doppelstrangbrüchen nach Exposition mit ionisierender Strahlung eine Rolle und werden im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter erläutert <sup>123</sup>.

### **2.5.2.2 NF- $\kappa$ B essential modulator - NF- $\kappa$ B unabhängige Funktion**

TAK1 spielt eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Funktionen von NEMO in der Hepatokarzinogenese. Neben der Aktivierung von NF- $\kappa$ B scheint TAK1 möglicherweise eine NF- $\kappa$ B-unabhängige Funktion von NEMO zu steuern. Eine Ausschaltung von TAK1 führt in parenchymalen Leberzellen zu einer NEMO-abhängigen NF- $\kappa$ B-unabhängigen Tumorentstehung, entstehend durch eine massive Dysplasie der Hepatozyten und eine frühe Karzinogenese. Sechs Wochen alte TAK1-Knockout-Mäuse zeigten massiv ansteigende AFP-Werte, ohne dass histologisch ein HCC gesichert werden konnte. Eine zusätzliche NEMO-Deletion in diesen Mäusen zu diesem Zeitpunkt senkte die AFP-Expression wieder, ohne dass in der Folge ein HCC detektiert werden konnte <sup>104</sup>.

### **2.5.2.3 Die Rolle von NEMO in der Kanzerogenese des HCC im Mausmodell**

Aktuell untersucht die Arbeitsgruppe um PD Dr. med. Tom Lüdde aus Aachen im Mausmodell eine mögliche Entstehung des HCC, in Verbindung mit NEMO <sup>124,125</sup>. Untersuchungen an NEMO-Knockout-Mäusen zeigten, dass NEMO-Knockout-Embryonen schon während der Embryonalentwicklung an massiver Apoptose der

## 2. Einleitung

Hepatozyten versterben und die Zellen nach Stimulation durch TNF- $\alpha$  keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B aufweisen. NEMO wäre hier für die Aktivierung des antiapoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B essentiell, um die Hepatozyten vor dem TNF-induzierten Zelltod zu schützen. Bereits bei drei Wochen alten NEMO-Knockout-Mäusen lassen sich erhöhte Level der Alaninaminotransferase (ALT), die auf das Vorhandensein einer erhöhten Hepatozytenschädigung hindeuten, nachweisen<sup>124-126</sup>. Unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  kommt es nach zwei Monaten zu einem massiven Untergang der Hepatozyten durch Apoptose. Während die NF- $\kappa$ B-Aktivierung ausbleibt, werden vermehrt proapoptotische Proteine wie Bax und Caspasen (3,8) exprimiert<sup>124,125</sup>.

Schaltet man in NEMO-Knockout-Mäusen zusätzlich FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) aus, das im Normalfall die TNF-induzierte Caspase-8-Kaskade initiiert, entwickeln diese Mäuse mit diesem „Apoptoseschutz“ keinen Tumor. Die Arbeitsgruppe Luedde (2007) vermuten, dass die selektive Inhibition von NEMO über eine vermehrte FADD-induzierte Caspasen-abhängige Apoptose (siehe Abb. 2.11) eine regenerative proliferative Antwort hervorruft, die mit einer Inflammation des Leberparenchyms sowie oxidativem Stress einhergeht<sup>124</sup>.

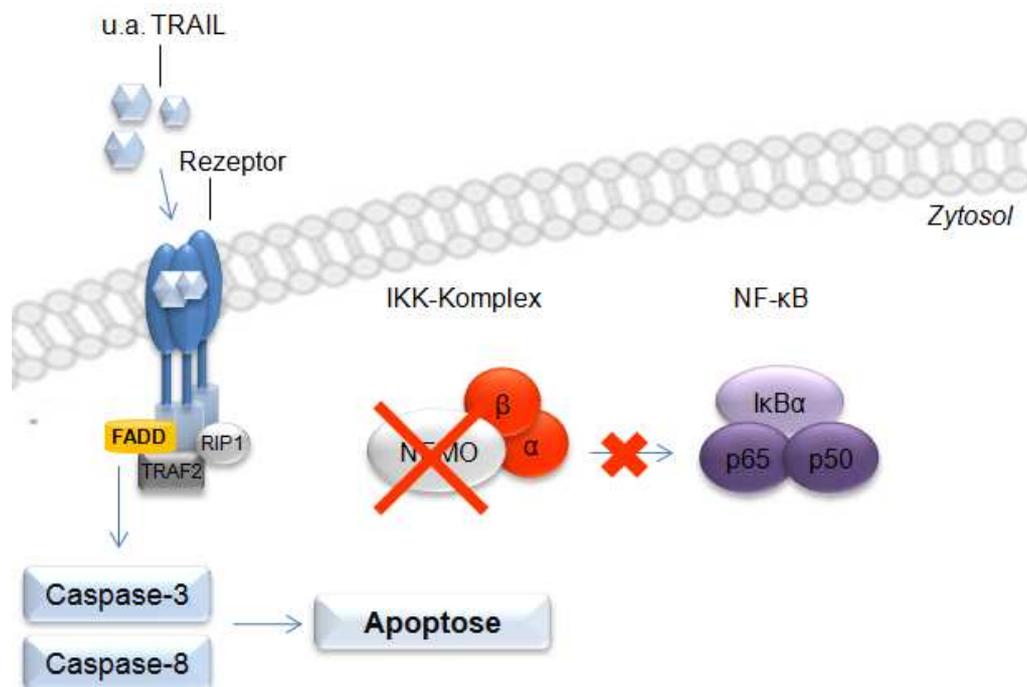


Abb. 2.11 (modifiziert): TRAIL-vermittelte Apoptose bei NEMO-defizienten Mäusen<sup>127</sup>

## 2. Einleitung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die den oxidativen Stress auslösen, haben u.a. wichtige Funktionen in zellulären Signalwegen, der Induktion von Wachstum und Apoptose und dienen als Effektormechanismus von Immunzellen<sup>128</sup>. Antagonisiert werden sie durch antioxidative Schutzsysteme der Zelle. Herrscht ein Missverhältnis überwiegen schädigende Effekte, es herrscht oxidativer Stress. In diesem Fall sind die ROS potentiell mutagen und kanzerogen. Anhaltende Inflammationsprozesse und hohe Level an ROS führen zu einer steigenden massiven Zellschädigung. Das Resultat ist eine Aktivierung von Progenitorzellen. Die Proliferationsfähigkeit der gesunden Hepatozyten reicht hier allein nicht aus<sup>124,129</sup>. Dies führt möglicherweise zur Entstehung von Tumoren. Liegt keine chronische Schädigung bzw. eine weniger ausgeprägte Apoptose vor, so erfolgt die Geweberegeneration durch die mitotische Teilung der gesunden Nachbarzellen.

Bei sechs Monaten alten NEMO-Knockout-Mäusen lassen sich zusätzlich zur Apoptose steigende Lipidkonzentrationen in den Hepatozyten und die Bildung von Ballonzellen nachweisen<sup>124</sup>. Diese sind analog zu den Ballonzellen, die für eine humane nicht-alkoholischen Fettleberhepatitis (NASH) charakteristisch sind. Die NASH kann hier möglicherweise die Entstehung des HCC mit begünstigen. Neben der Fibrosierung des Gewebes, bilden sich im Lebergewebe Entzündungen und Zelldysplasien<sup>124,126</sup>. Des weiteren steigert eine NASH in NEMO-Knockout-Mäusen die Aktivierung von natürlichen Killerzellen. Diese produzieren TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)<sup>130</sup>. NEMO-defiziente Zellen sind sensitiv gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose und so kommt es auch durch diesen Prozess zu einer Schädigung der Hepatozyten<sup>126</sup> (siehe Abb. 2.11). Schaltet man NEMO in adulten Mäusen aus, so resultiert dies direkt in einer spontanen Entwicklung eines HCC<sup>124</sup>.

### **2.5.2.4 Die Rolle von NEMO in der Kanzerogenese des humanen HCC**

Bisher wurde der mögliche Zusammenhang von NEMO und der Entstehung eines HCC in Mausmodellen untersucht. Aktuell ist eine Studie veröffentlicht worden, die - wie unsere Arbeitsgruppe - den Zusammenhang im Menschen untersucht<sup>131</sup>. Pichler et al. analysierten die NEMO-mRNA- und -Protein-Expression in Bezug zu den folgenden klinisch-pathologischen Parametern: Geschlecht, Alter, Tumorgroße, -grad, Wachstumsstruktur, Leberzirrhose und verschiedene Lebererkrankungen (Alkoholabusus, Hepatitis B/C, andere). Die Analyse erzielte folgende Ergebnisse: Eine verminderte 5-Jahres-progressionsfreie Überlebensrate geht einher mit einer niedrigen NEMO-Expression (nicht signifikant, ein Trend erkennbar). Die Tumorgroße korreliert

## 2. Einleitung

mit dieser Überlebensrate. Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen der 5-Jahres-Überlebensrate und einer niedrigen NEMO-Expression ( $p = 0,049$ ). Die anderen analysierten Parameter zeigten zu beiden Überlebensraten keinen Zusammenhang.

### **2.5.2.5 Die Rolle von NEMO in der Kanzerogenese des CCC und des kolorektalen Karzinoms**

Es gibt aktuell keine Studien, die den Zusammenhang zwischen der Kanzerogenese des cholangiozellulären Karzinoms und des kolorektalen Karzinoms bzw. dessen Metastasierung untersuchen. Bisher zeigen nur wenige Studien einen direkten Zusammenhang zwischen NF- $\kappa$ B und der Entstehung eines Cholangiokarzinoms. TRAIL aktiviert einen möglichen Mechanismus. In Apoptose-resistenten CCC-Zellen stimuliert der Ligand über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Zellmigration und Invasion und möglicherweise zudem die Metastasierung. TRAIL gilt ein vielversprechendes Krebsziel <sup>132</sup>. Die Verwendung sollte jedoch nur auf Apoptose-sensitive Tumoren beschränkt werden, da sonst möglicherweise die Tumordinvasion NF- $\kappa$ B-abhängig gefördert wird <sup>133</sup>. Auch durch die NF- $\kappa$ B-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors SNAIL und die Unterdrückung von E-Cadherin wird in Cholangiokarzinomen Migration und Invasion vermittelt. Auch hier liegt ein möglicher Zusammenhang mit NF- $\kappa$ B und der Tumorentstehung und dem -wachstum vor <sup>134</sup>. Kojima et al. (2004) zeigten eine Hochregulierung von NF- $\kappa$ B in humanen kolorektalen Tumorgeweben und stellten einen Zusammenhang zur Tumorprogression her. Es zeigte sich eine signifikante NF- $\kappa$ B-Expression, je weiter das Karzinom fortgeschritten (Stadium T3/T4) ist <sup>95</sup>. Weitere Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der Metastasierung. Das kolorektale Karzinom und die entsprechenden Fernmetastasen wiesen das gleiche erhöhte NF- $\kappa$ B-Level auf. Die vermehrte Aktivierung des Transkriptionsfaktors schien bei der Prognose und bei der Invasivität eine bedeutende Rolle zu haben <sup>135,136</sup>. Möglicherweise beruht dies auf einer veränderten Regulation durch NEMO.

### **2.5.3 Feedbackhemmung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade durch das Cylindromatosis Gen**

Mehrere Studien lassen darauf schließen, dass es sich bei dem Tumorsuppressorgen Cylindromatosis (CYLD) um einen Feedbackinhibitor der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade handelt. Brummelkamp et al. (2003) zeigten, dass eine gezielte Inhibition von CYLD mittels RNA-Vektoren zu einer vermehrten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt <sup>137</sup>. Verschiedene Stimuli, u.a. TNF- $\alpha$  und IL-1, führten neben der Initiierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges zu

## 2. Einleitung

einer gesteigerten CYLD-Expression. CYLD entfernt als Deubiquitinase die Lysin-63-verknüpften Polyubiquitinketten der Schlüsselmoleküle NEMO, RIP1 und TRAF2 (siehe Abb. 2.12). Die Feedbackhemmung verhindert eine überschießende Zellreaktion <sup>138</sup>.

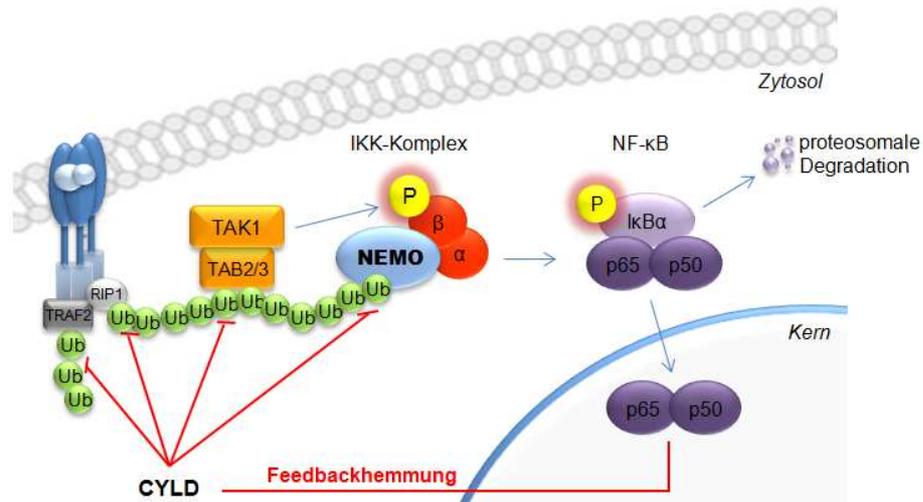


Abb. 2.12 (modifiziert) <sup>102</sup>: Feedbackhemmung der NF-κB-Signalkaskade durch CYLD

Im HCC sowie beim kolorektalen Karzinom lässt sich eine erniedrigte CYLD-Expression auf Protein- und RNA-Ebene im Vergleich zum umgebenden nicht-malignen Gewebe nachweisen <sup>139,140</sup>. Es zeigt sich ebenfalls eine erniedrigte CYLD-Expression bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dies lässt auf einen möglichen Zusammenhang von CYLD mit einer Fehlregulation der inflammatorischen Kontrolle schließen <sup>141</sup>.

### 3. Zielsetzung dieser Dissertation

Das Auftreten des hepatozellulären und des cholangiozellulären Karzinoms sowie der kolorektalen Lebermetastasen geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher.

Ursächlich sind v.a. folgende Gründe:

- Diese Malignitäten weisen eine hohe Aggressivität auf
- Das Leberparenchym ist durch Umbauprozesse geschädigt
- Es treten zu Beginn dieser Erkrankungen keine oder nur unspezifische Symptome auf, so dass die Diagnosestellung häufig erst in einem fortgeschrittenem Tumorstadium erfolgt
- Eine kurative Heilung ist bisher nur durch eine R0-Resektion möglich (Chemoresistenz)
- Die in der Klinik eingesetzten etablierten Tumormarker sind durch eine geringe Sensitivität und Spezifität nicht für die Früherkennung geeignet.

Durch seine vielfältigen Funktionen v.a. bei Entzündungsprozessen, der Zellproliferation und der Antiapoptose ist eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der hepatischen Kanzerogenese wahrscheinlich. Da NEMO bei dessen Aktivierung eine essentielle Rolle übernimmt und sich im Mausmodell eine mögliche Beziehung zur Tumorentstehung gezeigt hat, ist eine genauere Untersuchung sinnvoll.

Im Rahmen dieser Dissertation werden dazu folgende Fragestellungen analysiert:

- Zeigt sich eine veränderte Regulation von NEMO auf mRNA- oder Proteinebene in einer der untersuchten Tumorarten und ist diese spezifisch für diese Tumorart?
- Kann anhand von NEMO-mRNA oder -Protein eine Aussage zu verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern (Alter, Geschlecht, Tumorausdehnung, Differenzierungsgrad, Grad der Steatosis, Rezidiventwicklung) getroffen werden?
- Welche diagnostische Güte erreicht NEMO als Marker? Und eignet sich NEMO besser als die etablierten Marker?

## 4. Material und Methoden

### 4. Material und Methoden

#### 4.1 Materialien

##### 4.1.1 Geräte

Absorptions-Mikrotiterplatten-

Lesegerät	FluoStar Optima (BMG LABTECH Inc., Ortenberg)
Autoklav	WEBECO, Selmsdorf
Blockthermostat	BT100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	BINDER, Tuttlingen
Ein-Stunden-Signaluhr	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Geldokumentationssystem	VersaDoc (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Kühleinheiten	+ 4°C (Liebherr, Biberach a.d.R.) - 20°C (Liebherr, Biberach a.d.R.) - 80°C (Kirsch, Offenburg)
Magnetrührer	RCT (IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
Mikroskop	Axiovert 135 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
Pipetten	Eppendorf Reference 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 50 - 200 µl; 100 - 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg) PIPETBOY acu transparent (IBS integra-biosciences, Fernwald)
pH-Meter	CG 840 (Schott, Hofheim)
Real-Time PCR-Gerät	iCycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Schüttler	MTS 2 (IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
Spektrophotometer	NanoDrop <sup>®</sup> -ND-1000-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, US)
Sterilbank	Hera Safe (Heraeus, Osterode)
Stickstofftank	Taylor-Wharton Germany GmbH, Mildstedt
Thermocycler	PT-200 (Biozym Scientific GmbH, Wien, A)
Volt/Amperemeter	(Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Vortexer	MST Minishaker (IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
Waage	Feinwaage (Sartorius AG, Göttingen)
Wärmeschrank	BINDER, Tuttlingen

#### 4. Material und Methoden

Wasserbad	GFL, Burgwedel
Western Blot - Zubehör	Gläser, Kammer, Kunststoffkamm, Kassettenhalter (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer (Fein-Optik, Blankenburg)
Zentrifuge	Eppifuge (Eppendorf AG, Hamburg) Varifuge (Heraeus, Osterode)

##### 4.1.2 Verbrauchsmaterial

Einmal-Handschuhe	unsteril (Kimberly-Clark, West Malling, UK)
Klebefolie	für PCR-Mikrotiterplatten, optisch klar (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
Kryoröhrchen	2 ml (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
Messzylinder	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mikrotiterplatten	6-Well, 96-Well (BD Biosciences, San Jose, US)
Mörser & Pistill	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PCR-Mikrotiterplatten	96-Well (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
PCR-SoftTubes	Biozym Scientific GmbH, Wien, A
Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml (BD Biosciences, San Jose, US)
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml (RNase-free) (Eppendorf AG, Hamburg)
RNase-Inhibitor Spray	RNase Zap (Ambion Europe, Huntingdon, UK)
Tubes	Falcon, 15 ml, 25 ml (BD Biosciences, San Jose, US)
Western Blot - Zubehör	Blotting-Filterpapier, Blotting-Membran (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Zellschaber	25 cm (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)

##### 4.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien von Sigma (Deisenhofen), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) oder Life Technologies GmbH (Karlsruhe) bezogen.

## 4. Material und Methoden

### Enzyme

Complete Mini Protease Inhibitor	Roche Applied Science, Mannheim
SuperScript II Reverse Transkriptase	Life Technologies GmbH, Karlsruhe

### Hormone

Fortecortin	Merck, Darmstadt
Humanes Insulin	Sanofi-aventis, Frankfurt am Main

### Zytokine

TNF- $\alpha$	Biochrom AG, Berlin
---------------	---------------------

### 4.1.4 Lösungen und Puffer

Für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurde soweit nicht anders angegeben Ampuwa-Sterilwasser (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) verwendet.

#### 4.1.4.1 Extraktion Protein – Puffer

##### Pre-Lysis-Puffer – Isolierung Zytosol

Konzentration

---

Hepes (pH 7,9)	10 mM
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	1.5 mM
Kaliumchlorid (KCl)	10 mM
Dithiothreitol (DTT)	0.1 M
Protease-Inhibitor-(PI)-Cocktail +1/10	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1%
<i>mit Aqua bidest. auffüllen</i>	

##### Pre-Extraction-Puffer – Isolierung Kern

Konzentration

---

Hepes (pH 7,9)	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Natriumchlorid (NaCl)	0.42 M
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0.2 mM
Glycerol	25%
DTT	0.1 M
Protease-Inhibitor-Cocktail + 1/10 PMSF	1%

#### 4. Material und Methoden

##### 4.1.4.2 Western Blot - Lösungen und Puffer

<b>5x TBST - Stammlösung</b>	Konzentration	Menge
Tris base	50 mM	6,05 g/l
NaCl	150 mM	8,76 g/l

*mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und den pH mittels pH-Meter auf 7,5 einstellen, vor Gebrauch 1 ml Tween/Liter hinzugeben*

<b>5x Laufpuffer - Stammlösung</b>	Konzentration	Menge
Tris base	50 mM	15,1 g/l
Glycin		94 g/l
Natriumdodecylsulfat (SDS) (10%)		50 ml

*mit Aqua bidest. auf 2 l auffüllen, pH auf einen Wert von 8,9 einstellen*

<b>Transferpuffer</b>	Konzentration	Menge
Tris base	1 M	50 ml
Glycin-Lösung	1.9 M	200 ml
SDS (10%)		10 ml
Methanol (Herbeta, Berlin)		200 ml

*mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen*

<b>5x SDS-Ladepuffer</b>	Konzentration
TrisCl (pH 6,8)	0.225 M
Glycerol	50%
SDS	5%
Bromphenolblau	0.05%
DTT	0.25 M

##### 4.1.4.3 Western Blot - Gele

<b>Sammelgel</b>	Menge
Aqua bidest.	3,4 ml
Acrylamid	0,83 ml
Tris (pH 6,8)	0,63 ml

#### 4. Material und Methoden

SDS (10%)	50 µl
Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)	5 µl

<b>Trenngel (12,5%)</b>	Menge
Aqua bidest.	3,4 ml
Acrylamid	4 ml
Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
APS	50 µl
TEMED	5 µl

#### 4.1.4.4 Western Blot – Detektion mittels ECL (enhanced chemiluminescence)

<b>ECL-Lösung 1</b>	Menge
0.1 M Tris (pH 8,5)	1 ml
90 mM p-Cumarinsäure	4,4 µl
250 mM Luminol	10 µl

<b>ECL-Lösung 2</b>	Menge
0.1 M Tris (pH 8,5)	1 ml
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (30 %)	0,6 µl

*vor Gebrauch Lösung 1 und 2 in gleichem Verhältnis mischen*

#### 4.1.5 Kits und Assays

Die TaqMan®-Genexpressions-Assays für die Gene CYLD, GAP-DH und NEMO wurden ebenso wie der TaqMan® Universal PCR Master Mix von Applied Biosystems (Foster City, US) bezogen. Für den DNase-Verdau wurde das Desoxyribonuclease I-Kit der Life Technologies GmbH (Karlsruhe) eingesetzt. Die RNA- und Proteinextraktion der Gewebeproben wurde mit dem NucleoSpin® RNA/Protein-Kit der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren) durchgeführt.

##### 4.1.6 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Primär- und Sekundärantikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti – IKK $\gamma$	1:1000	Cell Signaling, Beverly, US
Anti – NF- $\kappa$ B p65	1:1000	Cell Signaling, Beverly, US
Anti – p-NF- $\kappa$ B p65	1:1000	Cell Signaling, Beverly, US
Anti – $\alpha$ -Tubulin	1:4000	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Anti- $\beta$ -Actin	1:4000	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti – Mouse	1:2000	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Anti – Rabbit	1:2000	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, US

##### 4.1.7 Humane Gewebeproben

Die in dieser Dissertation eingesetzten humanen Gewebeproben (HCC, CCC (intrahepatisch), kolorektale Lebermetastase) wurden im Rahmen von Leberteilresektionen in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin entnommen. Dies geschah nach informierter Einwilligung der Patienten und unter Zustimmung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Zur Vermeidung von langen Ischämiezeiten, die möglicherweise die untersuchte Signalkaskade beeinflussen könnte, erfolgte die Probenentnahme (ca. 30-70 mg) direkt nach der Resektion. Die Proben wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C in der Tiefkühlereinheit gelagert. Um Veränderungen in der Regulation der untersuchten Gene im Tumor nachweisen zu können, wurde zusätzlich jeweils eine Referenzgewebeprobe aus dem umgebenden nichtmalignem Gewebe gesichert. So ließ sich für jeden Patienten ein individueller Basislevel der Gene bestimmen. Patienten mit chronisch-entzündlichen Grunderkrankungen (rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) wurden ausgeschlossen. Es ist bekannt, dass die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade bei diesen Erkrankungen eine Rolle spielt. So konnte verhindert werden, dass eine veränderte Expression in der NF- $\kappa$ B-

## 4. Material und Methoden

Signalkaskade möglicherweise auf diesen Erkrankungen beruht und die Ergebnisse verfälscht wurden.

### 4.1.8 Humane Hepatozyten

Um die geplanten Methoden zu etablieren, wurden humane Hepatozyten verwendet. Die humanen Hepatozyten stammen ebenfalls aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin und wurden unter Zustimmung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin im Rahmen von verschiedenen Studien aus Leberteilresektaten von der AG Glanemann isoliert. Ausgewählt wurden drei Spender, deren Lebergewebe nicht oder nur geringgradig entzündet war. So war eine Beobachtung der Reaktion auf eine Stimulation mit TNF- $\alpha$ , das im entzündlichen Gewebe eventuell schon hochreguliert gewesen wäre, möglich.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt und sämtliche Medien, Lösungen und Materialien vor der Nutzung steril filtriert oder autoklaviert. Die Lagerung der Zellen erfolgte im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C und 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Waschschriffe mit PBS durchgeführt.

#### 4.2.1.2 Kultivierung von humanen Hepatozyten

Die Kultivierung der humanen Hepatozyten Zellen erfolgte nach der Isolation in Inkubationsmedium in 6-Well-Platten. Die Versuche wurden mit Prä-Inkubationsmedium durchgeführt, da dies keine Hormone enthielt. So konnte ein potentieller Einfluss dieser auf den Versuch ausgeschlossen werden.

