

Aus der Klinik für Chirurgische Medizin, Charité Centrum 8,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse purinerger Stoffwechselwege und NAD⁺-Konzentration in
Patienten mit hepatozellulärem Karzinom nach Leberresektion
und Lebertransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Babigian, Julia

aus Braunschweig

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1.	Abbildungsverzeichnis	5
2.	Tabellenverzeichnis	6
3.	Abkürzungsverzeichnis	7
4.	Symbolverzeichnis	13
5.	Abstrakt	14
5.1.	Deutsche Version	14
5.2.	Englische Version	15
6.	Einleitung	17
6.1.	Epidemiologie und Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms	17
6.2.	Therapiemanagement	18
6.2.1.	Die Leberresektion	18
6.2.2.	Die orthotope Lebertransplantation	20
6.2.3.	Die akute Abstoßung nach Lebertransplantation	21
6.2.4.	Der ischämische Reperfusionsschaden	22
6.3.	Bedeutung des Immunsystems in der Pathogenese des HCC	22
6.3.1.	TIE-2-exprimierende Monozyten	23
6.3.2.	Scavenger Rezeptor CD163	24
6.3.3.	T-Zellen mit Interleukin-10 Expression	25
6.3.4.	T-Zellen mit Interferon- γ Expression	26
6.3.5.	T-Zellen mit Interleukin-10 und Interferon- γ Expression	27
6.3.6.	T-Zellen mit Interleukin-17 und Interleukin-22 Expression	27
6.4.	Bedeutung der purinergen Signalgebung in der Pathogenese des HCC	29
6.4.1.	Gap junction alpha-1 protein (Connexin 43)	29
6.4.2.	CD39	30
6.4.3.	CD38	30
6.4.4.	CD203a	31

6.4.5.	Adenosinrezeptor A2a.....	32
6.4.6.	NAD ⁺ in der Tumormikroumgebung	32
6.5.	Zielsetzung.....	32
7.	Material und Methoden	34
7.1.	Labormaterialien.....	34
7.2.	Reagenzien.....	34
7.2.1.	Grundsubstanzen und Lösungen	34
7.2.2.	Puffer.....	34
7.2.3.	Materialien der T-Zellisolation	34
7.2.4.	Medien der T-Zell-Kultur.....	35
7.2.5.	Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie	35
7.3.	Geräte	36
7.4.	Studiendesign.....	37
7.5.	Studienkohorten.....	37
7.6.	Ein- und Ausschlusskriterien.....	37
7.7.	Technik der Lebertransplantation	39
7.8.	Technik der Leberresektion	39
7.9.	Isolierung und Kryokonservierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut ...	40
7.10.	Auftauen der mononukleären Zellen	41
7.11.	Isolierung und Kultivierung von T-Zellen.....	41
7.12.	Durchflusszytometrie.....	42
7.12.1.	Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbungen	42
7.12.2.	Durchflusszytometrische Messung	45
7.12.3.	Auswertung und Gating-Strategie der Durchflusszytometrie	45
7.13.	NAD ⁺ -Messung im Serumplasma	48
7.13.1.	Puffer und Standardmatrix	48
7.13.2.	Herstellung der Standardmatrix	49

7.13.3.	NAD ⁺ -Messung	49
7.14.	Statistische Methoden.....	50
8.	Ergebnisse	52
8.1.	Auftauen, T-Zellisolierung und -kultur der Patientenproben	52
8.2.	Patientenkollektiv	52
8.3.	Ergebnisse der Kohorte Leberresektion	56
8.3.1.	rezidivfreies- und Gesamtüberleben der Patienten mit Leberresektion	56
8.3.2.	Evaluation der Aussagekraft der prognostischen Biomarker der Patienten mit Leberresektion	57
8.3.3.	Erniedrigte NAD ⁺ -Serumkonzentration in HCC-Patienten mit Leberresektion.....	60
8.3.4.	Erniedrigte der Expression der Ektoenzyme der purinerger Signalgebung CD38, CD203a und Cx43 auf T-Zellen in HCC-Patienten mit Leberresektion	60
8.3.5.	Erniedrigte der Expression der Ektoenzyme der purinerger Signalgebung CD39, A2a und CD163 auf Monozyten und TEMs in HCC-Patienten mit Leberresektion	68
8.3.6.	Erniedrigte Zytokinexpression der Subtypen der T-Zellen in HCC-Patienten mit Leberresektion	70
8.3.7.	Evaluation der Aussagekraft der diagnostischen Biomarker der Patienten mit Leberresektion	73
8.4.	Ergebnisse der Kohorte Lebertransplantation	77
8.4.1.	Einfluss der postoperativen Immunsuppression auf die Subtypen der T-Zellen nach Lebertransplantation	77
8.4.2.	Risikoanalyse einer ACN und eines IRI nach Lebertransplantation anhand der warmen - und kalten Ischämiezeit	77
8.4.3.	Risikoanalyse einer ACN und eines IRI nach Lebertransplantation anhand der Expression der Ektoenzyme der purinerger Signalgebung CD38, CD203a und Cx43 auf T-Zellen	78
8.4.4.	Risikoanalyse einer ACN und eines IRI nach Lebertransplantation anhand der Ektoenzyme der purinerger Signalgebung CD39 und A2a sowie CD163 auf Monozyten und TEMs	80

9. Diskussion	82
9.1. Diskussion der Ergebnisse.....	82
9.2. Diskussion der Methodik.....	88
9.2.1. Qualitätsbeurteilung der potenziellen Biomarker	88
9.2.2. Probengewinnung und -weiterverarbeitung	90
9.2.3. Einschränkungen des Studiendesigns.....	91
9.2.4. Statistische Einschränkungen	92
10. Zusammenfassung und verbleibende Herausforderungen	94
11. Literaturverzeichnis	95
12. Eidesstattliche Versicherung	108
13. Lebenslauf	109
14. Danksagung	109

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Gating-Strategie der Subpopulationen der Monozyten.....	47
Abbildung 2: Genese der Leberzirrhose der Patienten mit Leberresektion und Lebertransplantation.....	55
Abbildung 3: rezidivfreie - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Patienten der Kohorte LR.....	57
Abbildung 4: ROC-Kurven zur rezidivfreien - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Kohorte LR.....	59
Abbildung 5: prä- und postoperative NAD ⁺ -Konzentration in µM der Kohorten LR und Ktrl....	60
Abbildung 6: prä- und postoperative Anzahl an CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorten LR und der Ktrl.....	61
Abbildung 7: prä- und postoperative Anzahl an Th1-Zellen (CD4 ⁺ IFN-γ ⁺) und CTL (CD8 ⁺ IFN- γ ⁺) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorten LR und der Ktrl.....	63
Abbildung 8: rezidivfreie – und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Anzahl der CD4 ⁺ Treg (IL-10 ⁺) mit CD38 Expression und des Anteils der CD38 exprimierenden Tr1-Zellen (IFN-γ ⁺ IL- 10 ⁺) der Kohorte LR.....	63
Abbildung 9: prä- und postoperative Anzahl an Th17-Zellen (CD4 ⁺ CCR4 ⁺ CCR6 ⁺ IL22 ⁺) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorten LR und der Ktrl.....	64
Abbildung 10: rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit der CD203a exprimierenden Th17- Zellen (CCR6 ⁺ CCR4 ⁺) und (CCR6 ⁺) der Kohorte LR	65
Abbildung 11: postoperative Korrelation Th17-Zellen (CD4 ⁺ CCR4 ⁺ CCR6 ⁺ IL-17 ⁺ IL-22 ⁺) und NAD ⁺ -Konzentration in µM der Kohorten LR und der Ktrl.....	68
Abbildung 12: prä- und postoperativer Anteil an CD39 exprimierenden CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten, TEMs und klassischen Monozyten der Kohorten LR und der Ktrl.....	69
Abbildung 13: rezidivfreie - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der CD163 exprimierenden TEMs und CD16 ⁺ CD14 ⁺ Monozyten der Kohorte LR	70
Abbildung 14: prä- und postoperative Anzahl der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen sowie Th1-Zellen und CTL mit IFN-γ Expression und der Anteil der IFN-γ exprimierenden Th1-Zellen und CTL der Kohorten LR und der Ktrl	71
Abbildung 15: rezidivfreie – und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der IL-10 exprimierenden CD4 ⁺ Treg und IL-10 ⁺ IFN-γ ⁺ exprimierenden Tr1-Zellen der Kohorte LR.....	72
Abbildung 16: ROC-Kurven zur diagnostischen Aussagekraft der Biomarker der Kohorten LR und der Ktrl	76

Abbildung 17: prä- und postoperative Anzahl der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen der Kohorten LTX und Ktrl	77
Abbildung 18: WIT und CIT der Kohorte LTX.....	78
Abbildung 19: Anzahl der Th17-Zellen (CD4 ⁺ CCR6 ⁺ IL-17 ⁺) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorte LTX	79
Abbildung 20: Anteil an CD39 exprimierenden CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten, klassischen Monozyten und TEMs der Kohorte LTX.....	81

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörperfärbung der Monozyten	35
Tabelle 2: Antikörperfärbung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ T-Zellen	36
Tabelle 3: Antikörperfärbung der Th17-Zellen.....	36
Tabelle 4: Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung der Monozyten	43
Tabelle 5: Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ T-Zellen	44
Tabelle 6: Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung der Th17-Zellen.....	44
Tabelle 7: Laser und Fluorochrome und Spannung (Volt)	45
Tabelle 8: β-NAD-Standards in DEPC-Wasser	49
Tabelle 9: Demographie und Studienmerkmale.....	54
Tabelle 10: Blutuntersuchung der Kohorten LR, LTX und Ktrl.....	54
Tabelle 11: prognostische Aussagekraft für das Auftreten eines Rezidivs des Anteils CD163 exprimierender TEMs und CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten, Anteils CD38 und IFN-γ ⁺ IL-10 ⁺ exprimierender Tr1-Zellen, Anzahl an CD4 ⁺ Treg mit CD38, Anteils IL-10 exprimierender CD4 ⁺ Treg, Anteils CD203a exprimierender Th17-Zellen (CCR6 ⁺ CCR4 ⁺)	58
Tabelle 12: diagnostische Aussagekraft für das Auftreten eines HCC der NAD ⁺ -Konzentration, des Anteils CD39 exprimierender TEMs und CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten, der Anzahl an CD4 ⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, der Anzahl an Th1-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, des Anteils IFN-γ exprimierender Th1-Zellen, der Anzahl CD8 ⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, der Anzahl CTL mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, der Anzahl Th17-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression.....	74

3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	acute cellular rejection, zu Deutsch: akute Abstoßungsreaktion
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosindiphosphatribose
cADPR	cADP-Ribose, zyklische Adenosindiphosphatribose
AFP	α -Fetoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ang	Angiopoetin
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
AUC	Area under the curve, zu Deutsch: Fläche unter der ROC-Kurve
BE	Blutentnahme
BMI	Body Mass Index, zu Deutsch: Körpermasseindex
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCR	cc-chemokine receptor, zu Deutsch: CC-Chemokin-Rezeptor

CD	Cluster of Differentiation
CIT	Cold ischemia time, zu Deutsch: Kalte Ischämiezeit
Child A-C	Child-Pugh-Kriterien A-C
CT	Computertomographie
CTP	Child-Turcotte-Pugh-Score
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte, zu Deutsch: cytotoxischer T-Lymphozyt
CXCL4	Platelet factor 4 oder CXC-Ligand 4
Cx	Connexin
DC	dendritic cell
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EASL	European Association for the Study of the Liver, zu Deutsch: Europäische Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum, zu Deutsch: Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor, zu Deutsch: Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FLRV	future liver remnant volume, zu Deutsch: zukünftiges Leberrestvolumen
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC-A	forward scatter area, zu Deutsch: Forward Scatter Fläche
FSC-H	forward scatter heigth, zu Deutsch: Forward Scatter Höhe

2'3'-cGAMP	zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat
ggf.	gegebenenfalls
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, zu Deutsch: Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPC-3	Glypican-3
HALR	hand-assisted liver resection, zu Deutsch: handassistierte Leberresektionen
HBV-Infektion	Hepatitis-B-Virusinfektion
HCC	Hepatocellular carcinoma, zu Deutsch: Hepatozelluläres Karzinom
HCV-Infektion	Hepatitis-C-Virusinfektion
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA	Human Leukocyte Antigen, zu Deutsch: Humane Leukozytenantigene
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IRI	Ischemia reperfusion injury, zu Deutsch IRI
INR	International Normalized Ratio
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
LLR	laparoscopic liver resection, zu Deutsch: laparoskopischen Leberresektion
LPS	Lipopolysaccharid

LIMAX	Maximum liver function capacity, zu Deutsch: Maximale funktionelle Leberkapazität
LTX	Lebertransplantation
m	männlich
MAGE-A1	melanoma antigen A1
MELD	Model For End Stage Liver Disease
labMELD	Labor MELD
MILS	minimally invasive liver surgery, zu Deutsch: minimal-invasiven Leberchirurgie
ml	Milliliter
min	Minute(n)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	number, zu Deutsch: Anzahl (der Studienteilnehmer)
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
eNAD⁺	extrazellulären NAD ⁺
NAADP	Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat
NADP⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease, zu Deutsch: Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis, zu Deutsch: Nicht-alkoholische Steatohepatitis

ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NTPDase	Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
NY-ESO-1	New York esophageal squamous cell carcinoma-1
OLR	offene Leberresektion
OLTx	Orthotope Lebertransplantation
PB	Piggyback
PBC	primär biliäre Cholangitis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, zu Deutsch: mononukleären Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphate buffered saline, zu Deutsch: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD 1-1/PD-L1	Programmed cell death protein 1/ Programmed cell death ligand 1
PLLR	pure laparoscopic liver resection, zu Deutsch: rein laparoskopische Leberresektionen
PMS	Polymethylsiloxanpolyhydrat
PPi	Diphosphat
präop.	präoperativ
postop.	postoperativ
ROC	Receiver-Operating-Characteristic, zu Deutsch: Operationscharakteristik
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

SD	Standard Deviation, zu Deutsch: Standardabweichung
r-SBF	revised simulated body fluid
SE	Standard Exception, zu Deutsch: Standardkriterien
SSC-A	side scatter area, zu Deutsch: Side Scatter Fläche
SOP	Standard Operating Procedure, zu Deutsch: Klinikinterne Standards
TAA	Tumor-associated antigen
TAM	Tumor-associated macrophage, zu Deutsch: Tumor-assoziierte Makrophage
TEM	TIE-2-expressing monocyte, zu Deutsch TIE-exprimierender Monozyt
Th-Zelle	T helper cell, zu Deutsch: T-Helfer Zelle
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIM3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	toll-like receptor
TME	tumor microenvironment, zu Deutsch: Tumormikroumgebung
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
Tr1-Zellen	Type 1 regulatory T cell, zu Deutsch: regulatorische Typ-1-T-Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
UTP	Uridintriphosphat
VCI	Vena cava inferior
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, zu Deutsch: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vgl.	vergleiche
w	weiblich

WIT Warm ischemia time, zu Deutsch: Warme Ischämiezeit

z. B. zum Beispiel

4. Symbolverzeichnis

α Alpha

β Beta

γ Gamma

μ My für Mikro

mM Millimolar

μ M Mikromolar

μ l Mikroliter

$^{\circ}$ C Grad Celsius

% Prozent

\pm Plusminuszeichen

< kleiner als

> größer als

5. Abstrakt

5.1. Deutsche Version

Hintergrund: In Deutschland entwickelt einer von 88 Männern und eine von 190 Frauen im Laufe ihres Lebens ein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Durch verbesserte kurative Therapien und neue multimodale Behandlungsstrategien haben Patienten nach Leberresektion oder -transplantation heutzutage erhöhte Überlebensraten. Da der wichtigste Faktor im Prozess der malignen Transformation des HCC das Immunsystem des Betroffenen selbst darstellt, ist ein ausgeprägtes Verständnis der zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen für die Weiterentwicklung von Therapie und Diagnostik unabdingbar. In dieser Studie stehen durch Ektoenzyme der T-Zellen und Monozyten vermittelte purinerge Signalmechanismen sowie NAD⁺-Konzentrationen im Blutplasma im Mittelpunkt. Ziel dieser Arbeit ist es, potenzielle Biomarker zu identifizieren und deren Eignung für Diagnostik und Prognose des HCC zu prüfen.

Methodik: In dieser explorativen Studie wurden 31 HCC-Patienten eingeschlossen, deren Therapie eine Lebertransplantation (n=11) bzw. -resektion (n=20) umfasste, und mit einer Kontrollgruppe (n=10) verglichen. An zuvor definierten Zeitpunkten, prä- und postoperativ sowie bei akuter Abstoßungsreaktion (ACR) oder ischämischen Reperfusionsschaden (IRI), wurden mononukleäre Zellen aus Blutproben isoliert und einschließlich des Blutplasmas kryokonserviert. Die NAD⁺-Konzentration im Blutplasma wurde per hitze-basiertem dichotomen pH-Extraktionsverfahren ermittelt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Monozyten der Patienten als auch aus den Proben gewonnene und kultivierte T-Zellen analysiert. Ein Schwerpunkt bildete dabei die Bestimmung von Ektoenzymen, purinergen Rezeptoren und Zytokinen.

Ergebnisse: Bei Patienten mit Leberresektion konnte sowohl prä- als auch postoperativ eine niedrigere NAD⁺-Konzentration nachgewiesen werden. Verschiedene durch Expression von Ektoenzymen und weiteren Regulatoren des purinergen Stoffwechsels (CD38, CD203a, Cx43) charakterisierte T-Zell-Subpopulationen waren in dieser Patientengruppe deutlich verringert, wohingegen ein höherer Anteil an TIE-2-exprimierenden Monozyten (TEMs) das Ektoenzym CD39 exprimierten. Patienten mit hohem Anteil an CD163 exprimierenden TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten wiesen ein erheblich verkürztes rezidivfreies - und Gesamtüberleben auf. Auch Transplantationspatienten mit einem IRI zeigten präoperativ eine Erhöhung der Expression der Ektoenzyme auf Th17-Zellen. Dagegen wiesen Patienten mit ACR präoperativ verringerte Anteile an CD39 exprimierenden Monozyten und TEMs auf.

Diskussion: Das purinerge Signalsystem hat erhebliche Auswirkungen auf Wachstum, Überleben und Progression solider Tumore, indem es nicht nur den Tumor selbst, sondern auch die Immunreaktionen und die mit ihm verbundene Tumormikroumgebung beeinflusst. Durch die Verwendung der in dieser Studie untersuchten Ektoenzyme als neue potenzieller Biomarker erscheint eine Verbesserung von Diagnose, Prognose, Therapieoptionen und -entscheidungen bei HCC-Patienten vielversprechend. Größere Kohortenstudien sind nötig, um die hier nachgewiesene Eignung der Ektoenzyme auf T-Zellen und Monozyten als auch die NAD⁺-Konzentration im Blut als Biomarker für die Diagnose und Prognose des HCC zu validieren.

5.2. Englische Version

Background: In Germany, one in 88 men and one in 190 women develop hepatocellular carcinoma (HCC) during lifetime. Improved curative therapies and new multimodal treatment strategies have nowadays increased survival rates upon liver resection or transplantation. Since the most important factor in the process of malignant transformation of HCC is the patient's individual immune system, a deep understanding of the underlying immunological mechanisms is essential for further refinement of diagnosis and therapy. This study focuses on purinergic signaling mechanisms mediated by ectoenzymes of T-cells and monocytes as well as determination of NAD⁺ in blood plasma. The aim of this work is to identify potential biomarkers and assess their suitability for diagnosis and prognosis of HCC.

Methods: In this exploratory study, 31 HCC patients whose therapy included either liver transplantation (n=11) or resection (n=20) were included and compared to a control group (n=10). At previously defined time points, pre-, and postoperatively as well as during acute rejection (ACR) or ischemic reperfusion injury (IRI), mononuclear cells were isolated from blood samples and cryopreserved together with blood plasma. The NAD⁺ concentration of the blood plasma was determined by heat-based dichotomous pH extraction procedure. Flow cytometry was used to assess the patients' monocyte and T-cell populations which had been extracted and cultivated from the samples, thereby emphasizing the analysis of ectoenzymes, purinergic receptors and cytokines.

Results: Lower NAD⁺ concentration was detected both, pre- and postoperatively in patients with liver resections. In this group, we found several subtypes of T-cells expressing ectoenzymes and other regulators of purinergic metabolism (CD38, CD203a and Cx43) to be depleted, while a higher proportion of TIE-2-expressing monocytes (TEMs) expressed the ectoenzyme CD39. A higher proportion of CD163 expressing TEMs and CD14⁺ CD16⁺ monocytes were associated with shorter recurrence-free and overall survival.

The Expression of Ectoenzymes on Th17-cells was preoperatively upregulated in transplant patients with IRI. Patients with ACR showed preoperatively decreased proportions of CD39-expressing monocytes and TEMs.

Discussion: The purinergic signaling system has a significant impact on solid tumor growth, survival, and progression by influencing not only the tumor itself but also immune responses and the associated tumor microenvironment. By establishing the studied ectoenzymes as new potential biomarkers, improvement of diagnosis, prognosis, treatment options and decisions in HCC appears promising. Larger cohort studies are needed to validate the herein proposed ectoenzymes on T-cells and monocytes as well as blood NAD⁺ levels as biomarkers for the diagnosis and prognosis of HCC.

6. Einleitung

6.1. Epidemiologie und Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist ein primärer Lebertumor, der sich in der Regel auf Grundlage einer chronischen Erkrankung der Leber, wie einer Leberzirrhose oder Hepatitis, entwickelt (Schonfeld and Kraywinkel, 2018). Weltweit betrachtet ist das HCC die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache, mit jährlich fast 841.000 Neuerkrankungen und 782.000 Todesfällen (Bray et al., 2018). Sowohl Inzidenz als auch Mortalität des HCC sind in Entwicklungsländern deutlich höher als in hoch entwickelten Staaten. Ursachen hierfür sind unterschiedliche Lebensbedingungen und damit verbundene Differenzen in der Dauer und dem Ausmaß der Exposition gegenüber Umwelt- und Infektionsrisikofaktoren, der Verfügbarkeit allgemeiner Gesundheitsversorgung und Vorsorgeuntersuchungen sowie der Möglichkeit eine potenziell kurative Behandlung anzubieten (Yang et al., 2019a).

Das HCC tritt in Deutschland weniger häufig auf, wobei die Diagnose für die Betroffenen nach wie vor mit einer schlechten Prognose einhergeht. Im Jahr 2016 wurden rund 9.000 Neuerkrankungen und fast 8.000 HCC bedingte Todesfälle registriert (Schonfeld and Kraywinkel, 2018). Das Lebenszeitrisko an einem HCC zu erkranken, beträgt für Frauen 0,5% und für Männer 1,1%. Das mittlere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose liegt für Männer bei 71 und Frauen bei 74 Jahren (Schonfeld and Kraywinkel, 2018). Männer erkranken zwei- bis achtmal häufiger an einem HCC als Frauen. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Inzidenz und Morbidität gelten sowohl für Hoch- wie für Niedriginzidenzgebiete und korrelieren mit den Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC (Dimitroulis et al., 2017).

Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung des HCC ist die Leberzirrhose, welche in ca. 80 % aller Fälle nachgewiesen werden kann (Schonfeld and Kraywinkel, 2018). Für die Stadieneinteilung der Leberzirrhose wird der Child-Pugh-Score (Child-Pugh-Kriterien A-C), auch Child-Turcotte-Pugh-Score (CTP) angewandt. In Deutschland ist die häufigste Ursache einer Leberzirrhose ein äthyltoxischer Leberschaden gefolgt von einer chronischen Hepatitis-C Virusinfektion (HCV-Infektion) (Schonfeld and Kraywinkel, 2018). Global stellen chronische Hepatitis-B-Virusinfektionen (HBV-Infektionen) und HCV-Infektionen mit zusammen ca. 80 % die wichtigsten Ursachen für die Entstehung eines HCC dar (El-Serag, 2012, Yang and Roberts, 2010). Damit ergeben sich in Deutschland im Hinblick auf Primär- und Sekundärprävention Unterschiede, da die Wahrscheinlichkeit ein HCC zu entwickeln bei Patienten mit einer

äthyltoxischen Leberzirrhose deutlich geringer ist als bei Patienten mit einer chronischen Virushepatitis (West et al., 2017).

6.2. Therapiemanagement

Prinzipiell stehen drei verschiedene kurative Therapieverfahren zur Behandlung des HCC zur Verfügung: die Leberresektion, die orthotope Lebertransplantation sowie die Tumorablation. In Abhängigkeit von Größe, Lage und Anzahl der Tumoren, der Leberrestfunktion bzw. dem Allgemeinzustand und ggf. beeinflussenden Komorbiditäten des Patienten wird im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz die individuelle Therapie festgelegt (Greten et al., 2013). Das an der Charité Universitätsmedizin Berlin angewendete Berliner Konzept ist ein an die klinischen Leitlinien der EASL (European Association for the Study of the Liver), die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Lebertransplantation, das deutsche Transplantationsgesetz (gem. § 16 Abs.1 S.1 Nrn. 2 u. 5) sowie der aktuellen S3-Leitlinie angepasster Therapiealgorithmus für Patienten mit HCC. Hierbei werden nicht nur die limitierte Verfügbarkeit geeigneter Spenderorgane in Deutschland, sondern auch die Fortschritte der laparoskopischen Leberchirurgie berücksichtigt (Schmelzle et al., 2018).

6.2.1. Die Leberresektion

Die Leberresektion ist die empfohlene Behandlungsoption für Patienten mit primär resektablem HCC ohne zusätzliche Leberzirrhose. Für Patienten mit einer Leberzirrhose muss im Voraus eine sorgfältige Evaluation erfolgen. Dementsprechend kann die Leberresektion auch für Patienten mit einem guten Allgemeinzustand sowie einer Leberzirrhose im Child A-Stadium in Betracht gezogen werden (Benson et al., 2009). Ebenfalls sind das Vorliegen einer portalen Hypertension, einer Aszites, einer Splenomegalie sowie des Child B-Stadiums keine endgültigen Ausschlusskriterien für die Durchführung einer Leberresektion. Sie erhöhen grundsätzlich das operative Risiko des Patienten, weshalb eine individuelle Nutzen-Risiko-Analyse aufgestellt werden muss (Benson et al., 2009). Das Berliner Konzept berücksichtigt für Patienten mit einem HCC in erster Linie das zukünftige Leberrestvolumen (future liver remnant volume = FLRV). Hierfür bietet die zu erwartende postoperative Leberfunktion, die anhand einer präoperativen Volumenmessung der Leber (mit Hilfe von Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT)) und einer Leberfunktionsmessung (maximum liver function capacity test = LiMAx-Test) beurteilt wird, die therapeutische Entscheidungsgrundlage (Schmelzle et al., 2018).

Kriterien der Nicht-Resektabilität eines HCC sind unter anderem eine extrahepatische Tumormanifestation, eine allgemeine Inoperabilität des Patienten aufgrund von Komorbiditäten, welche intra- und postoperativ mit einem erhöhten Risiko für den Patienten einhergehen sowie ein Tumorbefall aller drei Lebervenen (Bruix et al., 2011, Benson et al., 2009). Insgesamt bietet die Leberresektion einen Überlebensvorteil im Vergleich zur nicht-chirurgischen Behandlung für Patienten mit potenziell resektablem HCC und sollte deshalb auch für ausgewählte Patienten mit einer Lebererkrankung im mittleren oder fortgeschrittenen Stadium in Betracht gezogen werden (Yang et al., 2019a).

Obwohl die chirurgische Resektion eine potenziell kurative Behandlung ist, entwickeln fast 70 % der Patienten nach Resektion ein rezidivierendes HCC der Leber (Tabrizian et al., 2015). Frühe Rezidive, die innerhalb von 12 Monaten nach erfolgter Resektion auftreten, sind zumeist intrahepatische Metastasen des ursprünglichen Tumors, während späte Rezidive oft ein de novo HCC im Zusammenhang mit der zugrunde liegenden Leberzirrhose sind (Portolani et al., 2006). Dennoch hat sich auch bei Patienten mit einem Rezidiv eine erneute Leberresektion als sinnvoll erwiesen, da auch hier insbesondere bei nicht extrahepatischem Tumorwachstum, 5-Jahres-Überlebensraten nach erneuter Leberresektion von bis zu 80 % erreicht werden können (Greten et al., 2013). Vor allen in der jüngeren Vergangenheit (2005-2011) konnten die 5-Jahres-Überlebensraten von Patienten mit einer Leberresektion durch die Fortschritte der Leberchirurgie, unter Einsatz laparoskopischer Operationstechniken, verbesserten perioperativen Therapien für Patienten mit Leberzirrhose sowie der Entwicklung von multimodalen Behandlungsstrategien nach Auftreten von Rezidiven, auf 61 % deutlich verbessert werden (Krenzien et al., 2018). Aufgrund der hohen Rezidivrate des HCC innerhalb der ersten fünf Jahre nach Resektion und möglicher de novo Entstehung eines HCC ist eine Nachsorge mit bildgebenden Verfahren erforderlich. Die aktuelle S3-Leitlinie zur Behandlung des HCC empfiehlt den Einsatz einer abdominellen MRT, idealerweise mit dynamischer Kontrastmitteluntersuchung unter Verwendung eines Hepatozyten-spezifischen Kontrastmittels sowie diffusionsgewichteter Sequenzen (Greten et al., 2013). Innerhalb des ersten postoperativen Jahres sollte alle drei Monate eine MRT des Abdomens erfolgen. Nach einem Jahr lokaler Tumorfreiheit sollte halbjährlich über einen Zeitraum von insgesamt zwei Jahren eine bildgebende lokale Kontrolle der Leber durchgeführt werden (Crocetti et al., 2010).

6.2.2. Die orthotope Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) ist grundsätzlich eine therapeutische Option, die nicht nur das HCC selbst behandelt, sondern zusätzlich auch die zugrunde liegende Leberzirrhose. Aktuell stellt das HCC mit Leberzirrhose etwa ein Drittel der Wartelistenindikationen für eine orthotope Lebertransplantation in Europa dar (European Association for the Study of the Liver. Electronic address and European Association for the Study of the, 2018).

Die Indikation einer Lebertransplantation (LT) wird in einem interdisziplinären Transplantationszentrum gestellt. Die Mailand-Kriterien bilden die Einschlusskriterien für eine Lebertransplantation. Sie beinhalten die Betrachtung der Tumormasse, die durch einzelne Tumoren von bis zu 5 cm oder maximal drei Tumoren bis zu 3 cm in Abwesenheit von makrovaskulärer Invasion mit Tumorgewebe sowie dem Fehlen von extrahepatischen Metastasen gekennzeichnet sind (Mazzaferro et al., 1996). Patienten mit nachgewiesenem HCC innerhalb der Mailand-Kriterien können von Eurotransplant eine Standard Exception (SE) und somit Extrapunkte erhalten. Die Grundlage zur Berechnung der SE ist der MELD-Score (Model for Endstage Liver Disease). Er ermittelt in diesem Zusammenhang die Dringlichkeit einer Lebertransplantation, da er eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit für Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung innerhalb von drei Monaten zu versterben, ermöglicht. Für die meisten Patienten kann der labMELD-Score (Labor MELD-Score) aus den Laborwerten von Serumkreatinin, Serumbilirubin und Prothrombinzeit (International Normalized Ratio, INR) berechnet werden (Bundesärztekammer, 2019). Der gelistete Patient erhält so zu seinem bereits errechneten labMELD anfangs 15 % zusätzliche Extrapunkte und anschließend nach einer Reevaluation, alle drei Monate weitere 10 % Extrapunkte (Schmelzle et al., 2018). Die so selektionierten Patienten erreichen 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 73 % (Krenzien et al., 2018) und eine lokale Rezidivrate von unter 15 % (Greten et al., 2013).

Die Manifestationsorgane der Rezidive sind nicht nur die Leber, sondern auch die Lunge und die Knochen. Wobei das prognostisch schlechter einzuschätzende Lokalrezidiv in der Leber innerhalb der ersten zwölf Monate früher auftritt als die prognostisch bessere und später einsetzende Lungenmetastasierung (Escartin et al., 2007).

Als absolute Ausschlusskriterien für eine Lebertransplantation gelten weit fortgeschrittene Tumorerkrankungen mit einer leberübergreifenden Tumorausdehnung, einer makrovaskulären Infiltration mit Tumorgewebe oder eine Fernmetastasierung. Darüber hinaus ist die grundsätzliche

Eignung zur Lebertransplantation vor dem Hintergrund des allgemeinen Morbiditätsprofils des Patienten zu beachten (Bundesärztekammer, 2019).

Nach der Lebertransplantation ist eine tägliche immunsuppressive Therapie obligatorisch, um die Abstoßung des neuen Organs zu verhindern (Farkas et al., 2014). Besonders in der frühen Posttransplantationsphase besteht die immunsuppressive Therapie aus einer Kombination von verschiedenen Medikamenten, die individuell an den Patienten angepasst wird. Wichtige immunsuppressive Medikamente sind unter anderem Steroide, Lymphozyten-Antikörper, Calcineurininhibitoren und Inhibitoren der B- und T-Zellproliferation (Farkas et al., 2014).

6.2.3. Die akute Abstoßung nach Lebertransplantation

Obwohl die Leber als ein immuntolerantes Organ gilt, kommt es dennoch häufig zu Abstoßungsreaktionen (Kok et al., 2019). Die meisten Abstoßungsfälle sind auf eine akute Abstoßung (ACR) zurückzuführen, deren Anteil auf 10 % bis 30 % geschätzt wird, gefolgt von der chronischen Abstoßung, deren Anteil zwischen 3 % und 17 % liegt (Rodriguez-Peralvarez et al., 2016, Choudhary et al., 2017). Die ACR tritt mit einer Inzidenz von 20 % bis 40 % bei der derzeitigen postoperativen immunsuppressiven Therapie bei Patienten innerhalb der ersten fünf bis 30 Tage nach der Lebertransplantation auf (Shaked et al., 2009, Gornicka et al., 2006). Dabei handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte inflammatorische Reaktion auf die HLA-Spender-Antigene, die sich den Empfänger T-Zellen präsentieren (Hale, 2006).

Klinisch sind die Patienten oftmals asymptomatisch und äußern ggf. unspezifische Beschwerden wie Fieber, Bauchschmerzen oder Müdigkeit. In laborchemischen Tests können erhöhte Transaminasen, eine erhöhte alkalische Phosphatase (AP) oder ein erhöhter Bilirubinspiegel nachweisbar sein (Koo and Wang, 2018). Diese erhöhten Laborwerte entstehen als Folge der inflammatorischen Reaktion, die zu einer Endotheliitis oder Cholangitis führen, die unter anderem die histologischen Kriterien (Banff Kriterien) für die Diagnose einer ACR bilden (Anthony J. Demetris et al., 1997). Zu den Banff Kriterien zählt das Vorhandensein von typischen inflammatorischen Zellinfiltraten, bestehend aus Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten sowie Makrophagen und Plasmazellen und gelegentlich neutrophile Granulozyten. Eine milde ACR (Grad 1) ist histologisch auf eine Infiltration in der Minderheit der Periportalfelder begrenzt, wohingegen eine moderate ACR (Grad 2) bereits eine größere Ausdehnung mit einer Infiltration mehrerer Periportalfelder zeigt. Die schwere ACR (Grad 3) ist zusätzlich durch eine Infiltration aller periportal Bereiche mit einer schweren Inflammation, die sich in das Leberparenchym erstrecken kann und Nekrosen, gekennzeichnet (Anthony J. Demetris et al., 1997). Die ACR wird

mit einer Stoßtherapie mit Glukokortikoiden behandelt. Das vollständige Abklingen der Symptome sowie eine Normalisierung der Laborwerte kann anschließend bis zu zehn Tage dauern (Koo and Wang, 2018).

6.2.4. Der ischämische Reperfusionsschaden

Der ischämische Reperfusionsschaden (IRI) tritt bei 17 -50 % aller Lebertransplantationen auf (Lee YM, 2003) und ist auf eine Schädigung der Leber während der Explantation, der zwischenzeitlichen Lagerung oder der anschließenden Transplantation zurückzuführen (Zhai et al., 2013). Es kann zwischen zwei Formen des IRI unterschieden werden. Der warme ischämische Reperfusionsschaden bezeichnet eine Schädigung zwischen der Explantation und Transplantation, also zwischen Unterbrechung und Wiederherstellung der hepatischen Zirkulation. Von einem kalten ischämischen Reperfusionsschaden spricht man bei einer Schädigung während der Lagerung des Transplantats (Zhai et al., 2011). Der warme ischämische Reperfusionsschaden führt zu einer hepatozellulären Schädigung durch eine Kupfferzell-vermittelte Freisetzung von zytotoxischen Substanzen, während der kalte ischämische Reperfusionsschaden durch eine Störung der Mikrozirkulation der hepatisch sinusoidalen Endothelzellen verursacht wird (Ikeda T, 1992). Damit werden sowohl der kalte, als auch der warme ischämische Reperfusionsschaden durch lokale intrahepatische Prozesse auf Grund der Hypoxie verursacht, die zu einer zellulären Stoffwechselstörung und zu einer fehlenden ATP-Produktion führen, die wiederum zu entzündlichen Immunreaktionen und einer zytotoxischen Schädigung des Transplantats führen (Fondevila et al., 2003).

6.3. Bedeutung des Immunsystems in der Pathogenese des HCC

Verantwortlich für die Entstehung eines HCC sind chronisch entzündliche Prozesse, die die Hepatozyten anhaltend schädigen (Yang et al., 2019b). Da die Leber eine hohe Regenerationsfähigkeit besitzt, induziert diese Zellschädigung eine erhebliche Proliferation mit gleichzeitiger Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und DNS-Schäden, die wiederum das Entstehen genomischer DNS-Mutationen erhöhen (Yang et al., 2019b). Diese hohe Proliferationsrate in Kombination mit DNS-Mutationen, korreliert mit einer steigenden Häufigkeit für maligne Entartungen der Hepatozyten.

Das Stroma eines Tumors enthält verschiedenste zelluläre Anteile: Tumorzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten, vaskuläre Zellen und Immunzellen. Sie alle unterstützen die Tumorentwicklung durch Erhaltung der proliferativen Signalgebung, Förderung des Wachstums, Unterdrückung von Apoptose, Induktion der Angiogenese sowie der Minimierung der Zerstörung durch das

Immunsystem (Hanahan and Coussens, 2012, Hanahan and Weinberg, 2011). Auch der Großteil der HCCs zeichnet sich durch eine floride intratumorale Vaskularisation aus. Diese Angiogenese wird bei der Entwicklung und dem Fortschreiten des HCC als wichtiger Einflussfaktor angesehen, da klinische Studien bereits gezeigt haben, dass der Grad der Vaskularisation im HCC-Gewebe mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Coulon et al., 2011).

Der wichtigste Faktor im Prozess der malignen Transformation ist das Immunsystem des Betroffenen selbst. Die chronische Entzündung induziert immunologische Veränderungen, sodass sich die malignen Tumorzellen, im Rahmen von sogenannten „Immune escape mechanisms“ leichter der Überwachung der Immunzellen entziehen können (Yang et al., 2019b). Zu diesem „Immune Escape“ gehören unter anderem eine hohe Proliferationsrate, die Befähigung zur Immunsuppression, eine Resistenz gegenüber Apoptose sowie die Fähigkeit zur Neoangiogenese und Metastasenbildung zu induzieren (Kazemi et al., 2018).

Im Zentrum dieser Prozesse steht der Tumor selbst, denn durch die Induktion der immunsuppressiven Tumormikroumgebung (tumor microenvironment (TME)) kann das Immunsystem die antitumorale Immunreaktionen nicht koordinieren und somit Wachstums- und Metastasierungsprozessen nicht effektiv entgegenwirken (Khalil et al., 2016, Mahoney et al., 2015). Einige wichtige Einflussfaktoren der lokalen Immunantwort und deren Rolle bei Patienten mit einem HCC sind bereits bekannt. Im Folgenden werden die hier untersuchten Subpopulationen von verschiedenen im Blut des Patienten zirkulierenden Immunzellen und ihre Bedeutung in der Pathogenese des HCC vorgestellt.

6.3.1. TIE-2-exprimierende Monozyten

TIE-2 (Angiopoetin-Rezeptor oder CD202B) ist ein Tyrosinkinaserzeptor, der in erster Linie auf Tumor- und Endothelzellen in der TME exprimiert wird und in der Lage ist alle bekannten Angiopoetine (Ang1, Ang2, Ang3 und Ang4) zu binden (Matsubara et al., 2013). Angiopoetine sind starke Wachstumsfaktoren und wichtige Modulatoren im Prozess der Angiogenese, die unterschiedliche Funktionen ausüben (Balkwill et al., 2005). Perivaskuläre Zellen sezernieren Ang1 und tragen damit zur Integrität der Gefäße, zu einer Reduzierung der Gefäßdurchlässigkeit und zur Aufrechterhaltung der Gefäßversorgung bei. Die Sekretion von Ang2 überwiegt in Prozessen des Gefäßumbaus sowie der Angiogenese und spielt zusätzlich eine Rolle in entzündungsfördernden Prozessen, während Ang1 entzündungshemmende Eigenschaften hat (Atanasov et al., 2016).

TIE-2-exprimierende Monozyten (TEMs) sind CD14⁺ CD16⁺ Monozyten, die zusätzlich TIE-2 exprimieren. Sie wurden unlängst in malignen Tumoren der Niere, des Dickdarms, der Bauchspeicheldrüse und der Lunge, sowie in Weichteilsarkomen nachgewiesen (Venneri et al., 2007) und scheinen auch bei der Entstehung eines HCC eine wichtige Rolle zu spielen (Matsubara et al., 2013). Bei allen diesen Tumorentitäten gilt die Angiogenese als wichtiger Faktor für die weitere Tumorprogression. Während des unter hypoxischen Bedingungen stattfindenden Tumorwachstums, sezernieren die aktivierten Tumor- und Endothelzellen Angiopoetine und rekrutieren damit TEMs in die TME. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Angiopoetin-TIE-2-Achse und der TEMs im Kontext der Entstehung von gefäßreichen Tumoren wie dem HCC (Dapas et al., 2014, Murdoch et al., 2007).

6.3.2. Scavenger Rezeptor CD163

CD163 ist ein hochaffiner Rezeptor für Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe (Madsen et al., 2004, Kristiansen M, 2001). Diese Komplexe entstehen, wenn Hämoglobin aus Erythrozyten, während der physiologischen oder pathologischen Hämolyse austritt. CD163 wird auf verschiedenen Gewebsmakrophagen, unter anderen Kupfferzellen, exprimiert (Etzerodt and Moestrup, 2013). Die Expression von CD163 auf Monozyten ist deutlich geringer. Eine geringe oder fehlende CD163 Expression wurde außerdem bei dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen beobachtet (Kodelja V, 1994). Der größte Anteil von CD163 ist intrazellulär lokalisiert, denn bei rezeptorvermittelter Endozytose wandert der Rezeptor von der Oberfläche zu den Endosomen (Moestrup, 1994). Die Stimulatoren der CD163 Expression sind Glucocorticoide, IL-6, IL-10 und Hämoglobin, während IL-4, Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), CXC-Ligand 4 (CXCL4) und Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) die CD163 Expression herunterregulieren (Buechler C, 2000, Gleissner et al., 2010, Sulahian et al., 2000, Van den Heuvel MM, 1999).

CD163 exprimierenden Makrophagen wurden vor allen in Entzündungsherden nachgewiesen. Dazu gehören chronisch entzündete Gelenke bei Arthritis, atherosklerotische Plaques und die TME verschiedenster Tumorentitäten (Baeten et al., 2004, Bronkhorst et al., 2011, Fonseca et al., 2002, Ratcliffe NR, 2001). In Zusammenhang mit einem HCC wurde der signifikante Einfluss von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) und Monozyten mit unterschiedlicher funktioneller Polarisierung auf die tumoral vermittelte Inflammation, die Begünstigung der Escape-Mechanismen und die Tumorprogression bereits nachgewiesen (Chen and Mellman, 2013). CD163 ist in diesem Zusammenhang ein etablierter M2 Polarisationsmarker mit protumoraler

Wirkung und TAMs mit CD163 Expression wurden bereits bei Patienten mit multifokalen HCC und Lymphangiosis carcinomatosa in der TME nachgewiesen (Atanasov et al., 2019). Die genaue Bedeutung im Hinblick auf die Hepatokarzinogenese ist aber weitestgehend noch unklar.

6.3.3. T-Zellen mit Interleukin-10 Expression

Regulatorische T-Zellen (Treg), CD4⁺ T-Zellen, unter anderem über Foxp3⁺ (Forkhead-Box-Protein P3), CD56⁺ und/oder CD25⁺ Expression definiert, sind eine kleine aber funktionell einzigartige Population von T-Zellen, die die Immunhomöostase zwischen Immuntoleranz und der Kontrolle der Autoimmunität aufrechterhalten (Zhao et al., 2012). Sie sezernieren unter anderem IL-4 und IL-10 sowie TGF- β und spielen in der Tumorimmunologie eine zentrale Rolle. Dabei steht vor allem ihre Fähigkeit antitumorale Immunreaktionen zu unterdrücken im Vordergrund (Zhao et al., 2012). Bei Untersuchungen des Lebergewebes von Patienten mit HCC wurden CD4⁺ Treg in einer erhöhten Konzentration intratumoral nachgewiesen.

Regulatorische CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺ Treg) weisen im Gegensatz zu cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) keine cytotoxische Aktivität auf und produzieren auch nicht Interferon- γ (IFN- γ), sondern IL-10 und TGF- β und werden zusätzlich über die Expression von CD8⁺, Foxp3⁺ und nicht CD28⁻ definiert (Horwitz et al., 2003). Es besteht nur eine geringe phänotypische Ähnlichkeit zu den CD4⁺ Treg, obwohl sie ebenfalls IL-10 sezernieren und damit die Proliferation von CD8⁺ Effektorzellen und deren zytolytische Kapazitäten reduzieren (Filaci et al., 2007). Sie wurden bisher bei Patienten in Lymphknotenmetastasen von verschiedenen Krebsentitäten sowie im Resektat von Patienten mit Darm- oder Prostata Tumoren nachgewiesen (Chaput et al., 2009, Kuniwa et al., 2007). Ihr Einfluss im Zusammenhang mit den HCC ist noch nicht bekannt.

IL-10 ist ein pleiotropes Zytokin, das unter anderem von Makrophagen sowie T- und B-Zellen produziert wird und durch die entzündungshemmenden und immunsuppressiven Effekte eine zentrale Rolle bei der Modulation des Immunsystems spielt (Howard M, 1992). Diese entstehen durch die Unterdrückung der Makrophagenaktivierung und der IFN- γ Produktion, die beide wichtige Vermittler in der antitumoralen Immunität sind. Ebenfalls verhindert die Bindung von IL-10 an Rezeptoren auf den Tumorzellen das Induzieren der Apoptose und fördert deren Zellproliferation (El-Houseini ME, 2005). Dies kann den Tumorzellen helfen, der Immunüberwachung des Wirts zu entkommen und zu metastasieren („Immune Escape“). Bei Patienten mit einem HCC wurde der IL-10 Spiegel im Serum als unabhängiger prognostischer Faktor für Patienten mit inoperablen HCC identifiziert (Chan et al., 2012).

6.3.4. T-Zellen mit Interferon- γ Expression

Eine weitere Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen bilden die T-Helfer (Th)-Zellen. Th1-Zellen produzieren verschiedene Interleukine z.B. IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-12p35, IL-12p40, IL-15 sowie die Zytokine TNF- α und IFN- γ (Budhu and Wang, 2006). Sie haben insgesamt proinflammatorische Funktionen und verstärken, im Gegensatz zu immunsuppressiven Treg die antitumorale Immunreaktionen (Gajewski, 2007, Wang and Wang, 2007, Zou, 2005). Th1-Zellen wurden bei Patienten mit einem HCC nach einer Leberresektion im peritumoralen und intratumoralen Resektat nachgewiesen und haben eine prognostische Bedeutung (Yan et al., 2014).

CD8⁺ T-Lymphozyten gehören in erster Linie zu den cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) die in malignen Prozessen für die Entfernung von Tumorzellen verantwortlich sind. Sie sezernieren große Mengen von IFN- γ (Yao et al., 2017). CTL können tumorassoziierte Antigene (TAA) erkennen und Tumorzellen abtöten. TAA umfassen eine Reihe von Proteinen, die in den Tumoren entweder durch Mutationen oder aberrante Genexpression entstehen und bei Patienten mit einem HCC eine Reaktion der CTL induzieren (Van den Eynde BJ, 1997). Zu den bekannten TAA bei HCC gehören das α -Fetoprotein (AFP), Glypican-3 (GPC-3), melanoma antigen A1 (MAGE-A1) und New York esophageal squamous cell carcinoma-1 (NY-ESO-1) (Shang XY, 2004, Thimme et al., 2008, Xu et al., 2011, Zerbini et al., 2004). CTL wurden bei Patienten mit einem HCC im intra - und peritumoralen Lebergewebe sowie zirkulierend im Blut nachgewiesen und haben eine prognostische Bedeutung (Xu et al., 2019).

IFN- γ ist ein pleiotropes Zytokin mit immunmodulatorischen, antiviralen, antiproliferativen und antitumoralen Wirkungen und damit für die Regulierung der Wirtsabwehr unverzichtbar. Es ist Teil einer größeren Familie von Interferonen und das einzige Mitglied der Typ-II-Interferone, das von mehreren Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems produziert wird (Mojic et al., 2017). Hauptproduzenten in der TME sind NK-Zellen, CD4⁺ Th-Zellen und CTL nach Antigenstimulation oder nach Stimulation mit den Zytokinen IL-12 und IL-18, deren zytotoxische Funktionen durch IFN- γ verstärkt werden (Ikeda H, 2002, Pahl and Cerwenka, 2017). IFN- γ hat eine direkte, supprimierende Wirkung auf das Tumorwachstum, durch Hemmung der Angiogenese sowie die angeborene und adaptive Immunantwort gegen den Tumor (Ikeda H, 2002). Der Serumspiegel IFN- γ gemessen im Blut eines Patienten mit HCC steht in der Diskussion, als prognostischer Biomarker die antitumorale Immunität des Patienten widerzuspiegeln (Lee et al., 2013).

6.3.5. T-Zellen mit Interleukin-10 und Interferon- γ Expression

Regulatorische Typ-1-T-Zellen (Tr1-Zellen) sind eine Untergruppe von adaptiven CD4⁺ T-Zellen, die die Immuntoleranz fördern und übermäßige Entzündungsreaktionen kontrollieren können (Gregori and Roncarolo, 2018). Die Aktivierung über den Toll-like-Rezeptor (TLR) ist für die immunsuppressiven Funktionen von Tr1-Zellen erforderlich und führt zur Sekretion eines charakteristischen pro- und antiinflammatorischen Tr1-Zytokinprofils. Sie produzieren hohe Konzentrationen von IL-10 und TGF- β , variable Mengen von IFN- γ und niedrige Mengen IL-2, IL-4 und IL-17 (Groux H, 1997). Tr1-Zellen können ähnlich den CD4⁺ Treg Immunantworten via Programmed cell death protein 1/ Programmed cell death ligand 1 (PD1-1/PD-L1) unterdrücken (Akdis et al., 2004), aber auch durch alternative Mechanismen gezielt antigenpräsentierende Zellen abtöten oder durch Zell-Zell-Kontakte hemmend einwirken (Gregori and Roncarolo, 2018). Die Überexpression des Liganden PD-L1 führt zu einer Beeinträchtigung der zytolytischen Aktivität der T-Zellen und einem daraus resultierenden erhöhten Risiko für ein rasches Fortschreiten des Prozesses der malignen Entartung sowie eines invasiven Tumorwachstums (Dong H, 1999, Freeman GJ, 2000). Dieser Mechanismus ist Angriffspunkt neuer immunmodulatorischer Therapiestrategien. Tr1-Zellen wurden bereits in der TME bei Patienten mit kolorektalem Karzinom und Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen. Dort wirken sie als potenter Suppressor der antitumoralen Immunität (Scurr et al., 2014, Mandapathil et al., 2012, Mandapathil et al., 2010, Mandapathil et al., 2009).

CD8⁺ T-Zellen, die sowohl IFN- γ als auch IL-10 exprimieren bilden eine weitere Untergruppe der CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zu CTL weisen IFN- γ ⁺ IL-10⁺ CD8⁺ T-Zellen eine erniedrigte PD1-Rezeptor- und TIM3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) -Expression auf (Zhong et al., 2019). Sie wurden bereits bei Patienten mit einem Magenkarzinom im Blut sowie bei Patienten mit einem Ösophaguskarzinom in der TME nachgewiesen. Eine erniedrigte Anzahl war dort mit einem steigenden Schweregrad der Erkrankung assoziiert (Li and Zuo, 2019, Zhong et al., 2019).

6.3.6. T-Zellen mit Interleukin-17 und Interleukin-22 Expression

Die T-Helfer-17-Zellen (Th17-Zellen) sind ein Subtyp von T-Helfer-Zellen, die an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen wie der Karzinogenese von malignen Tumoren, der Wirtsabwehr, Infektionen, Autoimmunerkrankungen sowie der Abstoßungsreaktion bei Transplantationen durch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. Interleukin IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-6, beteiligt sind (Lan et al., 2017).

Sie werden zusätzlich über die Expression von c-chemokine receptor type 4 (CCR4) und/oder c-chemokine receptor type 6 (CCR6) definiert (Zhao et al., 2012). Die Funktion der Th17-Zellen in der Tumorphathogenese ist teilweise noch unklar und widersprüchlich. Sie fördern das Tumorstadium und die fortschreitende Metastasierung durch die Produktion von IL-6 und weiteren pro-angiogenetischen Faktoren (Wang et al., 2009). Andererseits wurde in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt, dass die Sekretion von IL-17 die Anwesenheit von CTL in der TME erhöht, die wiederum das Tumorstadium hemmen (Lin et al., 2015).

IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin aus der IL-17 Familie zu der auch IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) und IL-17F gehören und es wird von einer Gruppe von Th-Zellen, den Th17-Zellen, als Reaktion auf die Stimulation mit IL-23 sowie TGF- β , IL-6 oder IL-1 β produziert (Harrington et al., 2005, Volpe et al., 2008). IL-17 bindet an den Typ-1-Zelloberflächenrezeptor (IL-17R) und rekrutiert durch mehrere Signalkaskaden, weitere Immunzellen wie Monozyten an den Ort der Entzündung. Eine übermäßige Produktion von IL-17 schafft eine entzündliche TME, die durch mäßige Konzentrationen von endogenen IL-17 aufrechterhalten wird und letztendlich zu einer überschießenden Entzündungsreaktion und einer Gewebeschädigung führen kann, die die Zerstörung der Tumorzellen zur Folge hat (Langowski et al., 2006, Mantovani et al., 2008).

IL-22 gehört zu einer Gruppe von Zytokinen, die als IL-10-(Super) -familie (einschließlich IL-19, IL-20, IL-24 und IL-26) bezeichnet wird (Dumoutier et al., 2000). IL-22 wird von verschiedenen Zelltypen, wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen exprimiert, die innerhalb der Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen in drei weitere Subtypen aufgeteilt werden können: Th1-, Th17- und Th22-Zellen (Chung et al., 2006, Duhon et al., 2009, Liang et al., 2006, Liu et al., 2011, Nogales et al., 2009, Rutz S, 2013, Wolk et al., 2002). IL-22 unterscheidet sich von anderen Interleukinen, da es nicht als Bote zwischen verschiedenen Immunzellen dient, sondern an einen heterodimeren Zelloberflächenrezeptor bindet, der auf Gewebezellen (unter anderen auf der Haut, im Verdauungstrakt, in der Leber und Lunge) aber nicht auf Immunzellen exprimiert wird (Martin et al., 2014). In der Leber verhindert IL-22 die zelluläre Apoptose und fördert das Überleben und die Proliferation der Hepatozyten. Während einer Entzündung wie bei einer Hepatitis-Infektion sowie nach einer Resektion des Organs fördert IL-22 die Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten (Perusina Lanfranca et al., 2016). Die erhöhte Expression von IL-22 während einer chronischen Leberentzündung kann folglich das Überleben der geschädigten Hepatozyten fördern und so die Entstehung eines HCC begünstigen (Jiang et al., 2011).