	Inkubationsmedium	Prä-Inkubationsmedium
Williams' Medium E + Glutamax®	450 ml	450 ml
Penicillin/Streptomycin (100 $\mu$ M)	5 ml	5 ml
Fortecortin (0,8 ng/ml)	125 $\mu$ l	-
HEPES (15 mmol/l)	7,5 ml	7,5 ml
Natriumpyruvat (1 mmol/l)	5 ml	5 ml

## 4. Material und Methoden

*Fortsetzung von Seite 31*

	<b>Inkubationsmedium</b>	<b>Prä-Inkubationsmedium</b>
MEM	5 ml	5 ml
Humanes Insulin (1 mmol/l)	400 µl	-
FKS	50 ml	25 ml

### 4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung wurde mittels Neubauer-Zählkammer durchgeführt. So ließ sich die Gesamtzellzahl bei bekanntem Volumen ermitteln. Zur Bestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt und anschließend 10 µl luftblasenfrei in die Kammer gefüllt. Die Auszählung der ungefärbten lebenden Zellen erfolgte unter dem Mikroskop. Tote Zellen wiesen durch den Verlust der Membranintegrität eine blaue Färbung auf. Grundsätzlich wurden alle Quadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Gesamtzahl berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = (\text{Zellzahl/Zahl der Quadranten}) \times 10^4 \times \text{Verdünnung} \times \text{Volumen.}$$

### 4.2.1.4 Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$

Die Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  diente der Methodenetablierung, der Optimierung der Versuchsdurchführung sowie der Evaluierung der benötigten Konzentrationen bzw. Mengen. TNF- $\alpha$  ist bekanntermaßen ein starker Aktivator der untersuchten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade. So konnte überprüft werden, ob alle zu untersuchenden Gene mit den eingesetzten Antikörpern und Genexpressions-Assays detektiert werden können. Einen Tag vor der Versuchsdurchführung wurden jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well (6-Well-Platte) ausgesät, damit diese in den Wells adhären konnten. Direkt vor der Behandlung erfolgte ein Waschschriff, um verbleibende Reste des Inkubationsmediums zu entfernen. Pro ml Prä-Ink-Medium wurden 25 ng TNF- $\alpha$  eingesetzt. Nach einer Einwirkzeit von 15 min, 60 min bzw. 240 min konnte mit der Isolierung der RNA und der Proteine begonnen werden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

## 4.2.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

### 4.2.2.1 Proteinisolierung im Zytosol und Kern

Alle Schritte zur Proteinisolierung wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Wells zur Entfernung von Mediumresten mit PBS gespült und der Überstand entfernt. Im Anschluss wurde das Zellsediment in 300 µl Pre-Lysis-Buffer / Well (6-Wellplatte)

#### 4. Material und Methoden

resuspendiert und die Platte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben wiederholt eingefroren (in flüssigem Stickstoff) und aufgetaut (im Wasserbad) (3 Freeze-and-thaw-Zyklen). Nach der anschließenden 20 minütigen Zentrifugation ( $10000\times g$ , Eppifuge) konnte der Überstand mit der zytosolischen Fraktion abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Dieses wurde im Tiefkühler bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Proteinkonzentrationsbestimmung aufbewahrt.

Das Pellet enthielt die Kernfraktion. Zur Extraktion wurde es in  $40\ \mu\text{l}$  Pre-Extraction-Buffer resuspendiert und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgten 3 Freeze-and-thaw-Zyklen, danach wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler geschwenkt und abschließend zentrifugiert ( $20400\times g$ , 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , Eppifuge). Die Kernfraktion im Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### **4.2.2.2 Extraktion von Protein mittels NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein**

Die Extraktion von Protein erfolgte mithilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein-Kits von Macherey-Nagel und wurde gemäß des Protokolls durchgeführt. Das Kit ermöglichte die gleichzeitige Isolierung von RNA und Protein, ohne zuvor die Gewebeprobe teilen zu müssen. So waren auch kleine Gewebemengen für die Untersuchungen einsetzbar. Bei dieser Arbeit wurden jeweils 30 mg Tumor- bzw. Referenzgewebe eingesetzt.

##### **4.2.2.3 Messung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode**

Prinzip: Die Messung der Proteinkonzentrationen gewährleistete, dass für die Western-Blot-Analyse gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde die BCA-(4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin)-Methode angewandt. Diese Methode hat sich durch ihre Unempfindlichkeit gegenüber Puffersubstanzen, die meist zur Probenbearbeitung eingesetzt werden, bewährt. In einer ersten Reaktion kommt es zur Komplexbildung der Peptidbindungen der Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung (sog. Biuret-Reaktion). Im nächsten Schritt werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen reduziert, die durch eine Komplexbildung mit BCA durch Absorptionsmessung detektiert werden können.

Durchführung: Die Gewebeproben wurden zunächst 1:50, die Proben der humanen Hepatozyten 1:20, mit Aqua bidest. verdünnt. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe von Rinderserum-Albumin (BSA) in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5  $\mu\text{g/ml}$ . Um ein möglichst genaues

#### 4. Material und Methoden

Messergebnis zu erzielen, wurden Triplikate der Proben und Duplikate der Standardreihen eingesetzt. Die halbstündige Inkubation bei 37°C erfolgte in 96-Wellplatten mit jeweils 20 µl der Probe bzw. des Standards und jeweils 300 µl BCA-Mischung (BCA-Reagenz A (Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels) mit 2% Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>)). Die Extinktionsmessung erfolgte im Anschluss im FluoStar Optima bei 550 nm. Anhand der ermittelten Standardkurve aus den BCA-Standardkonzentrationen ließ sich die Proteinkonzentration der Proben errechnen. Diese wurden im Anschluss zu einer Endkonzentration von 40 µg mit Aqua bidest. Verdünnt, mit 5x SDS-Ladepuffer (20%) aliquotiert und im Western Blot eingesetzt.

##### **4.2.2.4 Western Blot**

###### **4.2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Prinzip: Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von Proteinen. Die Proteine wandern im angelegten elektrischen Feld in einer Polyacrylamid-Gelmatrix mit definierten Porengrößen und werden so nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Diese Gelmatrix entsteht durch die Polymerisation von Acrylamid und die Quervernetzung durch Bisacrylamid. Ammoniumpersulfat (APS) startet die Reaktion und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED) dient als Katalysator.

Durchführung: Um eine potentielle Störung durch Fremdproteine auszuschließen, wurden vor der Nutzung die Blot-Kammer und die Deckgläser mit 70%igem Ethanol gereinigt. Darauffolgend wurde das Trenngel gegossen und mit Aqua bidest. überschichtet, um eine möglichst regelmäßige, horizontale Gelkante zu erzielen. Das Aqua bidest. wurde direkt nach der Polymerisierung entfernt. Daraufhin erfolgten das Gießen des Sammelgels und das Einsetzen des Kunststoffkamms unter Vermeidung von Blasenbildung. Nach vollständiger Aushärtung des Gels wurde dies in die Blot-Kammer eingesetzt. Das äußere Kompartiment der Kammer wurde zu einem Drittel, das innere Kompartiment vollständig, mit 1x Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernung des Kunststoffkamms erfolgte die Befüllung der Geltaschen mit den vorbereiteten Aliquoten der Proben. Zusätzlich wurde ein Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) zur Kontrolle der Auftrennung und der Transfereffizienz sowie zur Proteingrößenbestimmung eingesetzt. Die Proteine wurden zunächst im Sammelgel bei niedriger Feldstärke (60V) gesammelt. Im Trenngel erfolgte im Anschluss die Auftrennung der Proteine (120V). Das elektrische Feld wurde solange aufrechterhalten bis die Proben das Ende des Gels erreichten.

## 4. Material und Methoden

### 4.2.2.4.2 Proteintransfer (Western Blot) und Antikörperdetektion

Prinzip: Die aufgetrennten Proteingemische werden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, um diese zu fixieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern, um das gesuchte Protein über eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu identifizieren. Der Nachweis erfolgt in einem zweiten Reaktionsschritt durch die Bindung eines mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpers. Dieser kann mittels Chemilumineszenzreaktion detektiert werden.

Durchführung: Für den Proteintransfer wurden die benötigten Filter, Schwämme sowie die Membran für 10 min in Transferpuffer eingeweicht und anschließend in den Kassettenhalter luftblasenfrei wie folgt aufeinandergeschichtet und in die Blot-Kammer eingesetzt (siehe Abb. 4.1):



Abb. 4.1: Schematischer Aufbau eines Blots

Die Kammer wurde verschlossen und der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0.34 A für 60 min. Um die Proteinbanden direkt nach dem Transfer sichtbar zu machen, wurde die Membran anschließend für 5 min mit Ponceau-S-Lösung inkubiert und danach mit Aqua bidest. kurz gespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Proteinbanden zeigten eine Anfärbung, wenn der Transfer funktioniert hat. Um die unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu sättigen, wurde diese im Anschluss in 5%iger Magermilchlösung (1 g Magermilch in 20 ml 1x TBST für eine Stunde geblockt. Darauf folgten drei jeweils fünfminütige Waschschrte mit TBST. Unter leichtem Schwenken wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit einem Primärantikörper in 5%iger BSA-Lösung (1 g BSA in 20 ml 1x TBST) inkubiert. Die optimale Verdünnung der Primärantikörper wurde im Vorfeld spezifisch ausgetestet (siehe Tab. 4.1). Am nächsten Tag wurde zur Entfernung von ungebundenem Antikörper die Membran dreimal erneut für jeweils 5 min in TBST gewaschen und schließlich für eine Stunde mit dem jeweiligen Sekundärantikörper bei Raumtemperatur

## 4. Material und Methoden

(RT) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschvorgang konnten nun die Proteinbanden mittels frisch angesetzter ECL-Lösung im VersaDoc detektiert werden. Die HRP des Sekundärantikörpers katalysiert die Umwandlung von Luminol mit Wasserstoffperoxid in dessen oxidierte Form (siehe Abb. 4.2). Durch die Reaktion entsteht eine Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum von ca. 430 nm, die photometrisch detektiert werden kann<sup>142</sup>.

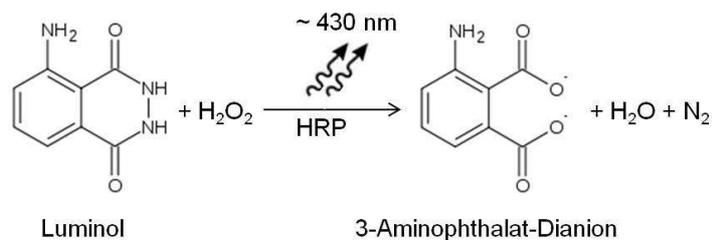


Abb. 4.2: Chemilumineszenzreaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid

Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden wurde mit der Software Quantity One durchgeführt. Die Quantifizierung der Signale erfolgte unter Subtraktion des manuell definierten Hintergrundes. Um Unterschiede in der Proteinmenge auszugleichen, wurden die Signale auf die Ladekontrolle ( $\alpha$ -Tubulin) normiert.

Wurden mehrere Proteine nachgewiesen, so wurden zur Vermeidung einer erneuten Detektion der Primär- und Sekundärantikörper mittels Stripping entfernt. Für 15 min wurde dazu die Membran in Re-Blot-Plus-Mild-Stripping-Puffer (Chemicon International, Temecula, USA) bei leichtem Schwenken inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 min in 1x TBST wurde die Membran zweimal für jeweils 5 min in 5%iger Magermilch geblockt und es konnte im Anschluss mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert werden.

### 4.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.3.1 RNA-Isolierung nach Trizol

Durchführung: Die RNA-Isolierung aus den humanen Hepatozyten erfolgte unter dem Abzug. Zu Beginn wurden in einem Waschschrift Mediumreste entfernt. Danach erfolgte die Zugabe von 500  $\mu$ l Trizol / Well (6-Well-Platte) mit einem Einwirkzeitraum von 10 min bei RT. Durch die Zugabe von Trizol wurden die Zellen lysiert und RNasen und Enzyme inaktiviert. Durch die Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen aus dem Well gelöst und in ein RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der

#### 4. Material und Methoden

Zugabe von 0,2 ml Chloroform mit anschließender 3 minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation (12.000x g, 15 min, 4°C, Eppifuge) erfolgte die Auftrennung der drei verschiedenen Phasen: wässrige Phase (RNA), Interphase (DNA), Trizol-Phase (Proteine). Die anschließende RNA-Präzipitation aus der wässrigen Phase erfolgte mit 0,5 ml Isopropanol und einer einstündigen Inkubation bei 4°C. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml 75%igem Ethanol und erneuter Zentrifugation (7500x g, 5 min, 4°C, Eppifuge). Nach der Trocknung des Pellets im Wärmeschrank bei 56°C wurden der RNA 100 µl Aqua dest. zugesetzt und erneut für 10 min erwärmt bei 56°C. Die RNA-Reinheit und RNA-Konzentration wurden mittels Nanodrop bestimmt (siehe Kapitel 4.2.3.3)

##### **4.2.3.2 Extraktion von totalRNA mittels NucleoSpin® RNA/Protein**

Die Extraktion von totalRNA aus den Gewebeproben erfolgte mithilfe des NucleoSpin® RNA/Protein-Kits von Macherey-Nagel und wurde gemäß des Protokolls durchgeführt.

##### **4.2.3.3 Messung der RNA-Konzentration**

Prinzip: Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde mit einem Nanodrop-Spektralphotometer durchgeführt. Dazu wurde die spezifische optische Dichte der RNA durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Durchführung: Es wurden jeweils 1,5 µl der Proben aufgetragen und gegen einen Referenzwert (Aqua bidest.) gemessen. Eine Absorptionseinheit  $A_{260}$  entspricht 40 µg RNA/ml. Daraus folgt die Berechnung der Konzentration:  $c [\mu\text{g RNA} / \text{ml}] = A_{260} \times 40$ . Zur Beurteilung der Reinheit wurde der Absorptionsquotient  $A_{260} / A_{280}$  herangezogen. Dieser sollte für eine optimale Reinheit zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt.

##### **4.2.3.4 DNase-Verdau**

Prinzip: Um eventuell vorhandene Verunreinigungen durch genomische DNA in der isolierten RNA auszuschließen, wird an die RNA-Extraktion ein enzymatischer DNase-Verdau angeschlossen. So werden fehlerhafte positive Signale in der Real-Time-PCR verhindert. Die eingesetzte DNase wird nach dem Verdau inaktiviert, um zu vermeiden, dass in der anschließenden cDNA-Synthese entstehende cDNA abgebaut wird.

Durchführung:

#### 4. Material und Methoden

<b>Ansatz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
RNA	1 $\mu$ g	
10x DNase I Reaction Buffer	-	1
DNase I	1 U (units)/ $\mu$ l	1
Aqua bidest.	-	auf 10 auffüllen
<i>Inkubation für 15 min bei RT</i>		
EDTA	25 mM	1
<i>Inkubation im Thermocycler für 10 min bei 65°C</i>		

#### 4.2.3.5 Synthese der komplementären DNA

Prinzip: Um die RNA in der Real-Time-PCR einsetzen zu können, ist die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) durch eine reverse Transkriptase notwendig. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert die Reaktion. Zur Initiation benötigt sie Primer. Es erfolgt die Generierung eines RNA-DNA-Hybridstrang. Die anschließende Hydrolyse der RNA schließt die cDNA-Synthese ab. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen, wird ein Ribonuclease-Inhibitor eingesetzt, der die RNA vor dem Abbau schützt.

Durchführung: Die Synthese wurde wie folgt durchgeführt:

<b>Ansatz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
RNA	500 ng	
Random-Hexamer-Primer	50 $\mu$ M	1
RNasin (Promega Corporation, Madison, US)	1 U/ $\mu$ l	1
Aqua bidest.	-	auf 12 auffüllen
<i>Inkubation im Thermocycler für 10 min bei 70°C</i>		
10x PCR Puffer	-	2
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1
dNTP	10 mM	1
DTT	0.1 M	2
Aqua bidest.	-	1
<i>Inkubation im Thermocycler für 5 min bei 42°C</i>		
SuperScript II Reverse Transkriptase	200 U/ $\mu$ l	1
<i>Inkubation im Thermocycler für 50 min bei 42°C und für 15 min bei 70°C</i>		

#### 4. Material und Methoden

Die weitere Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

##### 4.2.3.6 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR)

Prinzip: Die klassische Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Vervielfältigung kleinster Mengen eines DNA-Abschnitts mittels einer hitzestabilen Taq-Polymerase (DNA-Polymerase). Dies ist durch die zyklische Wiederholung der einzelnen PCR-Schritte möglich. Die Denaturierung dient der Trennung des DNA-Doppelstranges, das Annealing der Anlagerung der Primer und im letzten Schritt, der Elongation, wird die DNA amplifiziert. Die Echtzeit-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Die Besonderheit liegt hier in der quantitativen Erfassung der gewonnenen cDNA während jedes PCR-Zyklus'. So lässt sich die Expression der zu untersuchenden Gene auf RNA-Ebene anhand der cDNA quantifizieren.

Durchführung: In dieser Dissertation wurde die Real-Time-PCR mithilfe der TaqMan®-Gene Expression Assays für NEMO, CYLD, GAP-DH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt und pro Ansatz jeweils 75 ng cDNA eingesetzt (Ansatz und Protokoll siehe Tab. 4.2 und Tab. 4.3). Um Fehler weitgehend auszuschließen, wurden Triplikate der Proben genutzt und das arithmetische Mittel bestimmt. Als Referenzgen (housekeeping gene) wurde die GAP-DH ausgewählt, da sie ubiquitär und unabhängig vom Zellzyklus in Zellen vorliegt.

Tabelle 4.2: TaqMan® PCR Ansatz

TaqMan® Universal PCR Master Mix	10 µl
20x TaqMan®-Gene Expression Assay	1 µl
cDNA	3 µl
RNase-freies Wasser	6 µl

Tabelle 4.3: Real-Time-PCR-Protokoll

PCR-Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Inkubation mit Uracil-N-Glycosylase (UNG)	1	50°C	2 min
Aktivierung der Taq-Polymerase	1	95°C	10 min
Denaturierung	50	95°C	15 sec
Komb. Annealing und Verlängerung		60°C	1 min

## 4. Material und Methoden

Zur Auswertung, ob ein quantitativer Unterschied in der Expression der einzelnen Gene zwischen den Tumor- und Referenzproben besteht, wurde die Delta-Delta- $C_t$ -Methode angewandt. Bei dieser Methode wird die Expression eines Zielgens auf die Expression des Housekeeping-Gens bezogen ( $\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ GAP-DH}}$ ) und aus den Delta- $C_t$ -Werten beider Gruppen der Delta-Delta- $C_t$ -Wert gebildet ( $\Delta\Delta C_t = C_{t \text{ Tumorgewebe}} - C_{t \text{ Referenzgewebe}}$ ). Um den relativen Expressionsunterschied zu ermitteln, wurde dieser Wert anschließend in die Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  eingesetzt.

### 4.3 Datenbanken und Software

Die folgende Software und Datenbanken wurden für die Erstellung dieser Dissertation verwendet:

Excel 2007	Microsoft
SPSS Statistics 19	IBM
Reference Manager 11	ISI ResearchSoft, Berkeley, US
Quantity One Analysis Software 29	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, US
MyiQ Optical System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, US
NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank	NCBI, Bethesda, USA, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>

### 4.4 Statistische Auswertungen

#### 4.4.1 Deskriptive Statistik

Zur deskriptiven Statistik wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und Häufigkeiten berechnet. Die grafische Darstellung erfolgte mittels Punktdiagrammen.

#### 4.4.2 Kruskal-Wallis-Test / Mann-Whitney-U-Test

Zunächst wurden die verschiedenen Variablen der Gruppe mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf eine Normalverteilung überprüft. Da keine Normalverteilung vorlag, erfolgte der statistische Vergleich von Gruppen und Messergebnissen anhand nichtparametrischer Tests. Für alle Variablen wurde der Vergleich aller Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Zeigte sich hier eine Signifikanz, wurde im Anschluss der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen mit Bonferroni-Korrektur zur  $\alpha$ -Fehler-Kumulierung durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert  $< 0,05$  festgelegt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplots (\* = Extremwerte; ° = Ausreißer).

#### 4.4.3 ROC (Receiver operating characteristic) - Analyse

ROC-Kurven, die die Darstellung von Sensitivität und Spezifität bei verschiedenen Referenzwerten (Cut-Off-Werten) ermöglichen, dienen der Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit eines Markers anhand der Fläche unter der Kurve (engl. „area under the curve“ - AUC) (siehe Abb. 4.3). Ein Marker weist eine Trennschärfe auf, wenn sich die AUC signifikant von der Bezugslinie unterscheidet. Je größer (max. 1) die AUC ist, desto größer ist die Gesamtgenauigkeit eines diagnostisches Testes. Liegt der Wert bei 0,5 kann von einem zufälligen Ergebnis ausgegangen werden.

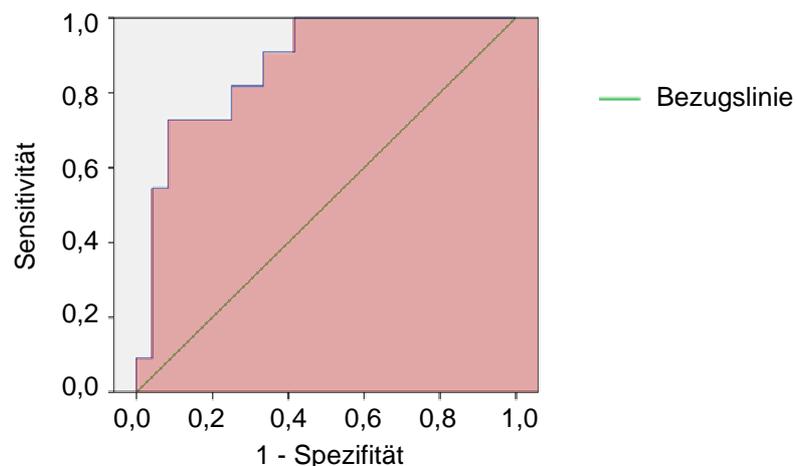


Abb. 4.3: Beispiel ROC-Kurve mit Kennzeichnung der „Area under the curve“ (AUC) (rot markiert)

Zur weiteren Beurteilung der Wertigkeit von NEMO als Tumormarker wurden der positive (PPV) und negative prädiktive Wert (NPV) mittels Vier-Felder-Tafel berechnet. Der PPV (bzw. NPV) gibt den Anteil der Spender an, die bei einem positiven (negativen) Testergebnis tatsächlich erkrankt sind bzw. die untersuchten Merkmale (nicht) aufwiesen.

Beispiel für eine Vierfelder-Tafel bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades (G2 vs. G3). Es wurde getestet, wie viele Tumorproben mit einem Cut-Off-Wert  $< x\%$  richtig als G3-Tumor erkannt wurden.

	<b>G3</b>	<b>G2</b>	Summe
<b>Cut-Off-Wert <math>&lt; x\%</math></b>	a	b	a + b
<b>Cut-Off-Wert <math>&gt; x\%</math></b>	c	d	c + d
Summe	a + c	b + d	N

#### 4. Material und Methoden

$$\text{PPV} = a / (a+b)$$

$$\text{NPV} = d / (c+d)$$

$$\text{Sensitivität} = a / (a+c)$$

$$\text{Spezifität} = d / (b+d)$$

##### **4.4.4 Korrelation nach Spearman**

Zur Bestimmung der Stärke von Beziehungen zwischen mehreren nicht normalverteilten Variablen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman eingesetzt. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant gewertet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Vorversuche

Im Vorfeld wurde das experimentelle Setup etabliert und evaluiert. Die in diesem Rahmen durchgeführten Vorversuche konzentrierten sich im Wesentlichen auf:

- Methodische Durchführung der RNA- und Protein-Extraktion sowie die Bestimmung der optimalen Konzentration für die weitere Versuchsdurchführung
- Durchführung des Western Blots mit Optimierung der Verdünnung der Antikörper
- Durchführung der Real-Time-PCR

Zentraler Bestandteil der hier durchgeführten Untersuchungen war die Detektion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Humane Hepatozyten wurden über verschiedene Zeiträume (15 min, 60 min, 240 min) mit TNF- $\alpha$  inkubiert, um die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu initiieren. Die Aktivitätsmessung erfolgte anhand der Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B p65 (p-p65). Dieser Versuchsaufbau diente als Grundlage für die Untersuchungen mit NEMO, da NEMO Teil der durch TNF- $\alpha$ -aktivierten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ist. Bereits nach 15 min zeigte sich in einem optimalen Versuchsaufbau ein Anstieg der p-p65-Protein-Expression im Zytosol und im Zellkern (siehe Abb. 5.1). Dies zeigte, dass NF- $\kappa$ B p65 zunächst im Zellkern aktiviert wurde und nach kurzer Zeit in den Nucleus translozierte. Der höchste Spiegel konnte nach 60 min detektiert werden. Der Gesamtproteinspiegel von NF- $\kappa$ B veränderte sich minimal. Wie erwartet lag ohne Stimulation NF- $\kappa$ B p-p65 im Zellkern nicht vor (nicht abgebildet).

Die Expression von NEMO-Protein veränderte sich unter der Stimulation von TNF- $\alpha$  nicht (siehe Abb. 5.2). Dies war am Ehesten darauf zurückzuführen, dass der NEMO-Antikörper die Gesamt-Proteinexpression misst und dieser sich wie die p65-Gesamtexpression nicht wesentlich ändert. Für die Versuche in dieser Dissertation war die Gesamt-Proteinexpression zur Beurteilung der Ergebnisse ausreichend.

## 5. Ergebnisse

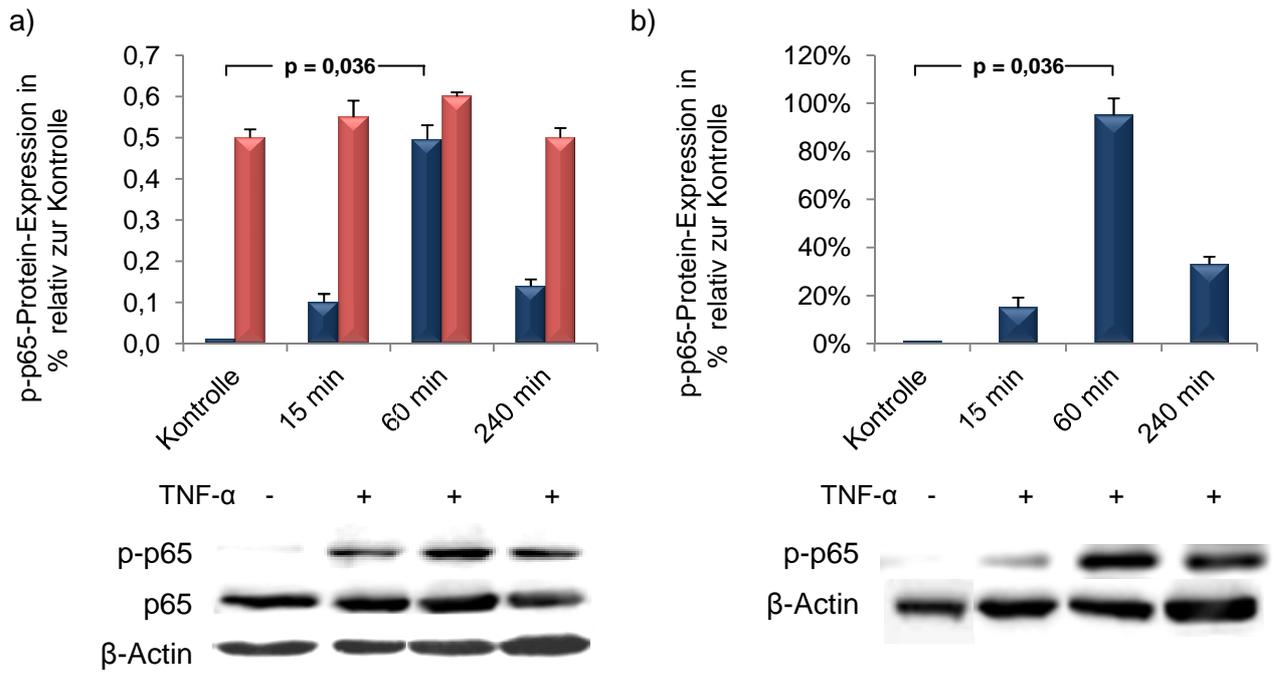


Abb. 5.1: Die Aktivierung und nukleäre Translokation von NF-κB p-p65 **a)** Zytosol: Gesamt-p65 (rot) liegt im Zytosol auch ohne Stimulation durch TNF-α vor. Das nach TNF-α-Stimulation durch Phosphorylierung aktivierte p65 (blau) hat den höchsten Spiegel nach 60 min (p-Wert = 0,036). **b)** Zellkern: Nach 60 min erreicht die aktivierte Form p-p65 den höchsten Spiegel (p-Wert = 0,036). Die Daten repräsentieren drei verschiedene unabhängige Experimente.