6.4. Bedeutung der purinergen Signalgebung in der Pathogenese des HCC

Das purinerge Signalsystem umfasst die Freisetzung extrazellulärer Nukleotide, die Stimulation purinergere Rezeptoren und die Modulation der Nukleotidkonzentration durch Ektoenzyme. In der Leber reguliert die purinerge Signalgebung neben wichtigen hepatischen Prozessen wie der Gallensekretion, den Glykogenmetabolismus und der Signalgebung des Insulins auch die Reaktionen auf thrombotische Ereignisse, entzündliche Prozesse und Gefäßverletzungen (Beldi et al., 2008). Das purinerge Signalsystem hat erhebliche Auswirkungen auf das Wachstum, das Überleben und die Progression eines soliden Tumors, indem es nicht nur den Tumor selbst, sondern auch die Immunreaktionen und die mit ihm verbundene TME beeinflusst (Di Virgilio and Adinolfi, 2017).

6.4.1. Gap junction alpha-1 protein (Connexin 43)

Gap Junctions sind Plasmamembrandomänen von interzellulären Kanälen, die den direkten Transfer von Ionen und kleinen Molekülen ($< \sim 1,2$ kDa) zwischen Zellen ermöglichen (Saez JC, 2003). Die Gap Junction Kanäle werden durch eine Familie von Transmembranproteinen, den Connexinen, gebildet (Beyer and Berthoud, 2018). Sie stellen einen Weg für die elektrische Kommunikation von erregbaren Zellen wie Neuronen, Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen bereit. Außerdem spielen sie durch das Ermöglichen des interzellulären Austausches von kleinen Metaboliten und Second Messengern eine wesentliche Rolle in nicht erregbaren Geweben, einschließlich der Regulierung der Zellproliferation und -differenzierung sowie der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase (Goodenough and Paul, 2009, Vinken, 2015, Aasen, 2015).

Connexin 43 (Cx43) ist das im menschlichen Körper am häufigsten vorkommende Connexin. Es wurde unter anderem in follikulären dendritischen Zellen, in Lymphgefäßen, auf T-, B-, und NK-Zellen sowie dem Gefäßendothel nachgewiesen (Oviedo-Orta et al., 2000, Jara PI, 1995, Krenács T, 1995, Yeh HI, 1998). Im Lebergewebe werden hauptsächlich die Connexine Cx26, Cx32 und Cx43 exprimiert. Deren Verteilung hängt vom Zelltyp und dessen Lage im Leberläppchen ab (Kojima T, 1997). Cx43 vermittelt transmembrane Nicotinamidadeninukleotid (NAD^+) Flüsse in intakten Zellen (Bruzzone et al., 2001). Daher können in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Situationen hohe lokale NAD^+ -Konzentrationen erreicht werden, die eine Adenosindiphosphat- (ADP-)Ribosylierung von Membranproteinen auf ADP-Ribosyltransferasen exprimierenden Nachbarzellen ermöglichen würden (Deaglio and Robson, 2011). Mit der Freisetzung von NAD^+ und der Aufnahme von ADPribose (cADPR) ist Cx43 an CD38

vermittelten Signalwegen direkt beteiligt. Die Regulation des Cx43 erfolgt anschließend über eine negative Rückkopplung über den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (De Vuyst et al., 2009). Bei Patienten mit HBV-assoziiertem HCC konnte im resezierten Lebergewebe Cx43 sowohl intratumoral als auch im peritumoralen Lebergewebe und mit der größten Expression im zirrhotischen Lebergewebe nachgewiesen werden (Wang et al., 2013).

6.4.2. CD39

Die Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1 (NTPDase 1 oder CD39) gehört zu der großen Gruppe der ATPasen, von denen sich vier (NTPDasen 1,2,3 und 8) auf der Zelloberfläche befinden und deren katalytisches Zentrum dem extrazellulären Raum zugewandt ist (Allard et al., 2017). Die NTPDasen unterscheiden sich darüber hinaus hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften. Während CD39 Adenosintriphosphat (ATP) und ADP hydrolysiert, haben die NTPDasen 3 und 8 ATP als bevorzugtes Substrat (Kukulski F, 2005).

CD39 wird auf verschiedenen immunologischen Zellen wie mehr als 90 % der B-Zellen und Monozyten sowie 20-30 % der CD4^+ T-Zellen, weniger als 5 % der CD8^+ T-Zellen und 2-5 % der NK-Zellen exprimiert und unter anderem durch die Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6 und IL-27) sowie oxidativem Stress und Hypoxie gefördert (Allard et al., 2017). Zusätzlich erfolgt eine erhöhte Expression von CD39 beim Auftreten von akuten Entzündungen und reaktiver Sauerstoffspezies sowie bei dem Ischämie-Reperfusionssyndrom (Robson SC, 1997). Eine Überexpression von CD39 wurde beim Menschen in verschiedenen Tumorentitäten wie dem Melanom, Pankreas-, Kolon- und Ovarialkarzinom sowie Leukämien vielfach nachgewiesen (Dzhandzhugazyan KN, 1998, Hausler et al., 2011, Künzli et al., 2007, Kunzli et al., 2011, Pulte et al., 2011). Bei Patienten mit HCC konnte im Lebergewebe sowohl eine vermehrte Expression von CD39 auf Kupffer-, B-, T- und Endothelzellen der Gefäße als auch eine prognostische Bedeutung nachgewiesen werden (Cai et al., 2016).

6.4.3. CD38

Die Expression von CD38 (ADP-Ribosylzyklase oder cADPR-Hydrolase 1) gilt mit variablen Expressionsniveaus zumindest auf den Zellen des Immunsystems als allgegenwärtig (Quarona et al., 2013). Aufgrund seiner hohen Affinität für NAD^+ und seiner effizienten Hydrolaseaktivität stellt CD38 das wichtigste extrazelluläre NAD^+ metabolisierende Enzym dar (Deaglio and Robson, 2011). CD38 ist ein multifunktionales Enzym, das die Synthese von cADPR aus NAD^+ katalysiert und auch die Hydrolyse von cADPR zu Adenosindiphosphatbose (ADPR) vermittelt und unter sauren Bedingungen die Erzeugung von Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat

(NAADP) aus Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺) katalysiert (Aarhus R, 1995, Howard M, 1993, Takasawa S, 1993, Zocchi E, 1995). cADPR, ADPR und NAADP binden an verschiedene intrazelluläre Rezeptoren und Kanäle, die an der Regulierung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Flüsse und Aktivierung von Signalwegen beteiligt sind, die wiederum für mehrere biologische Prozesse unerlässlich sind: z.B. Lymphozytenproliferation, kardiale und intestinale Muskelkontraktion, glukoseinduzierte Insulinausschüttung im Pankreas (Guse AH, 1999, Kuemmerle JF, 1995, Mészáros LG, 1993, Morra M, 1998, Takasawa S, 1993). Damit reguliert CD38 nicht nur die intrazellulären NAD⁺-Spiegel, sondern auch die Aktivität von Sirtuinen, die intrazellulären NAD⁺-abhängigen Deacetylasen die in Alterungsprozesse, Zellschutz und den Energiestoffwechsel involviert sind (Audrito et al., 2011, Malavasi et al., 2010). Die Expression von CD38 vor allem auf T-Zellen konnte im Lebergewebe von Patienten mit HCC nach der Resektion nachgewiesen werden.

6.4.4. CD203a

CD203a (Ekonukleotid-Pyrophosphatase oder Phosphodiesterase 1 (ENPP1)) ist ein Transmembranglykoprotein vom Typ II, das ursprünglich als negativer Regulator der Konchenmineralisierung entdeckt wurde (Johnson K, 2003, Johnson K, 1999). Es wird daher auf mineralisierenden Zellen, wie Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert, aber auch auf lymphoiden Zellen des Immunsystems lokalisiert (Ferretti et al., 2019). Die Funktion von CD203a ist vielfältig. Es fungiert sowohl als Diphosphatase als auch als Diesterase und hat damit eine breite Substratspezifität für einschließlich Dinukleotide wie NAD⁺, NADP⁺ sowie Triphosphate wie ATP, Uridintriphosphat (UTP), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat (2'3'-cGAMP) (Goding et al., 2003, Li et al., 2015b, Namasivayam et al., 2017, Terkeltaub, 2001). Das Enzym katalysiert 5'-Phosphodiesterase-Bindungen (meist ATP) zur Erzeugung von Nukleosid 5'-Monophosphaten (meist AMP), die dann durch 5'-Nukleotidasen (CD73) in Adenosin umgewandelt werden (Li et al., 2014). In diesem enzymatischen Kontext sind NAD⁺, ADPR (Produkte der enzymatischen Aktivität von CD38) und ATP allesamt potenzielle Substrate für die katalytische Aktivität von CD203a. Wenn NAD⁺ das Substrat von CD203a ist, ist AMP zusammen mit Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) das Produkt der Reaktion. Wenn umgekehrt ADPR oder ATP das Substrat von CD203a ist, sind die Hauptreaktionsprodukte AMP und Diphosphat (PPi) (Nikiforov et al., 2011). Die genaue Bedeutung im Hinblick auf die Hepatokarzinogenese ist weitestgehend noch unklar.

6.4.5. Adenosinrezeptor A2a

Extrazelluläres Adenosin kann an vier verschiedene purinerge P1-Rezeptoren (Adenosinrezeptoren A1, A2a, A2b und A3) binden (Fredholm et al., 2011). A1, A2a und A3 sind hochaffine Rezeptoren für Adenosin, während der A2b-Rezeptor eine geringere Affinität für Adenosin aufweist (Fredholm et al., 2011, Muller and Jacobson, 2011). Die Rezeptoren A2a und A2b werden auf verschiedenen Subpopulationen von Immunzellen exprimiert, einschließlich T-Zellen, NK-Zellen, neutrophilen Leukozyten, dendritische Zellen und Makrophagen (Allard et al., 2016). Insgesamt ist die Signalgebung durch die A2a- und A2b-Rezeptoren, vermittelt durch die Adenosinbildung in inflammatorischen Geweben, gekoppelt mit der Auslösung der Entzündung als Reaktion auf Gewebeverletzungen bis hin zu einer tiefgreifenden Unterdrückung der Antwort des Immunsystems ein grundlegender Mechanismus im Verständnis für die Entstehung von malignen Tumoren sowie des „Immune Escape“ (Leone and Emens, 2018). Eine Überexpression von A2a wurde unter anderen bei Patientinnen mit Brustkrebs nachgewiesen und ist das Ziel von neuen Immuntherapien (Chadet et al., 2014, Li et al., 2013, Li et al., 2015a). Die genaue Bedeutung im Hinblick auf die Hepatokarzinogenese ist weitestgehend noch unklar.

6.4.6. NAD⁺ in der Tumormikroumgebung

Die intrazelluläre NAD⁺-Konzentration liegt im Bereich von 1 mM, während die Plasmakonzentration im Bereich von 0,1 liegt μM (Krebs et al., 2003). Es ist jedoch denkbar, dass bei Gewebeschäden in Folge der Zellyse hohe Mengen an extrazellulären NAD⁺ (eNAD⁺) freigesetzt werden können. Darüber hinaus scheint NAD⁺ auch durch nicht-lytische Prozesse unter verschiedenen physiologischen Bedingungen wie Hypoxie, Entzündung, mechanischer oder chemischer Aktivierung freigesetzt zu werden (Bruzzone et al., 2001). NAD⁺ hat einen Einfluss auf die T-Zell Populationen und deren Differenzierung (Elkhal et al., 2016). Die genaue Bedeutung im Hinblick auf die Hepatokarzinogenese ist weitestgehend noch unklar.

6.5. Zielsetzung

In Deutschland entwickelt einer von 88 Männern und eine von 190 Frauen im Laufe ihres Lebens ein HCC (Schonfeld and Kraywinkel, 2018). Durch Fortschritte in der Therapie und neuen multimodalen Behandlungsstrategien erreichen Patienten nach einer Leberresektion mittlerweile ein ähnliches 5-Jahres-Gesamtüberleben wie Patienten nach einer Lebertransplantation (Krenzien et al., 2018). Dennoch ist ein ausgeprägtes immunologisches Verständnis der grundlegenden Mechanismen ist für die Weiterentwicklung auf diesem Gebiet unabdingbar. Es werden zwei Kohorten von Patienten mit einem HCC betrachtet. Patienten, die aufgrund des HCC eine

Lebertransplantation und solche, die eine Leberresektion erhalten haben. Als Kontrollgruppe wurden Patienten mit einem operativen Eingriff ausgewählt, die keine entzündlichen Erkrankungen und keine Lebererkrankungen aufwiesen und auch nicht an einem Karzinom erkrankt waren.

Im Fokus der Untersuchung stehen purinerge Signalmechanismen der unterschiedlichen Subpopulationen der T-Zellen (CD4⁺- und CD8⁺ Treg, Tr1-, Th1-Zellen, CTL und Th17-Zellen) sowie Subtypen der Monozyten mit einer speziellen Betrachtung der TEMs. Es gibt zwar zunehmend Hinweise darauf, dass die purinerge Signalgebung positive und negative Auswirkungen auf Zellen hat, die an der adaptiven Immunantwort beteiligt sind (Deaglio and Robson, 2011), aber bei Patienten mit einem HCC wurde die Expression von CD38, CD203a und Cx43 auf den verschiedenen Subpopulationen der im Blut zirkulierenden T-Zellen im Zusammenhang mit der NAD⁺-Konzentration im Blutplasma noch nicht untersucht. Des Weiteren werden die Expression von CD39 und A2a auf den Subtypen der Monozyten und TEMs betrachtet, da sie auf TEMs noch nicht nachgewiesen wurden. Zusätzlich wurde das Auftreten des A2a-Rezeptors auch noch nicht bei HCC-Patienten beschrieben. Es soll untersucht werden, ob die T-Zellen und Monozyten mit der Expression der Ektoenzyme und purinerger Rezeptoren als potenzielle Biomarker geeignet sind sowie deren Sensitivität und Spezifität in Hinblick auf die Vorhersagewahrscheinlichkeit eines Rezidivs, des Gesamtüberlebens oder einer ACR sowie eines IRI nach Lebertransplantation. Anschließend soll überprüft werden, ob die NAD⁺-Konzentration mit dem Auftreten der Ektoenzyme und purinerger Rezeptoren korreliert.

Des Weiteren wird mittels zytometrischer Durchflusszytometrie die direkte Expression von sowohl immunsuppressiven als auch proinflammatorischen Zytokinen (IL-10, IFN- γ , IL-22 und IL-17) auf den verschiedenen Subtypen der T-Zellen nachgewiesen. In einem Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen und malignen Tumoren steht die Expression von CD163 auf Immunzellen im Fokus, die noch nicht auf TEMs betrachtet wurde, allerdings bereits bei Patienten mit einem HCC auf Makrophagen nachgewiesen wurde. Die zentrale Frage ist ebenfalls die Eignung der T-Zellen mit Zytokinproduktion oder CD163 als potenzielle Biomarker für Patienten mit einem HCC.

7. Material und Methoden

7.1. Labormaterialien

- Falcon™ Zentrifugenröhrchen 50 ml und 10 ml
- Eppendorf™ Röhrchen 2 ml
- Falcon™ Rundbodenröhrchen (FACS-Röhrchen) 14 ml
- Thermo Scientific™ 96-Well-Standardmikrotiterplatte

7.2. Reagenzien

7.2.1. Grundsubstanzen und Lösungen

- DMSO = Dimethylsulfoxid, gelagert bei Raumtemperatur
- PBS = pH 7,4 (Phosphatgepufferte Salzlösung): 8,0 g Natriumchlorid (NaCl) + 0,2 g Kaliumchlorid (KCl) + 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) + 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) /l, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- FBS = Fetales Kälberserum, gelagert bei -20°C im Kühlfach
- Trizol = Guanidiniumthiocyanat, gelagert bei Raumtemperatur

7.2.2. Puffer

- FACS-Puffer = PBS (500 ml) + 1% BSA (5g) + % NaN₃ (0.5g), steril filtriert mit einem 0,2µm-Filter, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Lyse-Puffer = 80.2g/l NH₄Cl (1,5mol/l) + 8,4g/l NaHCO₃ (0,10mol/l) + 372.2mg/l EDTA (·2H₂O) (1mmol/l), in 800ml sterilem destilliertem H₂O gelöst, eingestellt auf pH 7,4), steril filtriert mit einem 0,2µm-Filter, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Lyse-Puffer (10-fach-verdünnt mit H₂O (dest.)), gelagert bei 4°C im Kühlschrank

7.2.3. Materialien der T-Zellisolation

- CTL (Cellular Technology Limited) Anti-Aggregate Wash™ Medium Supplement (CTL-AA-005), gelagert bei -20°C im Kühlfach
- PBS

- Easy Sep Cell Medium™ = Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS) (2%) und EDTA 1 mM in PBS von STEMCELL Technologies, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- T-Cell-Isolation Kit™ von STEMCELL Technologies, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Easy Sep™ Magnet von STEMCELL Technologies

7.2.4. Medien der T-Zell-Kultur

- T-Zellen-Medium = RPMI 1640 (+ 5ml L-Alanin /L-Glutamin + 4µl β-Mercaptoethanol + 5ml Pen/Strep (100U/ml) + 50ml FCS, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Anti-CD3 von ThermoFisher Scientific, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Anti-CD28 von ThermoFisher Scientific, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Protein Transport Inhibitor von ThermoFisher Scientific, gelagert bei 4°C im Kühlschrank

7.2.5. Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

- Fixationspuffer von BioLegend, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Perm Wash (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer) von BioLegend, gelagert bei 4°C im Kühlschrank
- Human TruStain FcX™ von BioLegend, gelagert bei 4°C im Kühlschrank

Tabelle 1: Antikörperfärbung der Monozyten

Antikörperfärbung	Name	Farbstoff	Klon	Firma
Monozyten	Zombie Green	FITC	77476	BioLegend
	CD39	PE-Cy7	A1	BioLegend
	TIE-2	APC	33.1	BioLegend
	CD163	BV421	GHI/61	BioLegend
	CD14	BV510	M5E2	BioLegend
	CD16	BV785	3G8	BioLegend
	A2a	UV	F6-G5-A2	Novus Biologicals

Tabelle 2: Antikörperfärbung der CD4⁺ - und CD8⁺ T-Zellen

Antikörperfärbung	Name	Farbstoff	Klon	Firma
T-Zellen				
	IL10	PE	JES3-19F1	BioLegend
	Cx43	APC	578618	R&D Systems
	CD8	APC-Cy7	RPA-T8	BioLegend
	CD38	BV650	HB-7	BioLegend
	CD4	BV711	OKT4	BioLegend
	IFN- γ	BV785	4S. B3	BD Bioscience
	Zombie UV	UV	77474	BioLegend
	CD203a	FITC	-	R&D Systems

Tabelle 3: Antikörperfärbung der Th17-Zellen

Antikörperfärbung	Name	Farbstoff	Klon	Firma
Th17-Zellen				
	IL-17	PE	BL168	BioLegend
	IL-22	PE-Cy7	2G12A41	BioLegend
	Cx43	APC	578618	R&D Systems
	CCR6	BV421	G034E3	BioLegend
	CCR4	BV605	L291H4	BioLegend
	CD38	BV650	HB-7	BioLegend
	CD203a	FITC	-	R&D Systems
	CD4	BV711	OKT4	BioLegend
	Zombie UV	UV	77474	BioLegend

7.3. Geräte

- Wasserbad
- CASYton: Zellzählung und Zellanalyse
- FACS-Gerät: BD LSRFortessa™ X-20 mit Hoechst UV-Filter

7.4. Studiendesign

Bei der hier vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie. Sie verfolgt das Ziel, immunologische Biomarker vor und nach Leberresektion und -transplantation bei Patienten, die an einem HCC erkrankt sind, im Blut zu beschreiben und zu evaluieren. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin mit den Antragsnummern EA1/193/16, EA1/291/16; EA1/018/17 lag vor Studienbeginn vor.

7.5. Studienkohorten

Die im Rahmen der Studie rekrutierten Patienten wurden in drei Patientengruppen eingeteilt. Bei der Gruppe Lebertransplantation (n=11) handelt es sich um Patienten, die im Zeitraum zwischen Dezember 2016 und Januar 2018 an der Chirurgischen Klinik am Campus Virchow-Klinikum der Charité aufgrund eines HCC transplantiert wurden. Die Kohorte Leberresektion (n=20) umfasst Patienten, die im Zeitraum Dezember 2016 bis Dezember 2017 aufgrund eines HCC eine Leberresektion erhielten. Die Kontrollgruppe (n=10) hat Patienten eingeschlossen, die sich im Zeitraum Januar 2018 bis Mai 2018 einem operativen Eingriff unterzogen haben, aber keine zugrundeliegende Lebererkrankung oder eine andere entzündliche Erkrankung aufwiesen und nicht an einem Karzinom erkrankt sind. Fünf Patienten (50 %) wurden auf Grund einer Leistenhernie, ein Patient (10 %) wegen einer Nabelhernie und ein Patient (10 %) anlässlich einer Hiatushernie operiert. Ein weiterer Patient (10 %) erhielt ein Varizenstripping, und ein anderer ein Lipofilling (10 %). Ein Patient wurde aufgrund einer Lebendspender-Nephrektomie (10 %) operiert. Da der Organismus durch operative Eingriffe nicht nur verschiedensten Stressreaktionen, sondern auch inflammatorischen Prozessen unterworfen ist, besteht durch den Einschluss der Kontrollgruppe die Möglichkeit operations-induzierte Reaktionen der Immunzellen gegenüber einer an HCC erkrankten Patientengruppe abzugrenzen.

7.6. Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien für die Kohorten der Patienten mit HCC (Leberresektion/Lebertransplantation)

- Alter: ≥ 18 Jahre
- keine aktuell vorliegende Schwangerschaft
- Lebertransplantation/Leberresektion aufgrund eines HCC
- keine vorausgegangene Lebertransplantation

- schriftliche Einwilligung des Patienten
- Aufklärungs- und Einwilligungsfähigkeit des Patienten

Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe:

- Alter \geq 18 Jahre
- keine aktuell vorliegende Schwangerschaft
- keine vorhergehende Organtransplantation
- keine immunsuppressive Therapie
- keine chronische Infektionskrankheit
- keine chronische Lebererkrankung
- keine maligne Tumorerkrankung
- schriftliche Einwilligung des Patienten
- Aufklärungs- und Einwilligungsfähigkeit des Patienten

Ausschlusskriterien aller Patientengruppen:

- Nichterfüllen der Einschlusskriterien
- keine schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme

In Übereinstimmung mit den Ein- und Ausschlusskriterien wurden Patienten direkt durch die begleitenden Studienärzte angesprochen, aufgeklärt und bei Zustimmung in die Untersuchung eingeschlossen. Die Patienten wurden vor Studienbeginn über Nutzen und Risiken bezüglich der Studienteilnahme umfassend aufgeklärt. Gleichzeitig wurden Patientendaten unter Berücksichtigung des Datenschutzgesetzes pseudonymisiert in einer passwortgeschützten Datenbank an der Chirurgischen Klinik des Campus Virchow-Klinikum gespeichert und ausgewertet. Für die statistischen Auswertungen wurden personenbezogene Daten aus den Patientenakten erhoben.

7.7. Technik der Lebertransplantation

Trotz der zunehmenden Erfahrung auf dem Gebiet der Lebertransplantation bleiben die anhepatische Phase und die Reperfusion des Transplantats eine große Herausforderung für die an einer Transplantation beteiligten Fachdisziplinen der Chirurgie und Anästhesie (Widmer et al., 2018). Seit 1963 wird die klassische, orthotope Lebertransplantation durchgeführt, bei der ein Abklemmen der Vena cava inferior (VCI) erforderlich ist. Dies führt zu einem verminderten venösen Rückfluss, einem erhöhten Druck in der VCI und damit konsekutiv zu einer Beeinträchtigung des Herzzeitvolumens (Starzl TE, 1963). Solche hämodynamischen Veränderungen beeinflussen die Perfusion der Bauchorgane und führen zusätzlich zu einer verminderten Nierenperfusion, welche postoperativ zu einem vermehrten Auftreten renaler Komplikationen führen kann. Zum Schutz der Patienten vor einer schweren hämodynamischen Instabilität und Hypotonie wird bei der klassischen Methode der Leberimplantation ein venovenöser Bypass geschaffen, der zusätzlich zu der positiven Wirkung auf die hämodynamischen Parameter für eine ausreichende Nierenperfusion sorgt (Shaw BW Jr, 1984).

Ein alternatives Verfahren ist die Cava-erhaltende Technik, die Piggyback-Implantation (PB), bei der nur eine teilweise Abklemmung der VCI erforderlich ist und damit der venöse Rückfluss aufrechterhalten wird (Margarit C, 1994). Bei Verwendung der PB-Implantationstechnik ist nur die Schaffung einer Anastomose zur Rekonstruktion der Spender- und Empfänger-VCI's nötig. Vor der Leberimplantation wird die retrohepatische VCI des Allotransplantats vorsichtig präpariert: Der untere Anteil der VCI wird mit einer laufenden Naht übernäht oder geklammert (Widmer et al., 2018). Abschließend ist die Verwendung verschiedener Rekonstruktionstechniken zur Kavokavostomie möglich (Side-to-Side- oder End-to-Side-Kavokavostomie).

7.8. Technik der Leberresektion

Die klassische offene Leberresektion (OLR) kann, je nach operativem Gebiet, über eine mediane Inzision mit Erweiterung in die rechte Flanke (L-Inzision), eine mediane Laparotomie sowie einen Rippenbogenrandschnitt vorgenommen werden (Tsai et al., 2019). Die Anfänge der laparoskopischen Leberresektion (LLR) begannen Anfang der 1990er Jahre. (Katkhouda N, 1992, Reich et al., 1991). Zu den Vorteilen einer LLR zählen vor allem die Reduzierung von intraoperativen Blutungen, ein kürzerer Krankenhausaufenthalt sowie insbesondere mit Blick auf Patienten mit Leberzirrhose, geringere Inzidenz von Komplikationen (z.B. postoperativer Aszites und Leberversagen) (Morise and Wakabayashi, 2017).

Der erste Konsens zur laparoskopischen Leberchirurgie im Jahr 2008 standardisierte die technischen Aspekte sowie die Nomenklatur der drei bevorzugten Methoden der minimal-invasiven Leberchirurgie (MILS): rein laparoskopische Leberresektionen (PLLR), handassistierte Leberresektionen (HALR) sowie Hybrid (-assistierte) Leberresektionen (Buell et al., 2009).

7.9. Isolierung und Kryokonservierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Für die Gewinnung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)) wurden den in die Studie eingeschlossenen Patienten auf den chirurgischen (Intensiv-) Stationen des Campus-Virchow-Klinikum der Charité unter sterilen Bedingungen Blut entnommen. Die Blutentnahme (BE) wurde sowohl prä-, als auch postoperativ am frühen Morgen, vor Nahrungsmittel- und Medikamenteneinnahme, durchgeführt. Die Entnahme von einem Blutröhrchen EDTA (ca. 3 ml) und Heparin (ca. 4 ml) erfolgte präoperativ am Tag der geplanten Operation und an verschiedenen Tagen postoperativ vor der Entlassung des Patienten. Anschließend wurden die Blutproben im Labor für die Kryokonservierung aufbereitet.