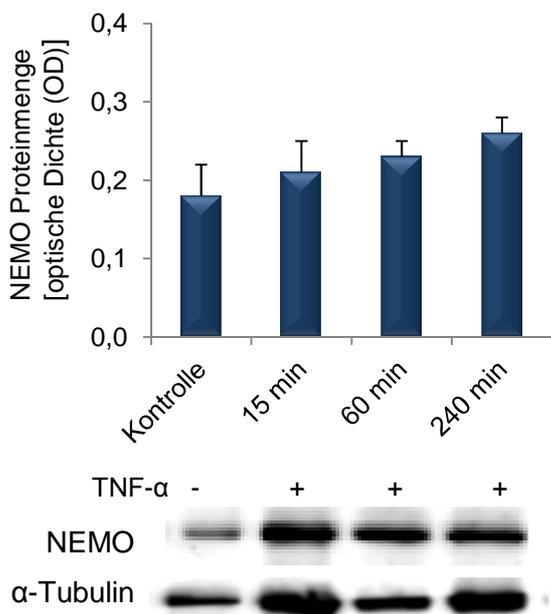


Abb. 5.2: NEMO-Protein-Expression unter TNF-α-Stimulation. Die Daten repräsentieren drei verschiedene unabhängige Experimente.

CYLD wird bei der Aktivierung von NF-κB vermehrt exprimiert. Die CYLD-mRNA weist bei 4-stündiger Inkubationszeit eine signifikante Veränderung gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle auf (siehe Abb. 5.3). Es reguliert als Feedbackinhibitor verschiedene Mitglieder der Signalkaskade. Die Expression von NEMO änderte sich nur

## 5. Ergebnisse

geringfügig (siehe Abb. 5.3). Dies ließ sich am Ehesten ebenfalls darauf zurückführen, dass die Gesamtexpression gemessen wird und nicht die aktivierte Form. Eine leichte Gegenregulation von CYLD blieb zu vermuten. Für die weitere Versuchsdurchführung der Real-Time-PCR war dieses Ergebnis ausreichend.

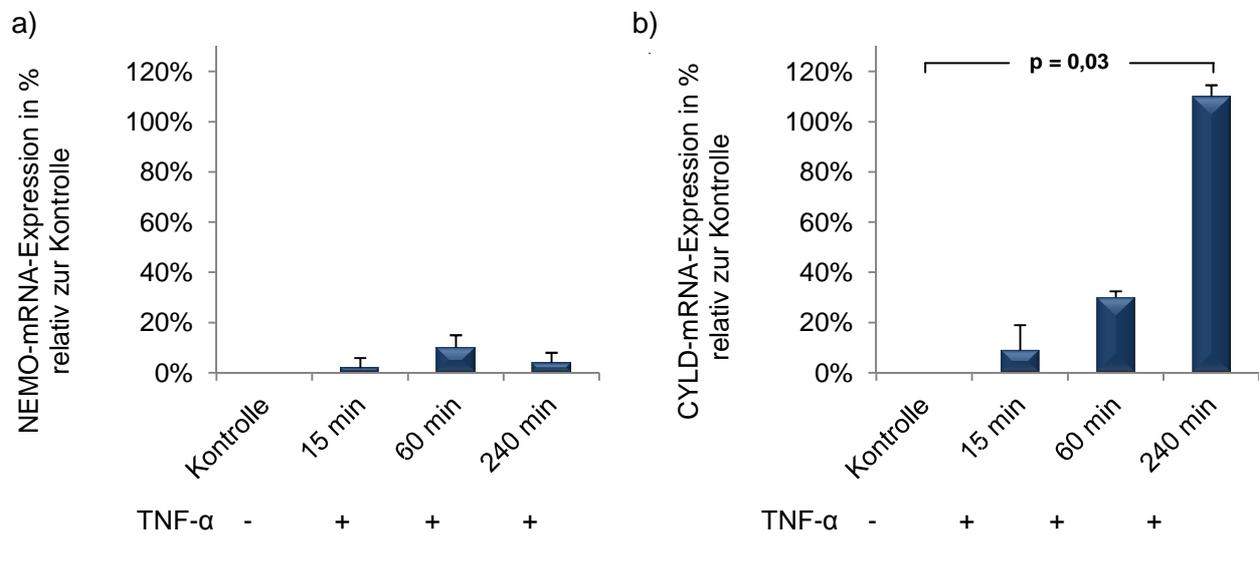


Abb. 5.3: NEMO- und CYLD-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation. **a)** NEMO-mRNA: Im Vergleich zur Kontrolle weisen die mRNA-Level keinen signifikanten Verlauf auf. **b)** CYLD-mRNA: Ein signifikanter Anstieg der CYLD-mRNA-Expression ist nach 240 min nachweisbar (p-Wert = 0,03). Der Trend zeigt sich bereits nach 60 min (p-Wert = 0,054). Die Daten repräsentieren drei verschiedene unabhängige Experimente.

Insgesamt konnten alle geplanten Versuchsdurchführungen so optimiert werden, dass sie in dieser Dissertation zur Ergebnisfindung eingesetzt werden konnten.

### 5.2 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 35 Tumor- und die dazugehörigen nichtmalignen Referenzproben von 18 Patientinnen und 17 Patienten untersucht. 11 (5 männlich, 6 weiblich) Patienten waren an einem HCC erkrankt und jeweils 12 (6 männlich, 6 weiblich) an einem intrahepatischen CCC bzw. einem mCRC. Die Altersverteilung in den drei Tumorgruppen war ausgeglichen (siehe Abb. 5.4). Die in die Analysen einbezogenen klinisch-pathologischen Parameter waren die Diagnose, der Fibrosegrad, die Ausdehnung des Tumors (Tumorgröße), der Differenzierungsgrad, der Grad der Steatosis hepatis sowie die Entwicklung eines Rezidives drei Jahre postoperativ (Verteilung der Parameter siehe Tab. 5.1).

## 5. Ergebnisse

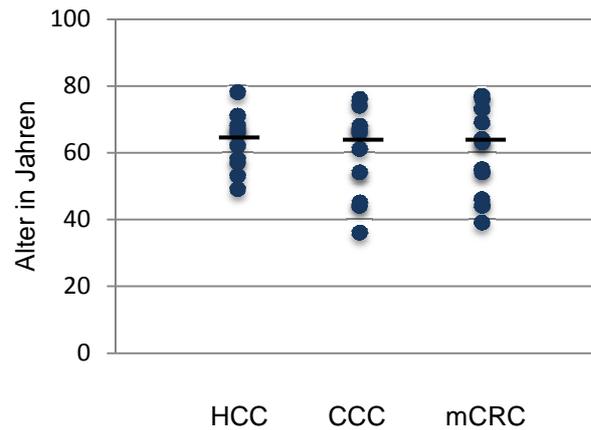


Abb. 5.4: Darstellung des Patientenalters zum OP-Zeitpunkt in den Tumorgeweben HCC, CCC und mCRC mit Kennzeichnung der Medianwerte ( — ) (HCC ( $n = 11$ ): 66 Jahre; CCC ( $n = 12$ ): 63,5 Jahre; mCRC ( $n = 12$ ): 63 Jahre); jeder Kreis repräsentiert eine(n) Patient(en)

Tabelle 5.1: Verteilung der Parameter Fibrosegrad, Tumorgöße, Differenzierungsgrad, Steatosis und Rezidiventwicklung in den drei Tumorgruppen HCC, CCC und mCRC

		HCC (n = 11)	CCC (n = 12)	mCRC (n = 12)	gesamt (n = 35)
<b>Fibrosegrad</b>	0	2	8	*	10
	1	2	3	*	5
	2	7	1	*	8
<b>Tumorgöße</b>	T1	6	0	*	6
	T2	1	7	*	8
	T3	4	4	*	8
	T4	0	1	*	1
<b>Differenzierungsgrad</b>	G1	0	0	1	1
	G2	7	8	8	23
	G3	4	4	3	11
<b>Steatosis hepatis</b>	0 (0%)	6	9	7	22
	I (< 20%)	0	2	1	3
	II (> 20%)	5	1	0	6
<b>Rezidiventwicklung</b>	nein	7	8	12	27
	ja	4	3	0	7

\*es lag keine entsprechende histologische Beurteilung vor

### 5.3 Expression von NEMO auf mRNA- und Protein-Ebene

Die in dieser Dissertation verwendeten Analysen wurden mit den folgenden Daten durchgeführt:

- mRNA-Expression: Die mRNA-Expression wurde mit der Delta-Delta-C<sub>T</sub>-Methode berechnet und ist in relativen Werten angegeben. Die Expression im nichtmalignen Referenzgewebe entspricht 100%. Ist beispielsweise im Tumorgewebe die Expression im Vergleich zum Referenzgewebe niedriger, ist der Wert < 100%.
- Protein-Expression: Es werden absolute Werte angegeben. Die Proben wurden dazu alle auf eine einheitliche Kontrollprobe normiert, die auf jedem Western Blot vorhanden war. Es handelte sich um eine unbehandelte Probe aus nichtmalignem Gewebe. Zudem wurde die relative Protein-Expression in den Analysen eingesetzt. Die Berechnung wurde wie folgt durchgeführt:

$$\frac{\text{Tumorgewebe}}{\text{Referenzgewebe}} * 100\%.$$

### 5.4 NEMO als Marker zur Unterscheidung von Diagnosen

Zunächst wurden die Expressionen von NEMO-mRNA und NEMO-Protein in den drei verschiedenen Tumorarten evaluiert. Ziel war es herauszufinden, ob sich spezifische Expressionslevel für die jeweiligen Tumoren nachweisen lassen und auf diese Weise NEMO potentiell in der Diagnosesicherung einsetzbar ist. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-H-Test (KW-Test) bzw. Mann-Whitney-U-Test (MW-Test).

#### 5.4.1 NEMO-mRNA-Expression im HCC, CCC und mCRC

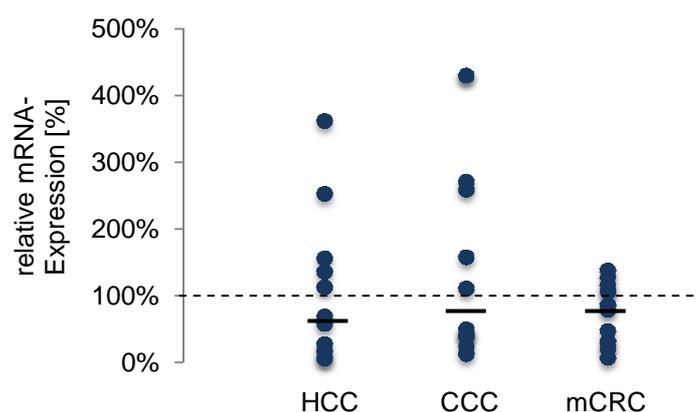


Abb. 5.5: Vergleich der relativen mRNA-Expression (nichtmalignes Referenzgewebe = 100%) in den Tumorgeweben HCC, CCC und mCRC mit Kennzeichnung der Medianwerte (—) (HCC ( $n = 11$ ): 68%; CCC ( $n = 12$ ): 79,5%; mCRC ( $n = 12$ ): 81,5%);  $p$ -Wert = 0,547; jeder Kreis repräsentiert eine(n) Patienten(in)

## 5. Ergebnisse

Analysierte man die relative mRNA-Expression, so zeigte sich im Median eine Verminderung in allen drei Tumorarten (siehe Abb. 5.5). Die Unterschiede waren nicht ausgeprägt genug, um eine Signifikanz aufzuweisen ( $p$ -Wert = 0,547).

### 5.4.2 NEMO-Protein-Expression im HCC, CCC und mCRC

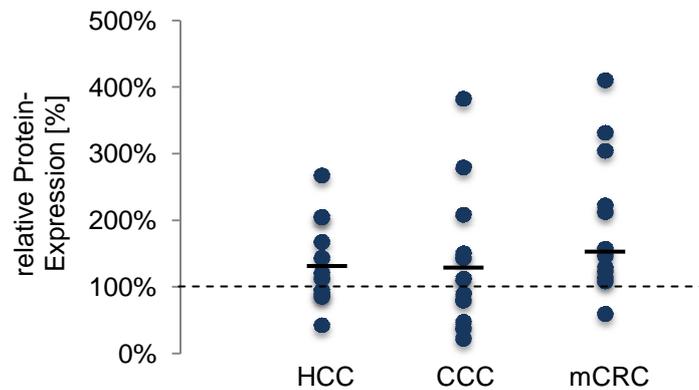


Abb. 5.6: Vergleich der relativen Protein-Expression (nichtmalignes Referenzgewebe = 100%) in den Tumorgeweben HCC, CCC und mCRC mit Kennzeichnung der Medianwerte (—) (HCC ( $n = 11$ ): 120%; CCC ( $n = 12$ ): 111,5%; mCRC ( $n = 12$ ): 151,5%);  $p$ -Wert = 0,195; jeder Kreis repräsentiert eine(n) Patient(en)

Die NEMO-Protein-Expression war in allen drei Tumorgeweben im Median leicht erhöht (siehe Abb. 5.6). Die Unterschiede zwischen den Tumorgruppen waren gering und wiesen keine Signifikanz auf ( $p$ -Wert = 0,195).

Die Analyse der absoluten Proteinmengen in den nichtmalignen Referenzgeweben zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen (KW-Test:  $p = 0,013$ ). Die hohe Signifikanz war insbesondere auf den Unterschied der NEMO-Proteinlevel zwischen dem nichtmalignen Gewebe aus der HCC-Leber und dem nichtmalignen Gewebe aus der CCC-Leber zurückzuführen. Das Gewebe aus der HCC-Leber wies deutlich mehr NEMO-Protein auf (MW-Test:  $p = 0,013$ ; siehe Abb. 5.7).

Dies stellte sich ebenfalls im Tumorgewebe dar, sowohl zwischen den drei Tumorgruppen (KW-Test:  $p = 0,005$ ) als auch im direkten Vergleich zwischen HCC- und CCC-Gewebe (MW-Test:  $p = 0,003$ , siehe Abb. 5.7).

## 5. Ergebnisse

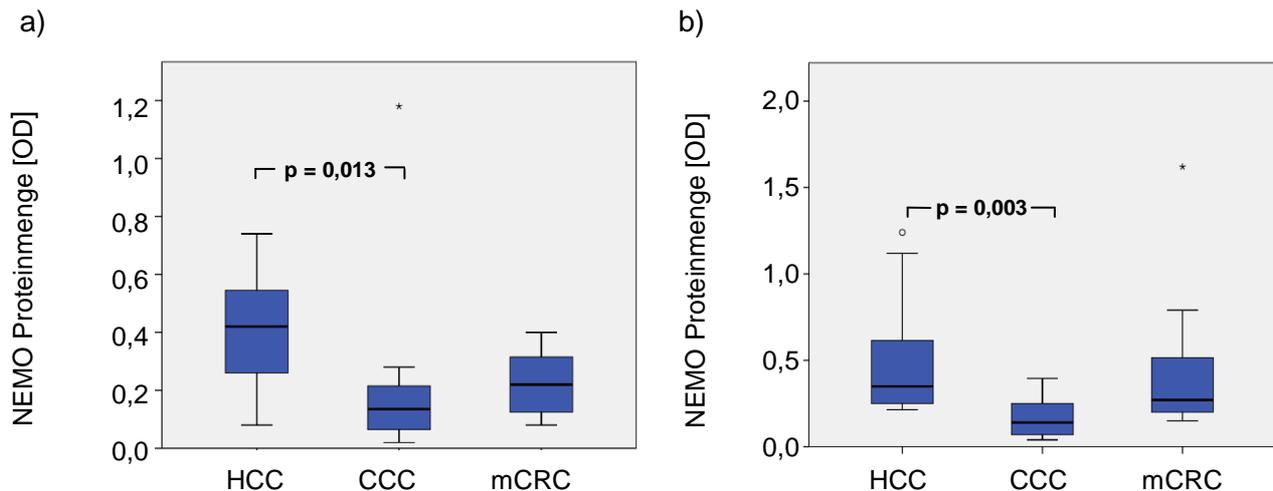


Abb. 5.7: Absolute NEMO-Protein-Expression **a)** im Referenzgewebe in den drei Tumorgruppen: Das Gewebe weist abhängig von der Tumorart unterschiedliche NEMO-Protein-Level auf (KW-Test:  $p = 0,013$ ); im MW-Test HCC vs. CCC:  $p = 0,013$ ; Medianvergleich: 0,42 vs. 0,13; ( $n = 35$ ) **b)** im Tumorgewebe in den drei verschiedenen Tumorgruppen: Das Proteinlevel des HCC ist signifikant höher als das Proteinlevel des CCC ( $p = 0,003$ , Medianvergleich: 0,35 vs. 0,14); KW-Test für alle Gruppen:  $p = 0,005$ ; ( $n = 35$ )

Inwieweit die absolute NEMO-Protein-Expression als ein möglicher Marker zur Unterscheidung der Tumorart eingesetzt werden kann, wurde mittels ROC-Analyse untersucht. Diese diente der Ermittlung jener Grenzwerte (Cut-Off-Werte), die ein optimales Gleichgewicht zwischen Sensitivität und Spezifität herstellen. Ziel war es eine bestmögliche Unterscheidung der Tumoren zu erreichen. Analyierte man die Aussagekraft des Testes bezüglich der Diagnose „HCC“, so berechnete sich eine Fläche unter der Kurve (AUC) von 0,788 im Referenz- und von 0,744 im Tumorgewebe (siehe Abb. 5.8). Dies deutete auf eine mittlere bis akzeptable Gesamtgenauigkeit (Wert  $< 0,8$ ) hin. Die Sensitivität und Spezifität für die Eignung als Marker befanden sich in beiden Gewebetypen im mittleren Bereich (siehe Tab. 5.2). Insgesamt wurden nur 50-53% der HCC (positiver prädiktiver Wert - PPV) bei einem Cut-Off-Wert  $> 0,255$  und 85-88% der anderen Tumoren bei einem Cut-Off-Wert  $< 0,255$  richtig detektiert (negativer prädiktiver Wert - NPV). Analyierte man diesen Test für die Diagnosesicherung „CCC“ so ließen sich zunächst AUC-Werte mit Flächen von 0,746 (im Referenzgewebe) und 0,824 (im Tumorgewebe) ermitteln (siehe Abb. 5.8). Die Sensitivität und Spezifität lagen wie beim HCC ebenfalls im mittleren Bereich (siehe Tab. 5.2). Es konnten 50-56% der

## 5. Ergebnisse

CCC mit dem Test (Cut-Off-Wert < 0,195) richtig diagnostiziert werden, 82-84% der anderen Tumoren wurden mit einem Cut-Off-Wert > 0,195 richtig zugeordnet.

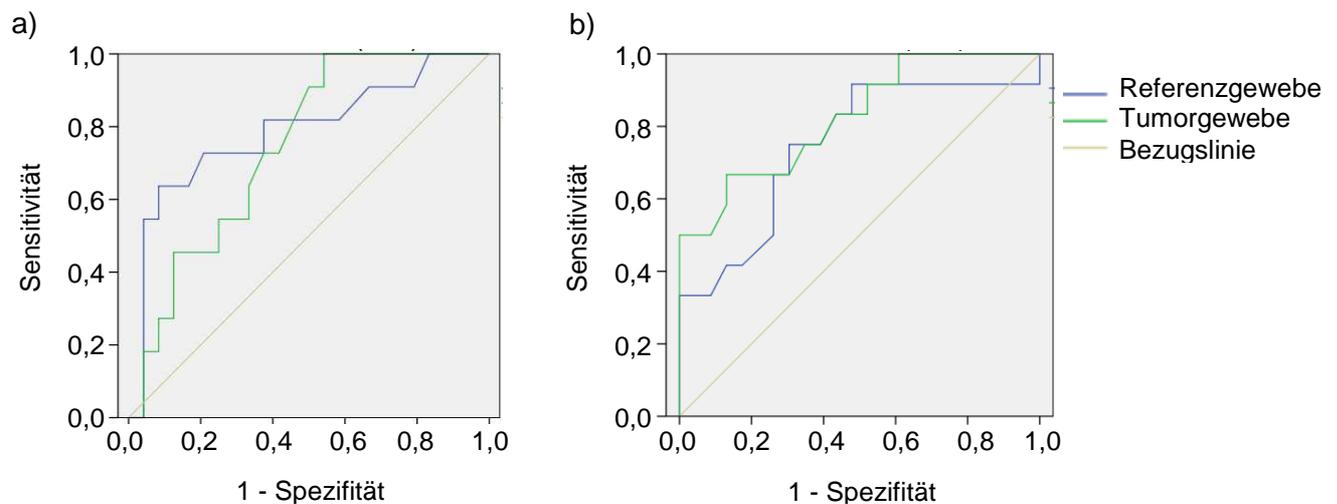


Abb. 5.8: ROC-Kurve zur Analyse der Tumorart **a)** HCC vs. andere Tumoren (absolute NEMO-Protein-Expression im Referenz- (AUC = 0,788, KI (Konfidenzintervall): 0,611-0,965; p-Wert = 0,022) und Tumorgewebe (AUC = 0,744, KI: 0,582-0,906; p-Wert = 0,007); ( $n = 35$ ) **b)** CCC vs. andere Tumoren (absolute NEMO-Protein-Expression im Referenz- (AUC = 0,746, KI (Konfidenzintervall): 0,563-0,929; p-Wert = 0,018) und Tumorgewebe (AUC = 0,824, KI: 0,678-0,971; p-Wert = 0,002); ( $n = 35$ ); *diagonale Segmente ergaben sich aus Bindungen*

Tabelle 5.2: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der NEMO-Protein-Expression bei der Unterscheidung der Tumorarten im nichtmalignen Referenzgewebe und im Tumorgewebe

<b>Nichtmalignes Referenzgewebe</b>			
<b>HCC (<math>n = 11</math>)</b>	<b>Wert</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	0,255		
Sensitivität	82%	48	98
Spezifität	63%	41	81
<b>CCC (<math>n = 12</math>)</b>	<b>Wert</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	0,195		
Sensitivität	75%	43	95
Spezifität	70%	47	87
<b>Tumorgewebe</b>			
<b>HCC (<math>n = 11</math>)</b>	<b>Wert</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	0,205		

## 5. Ergebnisse

Sensitivität	73%	39	94
Spezifität	71%	49	87
<b>CCC (n = 12)</b>	<b>Wert</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	0,235		
Sensitivität	75%	43	95
Spezifität	61%	39	80

Insgesamt konnte NEMO – weder auf mRNA- noch auf Proteinebene – die Diagnosen hochsensitiv und hochspezifisch zuordnen. Das Level an NEMO-Protein war im HCC signifikant höher als im CCC. Im Vergleich zu den beiden anderen Tumorarten ist die Entstehung des HCC häufig mit einer Leberfibrose bzw. -zirrhose vergesellschaftet, die als Basis der Tumorentstehung dienen kann. Dieser chronische Inflammations- und Umbauprozess geht mit einer Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade einher. Um herauszufinden, ob die Erhöhung der NEMO-Proteinmenge mit diesen Prozessen in einem Zusammenhang steht, wurde die Korrelation zwischen der Proteinmenge und dem Vorhandensein einer Leberfibrose (Grad 0 – keine Fibrose vs. Grad I / II – mäßiggradige Fibrose) untersucht. Da für das mCRC keine Angaben vorlagen, wurden in diese Analyse nur die Gruppen HCC und CCC einbezogen (N = 23). Es zeigte sich ein schwach positiver Zusammenhang (siehe Tab. 5.3).

Tabelle 5.3: Korrelation zw. der NEMO-Proteinmenge und dem Vorhandensein einer Fibrose

		<b>Fibrose ja / nein (n = 23)</b>
<b>Nichtmalignes Gewebe</b>	Korrelationskoeffizient	0,717*
	Signifikanz (2-seitig)	0,034
		<b>Fibrose ja / nein (n = 23)</b>
<b>Tumorgewebe</b>	Korrelationskoeffizient	0,424*
	Signifikanz (2-seitig)	0,044

\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Wenn eine Fibrose vorlag, war die Proteinmenge von NEMO im Mittelwert höher als in nicht fibrotischem Gewebe (siehe Abb. 5.9).

## 5. Ergebnisse

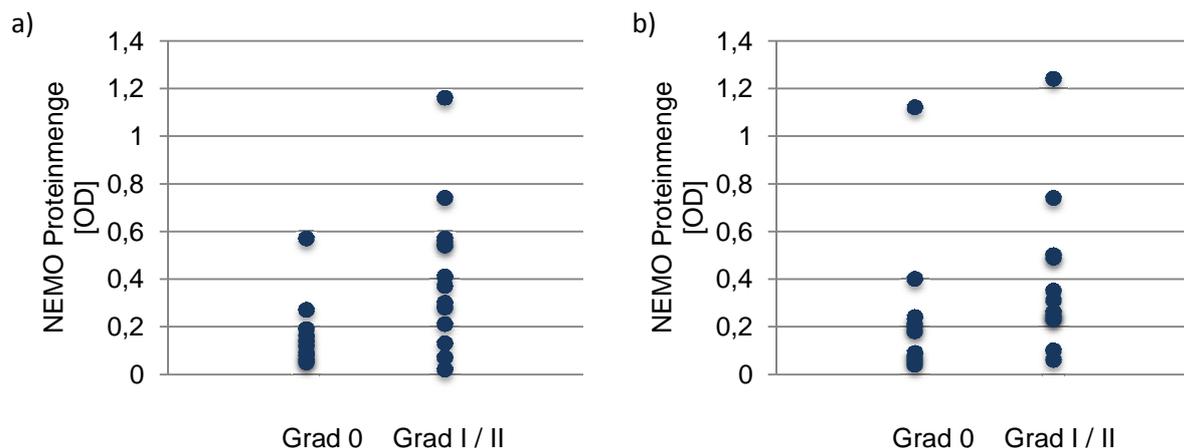


Abb. 5.9: Absolute Proteinmenge in nicht fibrotischer (Grad 0) und fibrotischer (Grad I / II) Leber: **a)** Referenzgewebe: Grad 0 =  $0,173 \pm 0,15$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung); Grad I / II =  $0,412 \pm 0,31$ ; **b)** Tumorgewebe: Grad 0 =  $0,262 \pm 0,32$ ; Grad I / II =  $0,387 \pm 0,311$ ; jeder Kreis repräsentiert eine(n) Patient(en); ( $n = 23$ )

Ob sich das Protein NEMO als Marker für das HCC eignet oder nur den chronischen, entzündlichen Umbauprozess widerspiegelt, bleibt diskussionswürdig. In der Gruppe der Patienten mit einem CCC wiesen nur vier (von zwölf Patienten) eine Fibrose auf, während in der Gruppe der HCC-Patienten neun (von elf Patienten) einen fibrotischen Prozess zeigten. Um eine Aussage treffen und ggf. weiterführende statistische Analysen durchführen zu können, müssten die beiden untersuchten Gruppen homogen sein.

Neben dem Einsatz als diagnostischer Tumormarker sind weitere klinische Einsatzmöglichkeiten für NEMO vorstellbar, die im weiteren Verlauf dieser Dissertation untersucht werden.

### 5.5 NEMO als Marker zur Analyse der Tumorausdehnung

Die Analyse der Ausdehnung des Primärtumors erfolgte, um eine Aussage treffen zu können, ob NEMO in den verschiedenen Tumorstadien unterschiedlich exprimiert ist. Ist eine Veränderung im Verlaufe des Tumorwachstums erkennbar, so ist es möglich, dass NEMO im Wachstumsprozess des Tumors eine Rolle spielt. Diese Erkenntnis könnte eine mögliche Rolle in der diagnostischen Früherkennung von Tumoren spielen.

Untersucht wurden nur die Gruppen HCC und CCC, da für die Gruppe mCRC keine histologische Beurteilung vorlag.

## 5. Ergebnisse

### 5.5.1 NEMO-mRNA-Expression in den Tumorstadien T1 – T4

In den Tumorstadien T1 und T2 zeigte sich eine Verminderung der mRNA im Median. In dem fortgeschrittenen Stadium T3 fanden sich im Median erhöhte NEMO-mRNA-Expressionswerte (siehe Abb. 5.10).

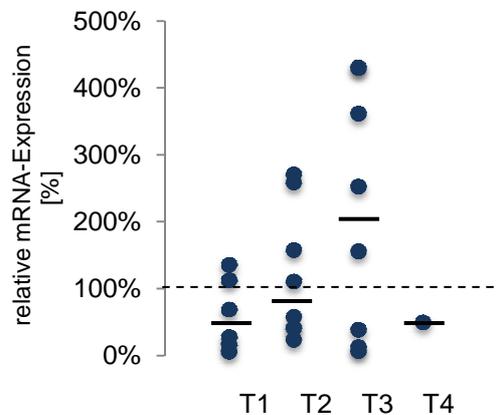


Abb. 5.10: Vergleich der relativen mRNA-Expression (nichtmalignes Referenzgewebe = 100%) in den Tumorstadien T1, T2, T3 und T4 mit Kennzeichnung der Medianwerte (—) (T1: 47,5%; T2: 83,5%; T3: 203,5%; T4: 49%); p-Wert = 0,313 (T4 wurde in der Analyse ausgeschlossen); jeder Kreis repräsentiert eine(n) Patienten(in); (n = 23)

Für das T4-Stadium, das ebenfalls eine Verminderung aufwies, lag nur eine Probe vor, so dass der Wert nicht in die Berechnung einbezogen wurde. Die Ermittlung der Signifikanz mittels KW-Test zeigte, dass es keinen Unterschied der mRNA-Expression zwischen den Tumorstadien T1, T2 und T3 gab. Der p-Wert lag bei 0,313, so dass eine Interpretation als Tendenz zweifelhaft war. Dies bestätigte sich auch in den einzelnen Tumorgruppen (HCC: p-Wert: 0,319; CCC: p-Wert: 0,850).

### 5.5.2 NEMO-Protein-Expression in den Tumorstadien T1 – T4

Für die Ausdehnung des Primärtumors ließ sich kein signifikanter Unterschied in der relativen NEMO-Protein-Expression nachweisen (insgesamt: p = 0,844, HCC: p = 0,637, CCC: p = 0,571). In allen 4 Tumorstadien lag der Median zwischen 111% und 117%. Dies bedeutet, dass sich im Tumorgewebe im Vergleich zum Referenzgewebe nur eine leichte Erhöhung der relativen NEMO-Protein-Expression zeigt und diese sich in den verschiedenen Tumorgrößen nicht veränderte. Dies zeigte sich ebenfalls in der relativen NF-κB-Expression bei einem Median zwischen 150% – 154%. Analyierte man die absoluten Werte des Tumorgewebes, so zeigte sich zunächst im Kruskal-Test ein p-Wert von 0,016. Der gezielte Vergleich zwischen den Gruppen T1 bis T3 mittels Mann-

## 5. Ergebnisse

Whitney-Test wies für das T3-Stadium einen signifikant höheren NEMO-Protein-Level im Vergleich zum T2-Tumor auf (nach Bonferroni-Korrektur:  $p = 0,036$ ). Der Vergleich des T1- mit dem T2-Stadium wies nach Bonferroni-Korrektur einen  $p$ -Wert von 0,06 auf und war folglich nicht signifikant.

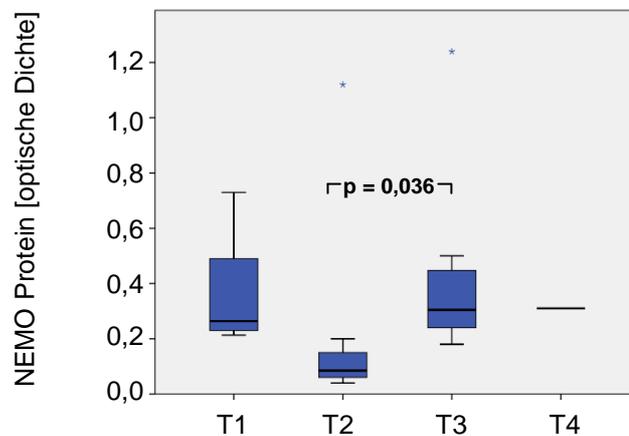


Abb. 5.11: Vergleich der absoluten Protein-Expression im Tumorgewebe in den Tumorstadien T1, T2, T3 und T4 (Mediane: T1: 0,265; T2: 0,085; T3: 0,305; T4: 0,31);  $p$ -Wert = 0,016; MW-Test T2 vs. T3:  $p$ -Wert = 0,036; ( $n = 23$ )

Auffallend war (siehe Abb. 5.11), dass der Median des T1-Stadiums mit einem Wert von 0,265 und der Median des T3-Stadiums mit einem Wert von 0,305 beide über dem Median des dazwischenliegenden T2-Stadiums (Median: 0,085) lagen. Um genauer zu differenzieren, wie sich diese Werte ergaben, wurden die Tumorgruppen einzeln analysiert (siehe Abb. 5.12). Es zeigte sich, dass nur in der Gruppe HCC dieses Ereignis für die Proteine NEMO und NF- $\kappa$ B auftrat. Grund dafür war, dass nur ein T2-Tumor untersucht wurde, dessen Wert (1,12; 1,47) im Vergleich extrem hoch war. Ein Vergleich zwischen den Stadien T2 und T3 war in dieser Gruppe folglich nicht möglich. In der Gruppe CCC zeigte sich insgesamt eine Zunahme von NEMO- und NF- $\kappa$ B-Protein vom Stadium T2 bis T4 (für T1 lag keine Probe vor). Ein signifikanter Unterschied ließ sich zwischen den Stadien T2 und T3 in der NEMO-Expression nachweisen ( $p = 0,036$  nach Bonferroni-Korrektur). Um zu überprüfen, ob sich das Protein eignet, das Tumorstadium genauer zu differenzieren, wäre die ROC-Analyse anwendbar. Jedoch sind nicht für alle Stadien ausreichend Daten vorhanden (T1: keine Werte, T2: 7, T3: 4, T4: 1). Die ROC-Analyse insgesamt durchzuführen, d.h. ohne Trennung der Gruppen, wäre nicht sinnvoll, da die entstandene Signifikanz auf die Ergebnisse der Gruppe CCC zurückzuführen ist.

## 5. Ergebnisse

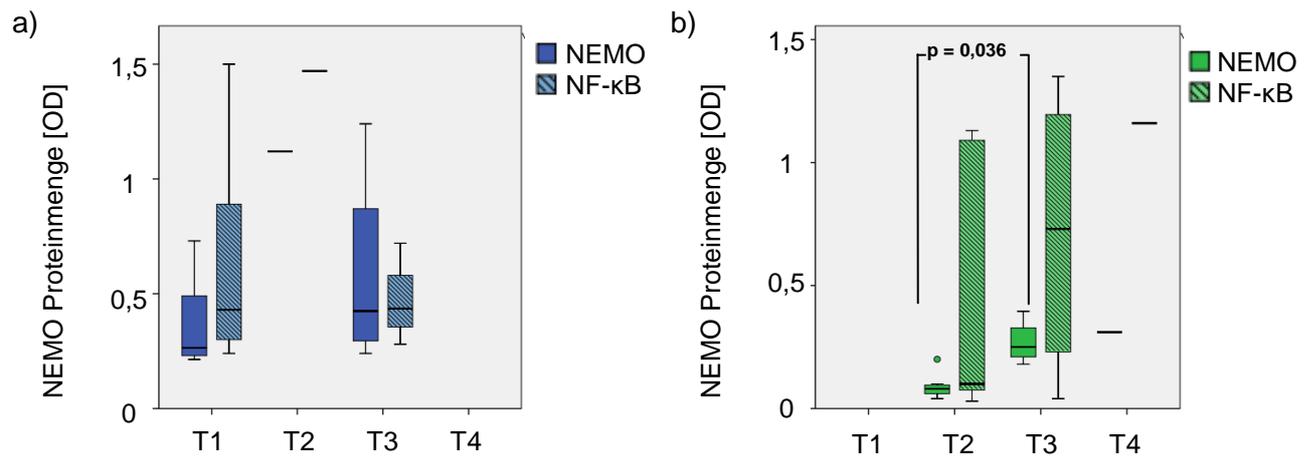


Abb. 5.12: Vergleich der absoluten NEMO- und NF-κB-Protein-Expression im Tumorgewebe in den Tumorstadien T1, T2, T3 und T4 **a)** im HCC: NEMO: Mediane: T1: 0,265; T2: 1,12; T3: 0,425; T4: /; NF-κB: Mediane: T1: 0,43; T2: 1,47; T3: 0,435; T4: /; ( $n = 11$ ) **b)** im CCC: NEMO: Mediane: T1: /; T2: 0,08; T3: 0,25; T4: 0,31; Vergleich T2 vs. T3: p-Wert = 0,036 (nach Bonferroni-Korrektur); NF-κB: Mediane: T1: /; T2: 0,1; T3: 0,73; T4: 1,16; p-Wert T2 vs. T3: 0,788; ( $n = 12$ )

Insgesamt zeigte sich, dass sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene mit steigender TumorgroÙe bzw. Ausdehnung hohere Expressionswerte gemessen wurden.

### 5.6 NEMO als Marker zur Analyse des Differenzierungsgrades

Mittels Kruskal-Wallis-H-Test wurden die verschiedenen Differenzierungsgrade (G1 – G3) verglichen. Hochdifferenzierte Tumoren (G1) sind dem Ursprungsgewebe sehr ahnlich und weisen meist einen geringen Malignitätsgrad auf. Undifferenzierte Tumoren (G3) hingegen weichen stark vom Ursprungsgewebe ab und sind hochmaligne.

#### 5.6.1 NEMO-mRNA-Expression in den Differenzierungsgraden G1 – G3

Die Analyse zeigte, dass schlecht differenzierte Karzinome signifikant weniger NEMO-mRNA als gut oder mittelgradig differenzierte Karzinome exprimierten (siehe Abb. 5.13). G3-Tumore wiesen insgesamt eine starke Verminderung der relativen NEMO-mRNA-Expression auf (auf 19% im Vergleich zum Referenzgewebe), während G1- sowie G2-Tumoren eine leichte Hochregulation der mRNA-Expression (auf 116% bzw. 110%) zeigten. Für den Grad G1 lag nur eine Probe in der Gruppe mCRC vor.

## 5. Ergebnisse

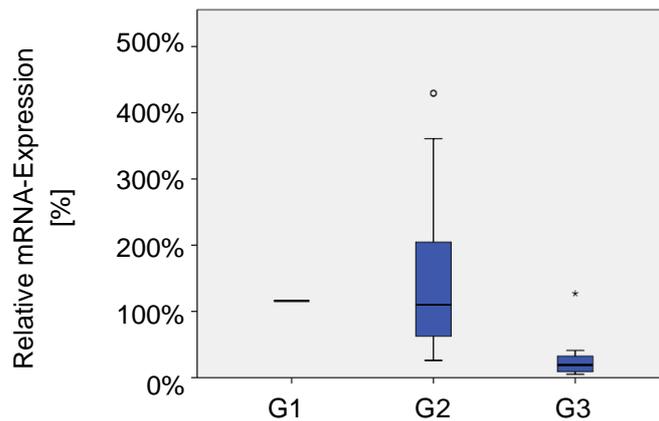


Abb. 5.13: Relative NEMO-mRNA-Expression in den drei Tumorgaden G1 – G3 (nichtmalignes Referenzgewebe = 100%): G3-Tumoren wiesen eine starke Verminderung der mRNA-Expression (Median: 19%) im Vergleich zu G1- oder G2-Tumoren auf (G1: 116%; G2: Median: 110%), p-Wert = 0,0004; ( $n = 35$ ) (\* = Extremwerte; ° = Ausreißer).

Um zu ermitteln, in welcher Tumorgruppe sich ebenfalls dieses Ergebnis nachweisen lässt, wurden diese einzeln analysiert. In den Gruppen HCC und CCC fand sich der signifikante Expressionsunterschied ebenfalls (siehe Abb. 5.14): eine erhöhte Expression im G2- und eine starke Verminderung der mRNA-Expression im G3-Tumor. In der Gruppe mCRC zeigte sich im G2- und G3-Tumor eine Verminderung der mRNA auf 81,5% bzw. 19%. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (p-Wert = 0,416) (nicht abgebildet).

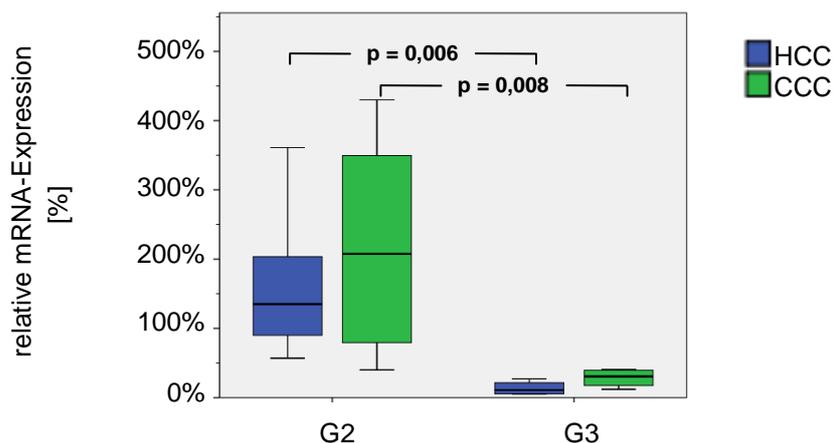


Abb. 5.14: Relative NEMO-mRNA-Expression (nichtmalignes Referenzgewebe = 100%) in den Tumorgaden G2 und G3 der Tumorgruppen HCC (G2: 135%; G3: 11%; p-Wert = 0,006) und CCC (G2: 207,5%; G3: 30,5%; p-Wert = 0,008); (HCC:  $n = 11$ ), (CCC:  $n = 12$ )

## 5. Ergebnisse

Um das Ergebnis genauer zu analysieren, wurde die ROC-Analyse durchgeführt. Es berechnete sich eine AUC von 0,924 (KI: 0,818-1, p-Wert: 0,012) (nicht abgebildet). Dies deutete auf eine hohe Gesamtgenauigkeit dieses Testes hin.

Verschiedene Cut-Off-Werte wurden bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität evaluiert. Der optimale Cut-Off-Wert lag bei 40,5%, d.h. einer relativen mRNA-Erniedrigung im Tumorgewebe, mit einer hohen Sensitivität und Spezifität (siehe Tab. 5.4). Die hohen Konfidenzintervalle ließen sich durch die niedrige Anzahl an Proben erklären. Es wurden insgesamt 75% der G3-Tumoren identifiziert, die eine Erniedrigung der mRNA-Expression unterhalb des Cut-Off-Wertes aufwiesen (PPV) (KI von 43% - 95%). 91% der Proben, deren mRNA-Expression über dem Cut-Off-Wert lag, wurden richtig als G2-Tumoren erkannt (NPV) (KI: 71% – 99%).

Tab. 5.4: Sensitivität und Spezifität der NEMO-mRNA-Expression bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades bei einem Cut-Off-Wert von 40,5% ( $n = 35$ )

	Wert [in %]	Konfidenzintervall [in %]	
Sensitivität	81,8	52,3	94,8
Spezifität	86,9	67,8	95,4

Analysierte man gezielt die unterschiedlichen Tumorguppen, berechnete sich in der Gruppe HCC die größtmögliche AUC mit einem Wert von 1 (asympt. Signifikanz: 0,008) (siehe Abb. 5.15). Bei einem Cut-Off-Wert von 42% wurden alle Tumorggrade anhand des mRNA-Levels richtig erkannt (PPV von 100%). Die Werte der NEMO-mRNA-Expression waren zu 100% sensitiv und spezifisch (siehe Tab. 5.5).

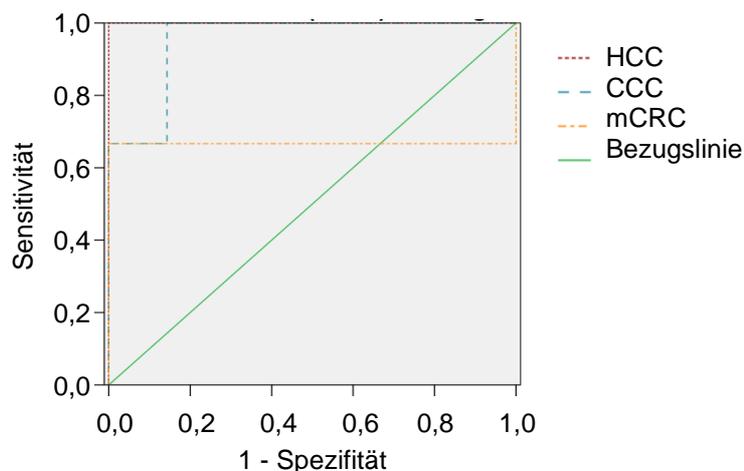


Abb. 5.15: ROC-Kurve zur Analyse des Differenzierungsgrades (relative NEMO-mRNA-Expression im HCC (AUC = 1; p-Wert = 0,008), CCC (AUC = 0,969, KI: 0,876-1; p-Wert=0,011) und mCRC (0,708, KI: 0,231-1; p-Wert = 0,307)); (HCC:  $n = 11$ ), (CCC:  $n = 12$ ), (mCRC:  $n = 12$ )

## 5. Ergebnisse

Die Analyse in der Gruppe CCC ergab eine AUC von 0,969 (asympt. Signifikanz: 0,011) (siehe Abb. 5.15). Der ermittelte Cut-Off-Wert in der Gruppe CCC lag bei einer verminderten relativen mRNA-Expression von 40,5% im Tumorgewebe. 75% (KI: 19% – 99%) der G3-Tumoren wiesen eine mRNA-Expression unterhalb dieses Wertes auf und wurden richtig detektiert. Im Vergleich dazu wurden 87% (KI: 47% – 100%) der G2-Tumoren richtig diagnostiziert. Die Sensitivität (75%) und Spezifität (87,5%) waren insgesamt geringer als beim HCC (siehe Tab. 5.5). Die ROC-Kurve in der Gruppe mCRC war nicht signifikant (AUC = 0,708; asympt. Signifikanz: 0,307) (siehe Abb. 5.15). Es ließen sich keine Unterschiede zwischen G2- und G3-Tumoren nachweisen.

Tabelle 5.5: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der NEMO-mRNA-Expression bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades in den Gruppen HCC und CCC

<b>HCC (n = 11)</b>	<b>Wert [in %]</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	42		
Sensitivität	100	51,0	100
Spezifität	100	64,6	100
<b>CCC (n = 12)</b>	<b>Wert [in %]</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	40,5		
Sensitivität	75	30,1	95,4
Spezifität	87,5	52,9	97,7

Insgesamt zeigte sich, dass anhand der NEMO-mRNA-Expression der Differenzierungsgrad eines Tumors, insbesondere der des HCC, ermittelt werden konnte. War ein Tumor schlecht differenziert, so war die NEMO-mRNA-Expression stark vermindert (ca. 41% im Vergleich zum nichtmalignen Referenzgewebe). Im Gegensatz dazu war im mittelgradig differenzierten Tumor die mRNA-Expression im Median hochreguliert.

### 5.6.2 NEMO-Protein-Expression in den Differenzierungsgraden G1 – G3

Zunächst wurde die relative NEMO-Protein-Expression untersucht. Im Vergleich der Tumorgrade G1, G2 und G3 zeigte sich unabhängig der Tumorgruppe ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,001$ ). Die relative Protein-Expression war im G3-Tumor auf 85% vermindert, während G1- und G2-Tumoren im Vergleich zum Referenzgewebe eine erhöhte Expression aufwiesen (108% bzw. 167%) (siehe Abb. 4.16). Mit einem Median von 141% war die relative NF- $\kappa$ B-Expression im G3-Tumor ebenfalls vermindert im

## 5. Ergebnisse

Vergleich zum G2-Tumor (159%). Dieser Unterschied war nicht signifikant (siehe Abb. 5.16).

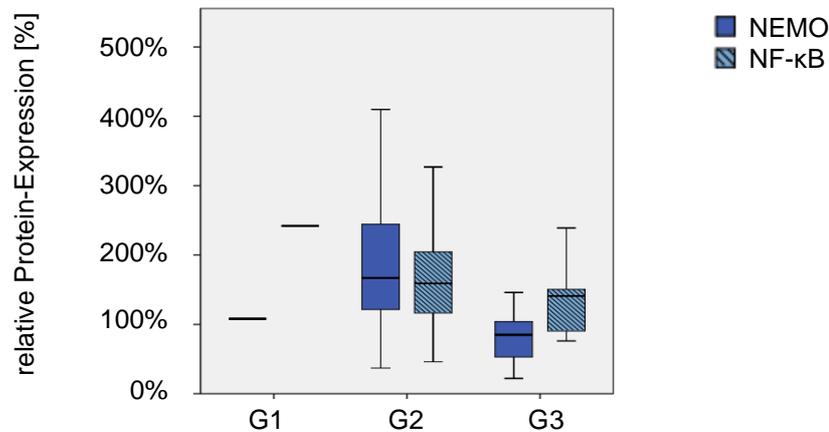


Abb. 5.16: Relative NEMO- und NF-κB-Protein-Expression (Referenzgewebe = 100%) in den drei Tumorgraden G1 – G3: G3-Tumoren wiesen eine Verminderung der Protein-Expression im Vergleich zu G1- oder G2-Tumoren auf; NEMO: p-Wert = 0,001, NF-κB: p-Wert = 0,167; ( $n = 35$ )

Analysierte man die Tumorgruppen einzeln, so zeigte sich in der Gruppe HCC der Unterschied in der NEMO-Expression ebenso (siehe Abb. 5.17).

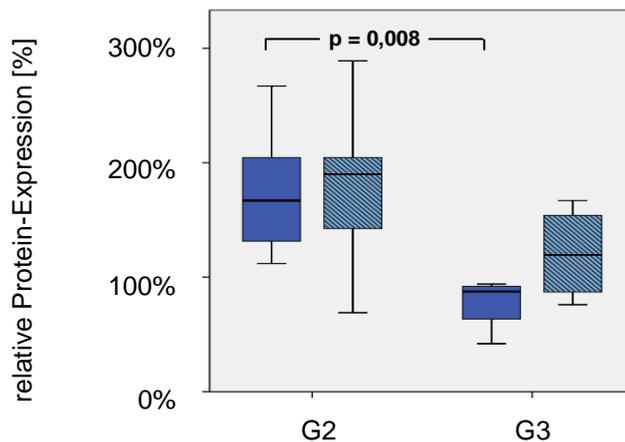


Abb. 5.17: Relative NEMO- und NF-κB-Protein-Expression in den Tumorgraden G2 und G3 in der Gruppe HCC: G3-Tumoren wiesen eine signifikante Verminderung der NEMO-Protein-Expression im Vergleich zu G2-Tumoren auf; NEMO: p-Wert = 0,008, NF-κB: p-Wert = 0,131; ( $n=11$ )

Die Tumorgruppe CCC zeigte eine ähnliche Tendenz bei einem p-Wert von 0,062 (Median: G2: 147% (37% - 382%) vs. G3: 63% (22% - 112%)) (nicht abgebildet).

## 5. Ergebnisse

Vergleich man den Differenzierungsgrad in der Gruppe mCRC, so war kein signifikanter Unterschied nachweisbar ( $p = 0,112$ ; G2: 217% (113% – 410%) vs. G3: 129% (59% – 1,46%)). Welche Aussagekraft die relative NEMO-Protein-Expression in Bezug zum Tumorgrad hat, wurde in der ROC-Analyse untersucht. Es berechnet sich eine Fläche von 0,875 (asympt. Signifikanz: 0,0004) (siehe Abb. 5.18).

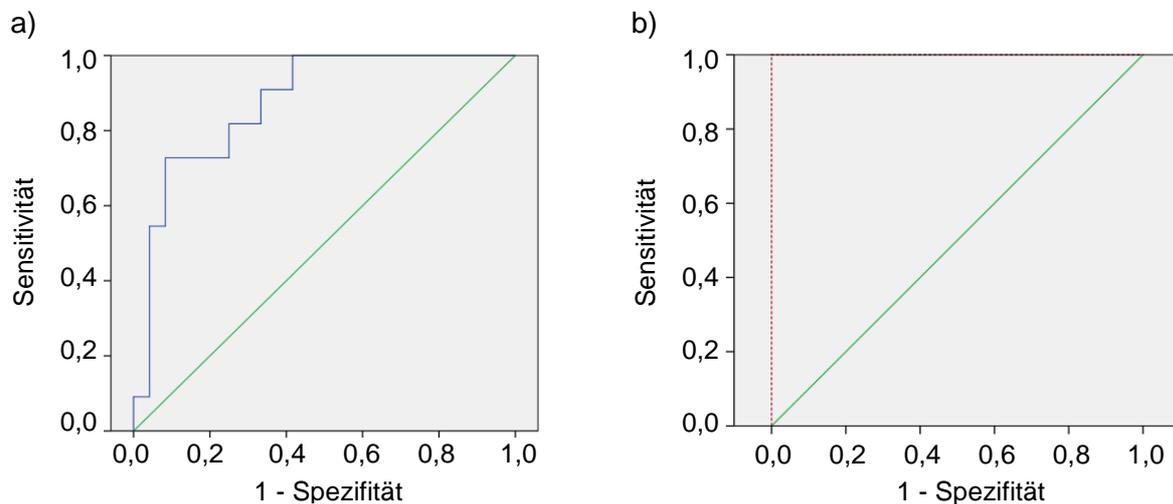


Abb. 5.18: ROC-Kurve zur Analyse des Differenzierungsgrades (relative NEMO-Protein-Expression) **a)** unabhängig von der Tumorart (AUC = 0,875, KI: 0,757-0,993; p-Wert = 0,0004); ( $n = 35$ ) **b)** in der Gruppe HCC (relative NEMO-Protein-Expression (AUC = 1, KI: 1-1; p-Wert = 0,008)); ( $n = 11$ )

Bei einem Cut-Off-Wert von 113,5% lag die Sensitivität bei 72,7% und die Spezifität bei 78% (siehe Tab. 5.6). Insgesamt wurden 62% (KI: 32% - 86%) der G3-Tumoren erkannt und 86% (KI: 64% - 97%) der G2-Tumoren.