Für die Konservierung des Blutplasmas wurden die Blutentnahmeröhrchen bei 2500 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Blutplasma aus dem Heparin-Röhrchen in acht Eppendorfröhrchen und das Blutplasma aus dem EDTA-Röhrchen in zwei Eppendorfröhrchen umgefüllt, in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und schließlich bei -80°C im Kühlschrank eingelagert. Für die Zellisolation wurde das fehlende Blutplasma im EDTA-Röhrchen durch 2 ml FACS-Puffer ersetzt und wieder vorsichtig mit dem Hämatokrit vermischt. Das EDTA-Blut wurden mit 40 ml Lyse-Puffer vermischt und geschwenkt bis nach einigen Minuten die Lyse der Erythrozyten abgeschlossen war und die Flüssigkeit klar wurde. Hierauf wurde nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 400g und 4°C und Entfernung des Überstandes die erneute Zentrifugation mit 10 ml Lyse-Puffer wiederholt. Anschließend wurde die Lyse durch Zugabe von 2 ml PBS gestoppt und die nun übrigen Blutzellen auf Eis zwischengelagert.

Für den letzten Schritt der Kryokonservierung wurden die Zellen mittels CASYton gezählt und wenn möglich je 2.000.000 Zellen auf zwei Eppendorfröhrchen, wovon eines mit 300 µl Trizol aufgefüllt war, aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und schließlich bei -80°C im Kühlschrank eingelagert. Für die endgültige Lagerung bei -156°C wurden die isolierten PBMC in zwei bis drei Kryokonservierungsgefäßen zu je ca. 10.000.000 Zellen mit 100 µl DMSO und 900 µl FBS-Serum umgefüllt und zuerst 24 Stunden bei -80°C in einem Kühlcontainer (Mr. Frosty™) zwischengelagert.

7.10. Auftauen der mononukleären Zellen

Für das Auftauen der kryokonservierten PBMC wurde zunächst für jede aufzutauende Probe 1ml CTL Anti-Aggregate Wash Medium™ (CTL Europe GmbH, Bonn Deutschland) im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend mit 19 ml T-Zellen- (RPMI-) Medium vermischt. Die Lösung wurde in zwei Falcons zu je 10ml aufgeteilt, die für 20 Minuten im Wasserbad inkubierten, damit sich pH und Temperatur einstellen konnten. Die kryokonservierten Proben wurden in flüssigen Stickstoff transportiert und eine Minute in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten, sodass sie antauten, aber noch ein gefrorener Anteil erhalten blieb. Die angetauten PBMC wurden nun vorsichtig und tröpfchenweise mit 1 ml CTL Anti-Aggregate Wash Medium™ gemischt und wieder tröpfchenweise in ein 50 ml Falcon mit der restlichen Lösung aus CTL und RPMI-Medium überführt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 400 g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nun entfernt und mit den restlichen 10 ml der Lösung aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurden die aufgetauten PBMC in 300 µl Easy Sep™ Cell Medium resuspendiert und mit CASYton gezählt. Für die Antikörperfärbung der Monozyten wurden hiernach bereits 1.000.000 Zellen pro Patientenprobe in eine 96-Well-Standardmikrotiterplatte umgesetzt und anschließend laut Protokoll gefärbt (vgl. Kapitel 7.12.1.)

7.11. Isolierung und Kultivierung von T-Zellen

Die T-Zell-Isolation erfolgte mit Hilfe des EasySep™ Human-T-Zell-Isolierungskit (STEMCELL Technologies GmbH, Köln Deutschland) bei dem die unerwünschten Zellen mit Antikörperkomplexen und magnetischen Partikeln markiert werden. Die magnetisch markierten Zellen werden von den unangetasteten, erwünschten Zellen getrennt, indem man einen EasySep™ Magneten verwendet und die gewünschten Zellen in ein neues Röhrchen überführt. Die magnetisch markierten Zellen verbleiben dabei durch den Magneten im ursprünglichen Röhrchen.

Für die T-Zell-Isolation wurden 250 µl der aufgetauten Zellen mit 12 µl Isolations-Cocktail in einem FACS-Röhrchen vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 µl RapidSpheres™ hinzugefügt und die gesamte Suspension auf ein Volumen von 2,5 ml mit Easysep™ Medium aufgefüllt. Das FACS-Röhrchen wurde hiernach für die Zeit von 3 Minuten in einem Magneten platziert und anschließend die isolierten T-Zellen vorsichtig in ein FACS-Röhrchen umgefüllt und mit CASYton gezählt.

Über Nacht wurde eine 96-Well-Standardmikrotiterplatte bei 4°C mit Anti-CD3 (1 mg/ml) in PBS inkubiert. Die Platte wurde am nächsten Tag mit 200 µl PBS gespült und die Wells mit 50 µl T-

Zellen-Medium pro Well wieder aufgefüllt. Anschließend wurden pro Patientenprobe 500.000 bis maximal 1.000.000 isolierte T-Zellen in die 96-Well-Standardmikrotiterplatte umgesetzt und mit Anti-CD28 und Protein Transport Inhibitor mit einer Konzentration von je 0,2 µl in 100 µl PBS sowie mit auf 100 µl aufgefüllten T-Zellen-Medium vier Stunden bei 37°C inkubiert.

CD28 ist ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, das auf den meisten T-Lymphozyten des peripheren Blutes konstitutiv exprimiert wird. Darüber hinaus ist CD28 der kritische kostimulatorische T-Zell-Rezeptor, der der Zelle das wichtige zweite Aktivierungssignal liefert, indem er CD80 und CD86 bindet, die von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden. Zusätzlich zu seiner kostimulierenden Funktion verhindert CD28, dass T-Zellen in einen anergisch-hyporesponsiven Zustand übergehen oder einen vorzeitigen apoptotischen Zelltod erleiden. Der Protein Transport Inhibitor ist eine Mischung aus Brefeldin A und Monensin. Die Zugabe zu Zellen in Kulturen hemmt den intrazellulären sekretorischen Weg/Transportweg für Proteine, was zu einer Ansammlung von sekretorischen Proteinen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und im Golgi-Apparat führt. Diese Ansammlung kann durch intrazelluläre Färbung und Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

7.12. Durchflusszytometrie

7.12.1. Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbungen

Für die drei verschiedenen Antikörperfärbungen wurden für jede Patientenprobe je 50 µl der unterschiedlichen Antikörperfärbungen angesetzt (Tabelle 4-6).

Die PBMC wurden für die Antikörperfärbung der Monozyten (Tabelle 5) in einer 96-Well-Standardmikrotiterplatte mit je 50 µl der extrazellulären Färbung für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Der Human TruStain FcX™ dient zur Blockierung der Fc-Rezeptoren vermittelten, unerwünschten Färbung, ohne die Antikörper-vermittelte spezifische Färbung zu beeinträchtigen. Daraufhin wurden die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer 5 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend erfolgte die 20-minütige Fixierung der Zellen mit 100 µl Fixationspuffer. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit 100 µl Perm Wash wieder zentrifugiert und für 15 Minuten mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Nachfolgend wurden die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und mit 200 µl FACS-Puffer aufgefüllt sowie auf Eis für die durchflusszytometrische Messung transportiert und gemessen.

Nach vier Stunden Inkubation wurden die isolierten T-Zellen mit 100 µl PBS gewaschen und bei 400 g und Raumtemperatur 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden mit je 50 µl der extrazellulären Färbung (Tabelle 5 und 6) für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer 5 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend erfolgte die 20-minütige Fixierung der Zellen mit 100 µl Fixationspuffer. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit 100 µl Perm Wash wieder zentrifugiert und für 15 Minuten mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Nachfolgend wurden die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert und mit 200 µl FACS-Puffer aufgefüllt sowie auf Eis für die durchflusszytometrische Messung transportiert und gemessen.

Tabelle 4: Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung der Monozyten

Antikörperfärbung Monozyten	Menge (µl)
Extrazelluläre Färbung	
PBS-Puffer	39
FC-Block	5
Zombie Green	0,1
CD39	1
TIE-2	2
CD163	1
CD14	1
CD16	1
Antikörperfärbung Monozyten	
Intrazelluläre Färbung	
Perm-Wash	49
A2a	1

Tabelle 5: Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen

Antikörperfärbung T-Zellen	Menge (µl)
Extrazelluläre Färbung	
PBS-Puffer	40
FC-Block	5
CD203a	1
Cx43	2,5
CD8	0,5
CD38	0,5
CD4	0,5
Zombie UV	0,1
Antikörperfärbung T-Zellen	
Intrazelluläre Färbung	
Perm-Wash	48
IFN-γ	1
IL-10	1

Tabelle 6: Extra- und intrazelluläre Antikörperfärbung der Th17-Zellen

Antikörperfärbung Th17-Zellen	Menge (µl)
Extrazelluläre Färbung	
PBS-Puffer	5
FC-Block	5
CD203a	1
Cx43	2,5
CCR6	1
CCR4	1
CD38	0,5
CD4	0,5
Zombie UV	0,1
Antikörperfärbung Th17-Zellen	
Intrazelluläre Färbung	
Perm-Wash	48
IL-17	1
IL-22	1

7.12.2. Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem FACS-Gerät: BD LSRFortessa™ X-20 mit Verwendung des Hoechst UV-Filter und der FACSDiva Software BD FACSDiva™ v9.0 (BD Biosciences, San Jose USA). Es wurden eine jeweils der Patientenprobe angepasste Anzahl an Ereignissen gemessen. Die Einstellungen für die verschiedenen Messkanäle sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Für die Mehrfachfärbungen wurden die überlappenden Emissionsspektren vor der eigentlichen Messung am Durchflusszytometer kompensiert. Die Berechnung der Kompensationsmatrix wurde mit der oben genannten Software durchgeführt. Grundlage für eine Kompensation war die Einzelfärbung aller Antikörper an Patientenproben aus der Gruppe der Patienten mit einer Leberresektion.

Tabelle 7: Laser und Fluorochrome und Spannung (Volt)

Fluorochrome	Laser (nm)	Spannung (Volt)
FSC	-	200
SSC	-	261
BV510	405	300
BV785	407	440
APC	652	520
BUV 395	355	290
BV421	421	245
FITC	494	300
PE-Cy7	496	500
PE	496	380
APC-Cy7	650	630
BV605	407	520
BV650	405	520
BV711	405	480

7.12.3. Auswertung und Gating-Strategie der Durchflusszytometrie

Die zytometrischen Messungen wurden mit FlowJo (Software Version FlowJo X 10.0.7r2, BD Biosciences, San Jose USA) ausgewertet sowie die dazugehörigen Abbildungen erstellt. Das Ziel war vitale T-Lymphozyten sowie TEMs und Monozyten herauszufiltern und unerwünschte Ergebnisse, wie nicht vitale Zellen auszuschließen. Die Auswertung erfolgte für die drei

verschiedenen Antikörperfärbungen in ihren Gruppen konsistent, da sich sonst prozentuale Angaben der einzelnen Gruppen unterscheiden und die Vergleichbarkeit verloren geht.

Im ersten Schritt wurden durch das Auftragen von Forward Scatter Fläche (FSC-A) gegen Höhe (FSC-H) Zellaggregate herausgefiltert (Abb. 1A). Einzelne vitale Zellen verhalten sich in beiden Signalen identisch und lassen sich somit von den Aggregaten unterscheiden. In der Ansicht im FSC-A gegen Side Scatter Fläche (SSC-A) ließen sich anschließend anhand ihrer Größe und Granularität die typische Lymphozyten- und Monozytenpopulation markieren (Abb. 1B). Im nächsten Schritt wurden die apoptotischen Zellen über die Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der für lebende Zellen nicht, aber für Zellen mit geschädigter Membran durchlässig ist, ausgeschlossen (Abb. 1C). Zur genaueren Differenzierung der T-Zell-Populationen sowie TEMs und Monozyten wurden dann definierende immunphänotypische Oberflächenmerkmale herangezogen.

Monozyten wurden lange auf der Grundlage der CD14 und CD16 Expression in zwei Subpopulationen aufgeteilt: Monozyten die CD14⁺ und nicht CD16⁻ exprimieren sowie Monozyten CD14⁺ und CD16⁺ exprimieren (Passlick et al., 1989). Eine neue Nomenklatur teilt nun die Monozyten in drei Gruppen auf, da die kleine CD16⁺ Subpopulation in zwei kleinere Unterpopulationen aufgeteilt wurde. Die Subpopulation intermediate Monozyten (CD14⁺⁺ CD16⁺) zeigt einen relativ höheren Anteil an CD14⁺, gekoppelt mit einer niedrigeren CD16⁺ Expression während die nicht-klassischen Monozyten (CD14⁺ CD16⁺⁺) eine niedrigere Expression von CD14⁺ mit höherer Expression von CD16⁺⁺ zeigen. Als klassische Monozyten (CD14⁺ CD16⁻) wird die Subpopulation mit einer hohen Expression von CD14⁺ sowie keiner Expression von CD16⁻ bezeichnet (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Bei der Auswertung der hier gemessenen zytometrischen Daten konnte diese Einteilung der Monozytensubpopulationen allerdings nicht vorgenommen werden. Für die Bestimmung der Monozyten wurden bei der Auswertung mit FlowJo die CD14⁺ Monozyten und die CD16⁺ Monozyten gegeneinander aufgetragen und mit Hilfe von Quadranten unterteilt (Abb. 1D). Das Feld Q1 zeigt nur die CD16⁺ Monozyten. Im Feld Q4 sind die CD14⁻ CD16⁻ Monozyten und im Feld Q3 die klassischen Monozyten (nur CD14⁺) abgebildet. Die nicht klassischen - sowie die intermediaten Monozyten, also doppelt positive Monozyten (CD14⁺ CD16⁺), sind in Feld Q2, in dem keine zwei Subpopulationen abgegrenzt werden können.

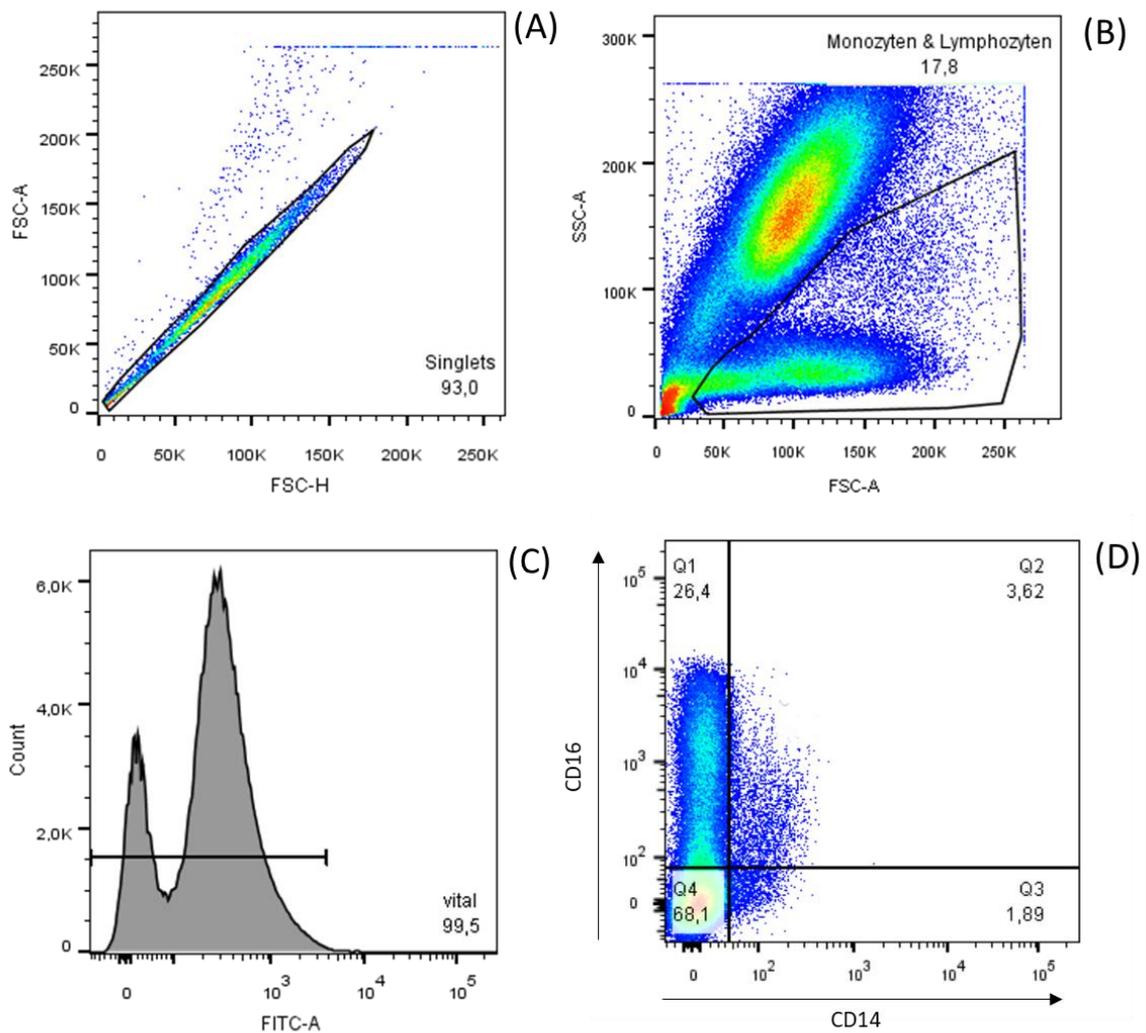


Abbildung 1: Die Gating-Strategie der Subpopulationen der Monozyten
 (A) Darstellung FSC-A gegen FSC-H; (B) Darstellung SSC-A gegen FSC-A, (C) Darstellung vitaler Zellen mit Farbstoff Zombie, (D) CD16 (BV785) gegen CD14 (BV510)

CD14⁺ CD16⁺ Monozyten exprimieren TIE-2 in einem höheren Grad als CD14⁺ CD16⁻ Monozyten, sodass CD14⁺ CD16⁺ TIE-2⁺ Monozyten als TIE-2-expressing-Monocytes (TEMs) bezeichnet werden (Matsubara et al., 2013). Aufgrund ihrer Expression von weiteren Rezeptoren (u.a. CD11b, CD40, CD86) unterscheiden sich TEMs sowohl phänotypisch als auch funktionell von TIE-2⁺ Monozyten oder endothelialen Vorläuferzellen.

7.13. NAD⁺-Messung im Serumplasma

Für die NAD⁺-Messung wurde ein hitze-basiertes dichotomes pH-Extraktionsverfahren verwendet, um aufgereinigte Versionen von NAD⁺ zu extrahieren (Brunnbauer et al., 2018).

7.13.1. Puffer und Standardmatrix

- Salzsäure (HCL) = 0,3N HCl und 0,6N HCl
- Kaliumhydroxid (KOH) = 0,3N KOH und 0,6N KOH
- Extraktionspuffer = NAD Extraktion: 0.3N HCl und NADH Extraktion: 0.3N KOH
- Neutralisationspuffer = Triethylamin-Salzsäure (TEA-HCl): 0.36N TEA-HCl, eingestellt auf einen pH von 7.4
 - NAD Neutralisation: 0.36N TEA-HCl: 0.6N KOH (Verhältnis 1 : 1)
- Mastermix =
 - TEA-Puffer: 1 : 10 verdünnt, eingestellt auf einen pH von 7.4
 - Alkoholdehydrogenase (ADH): 1 : 10 verdünnt
 - Polymethylsiloxanpolyhydrat (PMS): 10mg/ml Lösung
 - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT): 1mg/ml Lösung
 - Ethanol (EtOH): 100%
- NAD⁺ Standard-Matrix Lösung („revised simulated body fluid“ (r-SBF)), eingestellt auf einen pH von 7.4 in 1000 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser
 - Natriumchlorid (NaCl): 5.403 g, Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃): 0.740 g, Natriumcarbonat (Na₂CO₃): 2.046 g
 - Kaliumchlorid (KCl): 0.225 g, Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄): 0.138 g
 - Magnesiumchlorid (MgCl₂·6H₂O): 0.311 g
 - 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure (HEPES): 11.928 g

- Calciumchlorid (CaCl₂·2H₂O): 0.388 g
- Natriumsulfat (Na₂SO₄): 0.072 g
- Bovines Serumalbumin (BSA): 40 g

7.13.2. Herstellung der Standardmatrix

Für die Herstellung der Standardmatrix wurde zuerst eine Lösung von β-NAD mit der Konzentration 1 mg/ml in DEPC-Wasser vorbereitet. Anschließend wurde die Lösung von β-NAD 1000-fach in 9990 µl DEPC-Wasser verdünnt. Für die Herstellung des Standards S1 werden von der Verdünnung wieder 500 µl in 500 µl DEPC-Wasser verdünnt. Es wird nach dem Schema für die anderen Verdünnungen weiter verfahren (Tabelle 8).

Tabelle 8: β-NAD-Standards in DEPC-Wasser

Standard	β-NAD (nM)	β-NAD (ng/ml)
S1	753,6	50,00
S2	376,8	25,00
S3	188,4	12,50
S4	94,2	6,25
S5	47,1	3,13
S6	23,5	1,56

7.13.3. NAD⁺-Messung

Das bei -80°C gefrorene Heparinplasma in den Eppendorfröhrchen wurde bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Anschließend erfolgte die Aufteilung des Plasmas. 300 µl wurden in ein Eppendorfröhrchen für die NAD-Extraktion pipettiert und 300 µl zusammen mit 270 µl r-SBF in ein Eppendorfröhrchen für die NADH-Extraktion pipettiert. Nach Zugabe der Säure- und Basenlösungen (NAD: 300 µl 0.3N HCL; NADH: 300 µl 0.3N KOH; r-SBFA: 300 µl 0.3N HCl) für die Extraktion wurden die Eppendorfröhrchen bei 60°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten auf Eis equilibriert.

Danach erfolgte die Neutralisation der Proben mit 300 µl ihrer jeweiligen Neutralisationspuffer und die anschließende Zentrifugation bei 16.000 g für 10 Minuten bei 4°C. Auf einer transparenten 96-Well-Standardmikrotiterplatte wurden alle Proben im Duplikat gemessen. Dafür wurden für die NAD⁺-Messung jeweils 50 µl einer Probe und für NADH 5 µl einer Probe sowie 45 µl einer Kontrollprobe (300 µl r-SBF in 1 :10 Verdünnung) angesetzt. Unter Zeitnahme wurden 150 µl des

Mastermixes in die Vertiefungen gegeben und zweimalig resuspendiert. Nach 5 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Absorption der Proben bei 565 nm im „microplate reader Infinite® 200 PRO“ (Tecan Trading AG, Schweiz) bei einer Temperatur von 25°C gemessen.

7.14. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgt mittels GraphPad Prism (GraphPad Software Version 6.01, San Diego, USA). Für die demographischen und klinischen Patientendaten wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet. Anschließend erfolgte ein Vergleich der gesammelten Daten mittels ungepaarten t-Test. Bei kategorischen Merkmalen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Danach wurde eine deskriptive Statistik der Patientenkohorte, inklusive Mittelwert und Standardabweichung angefertigt. Die Verteilung der Werte wurde anhand des D'Agostino-Pearson Omnibus Tests überprüft.

Für die Ermittlung signifikanter Unterschiede in den Patientenkohorten Leberresektion und der Kontrollgruppe wurde der One-Way ANOVA Test bei normalverteilten Werten und der Kruskal-Wallis Test bei nicht normal verteilten Werten verwendet. Die Pearson Korrelation wurde für die Korrelationsuntersuchungen der gemessenen Daten der Durchflusszytometrie, die normalverteilt waren, verwendet. Alternativ wurde die Spearman Korrelation angewendet. Bei der Betrachtung der Patientengruppe Lebertransplantation und den drei gebildeten Subgruppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurde der Multiple t-Test verwendet.

Anschließend wurde eine Bewertung der potenziellen diagnostischen und prognostischen Biomarker anhand einer receiver operating characteristic Kurve (ROC-Kurve) vorgenommen. Die ROC-Kurve stellt die Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) und die 1-Spezifität (Falsch-Positiv-Rate) gegenüber. Die Punkte auf der Kurve entsprechen den verschiedenen verwendeten Grenzwerten (oder Cut-Off-Werten), um festzustellen, ob die Testergebnisse positiv sind (Mandrekar, 2010). Die Referenz (Zufallsdiagonale), die durch die gezogene 45-Grad-Linie dargestellt wird, verläuft durch die Koordinaten 0 und 1. Wenn die Testergebnisse des potenziellen Biomarkes der Patienten als positiv oder negativ für die Erkrankung rein zufällig verteilt sind, dann fällt die ROC-Kurve auf die diagonale Linie. Als Maß für die Beschreibung der Kurve wird die Fläche unter der Kurve (Area under the curve oder ROC-AUC) verwendet. Die ROC-AUC fasst die diagnostische Genauigkeit des Biomarkers zusammen. Der Wert 0 zeigt einen vollkommen ungenauen Test und der Wert 1 einen vollkommen genauen Test an. Je größer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist die Klassifizierungsfähigkeit und somit die Qualität des diagnostischen Tests. Ein AUC-Wert

zwischen 0,7 und 0,8 zeigt eine akzeptable, ein Wert zwischen 0,8 und 0,9 eine exzellente und ein Wert von über 0,9 eine herausragende Abgrenzbarkeit des Testes (Assmann et al., 1996). Bei einem Wert nahe 0,5 liegt die ROC-Kurve auf der Diagonalen. Dies kommt einer Verteilung durch Zufallsprinzip gleich und weist auf eine fehlende Diskriminationsfähigkeit des Tests hin (Mandrekar, 2010).

Der Youden-Index wird in Verbindung mit einer ROC-Kurve für die Beurteilung eines Biomarkers verwendet, zeigt die maximale potenzielle Wirksamkeit an und dient der Identifizierung des optimalen Grenzwertes. Er errechnet sich aus der Sensitivität und Spezifität und liegt zwischen 0 und +1. Je näher der Youden-Index bei +1 liegt, desto besser sind die identifizierten Biomarker in der Lage, die untersuchten Patientengruppen voneinander zu unterscheiden.

Für die Berechnung der rezidivfreien - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit wurde der Logrank (Mantel-Cox) Test und der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test verwendet und zusätzlich die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel und Logrank) bestimmt.

Als Signifikanzniveau wurde allseits eine 2-seitige Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen.

8. Ergebnisse

8.1. Auftauen, T-Zell-Isolierung und -Kultur der Patientenproben

Aus den ETDA-Blutproben wurden bei den prä- und postoperativen BE durchschnittlich 23.778.830 Zellen/ml PBMC (\pm 5.846.603 Zellen/ml SD) pro Patienten isoliert. Anschließend wurden allen Blutproben bei -156°C kryokonserviert und zum Zeitpunkt der Messung wieder aufgetaut.

In der Kohorte der Patienten mit Lebertransplantation konnten pro präoperativer Probe durchschnittlich 12.940.000 Zellen/ml PBMC und postoperativ 20.440.000 Zellen/ml aufgetaut werden. Die Viabilität der Zellen in den präoperativen Proben betrug 57 %. In der Patientengruppe Leberresektion konnten präoperativ 24.726.315 Zellen/ml PBMC und postoperativ 27.165.000 Zellen/ml aufgetaut werden. Die Viabilität der Zellen in den präoperativen Proben betrug 61% und postoperativ 69 %. In der Kohorte der Kontrollgruppe konnten präoperativ 25.590.000 Zellen/ml PBMC und postoperativ ca. 31.500.000 Zellen/ml aufgetaut werden. Die Viabilität der PBMC betrug in den präoperativen Proben 72 % und postoperativ 76 %.

Anschließend erfolgten die Isolierung und Kultivierung von T-Zellen. In der Patientengruppe Lebertransplantation konnten nach der T-Zell-Isolation präoperativ nach 290.200 Zellen/ml und postoperativ 4.588.000 Zellen/ml mit einer Viabilität von 70 % gemessen werden. Die Kohorte der Patienten mit Leberresektion wurden aus den PBMC präoperativ 1.202.631 Zellen/ml und postoperativ 2.551.000 Zellen/ml isoliert. Deren Viabilität betrug präoperativ 79 % und postoperativ 73 %. In der Kontrollgruppe konnten aus den PBMC präoperativ ca. 3.495.000 Zellen/ml isoliert werden und postoperativ 2.794.000 Zellen/ml isoliert werden. Die Viabilität war in dieser Kohorte mit präoperativ 87 % und postoperativ 85 % am höchsten.

8.2. Patientenkollektiv

In der Tabelle 9 sind die demographischen und klinischen Daten der insgesamt 41 in diese Untersuchung eingeschlossen Patienten dargestellt. Die stetigen Variablen sind mit dem arithmetischen Mittel (MW) sowie der Standardabweichung (SD) angegeben. Nicht alle Parameter konnten in allen drei Kohorten erhoben werden. Die BE fanden in den drei Patientenkohorten präoperativ, am Tag der geplanten Operation und postoperativ an festgelegten Tagen bis zur Entlassung des Patienten statt. Die BE in der Patientengruppe Leberresektion (Abk. LR) erfolgten am 1., 2., 5., 10., 15. und 30. Tag nach der Operation. In der Kohorte Lebertransplantation (Abk. LTX) waren am 1., 3., 7., 14. sowie 30. postoperativen Tag nach der Transplantation. Die Kontrollgruppe (Abk. Ktrl.) wurden am 1. bis 7. Tag postoperativ für eine BE aufgesucht. Auf

Grund der signifikant unterschiedlichen Dauer des Krankenhausaufenthalts ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen bei dem Tag der postoperativen BE. Für die hier erfolgten Messungen wurde bei jedem Patienten der letztmögliche Zeitpunkt des Aufenthaltes der postoperativen BE ausgewählt.

In der Patientenkohorte Lebertransplantation wurden Blutproben von elf Patienten (sieben männliche und vier weibliche Patienten) präoperativ am Tag der Transplantation und durchschnittlich am 22. Tag postoperativ entnommen. Die Patienten waren zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 58 Jahre alt. In der Patientengruppe, die aufgrund des HCC eine Leberresektion erhalten haben, wurde 20 Patienten (14 männliche und 6 weibliche Patienten) präoperativ am Tag der Operation und durchschnittlich am 7. Tag postoperativ eine Blutprobe entnommen. Die Patienten waren zu diesem Zeitpunkt im Mittel 63 Jahre alt. Die Patienten in der Kontrollgruppe (5 männliche und 5 weibliche Patienten) waren durchschnittlich 49 Jahre alt. Die BE erfolgten präoperativ am Tag der Operation und durchschnittlich bereits am 1. Tag postoperativ.

Die Geschlechterverteilung in den drei Kohorten zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bei der Betrachtung des Altersdurchschnitts in der Patientengruppe Leberresektion im Vergleich zu den Patienten der Kontrollgruppe waren signifikante Unterschiede festzustellen. Keine Unterschiede gab es zwischen den Kohorten bei Größe, Gewicht und BMI. Die Leberfunktionsmessung LiMAX zeigte zwischen den HCC-Patienten präoperativ keinen signifikanten Unterschied. Bei diesem Test wird intravenös verabreichte ^{13}C -Methacetin-Lösung vom hepatischen Cytochrom-P450-1A2-Enzym selektiv zu $^{13}\text{CO}_2$ metabolisiert und anschließend in der Ausatemluft gemessen. Dieser Wert korreliert mit der Leberfunktion (Krenzien et al., 2018). Der labMELD wurde nur bei den transplantierten Patienten bestimmt.

Zusätzlich wurden die prä- und postoperativen Blutwerte, soweit sie in den drei Patientengruppen erhoben wurden, miteinander verglichen (Tabelle 10). Signifikante Unterschiede bei Blutwerten wurden zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit einem HCC bei den INR-Werten prä- und postoperativ festgestellt sowie weitere signifikante Unterschied bei den gemessenen Harnstoffwerten postoperativ bei den Patienten mit einer Leberresektion und der Kontrollgruppe. Keine Unterschiede wurden bei den Kreatinin-Werten beobachtet. Bilirubin und ALT zeigten postoperativ signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit Leberresektion und Lebertransplantation. Keine Unterschiede konnten prä- und postoperativ bei den erhobenen Werten AST, GGT und AP festgestellt werden.

Tabelle 9: Demographie und Studienmerkmale

	LR	p-Wert	LTX	p-Wert	Ktrl.
Anzahl der Patienten	n = 20	-	n = 11	-	n = 10
Geschlecht: (m/w)	14/6	0,56	7/4	0,56	5/5
Alter (Jahre)	63 ± 12	0,01	58 ± 7	0,10	49 ± 14
BMI (kg/m²)	25,5 ± 3,7	0,51	26,1 ± 4,7	0,86	26,4 ± 3,1
Größe (m)	1,68 ± 0,07	0,05	1,74 ± 0,09	0,74	1,76 ± 0,14
Gewicht (kg)	72,5 ± 12,1	0,06	79,7 ± 15,3	0,66	82,8 ± 16,7
Tag der BE postop.	7 ± 4	0,0005	22 ± 8	< 0,0001	1 ± 0,5
Krankenhausaufenthalt (Tage)	7 ± 5	0,008	42 ± 35	0,002	2 ± 1
labMELD	-	-	10 ± 5	-	-
Limax präop. (µg/kg/h)	384 ± 206	0,11	250 ± 80	-	-

Tabelle 10: Blutuntersuchung der Kohorten LR, LTX und Ktrl., prä- und postoperativ

	LR	p-Wert	LTX	p-Wert	Ktrl.
GLDH präop. (U/l)	-	-	10 ± 7	-	-
Bilirubin präop. (mg/dl)	0,6 ± 0,2	0,18	3,3 ± 8,8	-	-
Bilirubin postop. (mg/dl)	0,8 ± 0,5	0,0004	3,3 ± 2,7	-	-
INR präop.	1,08 ± 0,16	0,05	1,25 ± 0,26	0,007	0,96 ± 0,06
INR postop.	1,14 ± 0,16	0,35	1,48 ± 0,42	0,04	1,08 ± 0,10
Kreatinin präop. (mg/dl)	0,84 ± 0,17	0,15	0,73 ± 0,22	0,97	0,73 ± 0,15
Kreatinin postop. (mg/dl)	0,81 ± 0,17	0,80	1,60 ± 1,24	0,12	0,83 ± 0,23
Harnstoff präop. (mg/dl)	31 ± 11	0,07	35 ± 27	0,22	23 ± 3
Harnstoff postop. (mg/dl)	34 ± 10	0,03	85 ± 59	0,05	22 ± 6
ALT präop. (U/l)	44 ± 26	0,98	44 ± 20	-	-
ALT postop. (U/l)	150 ± 128	0,0007	488 ± 360	-	-
AST präop. (U/l)	45 ± 19	0,14	57 ± 26	-	-
AST postop. (U/l)	117 ± 127	0,82	126 ± 85	-	-
GGT präop. (U/l)	153 ± 217	0,74	178 ± 159	-	-
GGT postop. (U/l)	185 ± 180	0,08	308 ± 191	-	-
AP präop. (U/l)	161 ± 244	0,72	134 ± 82	-	-
AP postop. (U/l)	106 ± 74	0,47	126 ± 62	-	-

Bei der Betrachtung der zugrundeliegenden Genese der Leberzirrhose konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen den Patientengruppen mit einem HCC festgestellt werden. Die viralen Hepatitiden waren in der Kohorte Leberresektion mit 55 % (n=11) am häufigsten vertreten. Die Hepatitis-C bedingte Leberzirrhose wurde bei acht Patienten, eine Hepatitis B bedingte Leberzirrhose bei einem Patienten und kombinierte Hepatitiden bei zwei Patienten festgestellt (Abb. 2A). In der Gruppe der Lebertransplantation lag bei 36 % (n=4) eine Hepatitis bedingte Leberzirrhose vor. Bei zwei Patienten lag entweder eine Leberzirrhose bei HCV-Infektion oder kombinierte Hepatitiden vor. In dieser Patientengruppe war die äthyltoxische Leberzirrhose mit 37 % (n=4) die häufigste Ursache der Leberzirrhose (Abb. 2B).

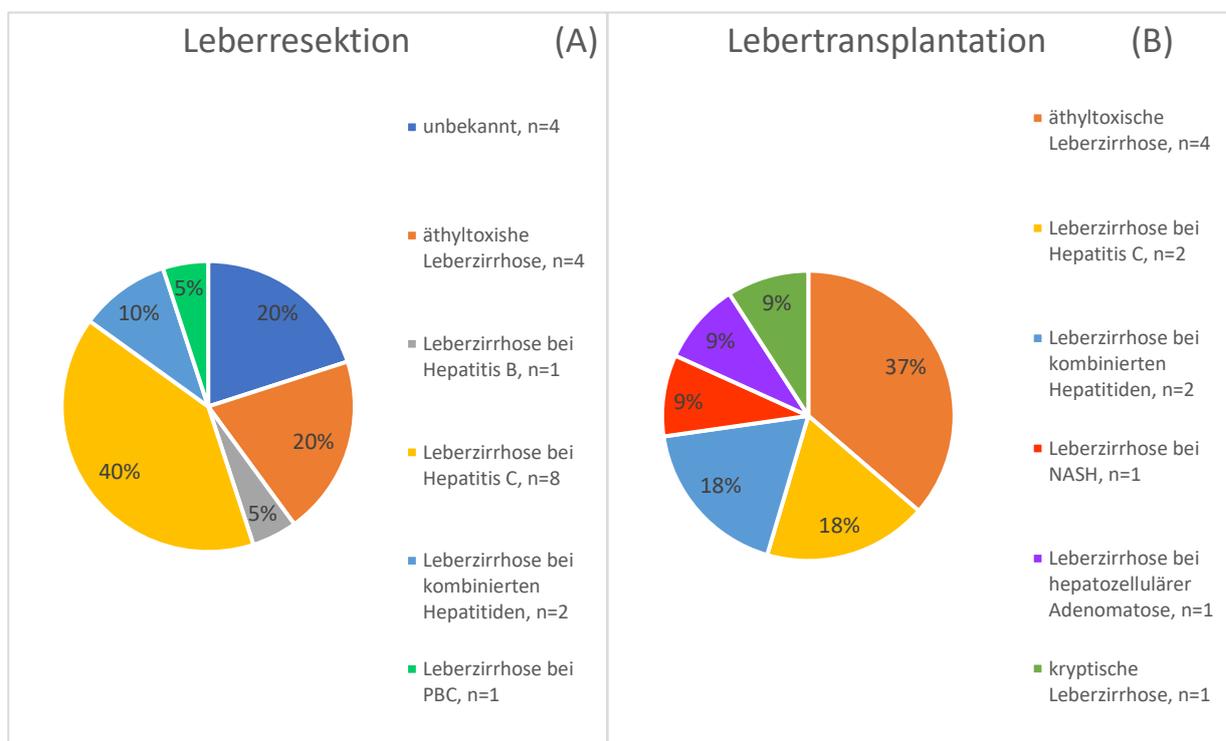


Abbildung 2: Genese der Leberzirrhose der Patienten mit Leberresektion (A) und Lebertransplantation (B)

Im Beobachtungszeitraum wurde in der Kohorte Lebertransplantation von den insgesamt elf Patienten bei sieben der klinische Verdacht auf eine ACR gestellt und anschließend eine Leberpunktion vorgenommen. Bei drei Patienten konnte die ACR bioptisch gesichert und als Grad 1 mit Zeichen einer geringgradigen zellulären ACR eingestuft werden. Eine milde ACR (Grad 1) ist histologisch auf eine Infiltration in der Minderheit der Periportalfelder begrenzt und zeichnet sich durch ein perivenöses zelluläres Infiltrat in der Minderheit der Leberläppchen sowie auf diese begrenzt und durch die Abwesenheit von konfluierenden hepatozellulären Nekrosen aus (Anthony J. Demetris et al., 1997).

Bei drei Patienten wurde anstatt der ACR eine ischämische perfusionsbedingte Schädigung des Lebergewebes, ein IRI, histologisch festgestellt. Bei einem weiteren Patienten lag zusätzlich eine toxische Schädigung des Leberbiopsats bei Cholangitis vor. Der ischämische Reperfusionsschaden ist in der histologischen Untersuchung durch eine Steatose, Cholestase und ballonbildende Degeneration der Hepatozyten gekennzeichnet ist (Neil and Hubscher, 2001). Zeitgleich zu der Leberbiopsie ist eine zusätzliche BE bei den Patienten erfolgt. Von den insgesamt sieben Patienten mit einer vermuteten ACR lagen bei zwei Patienten mit einem IRI BE vom Tag der erfolgten Leberpunktion vor. In der Gruppe mit einer histologisch bestätigten ACR lagen bei ebenfalls zwei Patienten Blutentnahmen vor, wobei eine BE bereits zwei Tage vor der Leberpunktion erfolgt ist. Auf Grund dieser Daten wurden drei Untergruppen innerhalb der Kohorte Lebertransplantation gebildet. Patienten, die während des beobachteten Zeitraums eine biopsisch gesicherte ACR aufwiesen (n=3) sowie Patienten, bei denen in der histologischen Untersuchung des Biopsats ein IRI nachgewiesen werden konnte (n=4) und Patienten, bei denen kein klinischer Verdacht auf eine ACR oder IRI bestand (n=4). Es wurden die Zeitpunkte prä- und postoperativ und eine Messung zum Zeitpunkt der vermuteten ACR ausgewertet.

8.3. Ergebnisse der Kohorte Leberresektion

8.3.1. rezidivfreies- und Gesamtüberleben der Patienten mit Leberresektion

In der Kohorte der Patienten, die aufgrund des HCC eine Leberresektion erhalten haben, traten im Beobachtungszeitraum bei zehn Patienten (50 %) lokale Rezidive in der Leber auf. Bei zehn Patienten konnten in der letztmaligen MRT-Nachsorgeuntersuchung keine Rezidive (50 %) nachgewiesen werden. Das erste Frührezidiv wurde bereits 30 Tage nach der Operation diagnostiziert und ist als Tumorprogression zu bewerten. Das letzte diagnostizierte Spätrezidiv trat nach 796 Tagen postoperativ auf (MW 208 Tage \pm 253 Tage SD). Die Werte sind normalverteilt. Der längste rezidivfreie Überlebenszeitraum liegt bei 1256 Tagen (3,4 Jahre) nach der Leberresektion. Die mediane rezidivfreie Überlebenszeit beträgt 796 Tage (2,1 Jahre) (Abb. 3A).

Anschließend wurde die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in der Patientengruppe mit Leberresektion mit dem 01.08.2020 als Stichtag betrachtet. Im Beobachtungszeitraum traten insgesamt fünf Todesfälle (25 %) auf. Der erste Patient verstarb 196 Tage nach der Operation, der letzte Patient nach 1055 Tagen postoperativ (MW 536 Tage \pm 348 Tage SD). Die Werte sind normalverteilt. Der längste Überlebenszeitraum eines Patienten liegt bei 1293 Tagen (3,5 Jahre) nach der Leberresektion. Die mediane Überlebenszeit kann bei ausschließlich fünf verstorbenen Patienten nicht bestimmt werden (Abb. 3B).

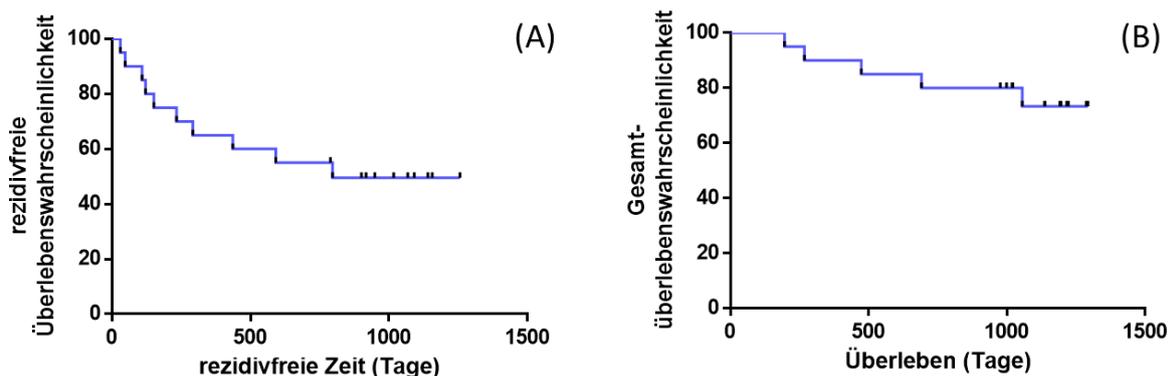


Abbildung 3: rezidivfreie - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Patienten der Kohorte LR, Kaplan Meier Kurven (A) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit (B) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit; Statistik: Logrank (Mantel-Cox) -, Gehan-Breslow-Wilcoxon Test und Hazard Ratio (Mantel-Haenszel und Logrank)

In der Patientengruppe Lebertransplantation trat im Beobachtungszeitraum 881 Tage nach der Lebertransplantation bei einem Patienten eine pulmonale Metastasierung eines mittelgradig differenzierten hepatozellulären Karzinoms auf. Ein Patient verstarb 112 Tage nach der Lebertransplantation an den Folgen eines unklaren Transplantatversagens auf der Intensivstation. Aufgrund des Auftretens eines einzigen Rezidivs und Todesfalls wurde die rezidivfreie - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in dieser Kohorte nicht weiter untersucht.

8.3.2. Evaluation der Aussagekraft der prognostischen Biomarker der Patienten mit Leberresektion

In der Patientengruppe mit Leberresektion konnten im Beobachtungszeitraum insgesamt zehn Rezidive und fünf Todesfälle beobachtet werden. Dementsprechend wurden die prä- und postoperativ gemessenen T-Zellen und Monozyten mit Expression der Ektoenzyme und Rezeptoren der purinergen Signalgebung dahingehend untersucht, ob sie als prognostische Biomarker für das Auftreten eines Rezidivs oder der Vorhersage eines reduzierten Gesamtüberlebens nach Leberresektion geeignet sind. Die Patienten der Kohorte wurden hierfür in zwei Subgruppen mit und ohne Auftreten eines Rezidivs im Beobachtungszeitraum eingeteilt. Für die Evaluation der prognostischen Qualität und folglich der Aussagekraft der prognostischen Biomarker wurde eine ROC-Kurve erstellt (Abb. 4). Als Maß für die Beschreibung der Kurve wird dabei die Fläche unter der Kurve (ROC-AUC) ermittelt. In Ergänzung wurde der Youden-Index für die Bestimmung des bestmöglichen Grenzwertes verwendet, der in der Lage ist zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv zu unterscheiden (vgl. Kapitel 7.14).

In der Tabelle 11 sind die ermittelten Grenzwerte der prognostischen Biomarker sowie deren Sensitivität und Spezifität im Hinblick auf die Vorhersage eines Rezidivs, die ROC-AUC und der Youden-Index dargestellt. Der Grenzwert mit dem höchsten Youden-Index von 0,70 bzw. 0,68 liegt bei dem Anteil der IFN- γ^+ IL-10 $^+$ bzw. CD38 $^+$ Tr1-Zellen bei 7,17 % bzw. 3,99 %. Damit weisen der Anteil der IFN- γ^+ IL-10 $^+$ bzw. CD38 exprimierenden Tr1-Zellen unter allen in dieser Studie getesteten Biomarkern die bestmögliche Unterscheidbarkeit zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv auf.

Der Anteil der CD163 exprimierenden TEMs und CD14 $^+$ CD16 $^+$ Monozyten mit den Grenzwerten von 26,45 % und 22,45 % sowie der Anteil der CD203a exprimierenden Th17-Zellen (CCR6 $^+$ CCR4 $^+$) mit einem Grenzwert von 81,05 % weisen die höchste Spezifität mit jeweils 90 % auf. Damit sind sie am bestmöglichen geeignet um Patienten, die kein Rezidiv aufweisen, als solche zu erkennen. Der Anteil der IL-10 exprimierenden CD4 $^+$ Treg mit einem Grenzwert von 17,25 % und der Anteil der IFN- γ^+ IL-10 $^+$ exprimierenden Tr1-Zellen weisen die höchste Sensitivität mit jeweils 100 % auf. Damit sind sie am bestmöglichen geeignet, um Patienten, die ein Rezidiv aufweisen, als solche zu determinieren. CD4 $^+$ Treg mit CD38 Expression mit einem Grenzwert von 1,28 % und der Anteil an CD203a exprimierenden Th17-Zellen (CCR6 $^+$) mit einem Grenzwert von 38,10 % weisen knapp hinter dem Anteil der CD38 exprimierenden Tr1-Zellen (ROC-AUC = 0,82) mit jeweils 0,81 die nächstgrößten ROC-AUC auf. Je größer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist die Klassifizierungsfähigkeit und somit die Qualität der prognostischen Biomarker. Eine Einordnung und Bewertung der Ergebnisse finden in Kapitel 9.2.1. statt.

Tabelle 11: prognostische Aussagekraft für das Auftreten eines Rezidivs des Anteils CD163 exprimierender TEMs und CD14 $^+$ CD16 $^+$ Monozyten, Anteils CD38 und IFN- γ^+ IL-10 $^+$ exprimierender Tr1-Zellen, Anzahl an CD4 $^+$ Treg mit CD38 Expression, Anteils IL-10 exprimierender CD4 $^+$ Treg, Anteils CD203a exprimierender Th17-Zellen (CCR6 $^+$ CCR4 $^+$); Grenzwert, Sensitivität, Spezifität, Youden-Index, ROC-AUC und p-Wert der prognostischen Biomarker

	Grenzwert	Sensitivität	Spezifität	Youden- Index	ROC- AUC	p-Wert
Anteil CD163 exprimierende TEMs	26,45 %	77 %	90 %	0,67	0,77	0,04
Anteil CD163 exprimierende CD14$^+$ CD16$^+$ Monozyten	22,45 %	77 %	90 %	0,67	0,78	0,03
Anteil CD38 exprimierende Tr1-Zellen	3,99 %	88 %	80 %	0,68	0,82	0,01
Anteil IFN-γ^+ IL-10$^+$ exprimierende Tr1-Zellen	7,17 %	100 %	70 %	0,70	0,77	0,04
CD4$^+$ Treg mit CD38	1,28 %	90 %	70 %	0,60	0,81	0,01

Anteil IL-10 exprimierende CD4⁺ Treg	17,25 %	100 %	60 %	0,60	0,78	0,03
Anteil CD203a exprimierende Th17-Zellen (CCR6⁺ CCR4⁺)	81,05 %	60 %	90 %	0,50	0,77	0,04
Anteil CD203a exprimierende Th17-Zellen (CCR6⁺)	38,10 %	90 %	70 %	0,60	0,81	0,01

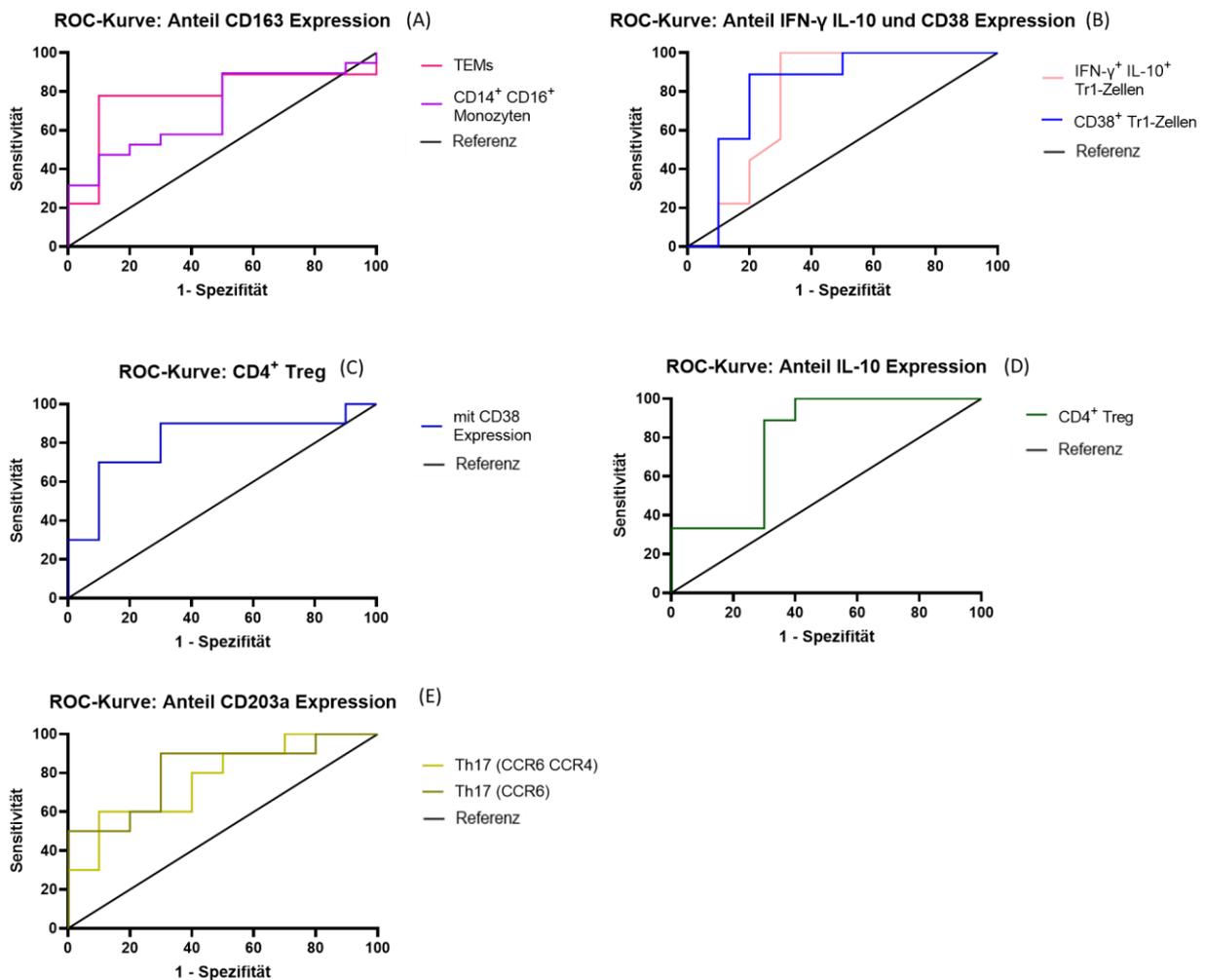


Abbildung 4: ROC-Kurven zur rezidivfreien - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Kohorte LR mit Referenzgraden (A) ROC-Kurve des Anteils an CD163 exprimierenden TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten (B) ROC-Kurve des Anteils an CD38 exprimierenden Tr1-Zellen und IFN- γ ⁺ IL-10⁺ exprimierenden Tr1-Zellen (C) ROC-Kurve der Anzahl an CD4⁺ Treg mit CD38 Expression (D) ROC-Kurve des Anteils an IL-10 exprimierenden CD4⁺ Treg (E) ROC-Kurve der Anteils an CD203a exprimierenden Th17-Zellen (CCR4⁺ CCR6⁺); Statistik: AUC unter der ROC-Kurve mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^* < 0,05$

8.3.3. Erniedrigte NAD⁺-Serumkonzentration in HCC-Patienten mit Leberresektion

Die Messung von NAD⁺ erfolgte aus den Heparinplasmaproben der drei Patientenkohorten laut Protokoll (vgl. Kapitel 7.13). Die NAD⁺-Konzentration im Blut der Patientengruppe, die aufgrund eines HCC eine Leberresektion erhalten haben, war sowohl prä- als auch postoperativ, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, erniedrigt (Abb. 5).

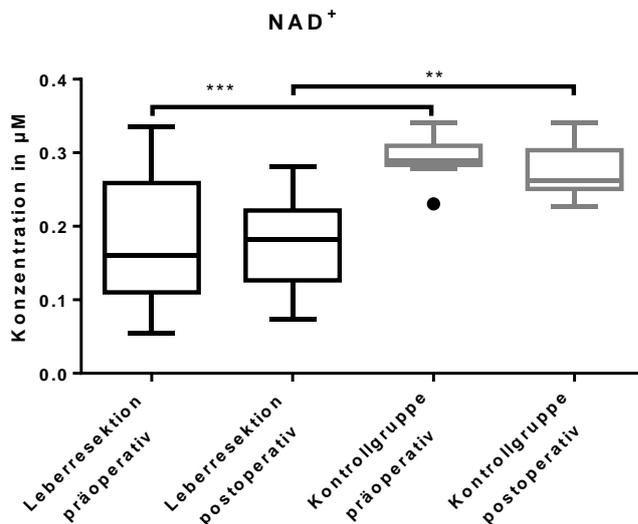


Abbildung 5: prä- und postoperative NAD⁺-Konzentration in µM der Kohorten LR und Ktrl, Box-Plot, Linie MW
Statistik: One-Way ANOVA - und Tukey's multiple comparisons Test mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$

8.3.4. Erniedrigte der Expression der Ektoenzyme der purinergen Signalgebung CD38, CD203a und Cx43 auf T-Zellen in HCC-Patienten mit Leberresektion

Die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression ist in der Patientengruppe, die auf Grund des HCC eine Leberresektion erhalten haben, sowohl prä- als auch postoperativ, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, erniedrigt (Abb. 6).