Tabelle 5.6: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der relativen NEMO-Protein-Expression bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades ( $n = 35$ )

	Wert [in %]	Konfidenzintervall [in %]	
Cut-Off-Wert	113,5		
Sensitivität	72,7	39	94
Spezifität	78	56	93

Ein eindeutiges Ergebnis in der ROC-Analyse zeigte sich in der Gruppe HCC mit einer AUC von 1 (asympt. Signifikanz = 0,008) (siehe Abb. 5.18). Alle Differenzierungsgrade wurden anhand des NEMO-Protein-Levels erkannt. Der Test war zu 100% sensitiv und

## 5. Ergebnisse

spezifisch. Für die Gruppen CCC und mCRC berechnete sich keine signifikante ROC-Kurve (siehe Tab. 5.7).

Tabelle 5.7: AUC der ROC-Kurve bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades anhand der relativen NEMO-Protein-Expression in den Gruppen CCC und mCRC

Gruppe	AUC	Signifikanz (asymptotisch)
CCC ( <i>n</i> = 12)	0,762	0,210
mCRC ( <i>n</i> = 12)	0,905	0,053

Die absoluten NEMO-Proteinwerte im Referenz- bzw. Tumorgewebe wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Differenzierungsgraden auf (siehe Tab. 5.8 und Tab. 5.9).

Tabelle 5.8: Absolute NEMO-Protein-Expression in den verschiedenen Differenzierungsgraden G1-G3 in den Gruppen HCC, CCC und mCRC im nichtmalignen Referenzgewebe

Gruppe	G1		G2		G3		p-Wert
	N	Median (Min-Max)	N	Median (Min-Max)	N	Median (Min-Max)	
<b>HCC</b> ( <i>n</i> = 11)	0	-	7	0,50 (0,21 – 1,24)	4	0,305 (0,23 – 0,49)	0,345
<b>CCC</b> ( <i>n</i> = 12)	0	-	8	0,15 (0,04 – 0,40)	4	0,13 (0,06 – 0,26)	0,671
<b>mCRC</b> ( <i>n</i> = 12)	1	0,38	8	0,27 (0,15 – 1,62)	3	0,18 (0,15 – 0,46)	0,523
<b>gesamt</b>	1	0,38	23	0,25 (0,04 – 1,62)	11	0,23 (0,06 – 0,49)	0,438

Im nichtmalignen Referenzgewebe zeigten sich ausgeglichene Level an NEMO-Protein (siehe Tab. 5.8). G3-Tumoren wiesen im Tumorgewebe ein niedrigeres Level an NEMO-Protein auf als G2-Tumoren (siehe Tab. 5.9). Jedoch ließ sich dies nicht statistisch nachweisen.

Insgesamt zeigte sich auch auf der Proteinebene eine Verminderung der relativen NEMO-Expression im schlecht differenzierten Tumor und eine erhöhte Expression im mittelgradig differenzierten Tumor. Dieser Unterschied konnte insbesondere im HCC nachgewiesen werden.

## 5. Ergebnisse

Tabelle 5.9: Absolute NEMO-Protein-Expression in den verschiedenen Differenzierungsgraden G1-G3 in den Gruppen HCC, CCC und mCRC im Tumorgewebe

Gruppe	G1		G2		G3		p-Wert
	N	Median (Min-Max)	N	Median (Min-Max)	N	Median (Min-Max)	
<b>HCC</b> (n = 11)	0	-	7	0,42 (0,08 – 0,74)	4	0,455 (0,31 – 0,55)	0,636
<b>CCC</b> (n = 12)	0	-	8	0,105 (0,02 – 0,28)	4	0,145 (0,1 – 1,18)	0,396
<b>mCRC</b> (n = 12)	1	0,35	8	0,155 (0,08 – 0,40)	3	0,31 (0,12 – 0,32)	0,335
<b>gesamt</b>	1	0,35	23	0,19 (0,02 – 0,74)	11	0,31 (0,1 – 1,18)	0,216

### 5.7 NEMO als Marker zur Entwicklung eines Rezidives

Sieben Patienten entwickelten in den Folgejahren nach der OP ein Rezidiv (4 HCC-Patienten (36%); 3 CCC-Patienten (25%)). Die Patienten der Tumorgruppe mCRC zeigten im Beobachtungszeitraum keine Rezidiventwicklung.

#### 5.7.1 NEMO-mRNA-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung

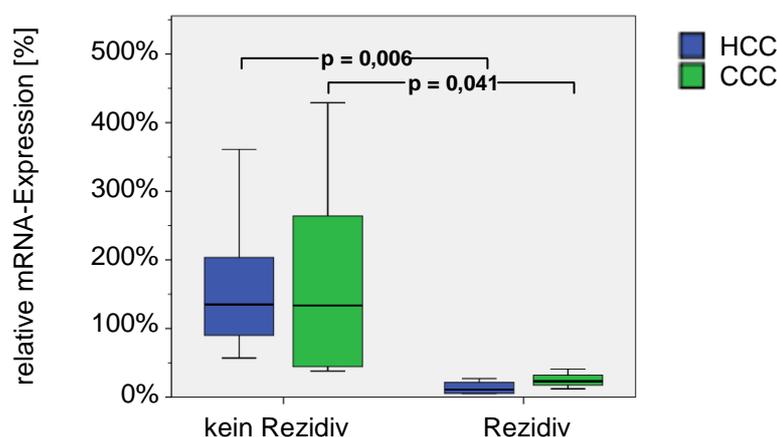


Abb. 5.19: Relative NEMO-mRNA-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung in den Tumorgruppen HCC (kein Rezidiv: 135%, Rezidiv: 11%; p-Wert = 0,006) und CCC (kein Rezidiv: 133,5%, Rezidiv: 23%; p-Wert = 0,041); (HCC: n = 11); (CCC: n = 11)

Unabhängig von der Tumorentität ließ sich im Mann-Whitney-Test eine signifikante Verminderung der NEMO-mRNA bei den Patienten, die in der Folge ein Rezidiv

## 5. Ergebnisse

entwickelten, nachweisen ( $p = 0,0005$ ) (nicht abgebildet). Dies konnte auch in den Tumorgruppen HCC ( $p = 0,006$ ) und CCC ( $p = 0,041$ ) festgestellt werden (siehe Abb. 5.19).

Um die Aussagekraft von NEMO hinsichtlich einer Rezidiventwicklung zu testen, wurde die ROC-Analyse durchgeführt. Insgesamt – ohne Trennung der Tumorgruppen – wies die AUC eine Fläche von 0,981 auf ( $p$ -Wert = 0,0004) (nicht abgebildet). Der Test war zu 85,7% sensitiv und zu 93,3% spezifisch. Bei einem Cut-Off-Wert von 39% wurden 85,7% der Tumore, die rezidierten, richtig detektiert sowie 93,2% derer, die rezidivfrei blieben (siehe Tab. 5.10).

Tabelle 5.10: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Wert der relativen NEMO-Protein-Expression bei der Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv ( $n = 22$ )

	Wert [in %]	Konfidenzintervall [in %]	
Cut-Off-Wert	39		
Sensitivität	85,7	49	97
Spezifität	93,2	70	98

Analysierte man dieses Ergebnis genauer in den einzelnen Tumorgruppen, so zeigte die Analyse die hohe Aussagekraft der relativen NEMO-mRNA-Expression beim HCC. Die AUC wies hier den höchstmöglichen Wert von 1 auf, beim CCC lag diese bei 0,917 (siehe Abb. 5.20).

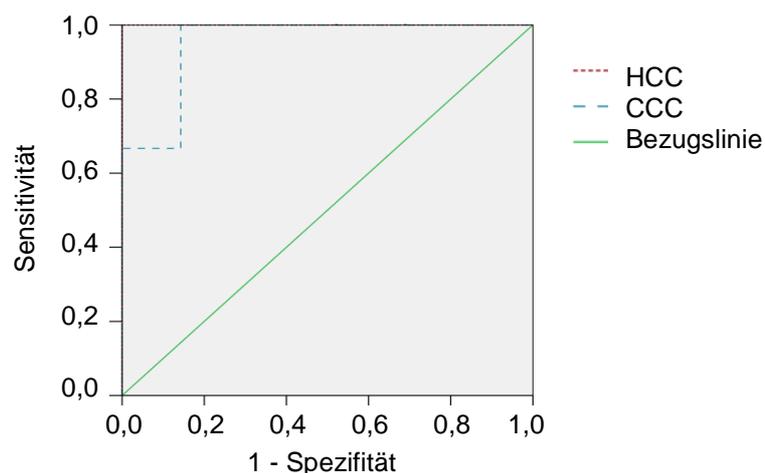


Abb. 5.20: ROC-Kurve zur Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv (relative NEMO-mRNA-Expression in den Gruppen HCC (AUC = 1;  $p$ -Wert = 0,008) und CCC (AUC = 0,917;  $p$ -Wert = 0,041); ( $n = 22$ ))

## 5. Ergebnisse

Für die Tumorgruppe HCC errechnete sich die höchste Sensitivität und Spezifität (siehe Tab. 5.11). Bei einem Cut-Off-Wert von einer relativen mRNA-Erniedrigung auf 42% wurden alle Proben richtig zugeordnet (PPV, NPV = 100%). In der Gruppe CCC war die Sensitivität und Spezifität im mittleren Bereich (66,7% bzw. 78%) (siehe Tab. 5.11). Es wurden zudem nur 50% (KI: 7-93%) der rezidivierenden Tumoren anhand des Cut-Off-Wertes entdeckt sowie 87% (KI:47-100%) der rezidivfreien Tumoren.

Tabelle 5.11: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der relativen NEMO-mRNA-Expression bei der Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv in den Tumorgruppen HCC und CCC

<b>HCC (n = 11)</b>	<b>Wert [in %]</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	42		
Sensitivität	100	51	100
Spezifität	100	64,6	100
<b>CCC (n = 11)</b>	<b>Wert [in %]</b>	<b>Konfidenzintervall [in %]</b>	
Cut-Off-Wert	40,5		
Sensitivität	66,7	22,77	93,85
Spezifität	78	45,26	93,68

### 5.7.2 NEMO-Protein-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung

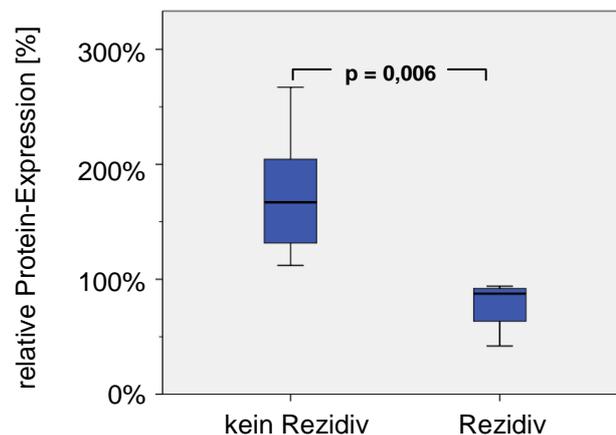


Abb. 5.21: Relative NEMO-Protein-Expression (nichtmalignes Referenzgewebe = 100%) bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung in der Tumorgruppe HCC (kein Rezidiv: 167%, Rezidiv: 87,5%; p-Wert = 0,006); (n = 11)

Mittels Mann-Whitney-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „Kein Rezidiv“ und „Rezidiv“ unabhängig der Tumorentität beim relativen NEMO-Protein-Level (Median: 144% (37% – 279%) vs. 79% (22% – 94%)) (p = 0,001).

## 5. Ergebnisse

So war die relative Änderung im Tumorgewebe in der Gruppe, die kein Rezidiv in den Folgejahren entwickelten, höher als bei den Patienten, die eines entwickelten. Dieser signifikante Unterschied ließ sich auch in der Gruppe HCC nachweisen ( $p = 0,006$ ) (siehe Abb. 5.21).

In der Gruppe CCC zeigte sich die Tendenz ebenfalls ( $p = 0,048$ ; Median: 129% (37% – 279%) vs. 47% (22% – 79%). Für die Gruppe HCC berechnete sich eine AUC in der ROC-Analyse von 1 mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 100% (siehe Abb. 5.22). Bei einem Cut-Off-Wert von 103% wurden alle rezidivierenden und nichtrezidivierenden Tumoren anhand des relativen Proteinlevels erkannt.

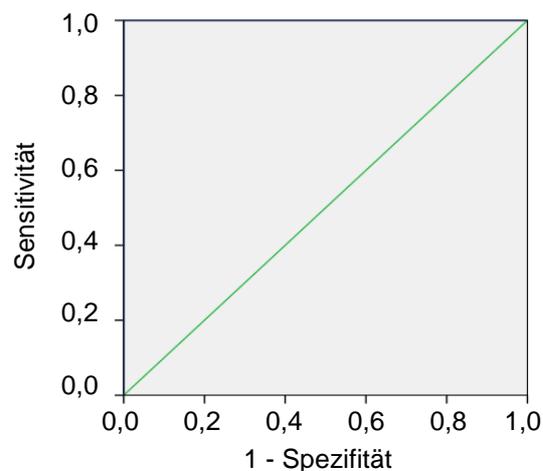


Abb. 5.22: ROC-Kurve zur Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv (relative NEMO-Protein-Expression in den Gruppen HCC (AUC = 1; KI: 1-1; p-Wert = 0,008) ( $n = 11$ ))

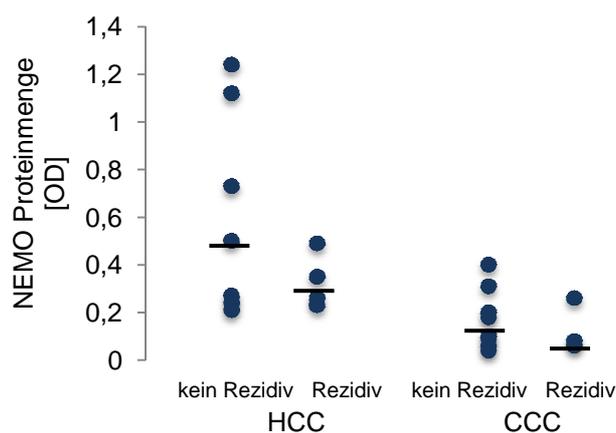


Abb. 5.23: Vergleich der absoluten Protein-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung mit Kennzeichnung der Medianwerte ( — ) in den Gruppen HCC (kein Rezidiv: 0,5, Rezidiv: 0,305;  $p$ -Wert = 0,412) und CCC (kein Rezidiv: 0,14, Rezidiv: 0,08;  $p$ -Wert = 0,630); jeder Kreis repräsentiert eine(n) Patient(en); (HCC:  $n = 11$ ); (HCC:  $n = 11$ )

## 5. Ergebnisse

Die Analyse der absoluten Protein-Expression im Tumorgewebe zeigte im Median in den Gruppen HCC und CCC eine niedrigere Expression in den Tumoren, die rezidierten (siehe Abb. 5.23). Dieser Unterschied war jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant.

Insgesamt hat die Analyse ergeben, dass sich bei Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, eine signifikante Verminderung der relativen NEMO-mRNA- und Protein-Expression nachweisen ließ. Insbesondere in der Gruppe HCC wies der Test eine hohe Sensitivität und Spezifität auf.

Vergleicht man dieses Resultat mit dem Ergebnis aus der Analyse des Differenzierungsgrades, fiel auf, dass diese sehr ähnlich waren. In der Literatur wird der Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und der Rezidiventwicklung kontrovers diskutiert<sup>143</sup>. Die Korrelationsanalyse für diese Untersuchung zeigte einen starken Zusammenhang (siehe Tab. 5.12). War ein Tumor schlecht differenziert (G3), so neigte er zur Rezidivierung.

Tabelle 5.12: Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und Rezidiventwicklung

		Rezidiv ja / nein ( <i>n</i> = 34)
<b>Differenzierungsgrad</b>	Korrelationskoeffizient	0,904**
	Signifikanz (2-seitig)	0,00001

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

### 5.8 NEMO in der steatotischen Leber

Wie bereits beschrieben wurde im Mausmodell beobachtet, dass sechs Wochen alte NEMO-Knockout-Mäuse steigende Lipidkonzentrationen in den Hepatozyten aufwiesen. Zudem fand sich eine Bildung von NASH-charakteristischen Ballonzellen. In der Folge entwickelten die Mäuse ein HCC. In dieser Dissertation wurde nun untersucht, ob sich in humanem Gewebe Unterschiede der NEMO-Expression in den verschiedenen Graden der Steatosis hepatis finden lassen, da auch beim Menschen die Steatosis hepatis ein möglicher Risikofaktor der HCC-Entstehung ist. In den Gruppen CCC und mCRC waren die Gruppen für eine Analyse zu inhomogen (siehe Tab. 5.1), so dass nur die Gruppe HCC untersucht wurde. Zudem wurde nur die absolute Expression analysiert, um beurteilen zu können, ob eine steatotisch-veränderte Leber eine andere NEMO-Expression – wie im Mausmodell – im nichtmalignen Gewebe bzw.

## 5. Ergebnisse

Tumorgewebe aufweist, als eine unveränderte Leber. Da für die mRNA-Expression nur relative Werte vorliegen, wurde nur die Protein-Ebene untersucht.

### 5.8.1 NEMO-Protein-Expression in nicht-steatotischer und steatotischer Leber

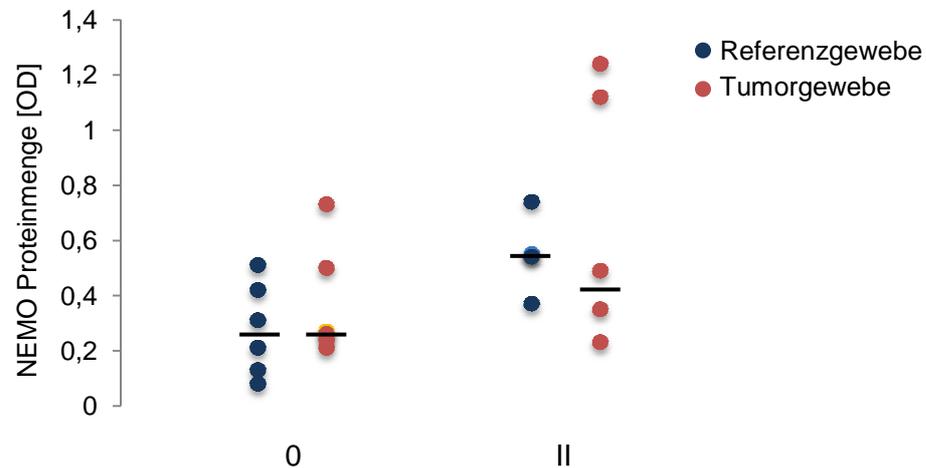


Abb. 5.24: Vergleich der absoluten Protein-Expression in den Steatosegraden 0 und II mit Kennzeichnung der Medianwerte (—) in der Gruppe HCC (Referenzgewebe: 0: 0,26 , II: 0,545; p-Wert = 0,017; Tumorgewebe: 0: 0,265, II: 0,42; p-Wert = 0,273); *jeder Kreis repräsentiert eine(n) Patient(en)*; ( $n = 11$ )

Die Analyse der absoluten NEMO-Proteinwerte zeigte in nicht-steatotischem Gewebe eine etwa gleiche Expression im Median im Referenz- und Tumorgewebe. Ein höheres Level der NEMO-Protein-Expression fand sich bei einer Verfettung der Leber in beiden Geweben, im Tumorgewebe etwas geringer als im Normalgewebe (siehe Abb. 5.24). Die Proteinexpression war in der steatotischen Leber im Referenzgewebe signifikant erhöht. Im Tumorgewebe ließ sich kein statistischer Unterschied nachweisen.

Insgesamt zeigte sich bei der Analyse, dass die relative Änderung auf mRNA- und Proteinebene eine nichtsignifikante Verminderung der Expression zeigte. Die absoluten Proteinwerte waren in beiden Gewebetypen (Tumor- und Referenzgewebe) in der steatotischen Leber insgesamt höher als in einer nichtverfetteten Leber.

## 5.9 Korrelation zwischen der NEMO-Expression und dem Geschlecht und dem Alter

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der NEMO-Expression und dem Geschlecht (siehe Tab. 5.13) bzw. der NEMO-Expression und dem Alter festgestellt werden (siehe Tab. 5.14).

Tabelle 5.13: Korrelation zwischen der Expression von NEMO und dem Geschlecht

		<b>Geschlecht</b> ( <i>n</i> = 35)
<b>NEMO mRNA</b>	Korrelationskoeffizient	0,006
	Signifikanz (2-seitig)	0,974
<b>NEMO Protein (relativ)</b>	Korrelationskoeffizient	0,314
	Signifikanz (2-seitig)	0,067
<b>NEMO Protein (Normalgewebe)</b>	Korrelationskoeffizient	-0,102
	Signifikanz (2-seitig)	0,560
<b>NEMO Protein (Tumorgewebe)</b>	Korrelationskoeffizient	0,167
	Signifikanz (2-seitig)	0,337

Tabelle 5.14: Korrelation zwischen der Expression von NEMO und dem Alter

		<b>Alter</b> ( <i>n</i> = 35)
<b>NEMO mRNA</b>	Korrelationskoeffizient	-0,309
	Signifikanz (2-seitig)	0,071
<b>NEMO Protein (relativ)</b>	Korrelationskoeffizient	-0,263
	Signifikanz (2-seitig)	0,128
<b>NEMO Protein (Normalgewebe)</b>	Korrelationskoeffizient	0,239
	Signifikanz (2-seitig)	0,167
<b>NEMO Protein (Tumorgewebe)</b>	Korrelationskoeffizient	-0,085
	Signifikanz (2-seitig)	0,626

## 5.10 Korrelation zwischen der NEMO-mRNA-Expression und CYLD

Physiologische Regulationsmechanismen bewirken, dass gleichzeitig mit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Aktivierung von CYLD stattfindet. Das Tumorsuppressorgen übernimmt

## 5. Ergebnisse

die Funktion eines Feedbackinhibitor der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade, der eine überschießende Zellreaktion verhindern soll. Eine Verminderung zeigt sich u.a. beim HCC. Der genaue Signalweg ist noch ungeklärt. Wie bereits beschrieben gibt es eine Interaktion mit NEMO. Mittels Korrelationsanalyse nach Spearman wurde die CYLD-mRNA- und die NEMO-mRNA-Expression auf einen Zusammenhang hin untersucht. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang ( $p$ -Wert = 0,000001) (nicht abgebildet). Wies die NEMO-mRNA eine verminderte Expression im Vergleich zum Referenzgewebe auf, so zeigte sich dies auch in der CYLD-mRNA (Korrelationskoeffizient: 0,879). Dies ließ sich in allen Tumorgruppen nachweisen (siehe Abb. 5.25).

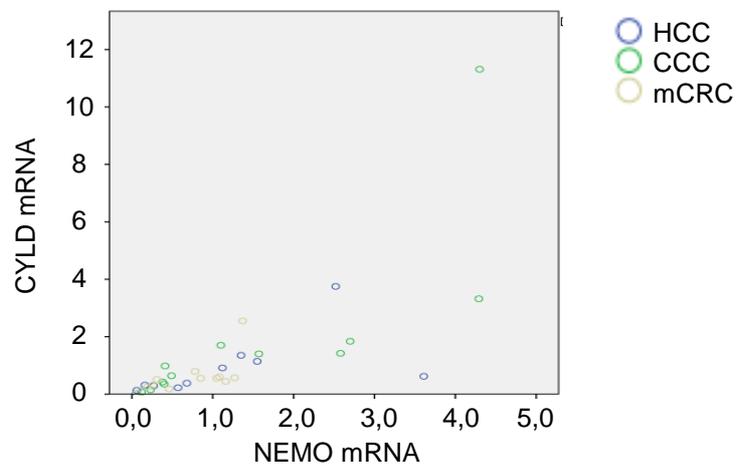


Abb. 5.25: Scatterplot zur Darstellung der Korrelation zwischen der relativen NEMO-mRNA- und CYLD-mRNA-Expression in den Tumorgruppen HCC (Korrelationskoeffizient: 0,864;  $p$ -Wert = 0,001), CCC (Korrelationskoeffizient: 0,965;  $p$ -Wert = 0,0004), und mCRC (Korrelationskoeffizient: 0,753;  $p$ -Wert = 0,005); ( $n = 35$ )

## 6. Diskussion

### 6.1 NEMO als Marker zur Analyse von Diagnosen

In dieser Dissertation wurde die Expression des NF- $\kappa$ B essential Modulator (NEMO) im humanen hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinom sowie in kolorektalen Lebermetastasen untersucht. Als Referenzgewebe wurde bei der Entnahme der Tumorproben nichtmalignes Gewebe gesichert und ebenfalls untersucht. Ziel der Untersuchung war die Analyse, ob sich NEMO als Tumormarker eignet. Tumormarker sind von großer Bedeutung in der Diagnostik und der Therapie von Tumoren. Im besten Fall ist es möglich sie in der Früherkennung einzusetzen. Eine hohe Sensitivität und Spezifität sind essentielle Eigenschaften sowie eine einfache und möglichst nicht invasive Durchführung. Für die untersuchten Tumoren HCC, CCC und das mCRC fehlen hochsensitive und hochspezifische Marker, die eine Erkennung im Frühstadium ermöglichen. Da bei diesen Tumoren erst spät Symptome auftreten, werden diese oft in einem nicht resezier- und damit nicht heilbaren Stadium diagnostiziert<sup>25,54</sup>. Die Entdeckung neuer Tumormarker ist ein wichtiger Forschungsansatz. In der Diagnostik des HCC wird derzeit in der Klinik das Alpha-Fetoprotein (AFP) eingesetzt. AFP ist im Serum nur bei 60-70% der Patienten mit einem HCC erhöht und weist eine Sensitivität von 39-64% auf<sup>25,27</sup>. Dies bedeutet, dass ca. 30%-40% nicht diagnostiziert werden können. Der Einsatz bei Hochrisiko-Patienten hat sich dennoch als sinnvoll erwiesen. Andere Erkrankungen (u.a. Hepatitis, Leberzirrhose) sowie die Einnahme von Medikamenten können zu einem Anstieg und damit zu einem falsch-positiven Ergebnis führen<sup>25-27</sup>. Die Messung des AFP-Spiegels kann einen Hinweis auf ein HCC geben, jedoch müssen andere diagnostische Verfahren (v.a. die sonographische Untersuchung ggf. mit Feinnadelpunktion) durchgeführt werden, um das Ergebnis zu bestätigen.

Die sensitive Diagnostik des CCC mittels CA19-9 ist abhängig, ob eine primär sklerosierende Cholangitis (PSC) vorliegt. Ohne PSC ist der Marker wenig sensitiv (nur ca. 53%). Liegt jedoch eine PSC vor, so steigt die Sensitivität auf 89% und die Spezifität auf 86%. Weitere Faktoren, die den Wert des CA19-9 beeinflussen, sind u.a. andere Malignitäten, Pankreatiden, die ethnische Zugehörigkeit und die medizinische Vorgeschichte<sup>44,56</sup>. Ein weiterer Tumormarker stellt das carcinoembryonale Antigen (CEA) dar. CEA dient der Verlaufskontrolle und kann aufgrund seiner geringen Sensitivität (55%) nicht in der Früherkennung eingesetzt werden<sup>56</sup>.