Ein Einfluss der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression auf das rezidivfreie- und Gesamtüberleben konnte nicht nachgewiesen werden (keine Abb.).

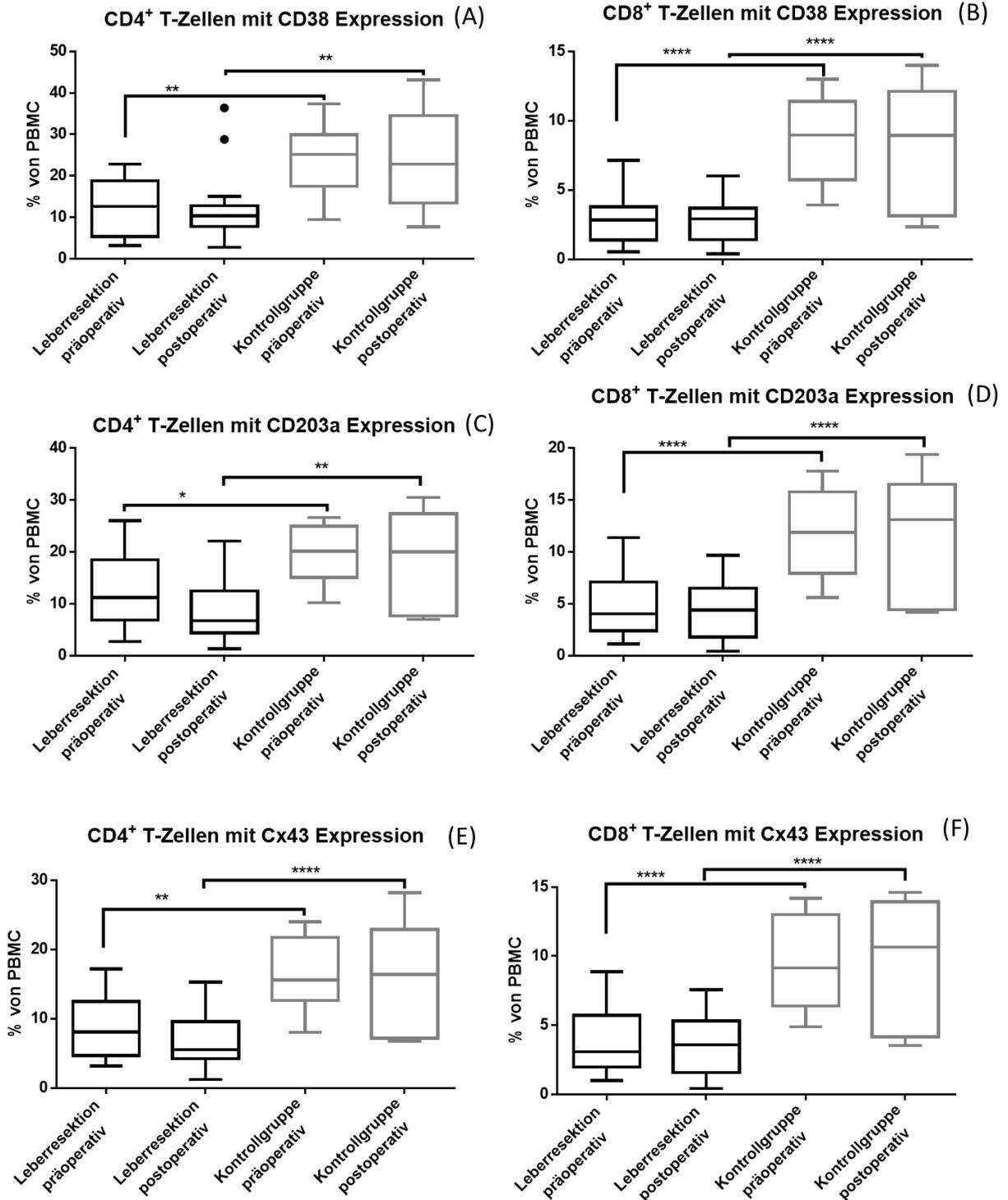


Abbildung 6: prä- und postoperative Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorten LR und der Ktrl, Box-Plot, Linie MW

(A) Anzahl an CD4⁺ T-Zellen mit CD38 Expression (B) Anzahl an CD8⁺ T-Zellen mit CD38 Expression (C) Anzahl an CD4⁺ T-Zellen mit CD203a Expression (D) Anzahl an CD8⁺ T-Zellen mit CD203a Expression (E) Anzahl an CD4⁺ T-Zellen mit Cx43 Expression (F) Anzahl an CD8⁺ T-Zellen mit Cx43 Expression; Statistik: One-Way ANOVA - und Tukey's multiple comparisons Test mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$

Für die Bestimmung von Th1-Zellen ($CD4^+ IFN-\gamma^+$) und CTL ($CD8^+ IFN-\gamma^+$) wurden $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen im Blut der Patienten zytometrisch gemessen, die nach der T-Zell-Stimulation und T-Zellkultur zusätzlich $IFN-\gamma$ exprimieren. Die Anzahl der Th1-Zellen und CTL mit CD38, CD203a und Cx43 Expression ist in der Patientengruppe mit Leberresektion sowohl prä- als auch postoperativ, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, erniedrigt. (Abb. 7). Ein Einfluss der Th1-Zellen und CTL mit CD38, CD203a und Cx43 Expression auf das rezidivfreie- und Gesamtüberleben konnte nicht nachgewiesen werden (keine Abb.).

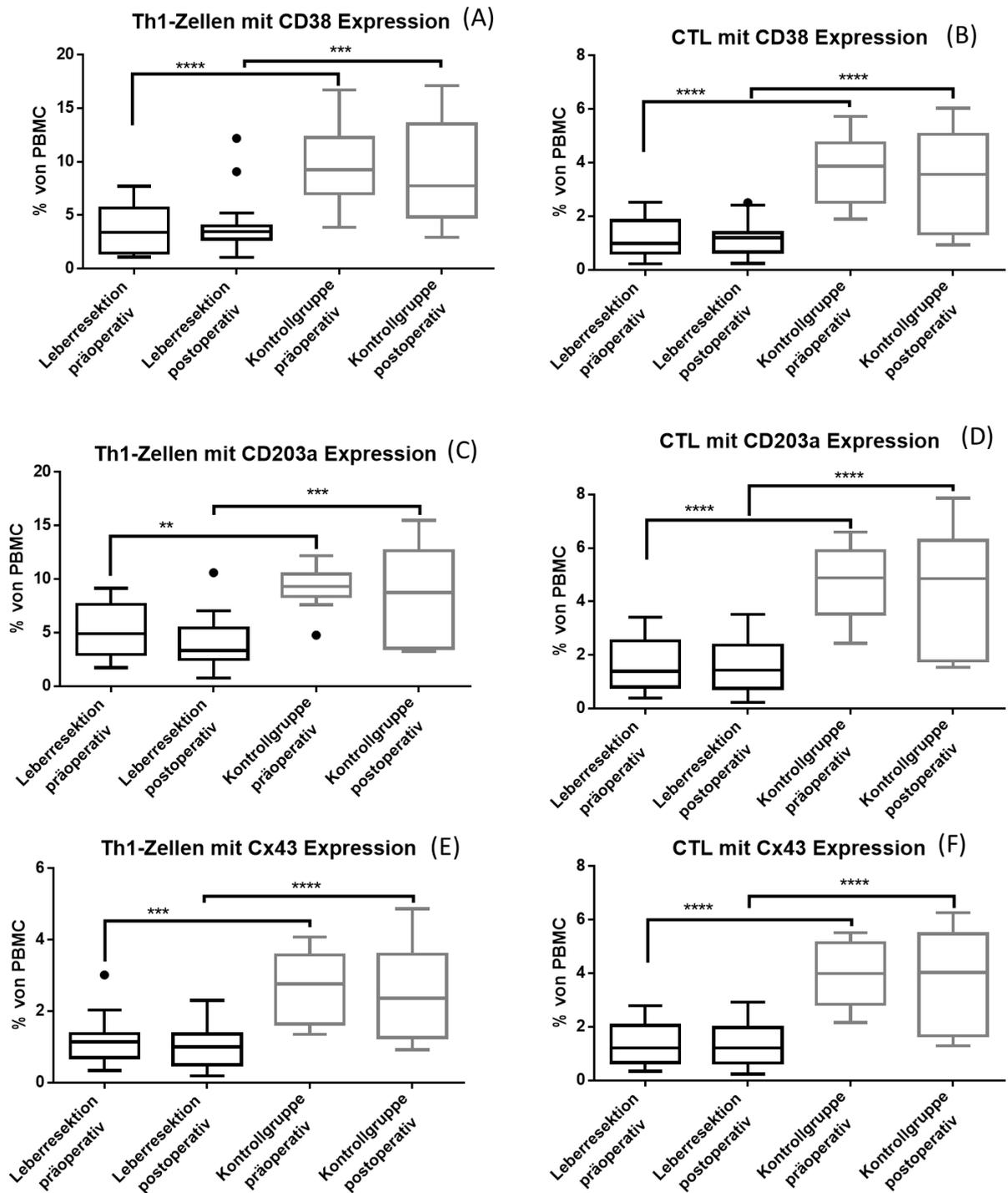


Abbildung 7: prä- und postoperative Anzahl an Th1-Zellen ($CD4^+ IFN-\gamma^+$) und CTL ($CD8^+ IFN-\gamma^+$) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorten LR und der Ktrl, Box-Plot, Linie MW
 (A) Anzahl der Th1-Zellen mit CD38 Expression; (B) Anzahl der CTL mit CD38 Expression; (C) Anzahl der Th1-Zellen mit CD203a Expression; (D) Anzahl der CTL mit CD203a Expression; (E) Anzahl der Th1-Zellen mit Cx43 Expression; (F) Anzahl CTL mit Cx43 Expression; Statistik: One-Way ANOVA - und Tukey's multiple comparisons Test mit dem Konfidenzintervall von $CL=95\%$, wobei ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$, $p^{****}<0,0001$

Patienten mit einer postoperativ erhöhten Anzahl an $CD4^+$ Treg ($IL-10^+$) mit CD38 Expression zeigten ein 7-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und eine mediane rezidivfreie Überlebenszeit von 233 Tagen (Abb. 8A). Patienten mit einem bereits präoperativ erhöhten Anteil an CD38 exprimierenden Tr1-Zellen ($IFN-\gamma^+ IL-10^+$) zeigten ein 6-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und eine mediane rezidivfreie Überlebenszeit von 364 Tagen (Abb. 8C). Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 8B/D).

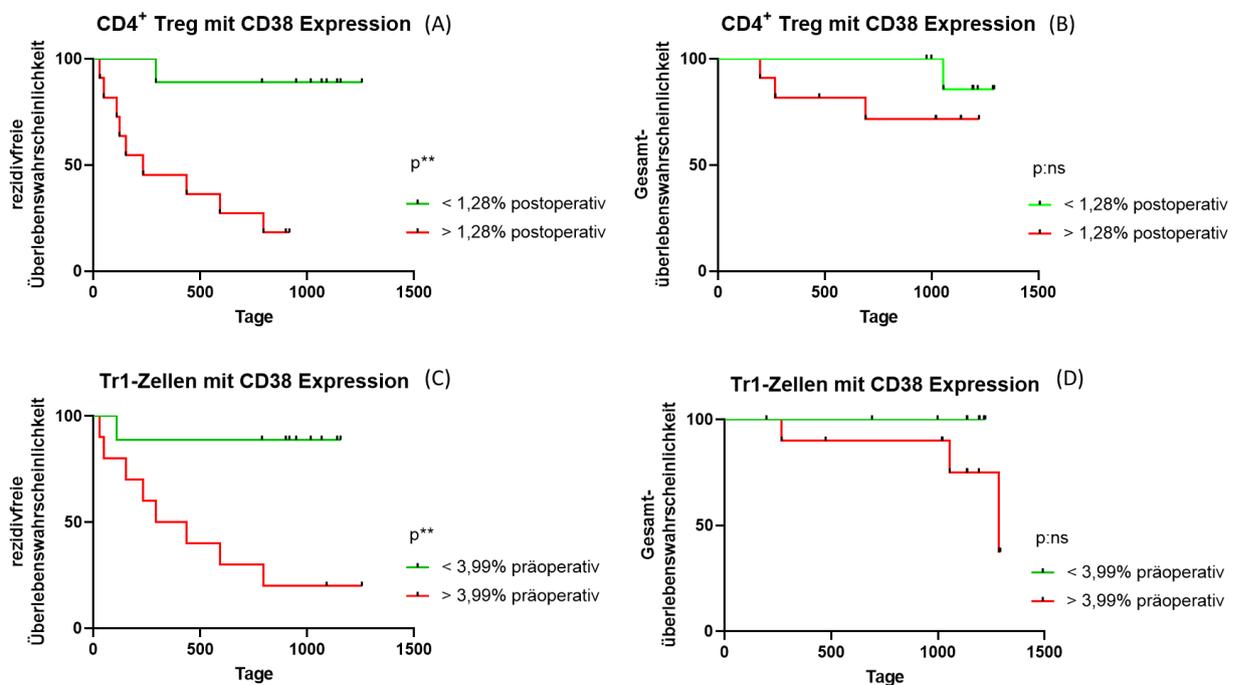


Abbildung 8: rezidivfreie – und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Anzahl der $CD4^+$ Treg ($IL-10^+$) mit CD38 Expression und des Anteils der CD38 exprimierenden Tr1-Zellen ($IFN-\gamma^+ IL-10^+$) der Kohorte LR, Kaplan Meier Kurven
 (A) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit der postoperativen Anzahl an $CD4^+$ Treg mit CD38 Expression, p^{**} (B) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der postoperativen Anzahl an $CD4^+$ Treg mit CD38 Expression, $p:ns$ (C) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an CD38 exprimierenden Tr1-Zellen, p^{**} (D) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an CD38 exprimierenden Tr1-Zellen, $p:ns$; Statistik: Logrank (Mantel-Cox) und Gehan-Breslow-Wilcoxon Test und Hazard Ratio (Mantel-Haenszel und Logrank), mit dem Konfidenzintervall von $CL=95\%$, wobei ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^{**}<0,01$

Unterschiede in der Anzahl an $CD4^+$ Treg oder Tr1-Zellen mit Expression der Ektoenzyme konnten zwischen den Kohorten Leberresektion und der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden (keine Abb.).

Für die Bestimmung von Th17-Zellen wurden CD4⁺ T-Zellen zytometrisch gemessen, die nach der T-Zell-Stimulation und T-Zellkultur zusätzlich die Zytokine IL-17 und/oder IL-22 sowie CCR6⁺ und/oder CCR4⁺ exprimieren. Die Anzahl der Th17-Zellen (CD4⁺ CCR4⁺ CCR6⁺ IL22⁺) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression ist in der Patientengruppe mit Leberresektion sowohl prä- als auch postoperativ, im Vergleich zu der Kontrollgruppe, erniedrigt (Abb. 9).

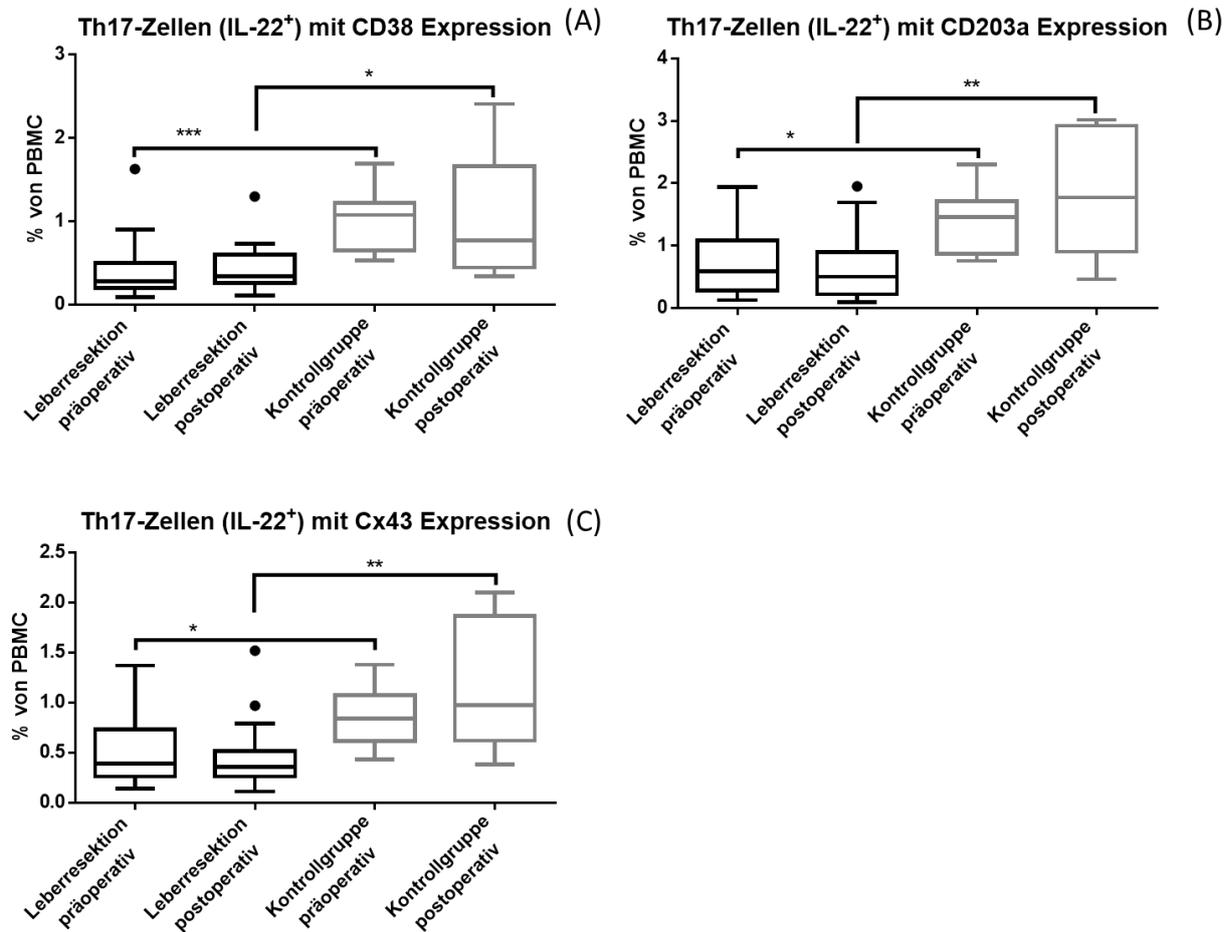


Abbildung 9: prä- und postoperative Anzahl an Th17-Zellen (CD4⁺ CCR4⁺ CCR6⁺ IL22⁺) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorten LR und der Ktrl, Box-Plot, Linie MW

(A) Anzahl an Th17-Zellen mit CD38 Expression (B) Anzahl an Th17-Zellen mit CD203a Expression (C) Anzahl an Th17-Zellen mit Cx43 Expression; Statistik: Kruskal-Wallis und Dunn's multiple comparisons Test mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$

Patienten mit einem postoperativ erhöhten Anteil an CD203a exprimierenden Th17-Zellen ($CCR6^+ CCR4^+$) zeigten ein 6-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und eine mediane rezidivfreie Überlebenszeit von 233 Tagen (Abb. 10A). Ebenso zeigten Patienten mit einem postoperativ erhöhten Anteil an CD203a exprimierenden Th17-Zellen ($CCR6^+$) ein 5-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und eine mediane rezidivfreie Überlebenszeit von 334 Tagen (Abb. 10C).

Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. B/D).

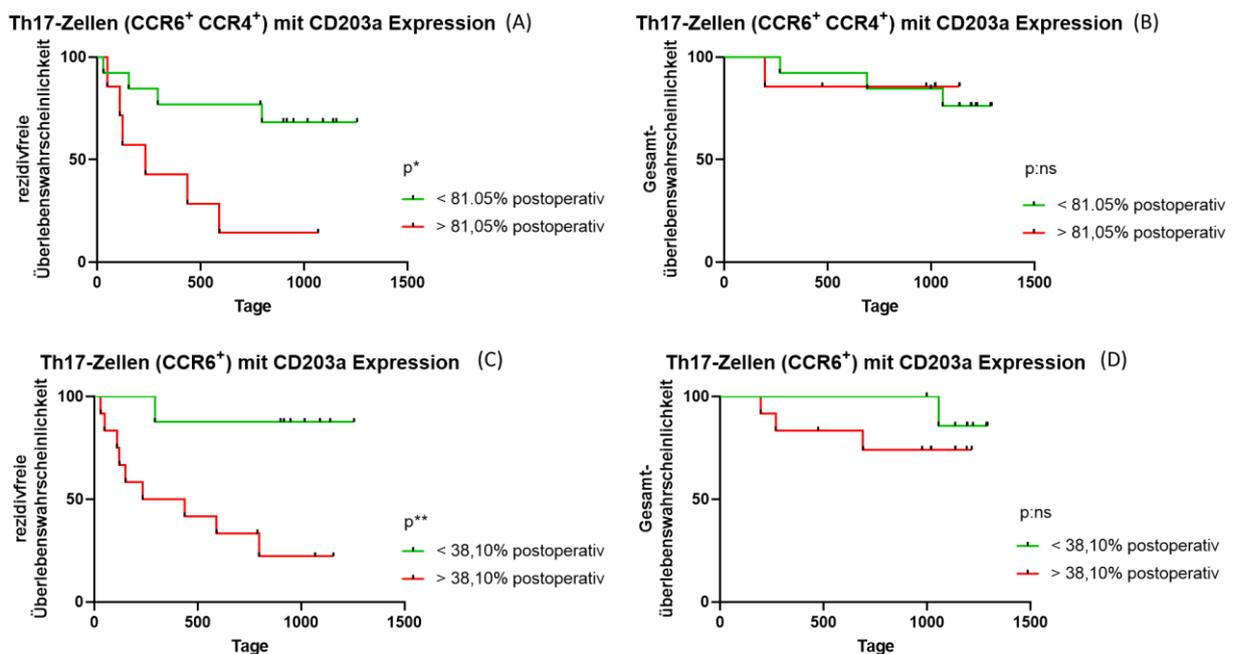
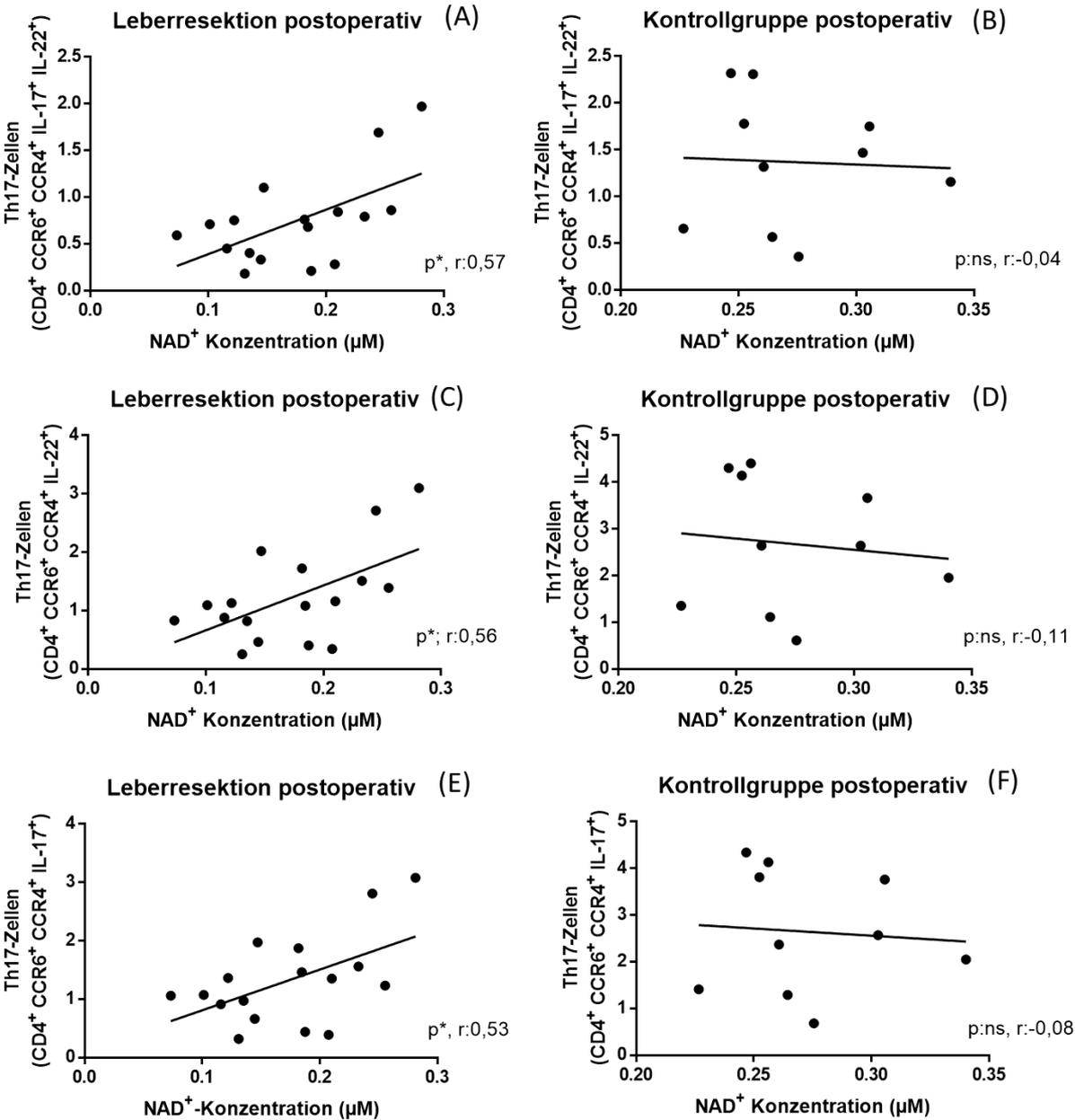


Abbildung 10: rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit der CD203a exprimierenden Th17-Zellen ($CCR6^+ CCR4^+$) und ($CCR6^+$) der Kohorte LR, Kaplan Meier Kurven (A) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit des postoperativen Anteils an CD203a exprimierenden Th17-Zellen ($CCR6^+ CCR4^+$), p^* (B) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des postoperativen Anteils an CD203a exprimierenden Th17-Zellen ($CCR6^+ CCR4^+$), $p:ns$ (C) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit des postoperativen Anteils an CD203a exprimierenden Th17-Zellen ($CCR6^+$), p^{**} (D) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des postoperativen Anteils an CD203a exprimierenden Th17-Zellen ($CCR6^+$), $p:ns$; Statistik: Logrank (Mantel-Cox) und Gehan-Breslow-Wilcoxon Test und Hazard Ratio (Mantel-Haenszel und Logrank), mit dem Konfidenzintervall von $CL=95\%$, wobei ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^*<0,05$, $p^{**}<0,01$

Eine moderat positive Korrelation bei HCC-Patienten mit einer Leberresektion konnte postoperativ zwischen der NAD⁺-Konzentration und den Subpopulationen der Th17-Zellen (CCR6⁺ CCR4⁺) mit sowohl IL-22 als auch IL-17 Expression nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich dieser Zusammenhang nicht (Abb. 11). Präoperativ konnte keine signifikante Korrelation zwischen Th17-Zellen und der NAD⁺-Konzentration nachgewiesen werden (keine Abb.).

Es bestanden ebenfalls keine Korrelationen zwischen den weiteren Subpopulationen der T-Zellen und Monozyten und der NAD⁺-Konzentration (keine Abb.).



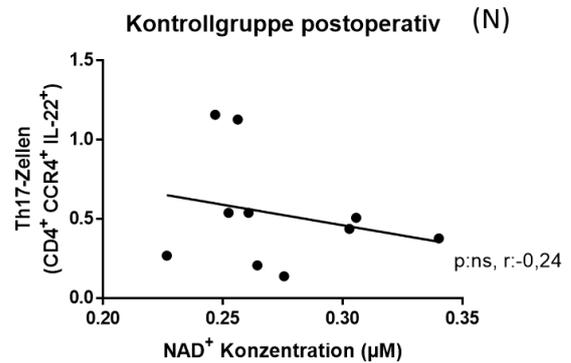
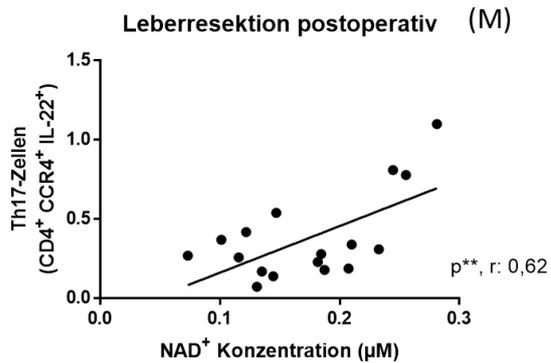
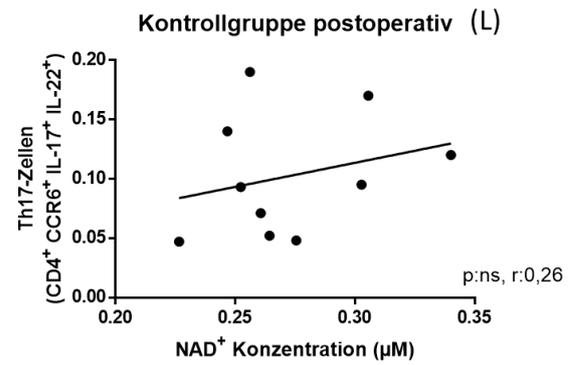
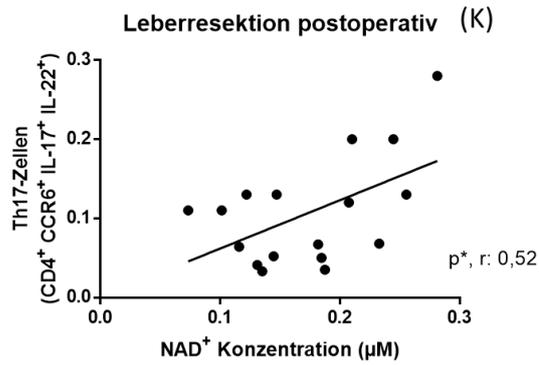
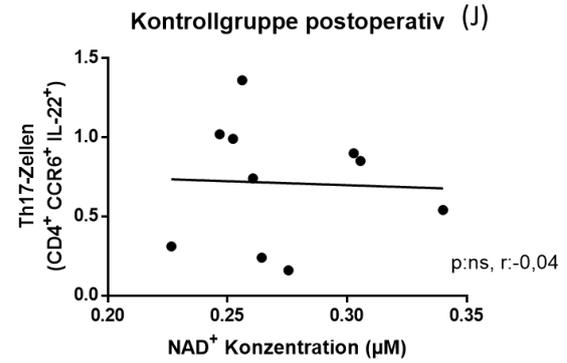
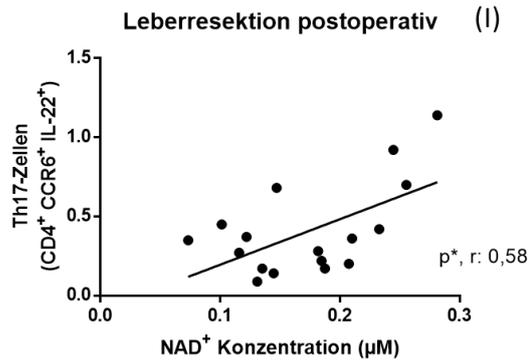
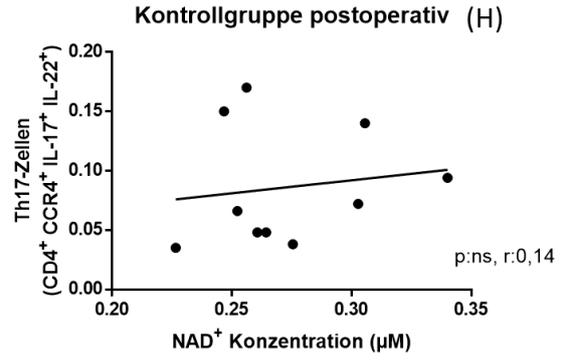
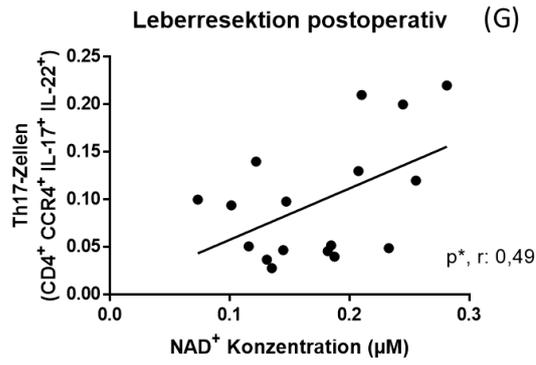


Abbildung 11: postoperative Korrelation Th17-Zellen ($CD4^+ CCR4^+ CCR6^+ IL-17^+ IL-22^+$) und NAD^+ -Konzentration in μM der Kohorten LR und der Ktrl, Streudiagramm mit linearer Regressionsgeraden (A) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ CCR4^+ IL-17^+ IL-22^+$) der Kohorte LR, p^* , $r:0,57$ (B) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ CCR4^+ IL-17^+ IL-22^+$) der Ktrl, $p:ns$, $r:-0,04$ (C) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ CCR4^+ IL-22^+$) der Kohorte LR, p^* ; $r:0,56$ (D) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ CCR4^+ IL-22^+$) der Ktrl, $p:ns$, $r:-0,11$ (E) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ CCR4^+ IL-17^+$) der Kohorte LR, p^* , $r:0,53$ (F) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ CCR4^+ IL-17^+$) der Ktrl, $p:ns$, $r:-0,08$ (G) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ IL-17^+ IL-22^+$) der Kohorte LR, p^* , $r:0,52$ (H) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ IL-17^+ IL-22^+$) der Ktrl, $p:ns$, $r:0,26$ (I) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ IL-22^+$) der Kohorte LR, p^* , $r:0,58$ (J) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR6^+ IL-22^+$) der Ktrl, $p:ns$, $r:-0,04$ (K) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR4^+ IL-17^+ IL-22^+$) der Kohorte LR, p^* , $r:0,49$ (L) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR4^+ IL-17^+ IL-22^+$) der Ktrl, $p:ns$, $r:0,14$ (M) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR4^+ IL-22^+$) der Kohorte LR, p^{**} , $r:0,62$ (N) Korrelation der Th17-Zellen ($CD4^+ CCR4^+ IL-22^+$) der Ktrl, $p:ns$, $r:-0,24$; Statistik: Pearson Korrelation mit dem Konfidenzintervall von $CL=95\%$, wobei ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^*<0,05$, $p^{**}<0,01$

8.3.5. Erniedrigte der Expression der Ektoenzyme der purinergen Signalgebung CD39, A2a und CD163 auf Monozyten und TEMs in HCC-Patienten mit Leberresektion

Die TEMs wurden entsprechend der bereits bekannten Definition als $CD14^+ CD16^+ TIE-2^+$ Monozyten definiert. Ein signifikant höherer Anteil an TEMs exprimierte CD39 sowohl prä- als auch postoperativ in HCC-Patienten mit Leberresektion (Abb. 12 B). Dies konnte präoperativ auch für $CD14^+ CD16^+$ Monozyten nachgewiesen werden (Abb. 12A). Die Patienten der Kontrollgruppe zeigten von prä- zu postoperativ einen signifikanten Anstieg des Anteils an $CD14^+ CD16^+$ Monozyten mit CD39 Expression. In der Subpopulation der klassischen Monozyten ($CD14^+ CD16^-$) konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 12C).

Die Anzahl der im Blut gemessenen TEMs zeigte keine signifikanten Unterschiede. Ebenfalls konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Expression von A2a oder CD163 nachgewiesen werden (keine Abb.).

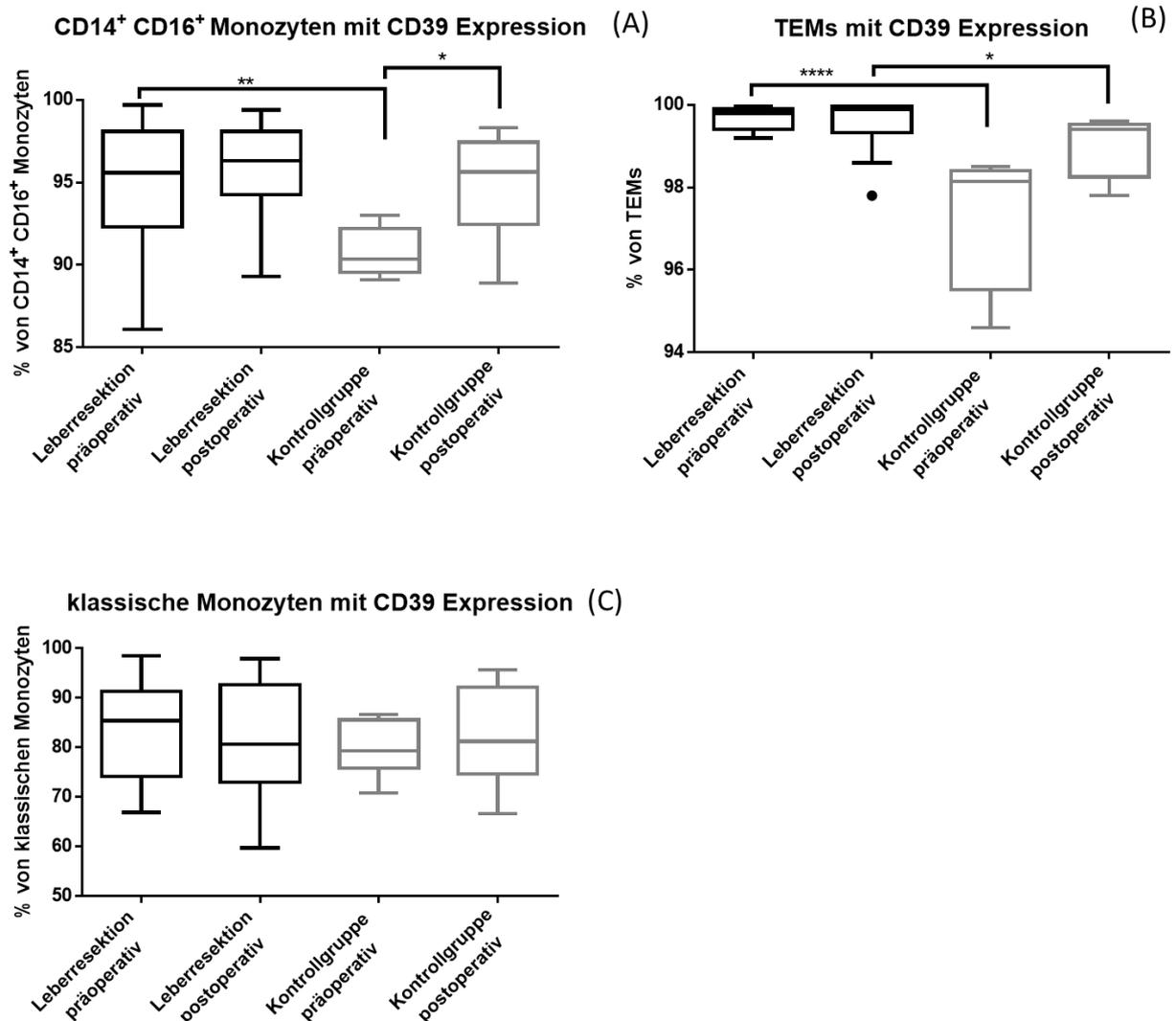


Abbildung 12: prä- und postoperativer Anteil an CD39 exprimierenden CD14⁺ CD16⁺ Monozyten, TEMs und klassischen Monozyten der Kohorten LR und der Ktrl, Box-Plot, Linie MW
 (A) Anteil an CD39 exprimierenden CD14⁺ CD16⁺ Monozyten (B) Anteil an CD39 exprimierenden TEMs (C) Anteil an CD39 exprimierenden klassischen Monozyten; Statistik: Kruskal-Wallis und Dunn's multiple comparisons Test (TEMs) und One-Way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test (CD14⁺ CD16⁺ Monozyten, klassischen Monozyten) mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{****} < 0,0001$

Patienten mit einem bereits präoperativ erhöhten Anteil an CD163 exprimierenden TEMs und CD16⁺ CD14⁺ Monozyten zeigten ein 19-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und eine mediane rezidivfreie Überlebenszeit von 192 Tagen sowie eine 17-fach reduzierte Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit mit einem medianen Gesamtüberleben von 1055 Tagen (2,8 Jahre) (Abb. 13).

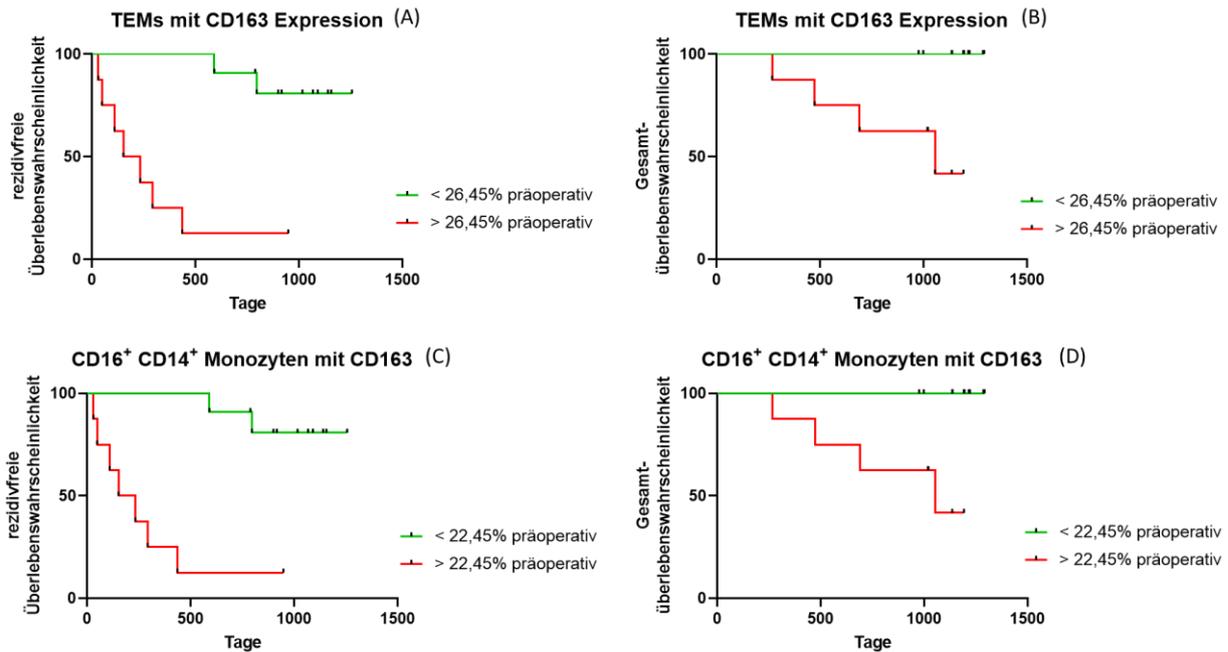


Abbildung 13: rezidivfreie - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der CD163 exprimierenden TEMs und CD16⁺ CD14⁺ Monozyten der Kohorte LR, Kaplan Meier Kurven

(A) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an CD163 exprimierenden TEMs, p*** (B) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an CD163 exprimierenden TEMs, p** (C) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an CD163 exprimierenden CD16⁺ CD14⁺ Monozyten, p*** (D) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an CD163 exprimierenden CD16⁺ CD14⁺ Monozyten, p**; Statistik: Logrank (Mantel-Cox) und Gehan-Breslow-Wilcoxon Test und Hazard Ratio (Mantel-Haenszel und Logrank), mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von p<0,05 zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; p**<0,01, p***<0,001

8.3.6. Erniedrigte Zytokinexpression der Subtypen der T-Zellen in HCC-Patienten mit Leberresektion

Die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen ist in der Patientengruppe mit Leberresektion sowohl prä- als auch postoperativ, im Vergleich zur Kontrollgruppe, erniedrigt. Dieser Unterschied zeigte sich bei der Betrachtung der CD4⁺ T-Zellen nicht (Abb. 14A/B). Th1-Zellen (CD4⁺ IFN- γ ⁺) und CTL (CD8⁺ IFN- γ ⁺), zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten. Bei Patienten mit einem HCC ist die Anzahl von IFN- γ exprimierenden CTL, im Vergleich zu der Kontrollgruppe sowohl prä- als auch postoperativ erniedrigt. Die Untersuchung der Th1-Zellen konnte nur postoperativ eine signifikante Erniedrigung in der Anzahl an Th1-Zellen in der Patientengruppe mit Leberresektion feststellen (Abb. 14C/D). Allerdings zeigte sich in Gegensatz dazu, dass sowohl prä- als auch postoperativ bei HCC-Patienten mit Leberresektion weniger Th1-Zellen IFN- γ exprimierten als bei Patienten der Kontrollgruppe. Dies konnte bei den IFN- γ exprimierenden CTL nicht beobachtet werden (Abb. 14E/F).

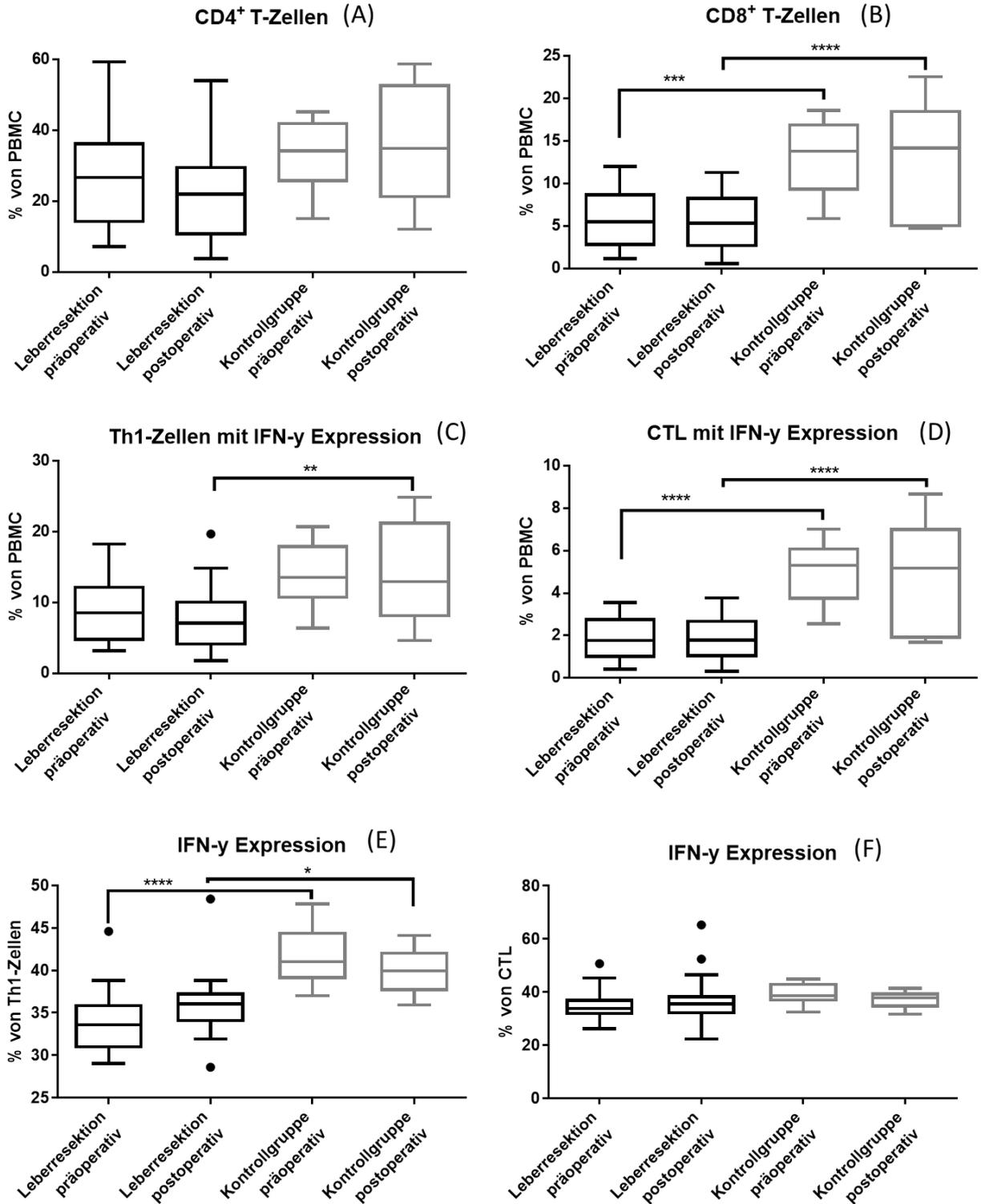


Abbildung 14: prä- und postoperative Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie Th1-Zellen und CTL mit IFN- γ Expression und der Anteil der IFN- γ exprimierenden Th1-Zellen und CTL der Kohorten LR und der Ktrl, Box-Plot, Linie MW (A) Anzahl CD4⁺ T-Zellen; (B) Anzahl der CD8⁺ T-Zellen; (C) Anzahl der Th1-Zellen mit IFN- γ Expression; (D) Anzahl der CTL mit IFN- γ Expression; (E) Anteil an IFN- γ exprimierenden Th1-Zellen; (F) Anteil an IFN- γ exprimierenden CTL; Statistik: One-Way ANOVA - und Tukey's multiple comparisons Test mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$

Ein Einfluss der CD4⁺ - und CD8⁺ T-Zellen mit IFN- γ Expression auf das rezidivfreie- und Gesamtüberleben konnte nicht nachgewiesen werden (keine Abb.).

Allerdings zeigten Patienten mit einem bereits präoperativ erhöhten Anteil an IL-10 exprimierenden CD4⁺ Treg ein 5-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und eine mediane rezidivfreie Überlebenszeit von 436 Tagen (Abb 15A). Patienten mit einem bereits präoperativ erhöhten Anteil an IL-10⁺ IFN- γ ⁺ exprimierenden Tr1-Zellen zeigten ein 7-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und eine mediane rezidivfreie Überlebenszeit von 364 Tagen (Abb. 15C). Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 15B/D).

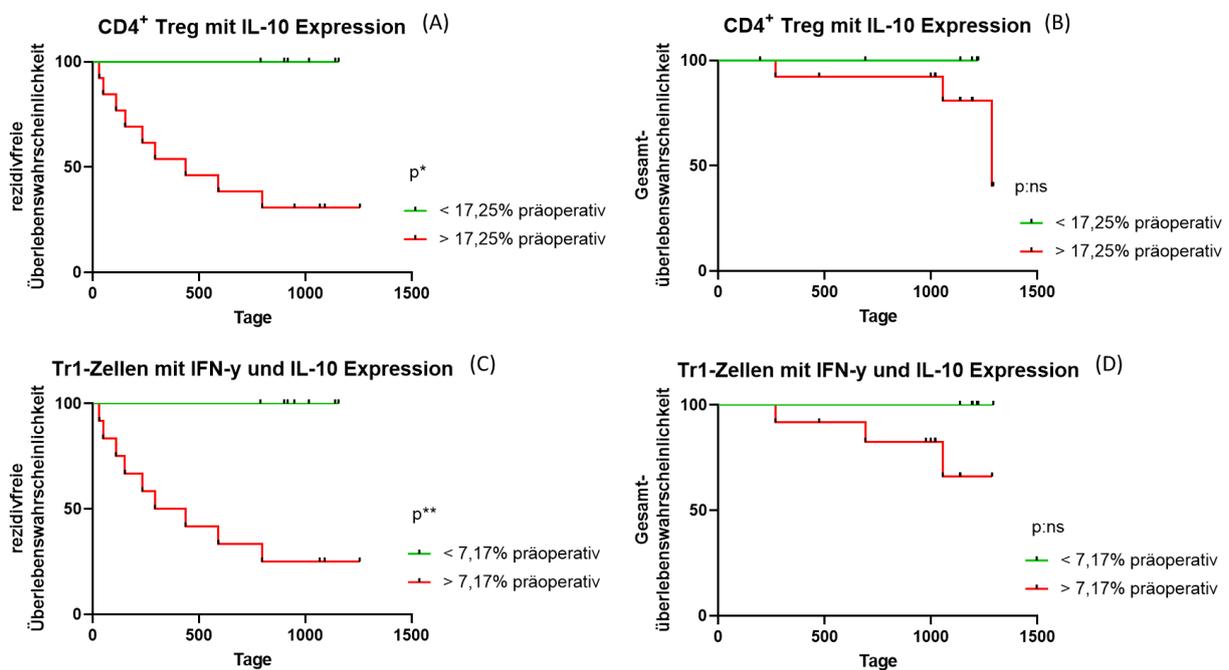


Abbildung 15: rezidivfreie – und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der IL-10 exprimierenden CD4⁺Treg und IL-10⁺ IFN- γ ⁺ exprimierenden Tr1-Zellen der Kohorte LR, Kaplan Meier Kurven (A) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an IL-10 exprimierenden CD4⁺ Treg, p* (B) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an IL-10 exprimierenden CD4⁺ Treg, p:ns (C) rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an IL-10⁺ IFN- γ ⁺ exprimierenden Tr1-Zellen, p** (D) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des präoperativen Anteils an IL-10⁺ IFN- γ ⁺ exprimierenden Tr1-Zellen, p:ns; Statistik: Logrank (Mantel-Cox) und Gehan-Breslow-Wilcoxon Test und Hazard Ratio (Mantel-Haenszel und Logrank), mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von p<0,05 zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; p* < 0,05, p** < 0,01

Unterschiede in der Anzahl an CD4⁺ Treg oder Tr1-Zellen mit Expression der Zytokine konnten zwischen den Kohorten Leberresektion und der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden (keine Abb.).

8.3.7. Evaluation der Aussagekraft der diagnostischen Biomarker der Patienten mit Leberresektion

In Kapitel 8.3.3. - 8.3.6. konnten in der Patientengruppe mit Leberresektion signifikante Unterschiede in den zytometrische gemessenen Immunzellen im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden. Dementsprechend wurden die prä- und postoperativ signifikant unterschiedlichen T-Zellen und Monozyten mit Expression der Ektoenzyme und Rezeptoren der purinergen Signalgebung dahingehend untersucht, ob sie als diagnostische Biomarker für das Auftreten eines HCC geeignet sind. Für die Evaluation der diagnostischen Qualität und folglich der Aussagekraft der Unterscheidbarkeit der potenziellen diagnostischen Biomarker zwischen an einem HCC erkrankten Patienten und nicht-erkrankten Patienten der Kontrollgruppe wurde eine ROC-Kurve erstellt (Abb. 16). Als Maß für die Beschreibung der Kurve wird die Fläche unter der Kurve (ROC-AUC) verwendet. In Ergänzung wurde der Youden-Index für die Auswahl des bestmöglichen Grenzwertes, der in der Lage ist zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv zu unterscheiden, bestimmt (vgl. Kapitel 7.14.).