## 6. Diskussion

Seit mehr als 30 Jahren wird CEA zur Diagnostik des kolorektalen Karzinoms eingesetzt. Jedoch ist der Einsatz auch hier umstritten. Hier führen ebenfalls andere benigne oder maligne Lebererkrankungen sowie ein starker Konsum von Nikotin zu einem Anstieg. Die Sensitivität ist abhängig vom UICC-Stadium und erreicht im UICC-IV-Stadium (Fernmetastasierung) eine mittlere Sensitivität von 65%<sup>82</sup>. Damit ist das CEA als alleinige Methode zur Diagnostik des kolorektalen Karzinoms ungeeignet. Als prognostischer Marker hingegen ist der klinische Einsatz sinnvoll<sup>81</sup>. Der Wert weist verschiedenen Studien zufolge eine Korrelation mit dem Tumorstadium und der Überlebenszeit auf<sup>144</sup>.

Inwieweit NEMO als (Tumor)-Marker besser geeignet ist, wird im Folgenden analysiert. NEMO ist als regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt<sup>119</sup>. Es ist bekannt, dass diese in verschiedenen Tumoren, insbesondere im HCC und Mamma-Ca, erhöht ist<sup>96,101</sup>. Die erhöhte und konstitutive NF- $\kappa$ B-Expression begünstigt durch die Proliferationsförderung und Hemmung der Apoptose die Tumorentwicklung und -progression<sup>93</sup>. Die Resistenz gegenüber Apoptose sowie das unbegrenzte Teilungspotential sind laut Hanahan und Weinberg zwei von sechs charakteristischen Eigenschaften einer Tumorzelle<sup>11</sup>. Zudem steuert der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B inflammatorische Prozesse<sup>100</sup>. Diese drei Prozesse lassen sich in den drei untersuchten Tumorarten nachweisen<sup>6,21,80</sup>.

So ist bekannt, dass der chronische Inflamationsprozess in bis zu 90% der Fälle die Basis der Hepatokarzinogenese darstellt<sup>16</sup>. Das Leberparenchym wird durch verschiedene Faktoren geschädigt. Die Infiltration durch Kupfferzellen fördert die Ausschüttung proinflammatorisch wirkender Interleukine, Wachstumsfaktoren sowie von TNF- $\alpha$ . Diese führen zu einer Gewebedestruktion mit einer kompensatorischen Zellproliferation<sup>21</sup>. Die Nekrose und Apoptose der Hepatozyten resultiert in einem bindegewebigen Umbau („liver remodeling“), der über die Zwischenstufe einer Leberzirrhose in einem HCC enden kann<sup>22,23</sup>. Die Cholangiokarzinogenese beruht ebenfalls häufig auf einem chronisch-entzündlichen Geschehen. Eine chronische Inflammation des Gallengangsystems und eine Cholestase führen zu einer Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen. Interleukin-6 steuert über die Hochregulation der Stickstoffmonoxid-Synthase iNOS die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, die das Gewebe zunehmend schädigen und einen Verlust der Homöostase zwischen DNA-Schäden und -Reparatur hervorrufen. Über die Aktivierung von TNF- $\alpha$  proliferieren die Zellen. Es folgt eine Hyperplasie des Gallengangepithels sowie die weitere maligne

## 6. Diskussion

Transformation durch verschiedene genetische Veränderungen<sup>6</sup>. CRC rufen während der Lebermetastasierung beim Eintritt in das hepatische Blutsystem eine TNF- $\alpha$ -induzierte Entzündung hervor<sup>80</sup>. Es ist davon auszugehen, dass NEMO als Regulator der NF- $\kappa$ B-Expression hier einen entscheidenden Einfluss nimmt.

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob sich die Expression von NEMO-mRNA und -Protein in den verschiedenen Tumoren unterscheidet. Die relative NEMO-mRNA-Expression war in allen drei Tumorarten im Tumorgewebe im Vergleich zum Referenzgewebe vermindert, während sich auf Proteinebene eine leicht vermehrte relative Expression zeigte. Dieser Unterschied ist dadurch zu erklären, dass die mRNA-Konzentration nicht zwangsläufig mit der Menge an exprimiertem Protein korrelieren muss. So sind allgemein u.a. Halbwertszeiten, Proteinbindungen und posttranskriptionale Kontrollmechanismen von Bedeutung. Die Unterschiede zwischen den Tumorgruppen waren insgesamt gering.

Die vermehrte absolute Proteinmenge in den Tumorgeweben ist Zeichen der tumorcharakterisierenden Zellproliferation, vermutlich einhergehend mit einem Entzündungsprozess. Im nichtmalignen Gewebe der HCC-Leber sowie im HCC-Gewebe selbst ist die absolute Proteinkonzentration signifikant höher als in den beiden anderen Tumorgruppen. Aus der Literatur geht hervor, dass auch Umbauprozesse in der Leber, wie die Leberzirrhose oder -fibrose, die häufig mit der HCC-Entstehung assoziiert sind, mit einem Inflammationsprozess und u.a. einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung einhergehen<sup>145</sup>. Der signifikante Unterschied lässt sich möglicherweise auf einen fibrotischen Umbauprozess zurückführen, der als Entstehungsgrundlage des HCC dient. Die Korrelation zwischen einem HCC und der Fibrosierung des Gewebes war in dieser Analyse zwar signifikant, jedoch nur schwach positiv. Die Ursache ist wahrscheinlich, dass nur mäßiggradige Fibrosen untersucht worden sind. Ausgeprägt fibrosierte bzw. zirrhotische Gewebe ließen sich mit den durchgeführten Extraktionstechniken nicht isolieren. Die Techniken, v.a. bezogen auf die Extraktion der Proteine und RNA, sollten in Folgestudien angepasst bzw. optimiert werden, um hier genauere Ergebnisse zu erzielen. Dies wäre wichtig, um die Wertigkeit von NEMO als Marker einschätzen zu können, da in den meisten Fällen eine ausgeprägte Zirrhose vorliegt. Hier sollte dann klar abgegrenzt werden, ob NEMO die Zirrhose detektiert oder das HCC. Dazu müssten zum Vergleich tumorfreie zirrhotische Lebern in die Untersuchung mit einbezogen werden.

## 6. Diskussion

In dieser Studie ist die Sensitivität und Spezifität für die Diagnostik des HCC oder den parenchymalen Umbauprozess im mittleren Bereich (63%-82%). Weder NEMO-mRNA noch NEMO-Protein konnte die Diagnose hochsensitiv und -spezifisch zuordnen. Der positive prädiktive Wert lag zwischen 50-56% und ist damit zu niedrig für eine optimale Diagnostik. NEMO ist nach diesen Ergebnissen nicht besser geeignet als der Serummarker AFP.

Die absoluten Werte der Proteinexpression waren für die Gruppe CCC am geringsten, obgleich auch hier eine chronische Inflammation über eine Zellproliferation zu einer Hyperplasie des Gallengangepithels führt. Es gibt nur wenige Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Cholangiokarzinogenese und NF- $\kappa$ B untersucht haben. Es hat sich gezeigt, dass hohe NF- $\kappa$ B-Level mit einem invasiven Wachstum und möglicherweise mit einer Metastasierung assoziiert sind<sup>132,133</sup>. Dieser Zusammenhang konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Studien zeigen, dass eine Vielzahl an Genen zur Cholangiokarzinogenese beitragen, u.a. die Expression der Cyclooxygenase-2, die eine Entzündungsreaktion aufrechterhält, und der AKT-Signalweg<sup>49</sup>. Wie genau NF- $\kappa$ B in diese multifaktorielle Karzinogenese involviert ist, lässt sich anhand unserer Untersuchung nicht klären.

Wenn man anhand dieser Ergebnisse Sensitivität und Spezifität für die Diagnose CCC ermittelt, befinden sich beide auch hier im mittleren Bereich (61-75%) und sind folglich nicht besser geeignet als der Serummarker CA19-9. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich NEMO nicht als Tumormarker für die untersuchten Tumoren eignet. Für die Gruppe HCC ist eine Untersuchung mit zirrhotischem Gewebe weiterhin sinnvoll, v.a. im Vergleich Zirrhose ohne HCC vs. Zirrhose mit HCC.

Ein wichtiges Kriterium für einen Tumormarker ist, dass dieser möglichst wenig invasiv ist. Dieses Kriterium erfüllt NEMO bisher nicht. Es ist fraglich, ob NEMO sich als Marker im Blut eignet, da es ubiquitär vorliegt. Bei der seltenen *Incontinentia pigmenti*, die auf einer Mutation des NEMO-Gens beruht, lässt sich die Mutation im peripheren Blut nachweisen. Hier handelt es sich jedoch um eine Multisystemerkrankung. Andere Erkrankungen, die ebenfalls mit einer erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung einhergehen, wie die rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, könnten die Diagnostik verfälschen. Zu überlegen wäre, dass man präoperativ sowie ein paar Tage postoperativ den Serumspiegel von NEMO überprüft, um sehen, inwieweit hier Veränderungen feststellbar sind. Dieser Schritt ist jedoch erst sinnvoll,

## 6. Diskussion

wenn sich NEMO in den Gewebeproben als ein hochempfindlicher bzw. hochempfindlicher Test herausstellt.

Möglicherweise hängt der Expressionsunterschied von HCC und CCC auch mit der Auswertung zusammen. Eine mögliche Fehlerquelle der Berechnung der absoluten Konzentrationen ist die Erfassung der optischen Dichte mit der Software QuantityOne. Es können sich Messungenauigkeiten bei der Dichtebestimmung ergeben, da die verschiedenen Proteinbanden nicht immer in der Breite übereinstimmen. Um die Vergleichbarkeit von verschiedenen Western Blots zu erhöhen und diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde jede Probe auf eine Kontrollprobe normiert, die auf allen Membranen vorhanden war. Das schließt jedoch Abweichungen nicht aus.

Da nicht viele Studien vorliegen, die die NEMO-Expression in den untersuchten Tumoren beschreiben, wurde zusätzlich der in der Forschung detaillierter untersuchte Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B mit in die Untersuchung einbezogen. Da NEMO wie bereits beschrieben als Regulator entscheidend auf die NF- $\kappa$ B-Expression Einfluss nimmt, können so Ergebnisse und Zusammenhänge besser verstanden werden. Die Analyse von NF- $\kappa$ B erfolgte jedoch nur auf Protein-Ebene. Für weitere Studien wäre es sinnvoll sich auch die mRNA-Ebene anzuschauen, um dies mit der NEMO-mRNA-Expression besser vergleichen zu können und dort mögliche Veränderungen zu identifizieren.

### **6.2 NEMO als Marker zur Analyse der Tumorausdehnung**

Eine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivität schützt die Tumorzellen vor der Apoptose und stimuliert das Zellwachstum<sup>92,93</sup>. Verschiedene Anti-Tumor-Therapien versuchen die NF- $\kappa$ B-Aktivität zu senken, um das Wachstum und damit die Ausdehnung des Tumors zu stoppen sowie die Tumorzellen für andere herkömmliche Therapien wie der Chemotherapie zu sensibilisieren<sup>93</sup>. Die relative NEMO-mRNA-Expression sowie die relative NEMO-Protein-Expression sind in dieser Untersuchung in den verschiedenen Tumorstadien jedoch nicht signifikant verändert. Die relative Protein-Expression war im Median in allen vier Tumorstadien zwischen 111% und 117%. Dies bedeutet, es liegt im Tumorgewebe im Vergleich zum nichtmalignen Gewebe zwar eine leichte Erhöhung der NEMO-Expression vor, die sich jedoch in den einzelnen Tumorstadien nicht ändert. Die absoluten Werte hingegen zeigen einen eindeutigen Anstieg der NEMO- sowie der NF- $\kappa$ B-Proteinexpression. Im Referenzgewebe scheint demzufolge ebenfalls ein

## 6. Diskussion

inflammatorischer oder proliferativer Prozess vorhanden zu sein, der äquivalent ansteigt, so dass sich im Verhältnis Tumor- zu Referenzgewebe nichts ändert. Die steigenden absoluten Proteinwerte mit zunehmender Tumorausdehnung entsprechen den Erwartungen, dass Zellproliferation sowie Antiapoptose mit dem Fortschreiten des Tumorwachstums zunehmen. Das umliegende Gewebe wird verdrängt oder der Tumor infiltriert es und initiiert zunehmend Gewebeschäden mit entzündlichen Veränderungen, die wiederum eine NF- $\kappa$ B-Aktivität hervorrufen. Diese Beobachtungen zeigten sich in anderen Studien ebenfalls, z.B. in kolorektalen Karzinomen. Je größer die Ausdehnung des Karzinoms war, desto höher war die NF- $\kappa$ B-Expression<sup>95</sup>.

Im CCC war die steigende Proteinmenge bei Fortschreiten des Wachstums deutlich erkennbar. Für das HCC war nur eine Probe im T2-Stadium vorhanden, die vergleichsweise extrem hoch war, so dass sich der zunehmende Anstieg nicht zeigte. In dem Fall lässt sich keine Aussage treffen und in Folgestudien sollte auf eine homogene Verteilung der Gruppen geachtet werden.

NEMO weist insgesamt einen niedrigeren absoluten Wert auf als NF- $\kappa$ B auf. Dies ist möglicherweise auf unterschiedliche Halbwertszeiten beider Proteine zurückzuführen. Zudem gehen die Proteine unterschiedliche Protein-Interaktionen ein, die wiederum Einfluss auf die Stabilität eines Proteins haben. Potentiell möglich sind wie bereits beschrieben auch Ungenauigkeiten in der Auswertung.

### **6.3 NEMO als Marker zur Analyse des Differenzierungsgrades und der Rezidiventwicklung**

Die Entdifferenzierung eines Tumors verläuft phasenweise und geht mit einem Funktionsverlust oder einer Funktionsminderung der Zellen einher. Initial induzieren der oxidative Stress sowie die Entzündungsreaktion in G1-Tumoren die Expression von NF- $\kappa$ B<sup>99</sup>. In der Promotionsphase eines Tumors, in der die Zellen zunehmend genetisch instabil werden, werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert. Diese können in der Progressionsphase direkt das Wachstum der Krebszellen stimulieren und die schrittweise Entdifferenzierung eines Tumors fördern<sup>128</sup>. Zudem unterliegt die Zelle einem Inflammationsprozess als ein Zeichen der zunehmenden Gewebeschädigung<sup>99</sup>. Während dieser Prozesse wird vermehrt NF- $\kappa$ B exprimiert.

## 6. Diskussion

In unserer Studie zeigte sich im G2-Tumor eine bis zu vierfache Erhöhung der relativen NEMO-mRNA- sowie -Protein-Expression im Vergleich zum nichtmalignen Gewebe. Dies gibt den Hinweis darauf, dass die oben genannten Prozesse in den untersuchten Geweben ablaufen. Schlecht-differenzierte G3-Tumoren, deren Zelleigenschaften sich stark vom Ursprungsgewebe unterscheiden, weisen hingegen eine stark verminderte NEMO-Expression auf. Sie scheinen möglicherweise an das hohe ROS-Level und die Inflammation zu adaptieren. Im Laufe ihrer Entwicklung verändern Tumorzellen ihren intrinsischen Metabolismus, um in einer prooxidativen und proinflammatorischen Umgebung zu überleben. Es kommt im Verlauf zu einer Hochregulation von antioxidativen Abwehrsystemen. Diese Resistenz gegenüber oxidativem Stress ist ein Hauptmechanismus der Chemo- und Radiotherapieresistenz von Tumoren <sup>146,147</sup>.

In unserer Untersuchung wurde nur ein G1-Tumor untersucht. Es kann daher keine Aussage getroffen werden, wie das initiale Level war. In Folgestudien muss hier auf eine homogene Verteilung der Differenzierungsgrade geachtet werden, um den Zusammenhang deutlicher untersuchen zu können.

Die NEMO-Expression in humanen Tumoren wurde bisher nur von einer Arbeitsgruppe untersucht. Pichler et al. (2011) konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der 5-Jahres-Überlebensrate und der NEMO-Expression im HCC finden. Ist die NEMO-Expression stark vermindert, versterben die Patienten früher. Ein Trend zeigt sich zwischen einer verminderten 5-Jahres-progressionsfreien Überlebensrate und einer verminderten NEMO-Expression <sup>131</sup>. Unsere Studie bestätigt diesen Zusammenhang.

Betrachtet man die NF-κB-Expression im G3-Tumor, zeigt sich im Vergleich zum Referenzgewebe im Tumorgewebe jedoch keine Verminderung (Median: 141%) wie es bei der NEMO-Expression der Fall war. Die Expression ist im Vergleich zum G2-Tumor dennoch ebenso vermindert. Dies bestätigen andere Studien, die den Zusammenhang der Entdifferenzierung und der NF-κB-Aktivierung genauer untersucht haben <sup>146</sup>. Als Regulator von NF-κB müsste NEMO theoretisch einen äquivalenten Verlauf zeigen. Möglicherweise ist NEMO verändert und konnte mit unseren eingesetzten Methoden nicht mehr detektiert werden oder NF-κB hat andere Eigenschaften, u.a. eine längere Halbwertszeit oder andere Interaktionen, die das Protein stabilisieren.

Zudem zeigten verschiedene Studien im Mausmodell einen Zusammenhang zwischen der Deletion von NEMO und der Karzinogenese. Die Versuche wurden an Mäusen durchgeführt, in denen gezielt NEMO in den Hepatozyten ausgeschaltet wurde (NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäuse). NEMO ist essentiell für die Aktivierung von NF-κB in der

## 6. Diskussion

Embryogenese<sup>124,125</sup>. Der NEMO<sup>Δhepa</sup>-Embryo verstirbt intrauterin durch eine massive Apoptose der Hepatozyten. Die Schutzfunktion von NEMO durch die Aktivierung des antiapoptischen Transkriptionsfaktors NF-κB fehlt<sup>148</sup>. Bei drei Wochen alten NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäusen kommt es als Zeichen der Hepatozytenschädigung zu einem erhöhten Level der Aminotransferasen. Eine Stimulation mit TNF-α führt zu einem massiven Untergang der Zellen durch Apoptose durch eine vermehrte Expression von proapoptischen Proteinen wie Bax und den Caspasen 3 und 8<sup>124,125</sup>. Auch hier fehlt NEMO, um die Hepatozyten vor dem TNF-induzierten Zelltod zu schützen. Deletiert man NEMO in adulten Mäusen, so resultiert dies direkt in einer spontanen Entwicklung eines HCC<sup>124</sup>. Weitere Studien weisen einen komplexen Phänotyp mit einer basalen Caspase-8-Aktivierung in NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäusen nach. Auch hier kommt es als Zeichen der Hepatozytenschädigung zu einem erhöhten Level der Leberenzyme AST und ALT. Zudem entwickelten NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäuse eine spontane Steatohepatitis und im weiteren Verlauf die Bildung einer Leberfibrose und eines HCC. Die NF-κB-Aktivierung ist bei diesen Mäusen vollständig inhibiert<sup>124,126</sup> (siehe Abb. 6.1).

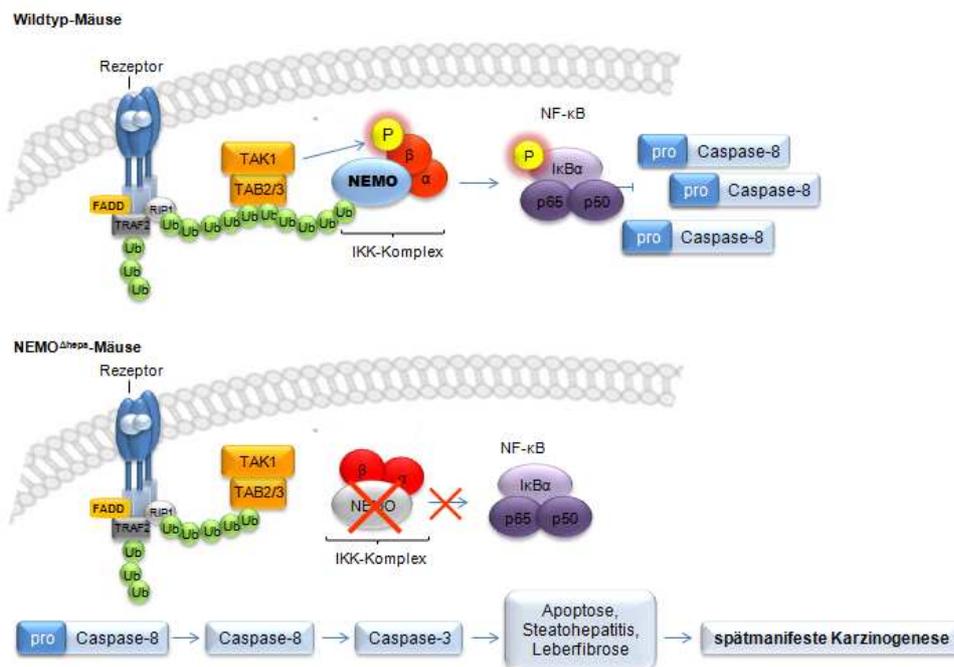


Abb. 6.1 (modifiziert)<sup>104</sup>: Signalkaskade in Wildtyp- und NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäusen: Eine Deletion von NEMO führt über die proapoptischen Proteine Caspase-3 und Caspase-8 zu einer spätmanifesten Karzinogenese. Der Transkriptionsfaktor NF-κB fehlt, um die Hepatozyten vor dem TNF-induzierten Zelltod zu schützen<sup>124-126</sup>.

Interessant ist, dass diese Studien von einer regenerative Antwort und eine

## 6. Diskussion

Inflammation trotz der NEMO-Deletion berichten. Es scheinen entweder andere inflammatorische Signalwege hochreguliert zu sein, deren Aktivierungsmechanismen in diesem Zusammenhang nicht geklärt sind, oder das Fehlen von NEMO führt zu einer genomischen Instabilität. Diese Instabilität ist ein möglicher weiterer Pathomechanismus, der die Karzinogenese fördert<sup>6,7,10</sup>

Schaltet man in NEMO-Knockout-Mäusen zusätzlich FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) aus, das im Normalfall die TNF-induzierte Caspase-8-Kaskade initiiert, so entwickeln diese Mäuse mit diesem „Apoptoseschutz“ keinen Tumor (siehe Abb. 6.2). Dies bedeutet, dass eine Inaktivierung von NEMO über diese im Normalfall aktive FADD-Signalkaskade möglicherweise zur Hepatokarzinogenese führt<sup>124</sup>.

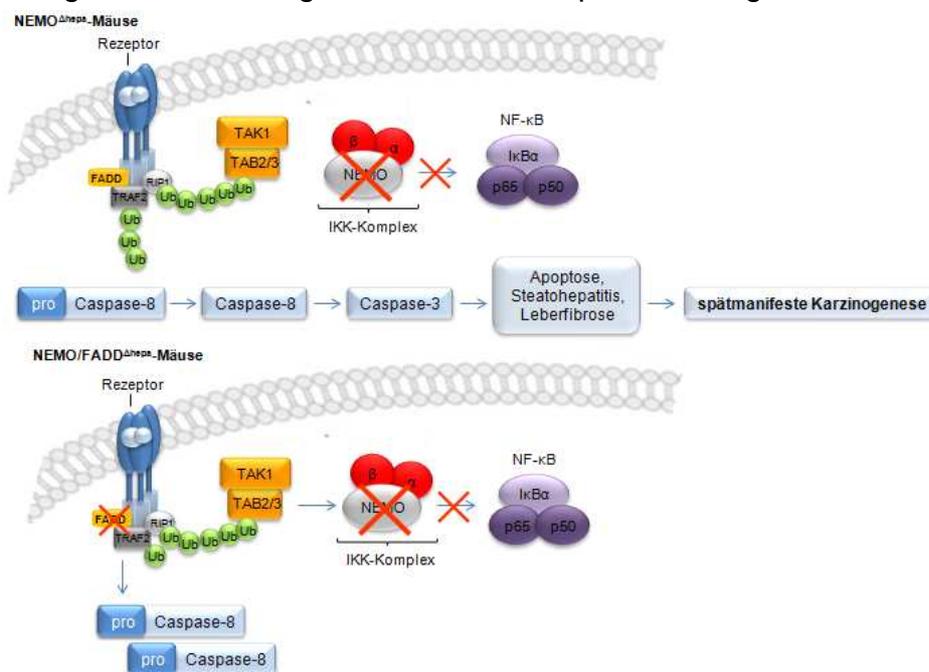


Abb. 6.2 (modifiziert)<sup>104</sup>: Signalkaskade in NEMO<sup>Δhepa</sup>- und NEMO/FADD<sup>Δhepa</sup>-Mäusen: Eine Deletion von NEMO führt über die proapoptischen Proteine Caspase-3 und Caspase-8 zu einer spätmanifesten Karzinogenese. Bei einer zusätzlichen Inhibition von FADD weisen die Zellen einen „Apoptoseschutz“ auf<sup>124</sup>.

Luedde et al. (2007) vermuten, dass die selektive Inhibition von NEMO über eine vermehrte FADD-induzierte Apoptose eine regenerative proliferative Antwort hervorruft, die mit einer Inflammation des Leberparenchyms einhergeht. Dieser Prozess verursacht einen hohen Level an ROS. Der entstehende oxidative Stress ist wie bereits beschrieben potentiell mutagen und kanzerogen<sup>124</sup>. Dass u.a. eine FADD-abhängige TRAIL-(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-Aktivierung an der

## 6. Diskussion

humanen Cholangiokarzinogenese beteiligt ist, wurde bereits in Studien nachgewiesen. Sind die CCC-Zellen resistent gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose, aktiviert TRAIL über die Aktivierung des IKK-Komplexes NF- $\kappa$ B<sup>132</sup>. Das Resultat ist eine Förderung der Tumorinvasion, eine mögliche Metastasierung und korreliert mit einer verminderten Überlebensrate<sup>149</sup>. Die genaue Regulation von NEMO ist im Zusammenhang mit der Cholangiokarzinogenese bisher nicht untersucht worden. Da hier eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfolgt, ist davon auszugehen, dass NEMO vorhanden ist und keine Verminderung aufweist. Aus der Studie geht nicht hervor, welche Differenzierungsgrade untersucht wurden.

Während NEMO in den zuvor beschriebenen Studien tumorsuppressiv zu sein scheint und eine Verminderung zu einem erhöhten Progressionsrisiko führt, besteht die Vermutung, dass NEMO auch einen tumorpromotenden Effekt hat. Wie bereits beschrieben ist die Aktivierung des IKK-Komplexes abhängig von der Kinase TAK1 (MAP3-kinase TGF $\beta$ -activated kinase). NEMO dient aktuellen Studien zufolge als Vermittler zwischen TAK1 und den katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ <sup>117-119</sup>. Fehlt die Kinase TAK1 kann der IKK-Komplex und damit NF- $\kappa$ B nicht aktiviert werden. Eine Ausschaltung von TAK1 im Mausmodell führt in Hepatozyten und Cholangiozyten zu einer NEMO-abhängigen NF- $\kappa$ B-unabhängigen Tumorentstehung. Dieser Prozess basiert auf einer massiven Dysplasie der Hepatozyten und einer frühmanifesten Karzinogenese<sup>104</sup>. Eine zusätzliche NEMO-Deletion in diesen Mäusen zu einem Zeitpunkt mit einer hohen AFP-Konzentration, senkte die AFP-Expression wieder, ohne dass in der Folge ein HCC detektiert werden kann. Als möglicher Mechanismus wird der inflammatorische und Stress-abhängigen JNK-(c-Jun-[N]-terminal-kinase)-Signalweg diskutiert. Eine Stimulation der Zellen in den TAK1-Knockout-Mäusen zeigt eine starke Aktivierung dieser Signalkaskade im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sowie eine Aktivierung der proapoptischen Caspasen (siehe Abb. 6.3).

Wie aussagekräftig die Verminderung von NEMO-mRNA und NEMO-Protein ist, zeigt die ROC-Analyse. Diese ist insbesondere für die Gruppe HCC auf mRNA- und Proteinebene eindeutig. Der Test war zu 100% sensitiv und spezifisch. Es konnten alle G3- sowie alle G2-Tumoren anhand des gewählten Cut-Off-Wertes diagnostiziert werden. Die gleiche Tendenz zeigte sich in der Gruppe CCC, jedoch nicht ganz so stark ausgeprägt. Insgesamt muss man beachten, dass für den Differenzierungsgrad G1 in der Gruppe HCC kein Tumor vorlag und so in der Analyse nur G2- mit G3-Tumoren

## 6. Diskussion

verglichen wurden. In weiteren Studien sollte hier auf eine homogene Verteilung sowie größere Fallzahlen geachtet werden, um eine genauere Aussage treffen zu können.

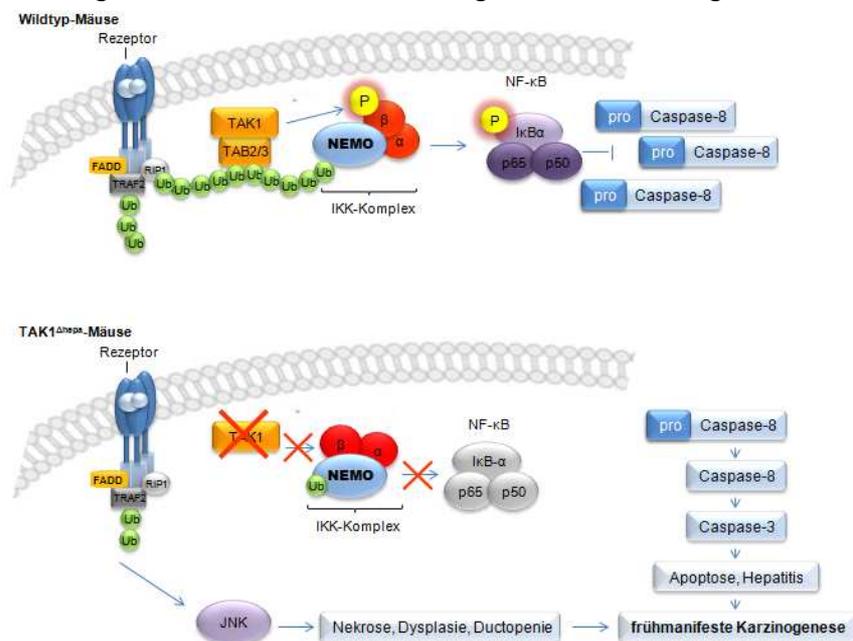


Abb. 6.3 (modifiziert) <sup>104</sup>: Signalkaskade in Wildtyp- und TAK1<sup>Δhepa</sup>-Mäusen: Eine Deletion von TAK1 führt zu einer NEMO-abhängigen NF-κB-unabhängigen Karzinogenese möglicherweise über JNK <sup>104</sup>.

Der Differenzierungsgrad korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs. So neigen G3-Tumoren eher zur Rezidivierung. In dieser Studie ist dieser Zusammenhang hochsignifikant. Mit der relativen Expression von NEMO-mRNA und -Protein kann ebenfalls eine Aussage getroffen werden, ob ein Tumor zur Rezidivierung neigt oder nicht, im HCC ebenso zu 100%.

Insgesamt ist NEMO nach diesen Ergebnissen ein prognostischer Marker und spielt eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression, die es weiter zu erforschen gilt. Gerade die Bestimmung des Rezidivrisikos ist für die Nachsorge von Bedeutung. So können Kontrolltermine in einem kürzeren Intervall durchgeführt und das mögliche Rezidiv früher entdeckt werden.

### 6.4 NEMO in der steatotischen Leber

Klinisch relevante Risikofaktoren sind die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) <sup>1,16,42</sup>. Bisher ist der genaue Pathomechanismus nicht vollständig aufgeklärt. Wichtige Faktoren scheinen u.a. die Akkumulation der Fettzellen sowie proinflammatorische Zytokine und anhaltender

## 6. Diskussion

oxidativer Stress zu sein. Derzeit noch erforscht werden genetische Ursachen. Steatotische Zellen sind insgesamt sensitiver gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie inflammatorischen Prozessen<sup>150</sup>. ROS entstehen überwiegend in den Mitochondrien und werden bei der NASH durch eine gesteigerte  $\beta$ -Oxidation vermehrt gebildet. Der entstehende oxidative Stress induziert eine peroxidative Schädigung an der Lipidmembran und schädigt die DNA. Die durch ROS und die Lipidperoxidation entstandene Zellschädigung führt zu einer vermehrten Sezernierung von Zytokinen, u.a. auch TNF- $\alpha$ , das über die klassische IKK-Signalkaskade NF- $\kappa$ B aktiviert<sup>99,150</sup>. Wichtig ist, dass über diese ROS-induzierte Leberschädigung sowie die Inflammation die Entstehung einer Fibrose begünstigt wird, die in einer Hepatokarzinogenese resultieren kann<sup>151</sup>. Die durchgeführte Analyse der absoluten NEMO-Proteinwerte zeigte wie erwartet bei einer Steatose > 20% signifikant höhere bzw. im Trend höhere Werte als in nicht-steatotischem Gewebe.

Im Gegensatz dazu zeigen Luedde et al., dass sechs Monate alte NEMO <sup>$\Delta$ hepa</sup>-Mäuse einer humanen NASH ähnelnde Veränderungen trotz einer Deletion von NEMO im Leberparenchyms aufweisen. Diese Veränderungen, u.a. das Ballooning der Hepatozyten sowie steigende Lipidkonzentrationen, sind auch hier eine Prädisposition für eine Leberkarzinogenese<sup>124,126,130</sup>.

Ursächlich ist die Sensitivität von NEMO-defizienten Mäusen gegenüber TRAIL-(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-vermittelter Apoptose sowie die durch oxidativen Stress induzierten Zellschäden. Die TRAIL-vermittelte Apoptose ist FADD-abhängig und induziert die proapoptotischen Caspasen 8 und 3 (siehe Abb. 6.4).

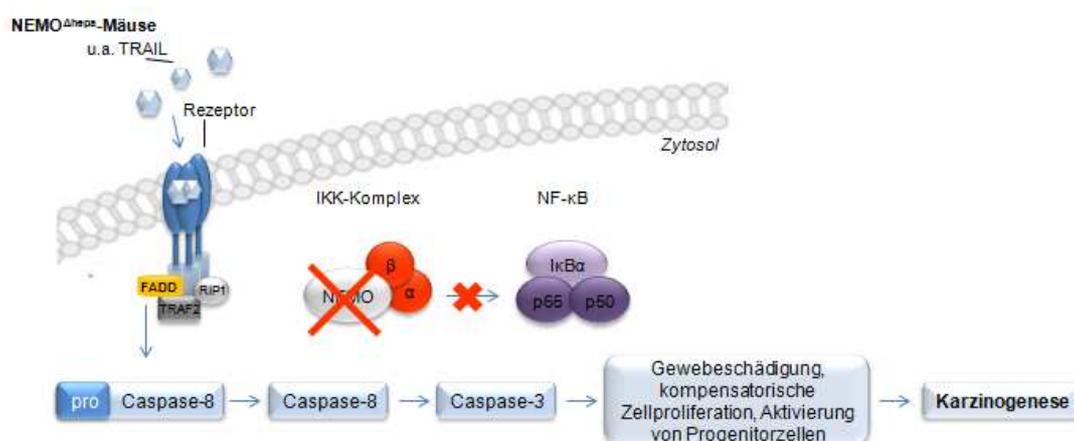


Abb. 6.4: Signalkaskade in NEMO <sup>$\Delta$ hepa</sup>-Mäusen in steatotischem Lebergewebe: Eine Deletion von NEMO führt zu einer FADD-vermittelten Apoptose, ausgelöst durch eine erhöhte TRAIL-Produktion<sup>126</sup>.

## 6. Diskussion

Hervorgerufen wird die TRAIL-Produktion von natürlichen Killerzellen, die durch die NASH aktiviert werden<sup>130</sup>. Physiologischerweise inaktiviert TRAIL Zielzellen, u.a. auch Tumorzellen, durch die Induktion der Apoptose und ist ein mögliches Medikament in der Krebstherapie. In dem Fall der NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäuse resultiert die TRAIL-Aktivierung in einer zunehmenden Gewebeschädigung mit einer kompensatorische Zellproliferation, einer Inflammation des Gewebes sowie der Aktivierung von Progenitorzellen<sup>126</sup>.

In jüngeren acht Wochen alten NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäusen zeigt sich zunächst eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, wie es typisch für eine NASH ist, sowie des oxidativen Metabolismus. Zudem weist die Leber Einlagerungen von Glykogen mit einer Abnahme der Glucose-Serumkonzentration auf und im Verlauf steigende Lipidkonzentrationen als Zeichen einer Insulinresistenz. Erhöhte AST- und ALT-Level weisen auch hier auf die schon vorhandene Gewebeschädigung mit einer kompensatorischen Zellproliferation hin. Behandelt man diese Mäuse in einem Alter von vier Wochen über einen Zeitraum von sechs Wochen mit einer antioxidativen Therapie, wird die Ausbildung der NASH verhindert, die ALT-Level weisen wieder Normalwerte auf und es zeigt sich eine starke Reduktion der Apoptose sowie der Inflammation<sup>124</sup>. Das deutet darauf hin, dass der Prozess zunächst reversibel ist und damit das Fortschreiten mit dem Endresultat eines HCC vermieden werden kann.

NEMO/FADD-Knockout-Mäuse zeigen keine Lipideinlagerung. Wie bereits beschrieben weisen diese Mäuse einen Apoptoseschutz auf<sup>124</sup>. Wahrscheinlich ist, dass die Lipideinlagerung eher die Folge einer chronischen Inflammation und des anhaltenden oxidativen Stress ist als ein metabolisches Problem. Die humane Karzinogenese sowie die Karzinogenese in NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäusen, die jeweils auf einer Steatose/NASH basieren, weisen verschiedenen Mechanismen auf. Die humane NF-κB-Aktivierung kann in den NEMO<sup>Δhepa</sup>-Mäusen nicht stattfinden, so dass es zu einer FADD-abhängige Apoptose der NEMO-defizienten Hepatozyten kommt. Die gemessene erhöhte NF-κB-Expression im humanen Gewebe entsprach so der Literatur.

Um genauer einschätzen zu können, wie genau NEMO in diesen Prozess involviert ist bzw. ob NEMO in vivo eine veränderte Regulation zeigt, die eine NASH/NAFLD induziert, könnte in Folgestudien genauer analysiert werden. Eine höhere Probenanzahl, sowie die Einbeziehung weiterer Steatosegrade und die klare Trennung zwischen NASH und NAFLD ermöglichen eine differenziertere Analyse. Gelingt es, den Entstehungsmechanismus einer NASH zu verstehen und ggf. zu inhibieren, wäre eine mögliche Prädisposition für die Entstehung eines HCC therapeutisch behandelbar bzw.

reversibel. Auch die Diagnostik einer hepatischen Verfettung würde neben der Sonographie ein sensitiver und spezifischer Marker vereinfachen. In dieser Studie gibt es allerdings noch keinen Anhaltspunkt, der auf einen direkten Zusammenhang zwischen NEMO und der humanen Steatoseentwicklung hinweist. Bei einer Patientenzahl von elf ist eine Aussage zudem nur sehr eingeschränkt zu treffen.

### 6.5 CYLD

Physiologische Regulationsmechanismen bewirken, dass gleichzeitig mit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Aktivierung von CYLD stattfindet. Es wird so ein Gleichgewicht zwischen der Aktivierung und Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität erreicht<sup>152</sup>. Brummelkamp et al. (2003) zeigen, dass eine gezielte Inhibition von CYLD mittels RNA-Vektoren zu einer vermehrten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führte<sup>137</sup>. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei CYLD, einem Tumorsuppressorgen, um einen Feedbackinhibitor der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade handelt, der eine überschießende Zellreaktion verhindert. Als Deubiquitinase entfernt CYLD Polyubiquitinketten u.a. von NEMO und TAK1 und inaktiviert diese<sup>138</sup>. Im HCC sowie beim kolorektalen Karzinom lässt sich eine erniedrigte CYLD-Expression auf Protein- und RNA-Ebene im Vergleich zum umgebenden nicht-malignen Gewebe nachweisen<sup>139,140</sup>. Es zeigt sich ebenfalls eine erniedrigte CYLD-Expression bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dies lässt auf einen möglichen Zusammenhang von CYLD mit einer Fehlregulation der inflammatorischen Kontrolle schließen<sup>141</sup>. In unserer Studie zeigt sich eine starke Korrelation von NEMO-mRNA und CYLD-mRNA. Je höher die Expression von NEMO-mRNA war, desto höher auch die Expression der CYLD-mRNA und umgekehrt. Zu erwarten wäre allerdings eine Gegenregulation. Eine sehr aktuelle Studie zeigt nun, dass eine leberspezifische Ausschaltung von CYLD zur Apoptose der Hepatozyten durch eine spontane Aktivierung der Kinase TAK1 führt<sup>153</sup>. Eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 6.5). Die vermehrte TAK1-Aktivität resultiert in einer Zunahme hepatischer Sternzellen sowie Kupfferzellen, die wie bereits beschrieben die Inflammation, die Fibrogenese sowie TNF- $\alpha$  induzieren, und einer steigenden Apoptose der Hepatozyten über eine Caspase-3-Aktivierung.

## 6. Diskussion

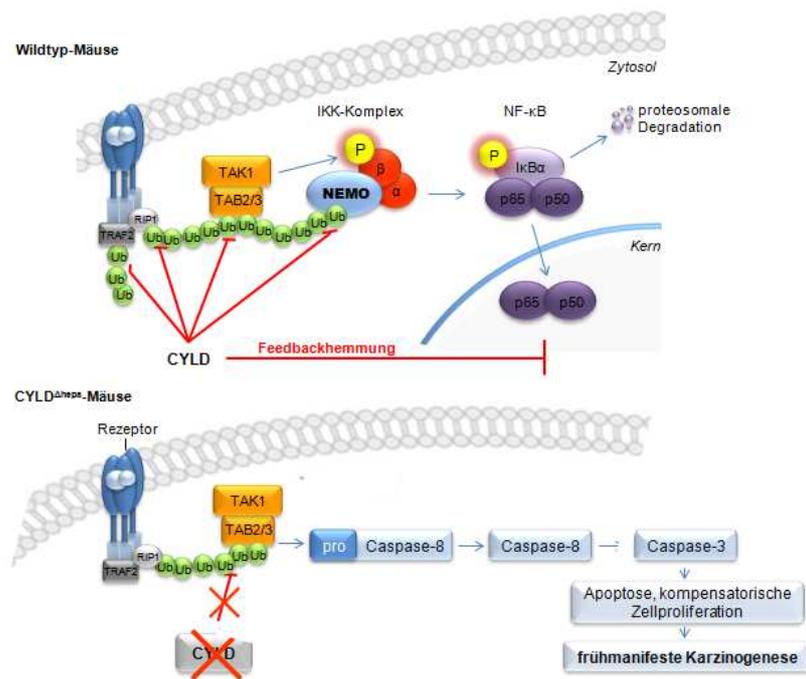


Abb. 6.5: Signalkaskade in  $CYLD^{\Delta hepa}$ -Mäusen: Eine Deletion von CYLD resultiert in einer spontanen TAK1-Aktivität mit einer Caspasenaktivierung<sup>153</sup>.

Über eine kompensatorische Zellproliferation kommt es zur Karzinogenese. CYLD ist ein folglich wichtiger Regulator, der die Zellen vor der spontanen TAK1-induzierten Apoptose schützt. Andererseits kommt es wie bereits zuvor erwähnt in  $TAK1^{\Delta hepa}$ -Mäusen ebenfalls zu einer frühmanifesten Karzinogenese, so dass TAK1 entweder über eine Aktivierung oder eine Inhibition die Karzinogenese fördert<sup>104</sup>.

Das Interessante an der neuen CYLD-Studie ist, dass Nikolaou et al. (2012) zeigten, dass einige der phänotypischen Eigenschaften der CYLD-Knockout-Mäuse denen der  $NEMO^{\Delta hepa}$ - und  $TAK1^{\Delta hepa}$ -Mäuse ähneln<sup>153</sup>. Hierzu gehören die Apoptose, die Fibrose, die Inflammation und die Karzinogenese. Wie nun das genaue Zusammenspiel von TAK1, CYLD und NEMO ist, muss in weiteren Studien mit humanen Geweben analysiert werden.

Inwieweit man insgesamt die Ergebnisse unserer Studie, z.B. eine Verminderung von NEMO, wie sie sich bei einem schlechten Differenzierungsgrad zeigte, mit der Inhibition in einer NEMO-Knockout-Maus gleichsetzen kann, muss in Folgestudien genauer überprüft werden. Weitere Studien werden zeigen, inwieweit sich die Ergebnisse ähneln. In jedem Fall geben Mausstudien Hinweise auf mögliche Interaktionen.

## 6.6 Ausblick

Es konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass eine Verminderung von NEMO-mRNA und NEMO-Protein mit einer Tumorprogression insbesondere im hepatozellulären Karzinom einhergeht. Der Differenzierungsgrad konnte mittels NEMO-mRNA und -Protein hochsensitiv und hochspezifisch detektiert werden. Hinter der Verminderung von NEMO steckt möglicherweise eine Adaptation der schlecht differenzierten Tumoren an die prooxidative und proinflammatorische Umgebung. Möglich sind auch andere bisher nicht bekannte involvierte Mechanismen, die die regulatorische Funktion von NEMO verhindern. Weitere Studien sollten zeigen, inwieweit die Verminderung von NEMO eine Schlüsselfunktion in der Tumorentdifferenzierung hat und ob sich das Ergebnis in größeren Studien bestätigen lässt. Möglich ist auch, dass der Prozess multifaktoriell ist wie die ebenfalls vorliegende Verminderung von CYLD zeigt.

Es ist wichtig, Mechanismen, die eine Verminderung von NEMO auslösen, zu identifizieren, um hier einen möglichen Angriffspunkt für Therapien entwickeln zu können. Studien an humanen Hepatozyten, in denen eine gezielte Ausschaltung bzw. Verminderung von NEMO mit siRNA durchgeführt wird, wären für das Verständnis des Mechanismus sehr hilfreich. Interessant wäre hier die proapoptotische Caspasenaktivität, den oxidativen Stress, die FADD- sowie die TAK1-Expression nach TNF- $\alpha$  oder TRAIL-Stimulation zu messen. Zudem sollte der Expressionsunterschied zwischen den Differenzierungsgraden gezielter untersucht werden. Auch hier wäre u.a. die Messung des oxidativen Stresses und der Caspasenaktivität von Bedeutung, um abschätzen zu können, ob die Zellen möglicherweise adaptieren oder andere Mechanismen, die NEMO-Expression vermindern.

In dieser Studie wurde nur die Gesamtprotein- und -RNA-Expression gemessen. Es wäre interessant zu untersuchen, inwieweit die aktive Form von NEMO Veränderungen in Tumorgewebeproben zeigt. In der Literatur werden verschiedene posttranslationale Modifikationen beschrieben, u.a. die Ubiquitinierung, die Sumoylierung und die Phosphorylierung. In diesem Fall wäre die Ubiquitinierung ein interessanter zu untersuchender Mechanismus, da die Sumoylierung bzw. die Phosphorylierung im Zellkern stattfindet und durch UV-Strahlung ausgelöst wird.

Um genauer einschätzen zu können, ob NEMO zudem in den Prozess der NASH/NAFLD-Entwicklung involviert ist, müssten ebenfalls weitere Studien folgen. Das

## 6. Diskussion

Verständnis des Entstehungsmechanismus einer NASH könnte in Zukunft helfen in den Mechanismus gezielt einzugreifen und damit den Umbauprozess der Leber und letztendlich die Tumorentstehung zu verhindern. Auch die Diagnostik einer hepatischen Verfettung würde neben der Sonographie ein sensitiver und spezifischer Marker vereinfachen. In dieser Studie gibt es allerdings noch keinen Anhaltspunkt, der auf einen direkten Zusammenhang zwischen einer veränderten Regulation von NEMO und der humanen Steatoseentwicklung hinweist.

In Folgestudien wäre es zudem wichtig, stark fibrosierte bzw. zirrhotische Gewebe in die Untersuchung einzubeziehen, da sie die häufigste Entstehungsgrundlage eines HCC sind. Im Rahmen dessen kann NEMO erneut auf seine Fähigkeit als Tumormarker getestet werden. Entscheidend ist, dass die Untersuchung eindeutig zeigen kann, ob NEMO die Zirrhose oder das HCC detektiert. Um eine Aussage treffen zu können, ist der Vergleich mit tumorfreien zirrhotischen Lebergeweben essentiell.

Insgesamt nimmt NEMO eine Schlüsselrolle in der Tumordifferenzierung ein. Zukünftige Studien werden zeigen, welcher genaue Mechanismus dahinter steckt und ob sich NEMO als diagnostischer Marker eignet oder ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt ist.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **61**, 69-90 (2011).
2. Levy, A., Biges-Sauvin, L., Massard, C., Soria, J. C., Deutsch, E. Cell cycle, mitosis and therapeutic applications. *Bull. Cancer.* **98**, 1037-1045 (2011).
3. Boveri, T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J. Cell Sci.* **121**, 1-84 (2008).
4. Nambiar, M., Kari, V., Raghavan, S. C. Chromosomal translocations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1786**, 139-152 (2008).
5. Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., Kerr, D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 489-499 (2009).
6. Fava, G., Lorenzini, I. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Int. J. Hepatol.* **2012**, 630543-630550 (2012).
7. Jain, S., Singhal, S., Lee, P., Xu, R. Molecular genetics of hepatocellular neoplasia. *Am. J. Transl. Res.* **2**, 105-118 (2010).
8. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. *Molecular Cell Biology.* **4**, (2000).
9. Khan, S. A., Thomas, H. C., Toledano, M. B., Cox, I. J., Taylor-Robinson, S. D. p53 Mutations in human cholangiocarcinoma: a review. *Liver Int.* **25**, 704-716 (2005).
10. Migheli, F., Migliore, L. Epigenetics of colorectal cancer. *Clin. Genet.* **81**, 312-318 (2012).
11. Hanahan, D., Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**, 57-70 (2000).
12. Vincent, T. L., Gatenby, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* **32**, 729-737 (2008).
13. Venitt, S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. *Clin. Chem.* **40**, 1421-1425 (1994).
14. Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* **51**, 5054-5059 (1991).
15. Jin, K., Gao, W., Lu, Y., Lan, H., Teng, L., Cao, F. Mechanisms regulating colorectal cancer cell metastasis into liver (Review). *Oncol Lett* **3**, 11-15 (2012).
16. Schutte, K., Bornschein, J., Malfertheiner, P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors. *Dig. Dis.* **27**, 80-92 (2009).
17. Maeda, S. NF-kappaB, JNK, and TLR Signaling Pathways in Hepato-carcinogenesis. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2010**, 367694-367704 (2010).

## 7. Literaturverzeichnis

18. Wild, C. P., Montesano, R. A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Lett.* **286**, 22-28 (2009).
19. Seitz, H. K., Cho, C. H. Contribution of alcohol and tobacco use in gastrointestinal cancer development. *Methods Mol. Biol.* **472**, 217-241 (2009).
20. Dragani, T. A. Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics. *J. Hepatol.* **52**, 252-257 (2010).
21. Coussens, L. M., Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature.* **420**, 860-867 (2002).
22. Martinez-Chantar, M., Lu, S., Mato, J., Luka, Z., Wagner, C., French, B. The role of stem cells/progenitor cells in liver carcinogenesis in glycine N-methyltransferase deficient mice. *Exp. Mol. Pathol.* **88**, 234-237 (2010).
23. Farazi, P. A., DePinho, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 674-687 (2006).
24. Breuhahn, K. Molecular mechanisms of progression in human hepatocarcinogenesis. *Pathologe.* **31**, 170-176 (2010).
25. Sherman, M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin. Liver Dis.* **30**, 3-16 (2010).
26. Block, T.M., Marrero, J., Gish, R.G. et al. The degree of readiness of selected biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma: notes from a recent workshop. *Cancer Biomark.* **4**, 19-33 (2008).
27. Minguez, B., Lachenmayer, A. Diagnostic and prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Dis. Markers.* **31**, 181-190 (2011).
28. Bertino, G., Ardiri, A. M., Calvagno, G. S., Bertino, N., Boemi, P. M. Prognostic and diagnostic value of des-gamma-carboxy prothrombin in liver cancer. *Drug News Perspect.* **23**, 498-508 (2010).
29. Ho, M. Advances in liver cancer antibody therapies: a focus on glypican-3 and mesothelin. *BioDrugs.* **25**, 275-284 (2011).
30. Fujiyama, S., Tanaka, M., Maeda, S., Ashihara, H., Hirata, R., Tomita, K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology.* **62**, 57-63 (2002).
31. Riener, M., Stenner, F., Liewen, H. et al. Golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2) expression in liver tumors and its value as a serum marker in hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* **49**, 1602-1609 (2009).
32. Marrero, J.A., Romano, P.R., Nikolaeva, O. et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **43**, 1007-1012 (2005).
33. Riener, M. O. Diagnosis of tumours of the liver and the biliary tract: new tissue and serum markers. *Pathologe.* **32**, 304-309 (2011).
34. Schwartz, M., Roayaie, S., Konstadoulakis, M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 424-432 (2007).

## 7. Literaturverzeichnis

35. Llovet, J. M., Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. **37**, 429-442 (2003).
36. Llovet, J. M., Fuster, J., Bruix, J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* **10**, 115-120 (2004).
37. Furuse, J. Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *Biologics*. **2**, 779-788 (2008).
38. Kudo, M. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: bench to bedside. *Dig. Dis.* **29**, 273-277 (2011).
39. Kalva, S.P., Iqbal, S.I., Yeddula, K. et al. Transarterial chemoembolization with Doxorubicin-eluting microspheres for inoperable hepatocellular carcinoma. *Gastrointest. Cancer Res.* **4**, 2-8 (2011).
40. Licata, A., Di, M., Parisi, P. et al. Radio-frequency thermal ablation (RFTA) of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. Experience at a single tertiary referral center. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* **51**, 171-178 (2005).
41. Kwon, J. H. Is percutaneous ethanol injection therapy still effective for hepatocellular carcinoma in the era of radiofrequency ablation? *Gut Liver.* **4**, 105-112 (2010).
42. Ustundag, Y., Bayraktar, Y. Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature. *World J. Gastroenterol.* **14**, 6458-6466 (2008).
43. Gatto, M., Bragazzi, M.C., Semeraro, R. et al. Cholangiocarcinoma: update and future perspectives. *Dig. Liver Dis.* **42**, 253-260 (2010).
44. Kubicka, S. Cholangiocellular and gallbladder carcinoma. *Z. Gastroenterol.* **42**, 397-402 (2004).
45. Gores, G. J., Gish, R. G., Sudan, D., Rosen, C. B. Model for end-stage liver disease (MELD) exception for cholangiocarcinoma or biliary dysplasia. *Liver Transpl.* **12**, 95-97 (2006).
46. Schramm, C., Galle, P. R. Primary sclerosing cholangitis is a premalignant condition. *Z. Gastroenterol.* **43**, 607-611 (2005).
47. Miyazaki, M., Takada, T., Miyakawa, S. et al. Risk factors for biliary tract and ampullary carcinomas and prophylactic surgery for these factors. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **15**, 15-24 (2008).
48. Jing, W., Jin, G., Zhou, X. et al. Diabetes mellitus and increased risk of cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* **19**, (2011).
49. Wang, C., Maass, T., Krupp, M. et al. A systems biology perspective on cholangiocellular carcinoma development: focus on MAPK-signaling and the extracellular environment. *J. Hepatol.* **50**, 1122-1131 (2009).
50. Zhang, L., Jiang, L., Sun, Q. et al. Prostaglandin E2 enhances mitogen-activated protein kinase/Erk pathway in human cholangiocarcinoma cells: involvement of EP1 receptor, calcium and EGF receptors signaling. *Mol. Cell Biochem.* **305**, 19-26 (2007).

## 7. Literaturverzeichnis

51. Han, C., Leng, J., Demetris, A. J., Wu, T. Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res.* **64**, 1369-1376 (2004).
52. Wu, T., Leng, J., Han, C., Demetris, A. J. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 299-307 (2004).
53. Yoshikawa, D., Ojima, H., Iwasaki, M. et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br. J. Cancer.* **98**, 418-425 (2008).
54. Hirner A, W. K. *Chirurgie.*, 616-619 (2008).
55. Singh, S., Tang, S. J., Sreenarasimhaiah, J., Lara, L. F., Siddiqui, A. The clinical utility and limitations of serum carbohydrate antigen (CA19-9) as a diagnostic tool for pancreatic cancer and cholangiocarcinoma. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 2491-2496 (2011).
56. Juntermanns, B., Radunz, S., Heuer, M. et al. Tumor markers as a diagnostic key for hilar cholangiocarcinoma. *Eur. J. Med. Res.* **20**, 357-361 (2010).
57. Ruibal, M. A. CEA serum levels in non-neoplastic disease. *Int. J. Biol. Markers.* **7**, 160-166 (1992).
58. Nehls, O., Gregor, M., Klump, B. Serum and bile markers for cholangiocarcinoma. *Semin. Liver Dis.* **24**, 139-154 (2004).
59. Riener, M. O., Fritzsche, F.R., Soll, C. et al. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas. *Histopathology.* **56**, 600-606 (2010).
60. Riener, M. O., Vogetseder, A., Pestalozzi, B.C. et al. Cell adhesion molecules P-cadherin and CD24 are markers for carcinoma and dysplasia in the biliary tract. *Hum. Pathol.* **41**, 1558-1565 (2010).
61. Tamandl D., Grünberger, T. Management des Cholangiokarzinoms. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen.* **7**, 34-50 (2009).
62. Jonas, S., Steinmuller, T., Neuhaus, P. Surgical therapy of liver hilus tumors. *Chirurg.* **72**, 775-783 (2001).
63. Bhuiya, M. R., Nimura, Y., Kamiya, J. Clinicopathologic studies on perineural invasion of bile duct carcinoma. *Ann. Surg.* **215**, 344-349 (1992).
64. Hanninen, E. L., Pech, M., Jonas, S. et al. Magnetic resonance imaging including magnetic resonance cholangiopancreatography for tumor localization and therapy planning in malignant hilar obstructions. *Acta Radiol.* **46**, 462-470 (2005).
65. Murakami, Y., Uemura, K., Sudo, T. Prognostic factors after surgical resection for intrahepatic, hilar, and distal cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **18**, 651-658 (2011).
66. Hong, J. C., Jones C.M., Duffy, J.P. Comparative analysis of resection and liver transplantation for intrahepatic and hilar cholangiocarcinoma: a 24-year

## 7. Literaturverzeichnis

- experience in a single center. *Arch. Surg.* **146**, 683-689 (2011).
67. Valle, J. W., Wasan, H., Johnson, P. et al Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with advanced or metastatic cholangiocarcinomas or other biliary tract tumours: a multicentre randomised phase II study - The UK ABC-01 Study. *Br. J. Cancer.* **101**, 621-627 (2009).
  68. Ullman, T., Odze, R., Farraye, F. A. Diagnosis and management of dysplasia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Inflamm. Bowel. Dis.* **15**, 630-638 (2009).
  69. Gryfe, R. Inherited colorectal cancer syndromes. *Clin. Colon Rectal. Surg.* **22**, 198-208 (2009).
  70. Ewing, G. P., Goff, L. W. The insulin-like growth factor signaling pathway as a target for treatment of colorectal carcinoma. *Clin. Colorectal Cancer.* **9**, 219-223 (2010).
  71. Degirolamo, C., Modica, S., Palasciano, G., Moschetta, A. Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. *Trends Mol. Med.* **17**, 564-572 (2011).
  72. Castellone, M. D., Teramoto, H., Williams, B. O., Druey, K. M., Gutkind, J. S. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science.* **310**, 1504-1510 (2005).
  73. Diggs, D. L., Huderson, A.C., Harris, K.L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective. *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **29**, 324-357 (2011).
  74. Jiang, Y., Kimchi, E. T., Staveley-O'Carroll, K. F., Cheng, H., Ajani, J. A. Assessment of K-ras mutation: a step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. *Cancer.* **115**, 3609-3617 (2009).
  75. Nash, G. M., Gimbel, M., Shia, J. et al. KRAS mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastases. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 572-578 (2010).
  76. Pino, M. S., Chung, D. C. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 385-399 (2011).
  77. Chua, T. C., Liauw, W., Chu, F., Morris, D. L. Viewing metastatic colorectal cancer as a curable chronic disease. *Am. J. Clin. Oncol.* **35**, 77-80 (2012).
  78. Kemeny, N. Presurgical chemotherapy in patients being considered for liver resection. *Oncologist.* **12**, 825-839 (2007).
  79. Havelaar, I. J., Sugarbaker, P. H., Vermess, M., Miller, D. L. Rate of growth of intraabdominal metastases from colorectal cancer. *Cancer.* **54**, 163-171 (1984).
  80. Khatib, A. M., Auguste, P., Fallavollita, L. et al. Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am. J. Pathol.* **167**, 749-759 (2005).

## 7. Literaturverzeichnis

81. Thomas, P., Forse, R. A., Bajenova, O. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin. Exp. Metastasis*. **8**, 923-932 (2011).
82. Fakih, M. G., Padmanabhan, A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know. *Oncology (Williston Park)*. **20**, 579-587 (2006).
83. Walgenbach-Brunagel, G., Burger, B., Leman, E.S. et al. The use of a colon cancer associated nuclear antigen CCSA-2 for the blood based detection of colon cancer. *J. Cell Biochem*. **104**, 286-294 (2008).
84. Engelen, S. M., Beets, G. L., Beets-Tan, R. G. Role of preoperative local and distant staging in rectal cancer. *Onkologie*. **30**, 141-145 (2007).
85. Young, A., Rea, D. ABC of colorectal cancer: treatment of advanced disease. *BMJ*. **321**, 1278-1281 (2000).
86. Schwartz, R. N. Management of early and advanced colorectal cancer: therapeutic issues. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **65**, 8-14 (2008).
87. Nordlinger, B., Sorbye, H., Glimelius, B. et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*. **371**, 1007-1016 (2008).
88. Sanoff, H. K., Sargent, D.J., Campbell, M.E. et al. Five-year data and prognostic factor analysis of oxaliplatin and irinotecan combinations for advanced colorectal cancer: N9741. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5721-5727 (2008).
89. Wong, R., Cunningham, D., Barbachano, Y. et al. A multicentre study of capecitabine, oxaliplatin plus bevacizumab as perioperative treatment of patients with poor-risk colorectal liver-only metastases not selected for upfront resection. *Ann. Oncol.* **22**, 2042-2048 (2011).
90. Kishi, Y., Zorzi, D., Contreras, C.M. et al. Extended preoperative chemotherapy does not improve pathologic response and increases postoperative liver insufficiency after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 2870-2876 (2010).
91. Klinger, M., Tamandl, D., Eipeldauer, S. et al. Bevacizumab improves pathological response of colorectal cancer liver metastases treated with XELOX/FOLFOX. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 2059-2065 (2010).
92. Manikandan, P., Vinothini, G., Vidya, P. R., Prathiba, D., Nagini, S. Eugenol inhibits cell proliferation via NF-kappaB suppression in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Invest New Drugs*. **29**, 110-117 (2011).
93. Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., Aggarwal, B. B. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta*. **1799**, 775-787 (2010).
94. Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L. M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem*. **45**, 7-17 (1999).
95. Kojima, M., Morisaki, T., Sasaki, N. et al. Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor

## 7. Literaturverzeichnis

- progression. *Anticancer Res.* **24**, 675-681 (2004).
96. Berger, R., Fiegl, H., Goebel, G. et al. Toll-like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. *Cancer Sci.* **101**, 1059-1066 (2010).
  97. Muerkoster, S., Arlt, A., Sipos, B. et al. Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit betaTRCP1 relates to constitutive nuclear factor-kappaB activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* **65**, 1316-1324 (2005).
  98. Cheng, Q., Lee, H. H., Li, Y., Parks, T. P., Cheng, G. Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition. *Oncogene.* **19**, 4936-4940 (2000).
  99. Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1493-1505 (2006).
  100. Bonizzi, G., Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280-288 (2004).
  101. Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 49-62 (2007).
  102. Wertz, I. E., Dixit, V. M. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a003350 (2010).
  103. Vucur, M., Roderburg, C., Bettermann, K. et al. Mouse models of hepatocarcinogenesis: what can we learn for the prevention of human hepatocellular carcinoma? *Oncotarget.* **1**, 373-378 (2010).
  104. Bettermann, K., Vucur, M., Haybaeck, J. et al. TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell.* **17**, 481-496 (2010).
  105. Fusco, F., Pescatore, A., Bal, E. et al. Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations. *Hum. Mutat.* **29**, 595-604 (2008).
  106. Cordier, F., Grubisha, O., Traincard, F. et al. The zinc finger of NEMO is a functional ubiquitin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **284**, 2902-2907 (2009).
  107. Laplantine, E., Fontan, E., Chiaravalli, J. et al. NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. *EMBO J.* **28**, 2885-2895 (2009).
  108. Rushe, M., Silvan, L., Bixler, S. et al. Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site. *Structure.* **16**, 798-808 (2008).
  109. Iha, H., Kibler, K.V., Yedavalli, V.R. et al. Segregation of NF-kappaB activation through NEMO/IKKgamma by Tax and TNFalpha: implications for stimulus-specific interruption of oncogenic signaling. *Oncogene.* **22**, 8912-8923 (2003).

## 7. Literaturverzeichnis

110. Hadian, K., Griesbach, R.A., Dornauer, S. et al. NF-kappaB essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 26107-26117 (2011).
111. Grover, A., Shandilya, A., Punetha, A., Bisaria, V. S., Sundar, D. Inhibition of the NEMO/IKKbeta association complex formation, a novel mechanism associated with the NF-kappaB activation suppression by *Withania somnifera*'s key metabolite withaferin A. *BMC. Genomics.* **11**, 4-25 (2010).
112. Yang, Y., Xia, F., Hermance, N. et al. A cytosolic ATM/NEMO/RIP1 complex recruits TAK1 to mediate the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/MAPK-activated protein 2 responses to DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **31**, 2774-2786 (2011).
113. Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., Miyamoto, S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell.* **115**, 565-576 (2003).
114. Poyet, J. L., Srinivasula, S.M., Lin, J.H. et al. Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma /NEMO-mediated oligomerization. *J. Biol. Chem.* **275**, 37966-37977 (2000).
115. Agou, F., Traincard, F., Vinolo, E. et al. The trimerization domain of NEMO is composed of the interacting C-terminal CC2 and LZ coiled-coil subdomains. *J. Biol. Chem.* **279**, 27861-27869 (2004).
116. Tegethoff, S., Behlke, J., Scheidereit, C. Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* **23**, 2029-2041 (2003).
117. Wu, C. J., Conze, D. B., Li, T., Srinivasula, S. M., Ashwell, J. D. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation. *Nat. Cell Biol.* **8**, 398-406 (2006).
118. Kovalenko, A., Wallach, D. If the prophet does not come to the mountain: dynamics of signaling complexes in NF-kappaB activation. *Mol. Cell.* **19**, 433-436 (2006).
119. Chen, Z. J. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol. Rev.* **246**, 95-106 (2012).
120. Lo, Y. C., Lin, S. C., Rospigliosi, C. C., Wu, H. Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO. *Mol. Cell.* **33**, 602-615 (2009).
121. Niu, J., Shi, Y., Iwai, K., Wu, Z. H. LUBAC regulates NF-kappaB activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. *EMBO J.* **30**, 3741-3753 (2011).
122. Palkowitsch, L., Leidner, J., Ghosh, S., Marienfeld, R. B. Phosphorylation of serine 68 in the IkappaB kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappaB activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 76-86 (2008).
123. Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S., Miyamoto, S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science.* **311**, 1141-1146 (2006).

## 7. Literaturverzeichnis

124. Luedde, T., Beraza, N., Kotsikoris, V. et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. **11**, 119-132 (2007).
125. Beraza, N., Ludde, T., Assmus, U. et al. Hepatocyte-specific IKK gamma/NEMO expression determines the degree of liver injury. *Gastroenterology*. **132**, 2504-2517 (2007).
126. Beraza, N., Malato, Y., Sander, L.E. et al. Hepatocyte-specific NEMO deletion promotes NK/NKT cell- and TRAIL-dependent liver damage. *J. Exp. Med.* **206**, 1727-1737 (2009).
127. Martin, S. J. Dealing the CARDS between life and death. *Trends Cell Biol.* **11**, 188-189 (2001).
128. Salganik, R. I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J. Am. Coll. Nutr.* **20**, 464S-472S (2001).
129. Katoonizadeh, A., Nevens, F., Verslype, C., Pirenne, J., Roskams, T. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int.* **26**, 1225-1233 (2006).
130. Falschlehner, C., Schaefer, U., Walczak, H. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*. **127**, 145-154 (2009).
131. Aigelsreiter, A., Haybaeck, J., Schauer, S. et al. NEMO expression in human hepatocellular carcinoma and its association with clinical outcome. *Hum. Pathol.* **43**, 1012-1019 (2011).
132. Siegemund, M., Pollak, N., Seifert, O. et al. Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity. *Cell Death. Dis.* **3**, 295 (2012).
133. Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S. F., Gores, G. J. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, 129-136 (2006).
134. Zhang, K., Zhaos, J., Liu, X. et al. Activation of NF-B upregulates Snail and consequent repression of E-cadherin in cholangiocarcinoma cell invasion. *Hepatogastroenterology*. **58**, 1-7 (2011).
135. Puvvada, S.D., Funkhouser, W.K., Greene, K. et al. NF-kB and Bcl-3 activation are prognostic in metastatic colorectal cancer. *Oncology*. **78**, 181-188 (2010).
136. Gavert, N., Ben-Shmuel, A., Lemmon, V., Brabletz, T., Ben-Ze'ev, A. Nuclear factor-kappaB signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells. *J. Cell Sci.* **123**, 2135-2143 (2010).
137. Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M., Dirac, A. M., Bernards, R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*. **424**, 797-801 (2003).
138. Harhaj, E. W., Dixit, V. M. Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. *Immunol. Rev.* **246**, 107-124 (2012).

## 7. Literaturverzeichnis

139. Urbanik, T., Kohler, B.C., Boger, R.J. et al. Down-regulation of CYLD as a trigger for NF-kappaB activation and a mechanism of apoptotic resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **38**, 121-131 (2011).
140. Hellerbrand, C., Bumès, E., Bataille, F. et al. Reduced expression of CYLD in human colon and hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*. **28**, 21-27 (2007).
141. Sun, S. C. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death. Differ.* **17**, 25-34 (2010).
142. Durrant, I., Fowler, S. Nonradioactive oligonucleotide probe labeling. *Methods Mol. Biol.* **31**, 163-175 (1994).
143. Tung-Ping, P. R., Fan, S. T., Wong, J. Risk factors, prevention, and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* **232**, 10-24 (2000).
144. Mitsuyama, Y., Shiba, H., Haruki, K. et al. Carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 are prognostic predictors of colorectal cancer with unresectable liver metastasis. *Oncol. Lett.* **3**, 767-771 (2012).
145. Robinson, S. M., Mann, D. A. Role of nuclear factor kappaB in liver health and disease. *Clin. Sci. (Lond)*. **118**, 691-705 (2010).
146. Skrzycki, M., Majewska, M., Podsiad, M., Czeczot, H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 663-670 (2009).
147. Fiaschi, T., Chiarugi, P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 762825 (2012).
148. Li, Q., Van, A. D., Mercurio, F., Lee, K. F., Verma, I. M. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*. **284**, 321-325 (1999).
149. Malhi, H., Gores, G. J. TRAIL resistance results in cancer progression: a TRAIL to perdition? *Oncogene*. **25**, 7333-7335 (2006).
150. Kojima, H., Sakurai, S., Uemura, M. et al. Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **31**, 61-66 (2007).
151. Farrell, G. C., van, R. D., Gan, L., Chitturi, S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver*. **6**, 149-171 (2012).
152. Jono, H., Lim, J.H., Chen, L.F. et al. NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 36171-36174 (2004).
153. Nikolaou, K., Tsagaratou, A., Eftychi, C. et al. Inactivation of the Deubiquitinase CYLD in Hepatocytes Causes Apoptosis, Inflammation, Fibrosis, and Cancer. *Cancer Cell*. **21**, 738-750 (2012).

## 8. Abbildungsverzeichnis

2.1: Eigenschaften einer Tumorzelle, die sie von einer nichtmalignen Zelle unterscheiden	4
2.2 (modifiziert): Schematische Darstellung der Hepatokarzinogenese	8
2.3: Therapie des HCC in den Tumorstadien BCLC A-D	10
2.4: Einteilung des Klatskin-Tumors nach Bismuth	11
2.5 (modifiziert): Cholangiokarzinogenese	12
2.6 (modifiziert): Tumorprogressionsmodell (Adenom-Karzinom-Sequenz)	16
2.7: Therapieschema für die Behandlung eines kolorektalen Karzinoms	18
2.8: Die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Kanzerogenese	19
2.9 (modifiziert): Aktivierung der klassischen NF- $\kappa$ B-Signalkaskade	20
2.10 (modifiziert): Struktur NEMO (human)	21
2.11 (modifiziert): TRAIL-vermittelte Apoptose bei NEMO-defizienten Mäusen	23
2.12: Feedbackhemmung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade durch CYLD	26
4.1: Schematischer Aufbau eines Blots	38
4.2: Chemilumineszenzreaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid	39
4.3: Beispiel ROC-Kurve mit Kennzeichnung der „Area under the curve“ (AUC)	43
5.1: Die Aktivierung und nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B p-p65	47
5.2: NEMO-Protein-Expression unter TNF- $\alpha$ -Stimulation	47
5.3: NEMO- und CYLD-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Stimulation	48
5.4: Darstellung des Patientenalters zum OP-Zeitpunkt in den Tumorgeweben HCC, CCC und mCRC	49
5.5: Vergleich der relativen mRNA-Expression in den Tumorgeweben HCC, CCC und mCRC	50
5.6: Vergleich der relativen Protein-Expression in den Tumorgeweben HCC, CCC und mCRC	51
5.7: Absolute NEMO-Protein-Expression im Referenz- und Tumorgewebe	52
5.8: ROC-Kurve zur Analyse der Tumorart	53
5.9: Absolute Proteinmenge in a) Referenz- und b) Tumorgewebe in nicht fibrotischer (Grad 0) und fibrotischer (Grad I / II) Leber	55
5.10: Vergleich der relativen mRNA-Expression in den Tumorstadien T1, T2, T3 und T4	56
5.11: Vergleich der absoluten Protein-Expression im Tumorgewebe in den	

## 8. Abbildungsverzeichnis

Tumorstadien T1, T2, T3 und T4	57
5.12: Vergleich der absoluten NEMO- und NF- $\kappa$ B-Protein-Expression im Tumorgewebe in den Tumorstadien T1, T2, T3 und T4 im HCC / im CCC	58
5.13: Relative NEMO-mRNA-Expression in den drei Tumorgraden G1 – G3	59
5.14: Relative NEMO-mRNA-Expression in den Tumorgraden G2 und G3 der Tumorgruppen HCC und CCC	59
5.15: ROC-Kurve zur Analyse des Differenzierungsgrades (relative NEMO-mRNA-Expression) im HCC	60
5.16: Relative NEMO- und NF- $\kappa$ B-Protein-Expression in den drei Tumorgraden G1 – G3	62
5.17: Relative NEMO- und NF- $\kappa$ B-Protein-Expression in den Tumorgraden G2 und G3 in der Gruppe HCC	62
5.18: ROC-Kurve zur Analyse des Differenzierungsgrades (relative NEMO-Protein-Expression) unabhängig von der Tumorart / in der Gruppe HCC	63
5.19: Relative NEMO-mRNA-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung in den Tumorgruppen HCC und CCC	65
5.20: ROC-Kurve zur Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv (relative NEMO-mRNA-Expression in den Gruppen HCC und CCC	66
5.21: Relative NEMO-Protein-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung in der Tumorgruppe HCC	67
5.22: ROC-Kurve zur Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv (relative NEMO-Protein-Expression) in der Gruppe HCC	68
5.23: Vergleich der absoluten Protein-Expression bei Rezidivfreiheit und Rezidiventwicklung	68
5.24: Vergleich der absoluten Protein-Expression in den Steatosegraden 0 und II	70
5.25: Scatterplot zur Darstellung der Korrelation zwischen der relativen NEMO-mRNA- und CYLD-mRNA-Expression in den Tumorgruppen HCC, CCC und mCRC	72
6.1 (modifiziert): Signalkaskade in Wildtyp- und NEMO <sup><math>\Delta</math>hepa</sup> -Mäusen	80
6.2 (modifiziert): Signalkaskade in NEMO <sup><math>\Delta</math>hepa</sup> - und NEMO/FADD <sup><math>\Delta</math>hepa</sup> -Mäusen	81
6.3 (modifiziert): Signalkaskade in Wildtyp- und TAK1 <sup><math>\Delta</math>hepa</sup> -Mäusen	83
6.4: Signalkaskade in NEMO <sup><math>\Delta</math>hepa</sup> -Mäusen in steatotischem Lebergewebe	84
6.5: Signalkaskade in CYLD <sup><math>\Delta</math>hepa</sup> -Mäusen	87

## 9. Tabellenverzeichnis

2.1: Beispiele für Onkogene	4
2.2: Beispiele für Tumorsuppressorgene	5
2.3: Biochemische Marker HCC	9
2.4: Biochemische Marker CCC	14
4.1: Primär- und Sekundärantikörper	33
4.2: TaqMan® PCR Ansatz	42
4.3: Real-Time-PCR-Protokoll	42
5.1: Verteilung der Parameter Fibrosegrad, Tumorgröße, Differenzierungsgrad, Steatosis und Rezidiventwicklung in den drei Tumorgruppen HCC, CCC und mCRC	49
5.2: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der NEMO-Protein-Expression bei der Unterscheidung der Tumorarten im nichtmalignen Referenzgewebe und im Tumorgewebe	53
5.3: Korrelation zw. der NEMO-Proteinmenge und dem Vorhandensein einer Fibrose	54
5.4: Sensitivität und Spezifität der NEMO-mRNA-Expression bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades bei einem Cut-Off-Wert von 40,5%	60
5.5: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der NEMO-mRNA-Expression bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades in den Gruppen HCC und CCC	61
5.6: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der relativen NEMO-Protein-Expression bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades	63
5.7: AUC der ROC-Kurve bei der Unterscheidung des Differenzierungsgrades anhand der relativen NEMO-Protein-Expression in den Gruppen CCC und mCRC	63
5.8: Absolute NEMO-Protein-Expression in den verschiedenen Differenzierungsgraden G1-G3 in den Gruppen HCC, CCC und mCRC im nichtmalignen Referenzgewebe	64
5.9: Absolute NEMO-Protein-Expression in den verschiedenen Differenzierungsgraden G1-G3 in den Gruppen HCC, CCC und mCRC im Tumorgewebe	65
5.10: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Wert der relativen NEMO-Protein-	

## 9. Tabellenverzeichnis

Expression bei der Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv	66
5.11: Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Werte der relativen NEMO-mRNA-Expression bei der Analyse Rezidiv vs. kein Rezidiv in den Tumorgruppen HCC und CCC	67
5.12: Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und Rezidiventwicklung	69
5.13: Korrelation zwischen der Expression von NEMO und dem Geschlecht	71
5.14: Korrelation zwischen der Expression von NEMO und dem Alter	71

## 10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christine Tarnogrocki, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der NF-κB essential modulator als diagnostischer Biomarker in der Kanzerogenese“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **11. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **12. Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation sehr unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. med. Glanemann danke ich für die Betreuung als Doktorvater, die Überlassung des Themas sowie die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Für die Übernahme meiner Betreuung als Doktorvater, die Begutachtung meiner Dissertation sowie zahlreiche Anregungen danke ich PD Dr. med. Daniel Seehofer.

Mein größter Dank gilt Dr. rer. nat. Georg Damm und Dr. rer. medic. Daniel Knobloch, die mich während der Zeit im Labor begleitet haben, mir mit Rat und Tat bei inhaltlichen und methodischen Fragen zur Seite standen und mich motiviert haben. Anregende Diskussionen sowie wertvolle Kritik haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem danke ich Prof. Dr. med. Andreas Nüssler für die kritische Durchsicht.

Danke an Anja Schirmeier und Jennifer Golembus für die technische Hilfe und die tolle Zusammenarbeit im Labor.

Für die harmonische und fröhliche Stimmung im Labor danke ich meinen Mitdoktoranden Anne Krüger und Sebastian Lünse.

Miriam Lauter danke ich für das sorgfältige mehrmalige Korrekturlesen und die aufmunternden Worte.

Danke an Pichit Buspavanich, ohne den ich das Studium nicht beendet hätte.

Und zu guter Letzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Jan, die immer hinter mir gestanden und mir den Rücken gestärkt hat.