In der Tabelle 12 sind die ermittelten Grenzwerte der diagnostischen Biomarker sowie deren Sensitivität und Spezifität im Hinblick auf die Vorhersage eines HCC, die ROC-AUC und der Youden-Index dargestellt. Der Grenzwert mit dem höchsten Youden-Index von 1 liegt bei dem Anteil der CD39 exprimierenden TEMs bei 98,85 %. Damit weisen der Anteil an CD39 exprimierenden TEMs die bestmögliche Unterscheidbarkeit zwischen Patienten mit und ohne ein HCC auf. Einen ebenfalls sehr hohen Youden-Index mit 0,90, 0,84 und 0,80 haben die CTL (CD8⁺ IFN- γ ⁺) mit Expression von CD38, CD203a, Cx43 und IFN- γ mit den Grenzwerten 3,62 %, 2,43 %, 3,00 % und 2,88 %. Auch hier liegt eine hohe Unterscheidbarkeit zwischen Erkrankten und Nicht-Erkrankten vor.

Der Anteil der CD39 exprimierenden CD14⁺ CD16⁺ Monozyten mit einem Grenzwert von 93,05 % weisen eine Spezifität von 100 % auf. Ebenfalls eine Spezifität von 100 % weisen die Th17-Zellen (CCR4⁺ CCR6⁺ IL-22⁺) mit CD38 und CD203a Expression auf mit einem Grenzwert von 0,51 % und 0,74 % auf. Die Spezifität der Th17-Zellen (CCR4⁺ CCR6⁺ IL-22⁺) mit Cx43 mit einem Grenzwert von 0,51 % liegt bei 90%. Auch die NAD⁺-Konzentration mit einem Grenzwert von 0,26 μ M hat eine Spezifität von 90 %. Des Weiteren ist eine Spezifität von 70 % bzw. 90 % der CD4⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 mit den Grenzwerten 23,60 %, 13,25 % und 11,25 % nachgewiesen wurden. Damit sind sie am bestmöglichen geeignet um Patienten, die kein HCC aufweisen, als solche zu erkennen.

Die Th1-Zellen mit der Expression der Ektoenzyme CD38, CD203a und Cx43 sowie die IFN- γ

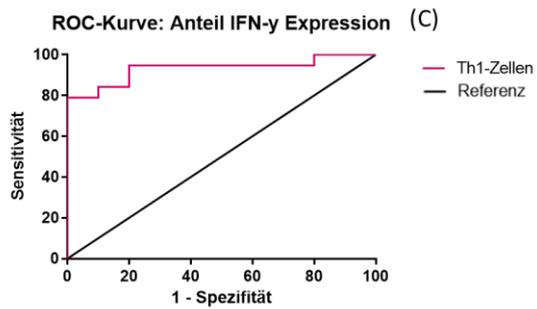
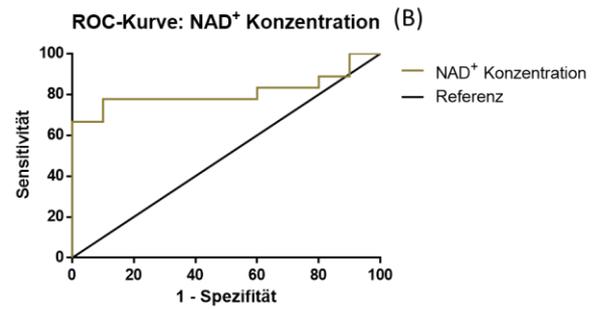
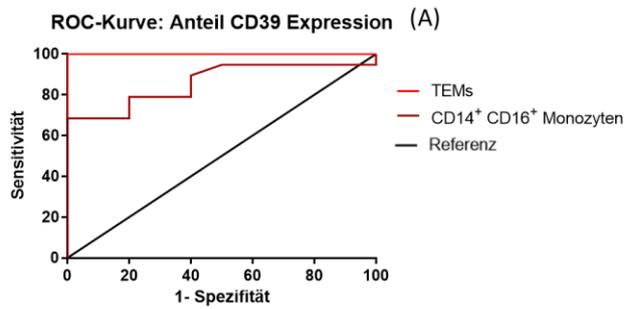
exprimierenden Th1-Zellen mit den Grenzwerten 7,25 %, 8,83 %, 1,53 % und 36,50 % weisen mit 94 %, bzw. 84 % und 78 % eine hohe Sensitivität auf. Damit sind sie gut geeignet, um Patienten, die ein HCC aufweisen, als solche zu determinieren.

Die CD8⁺ T-Zellen allein, als auch mit Expression der Ektoenzyme CD38, CD203a und Cx43 mit den Grenzwerten 12,45 %, 3,86 %, 8,00 % und 4,82 % weisen mit 0,92, 0,93 und 0,94 hohe Werte der ROC-AUC auf. Je größer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist die Klassifizierungsfähigkeit und somit die Qualität der diagnostischen Biomarker. Eine Einordnung und Bewertung der Ergebnisse finden in Kapitel 9.2.1 statt.

Tabelle 12: diagnostische Aussagekraft für das Auftreten eines HCC der NAD⁺-Konzentration, des Anteils CD39 exprimierender TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten, der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, der Anzahl an Th1-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, des Anteils IFN- γ exprimierender Th1-Zellen, der Anzahl CD8⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, der Anzahl CTL mit CD38, CD203a und Cx43 Expression, der Anzahl Th17-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression; Grenzwert, Sensitivität, Spezifität, Youden-Index, ROC-AUC und p-Wert der diagnostischen Biomarker

	Cut-Off	Sensitivität	Spezifität	Youden- Index	ROC- AUC	p-Wert
NAD⁺-Konzentration	0,26 μ M	77 %	90 %	0,67	0,81	0,007
Anteil CD39 exprimierende TEMs	98,85 %	100 %	100 %	1	1	<0,0001
Anteil CD39 exprimierende CD14⁺ CD16⁺ Monozyten	93,05 %	68 %	100 %	0,68	0,86	0,001
CD4⁺ T-Zellen mit CD38	23,60 %	100 %	70 %	0,70	0,86	0,001
CD4⁺ T-Zellen mit CD203a	13,25 %	63 %	90 %	0,53	0,78	0,01
CD4⁺ T-Zellen mit Cx43	11,25 %	73 %	90 %	0,63	0,86	0,001
Th1-Zellen mit CD38	7,25 %	94 %	80 %	0,74	0,92	0,0002
Th1-Zellen mit CD203a	8,83 %	94 %	70 %	0,64	0,90	0,0004
Th1-Zellen mit Cx43	1,53 %	84 %	90 %	0,74	0,92	0,0002
Anteil IFN-γ exprimierende Th1-Zellen	36,50 %	78 %	100 %	0,78	0,93	0,0001
CD8⁺ T-Zellen	12,45 %	100 %	70 %	0,70	0,92	0,0002
CD8⁺ T-Zellen mit CD38	3,86 %	78 %	100 %	0,78	0,94	<0,0001
CD8⁺ T-Zellen mit CD203a	8,00 %	94 %	80%	0,74	0,93	0,0001
CD8⁺ T-Zellen mit Cx43	4,82 %	73%	100 %	0,73	0,92	0,0002
CTL mit IFN- γ	3,62 %	100 %	90 %	0,90	0,97	<0,0001
CTL mit CD38	2,43 %	94 %	90 %	0,84	0,97	<0,0001
CTL mit CD203a	3,00 %	94 %	90 %	0,84	0,96	<0,0001
CTL mit Cx43	2,88 %	100 %	80 %	0,80	0,96	<0,0001

Th17 (CCR4⁺ CCR6⁺ IL-22⁺) mit CD38	0,51 %	78 %	100 %	0,78	0,90	0,0004
Th17 (CCR4⁺ CCR6⁺ IL-22⁺) mit CD203a	0,74 %	63 %	100 %	0,63	0,83	0,003
Th17 (CCR4⁺ CCR6⁺ IL-22⁺) mit Cx43	0,51 %	68 %	90 %	0,58	0,81	0,005



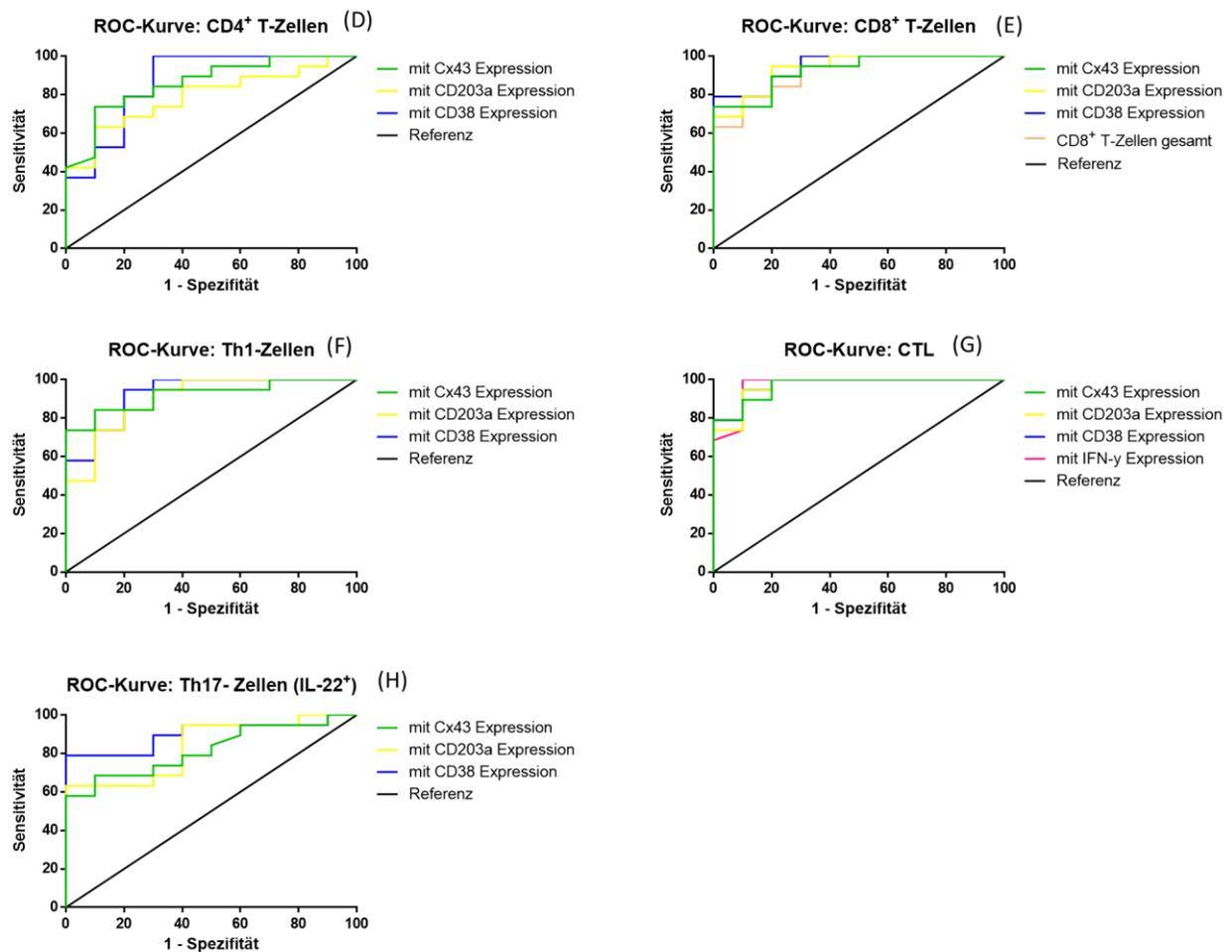


Abbildung 16: ROC-Kurven zur diagnostischen Aussagekraft der Biomarker der Kohorten LR und der Ktrl. mit Referenzgeraden (A) ROC-Kurve des Anteils an CD39 exprimierenden TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten (B) ROC-Kurve der NAD⁺-Konzentration (C) ROC-Kurve des Anteils an IFN- γ exprimierenden Th1-Zellen (D) ROC-Kurve der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression (E) ROC-Kurve der Anzahl der CD8⁺ T-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression (F) ROC-Kurve der Anzahl Th1-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression (G) ROC-Kurve der Anzahl CTL mit CD38, CD203a und Cx43 Expression (H) ROC-Kurve der Anzahl Th17 (CCR4⁺ CCR6⁺ IL-22⁺) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression; Statistik: AUC unter der ROC-Kurve mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$

8.4. Ergebnisse der Kohorte Lebertransplantation

8.4.1. Einfluss der postoperativen Immunsuppression auf die Subtypen der T-Zellen nach Lebertransplantation

Die Kohorte der HCC-Patienten erhielt als einzige untersuchte Patientengruppe postoperativ verschiedene immunsuppressive Medikamente. Die Patienten mit einer Lebertransplantation zeigten postoperativ eine signifikante Abnahme der Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 17). Auf einen Vergleich der drei Kohorten wurde in der weiteren Untersuchung verzichtet, stattdessen wurden die zytometrisch gemessenen T-Zellen und Monozyten der transplantierten Patienten innerhalb der Kohorte zu verschiedenen Messzeitpunkten betrachtet.

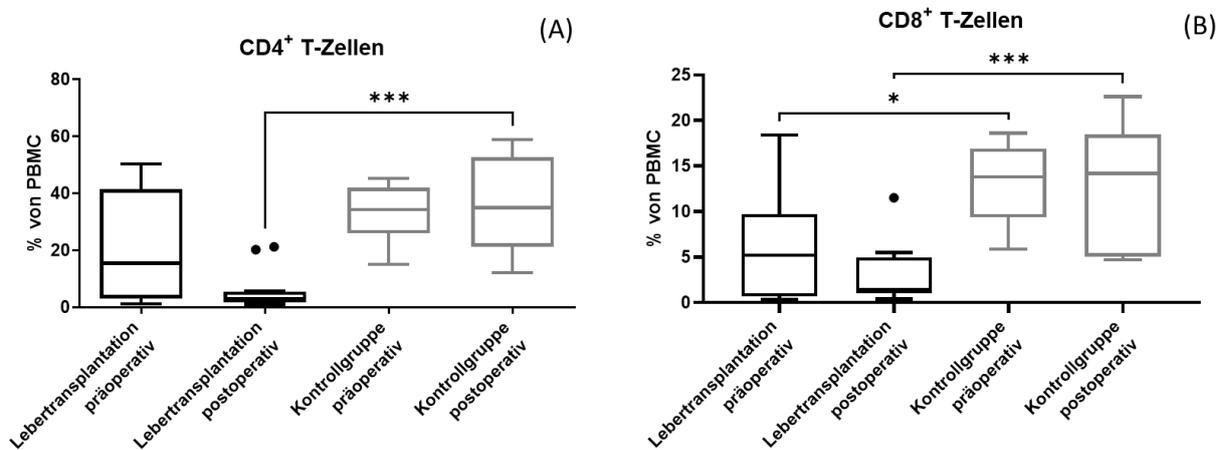


Abbildung 17: prä- und postoperative Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen der Kohorten LTX und Ktrl (A) Anzahl CD4⁺ T-Zellen (B) Anzahl CD8⁺ T-Zellen; Statistik: One-Way ANOVA - und Tukey's multiple comparisons Test mit dem Konfidenzintervall von CL=95%, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^* < 0,05$, $p^{***} < 0,001$

8.4.2. Risikoanalyse einer ACR und eines IRI nach Lebertransplantation anhand der warmen - und kalten Ischämiezeit

In der Patientengruppe Lebertransplantation wurden die warme (WIT) und kalte Ischämiezeit (CIT) in den drei Subgruppen der Patienten mit ACR, IRI und ohne Abstoßung betrachtet. Die CIT ist in der Patientengruppe mit einem IRI im Vergleich zu den Patienten mit einer bioptisch nachgewiesenen ACR sowie ohne Abstoßung signifikant erhöht (Abb. 18). Keine Unterschiede konnten bei der Betrachtung der WIT nachgewiesen werden.

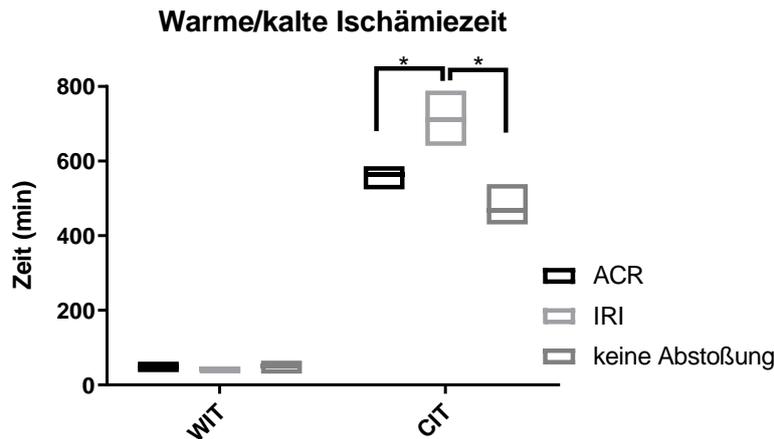


Abbildung 18: WIT und CIT der Kohorte LTX, Low-High-Floating-Bar, Linie MW
 Statistik: Multiple T-Test, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^* < 0,05$

8.4.3. Risikoanalyse einer ACR und eines IRI nach Lebertransplantation anhand der Expression der Ektoenzyme der purinerger Signalgebung CD38, CD203a und Cx43 auf T-Zellen

In der Kohorte Lebertransplantation zeigte sich bei der Betrachtung der Subpopulation der Th17-Zellen ($CCR6^+ IL-17^+$) bereits präoperativ bei Patienten mit einem IRI nach Transplantation eine signifikant erhöhte Anzahl der Th17-Zellen mit CD38, CD203a und Cx43 Expression (Abb. 19). Bei Patienten mit einer bioptisch gesicherten ACR ist ebenfalls die Anzahl der Th17-Zellen ($CCR6^+ IL-17^+$) mit Cx43 Expression zum Zeitpunkt der Leberpunktion erhöht (Abb. 19C). Postoperativ konnten diese signifikanten Unterschiede nicht nachgewiesen werden.

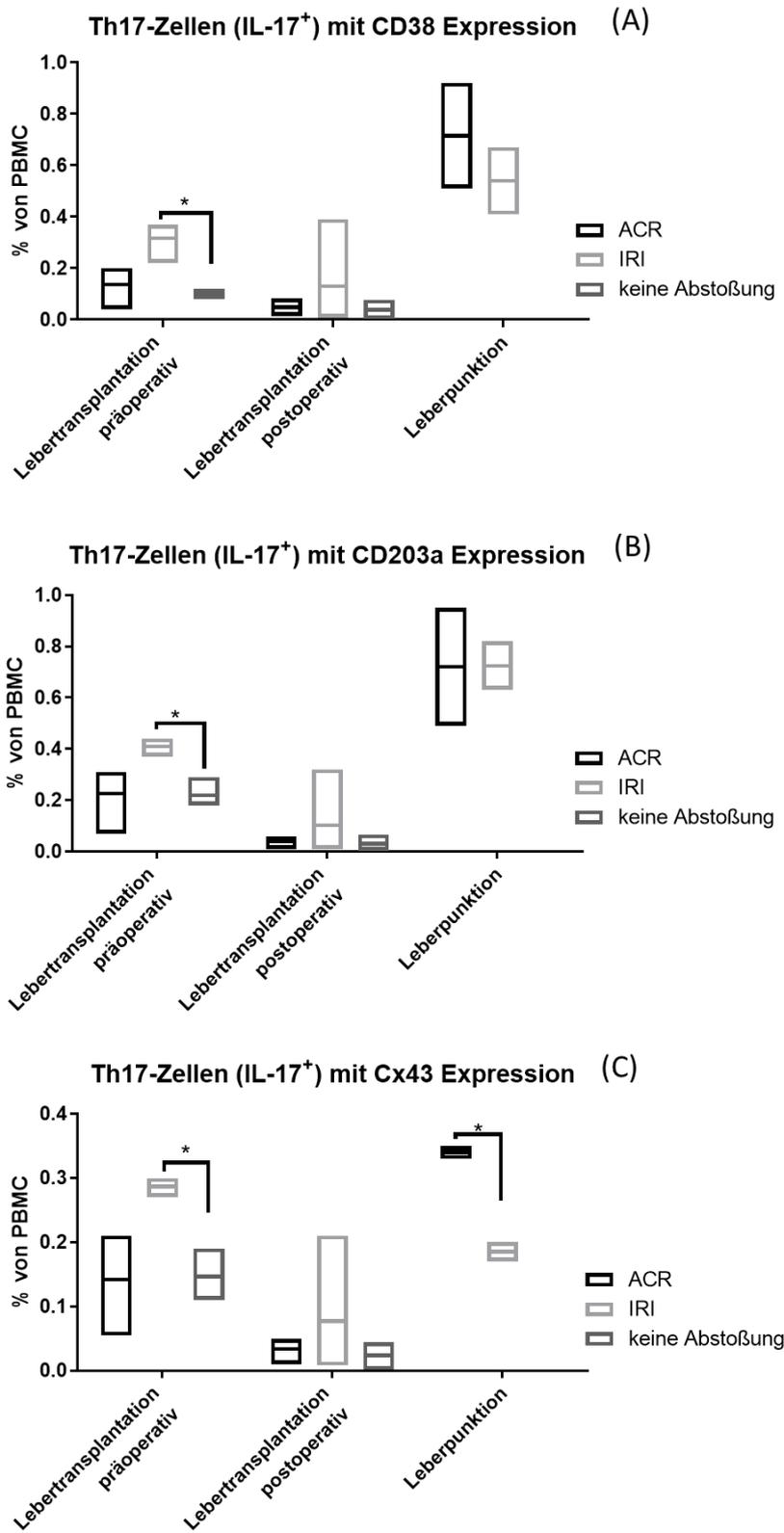


Abbildung 19: Anzahl der Th17-Zellen (CD4⁺ CCR6⁺ IL-17⁺) mit CD38, CD203a und Cx43 Expression der Kohorte LTX, prä- und postoperativ und zum Zeitpunkt der Leberpunktion, Low-High-Floating-Bar, Linie MW
 (A) Anzahl der Th17-Zellen mit CD38 Expression (B) Anzahl der Th17-Zellen mit CD203a Expression (C) Anzahl der Th17-Zellen mit Cx43 Expression; Statistik: Multiple T-Test, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p < 0,05$

8.4.4. Risikoanalyse einer ACR und eines IRI nach Lebertransplantation anhand der Ektoenzyme der purinergen Signalgebung CD39 und A2a sowie CD163 auf Monozyten und TEMs

In der Gruppe der Patienten mit Lebertransplantation zeigte sich, dass bei Patienten mit einer ACR nach Transplantation bereits präoperativ sowohl weniger TEMs als auch CD16⁺ CD14⁺ Monozyten das Ektoenzym CD39 exprimierten (Abb. 20A/B). Die klassischen Monozyten (CD14⁺ CD16⁻) zeigten diesen signifikanten Unterschied nicht (Abb. 20C). Postoperativ oder zum Zeitpunkt der Leberpunktion konnten diese signifikanten Unterschiede nicht nachgewiesen werden.

Keine signifikanten Unterschiede konnten ebenfalls bei der Expression von A2a oder CD163 nachgewiesen werden (keine Abb.).

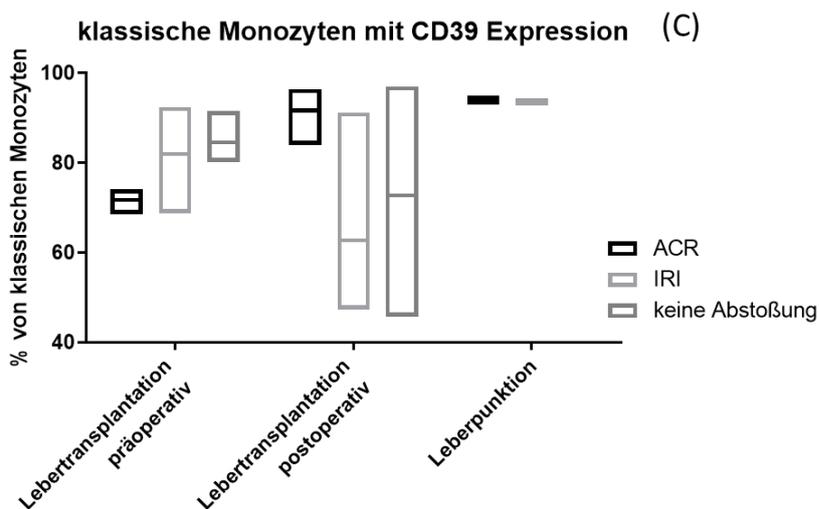
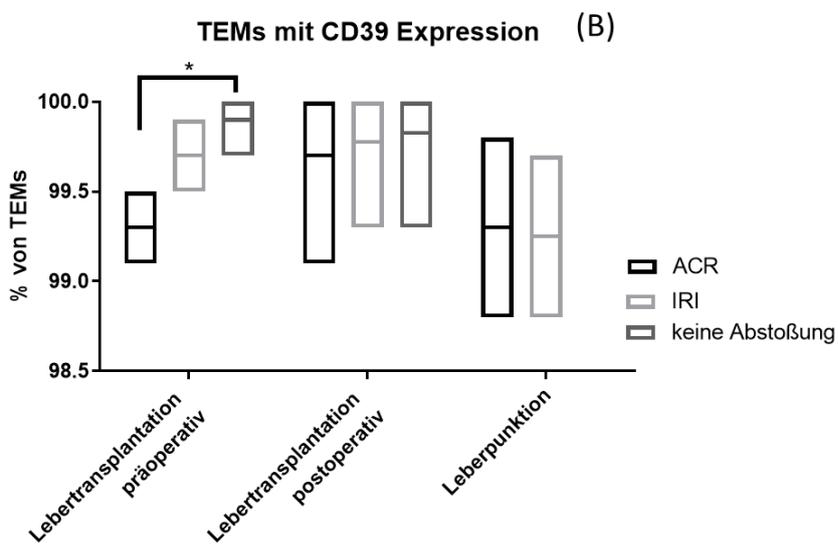
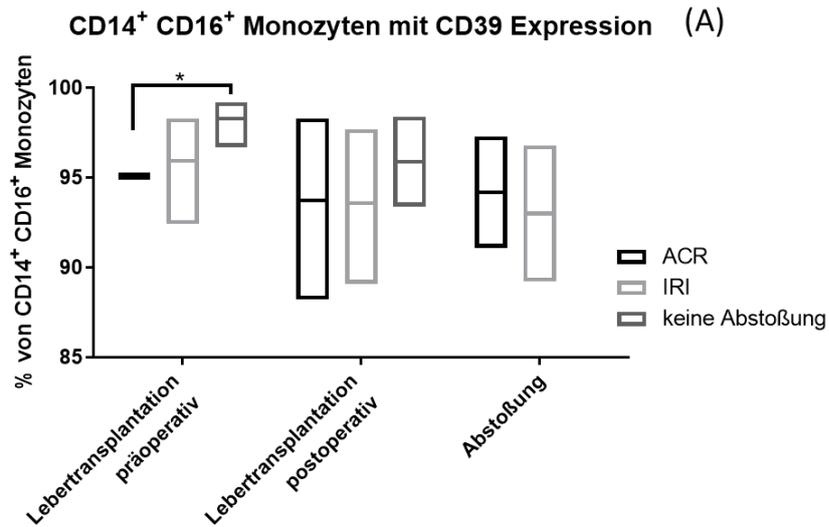


Abbildung 20: Anteil an CD39 exprimierenden CD14⁺ CD16⁺ Monozyten, klassischen Monozyten und TEMs der Kohorte LTX prä-, postoperativ und zum Zeitpunkt der Leberpunktion, Low-High-Floating-Bar, Linie MW
 (A) Anteil an CD39 exprimierenden CD14⁺ CD16⁺ Monozyten (B) Anteil an CD39 exprimierenden TEMs (C) Anteil an CD39 exprimierenden klassischen Monozyten; Statistik: Multiple T-Test, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese angewendet wurde; $p^* < 0,05$

9. Diskussion

9.1. Diskussion der Ergebnisse

Das purinerge Signalsystem hat erhebliche Auswirkungen auf Wachstum, Überleben und Progression eines soliden Tumors, indem es nicht nur den Tumor selbst, sondern auch die Immunreaktionen und die mit ihm verbundene TME beeinflusst (Di Virgilio and Adinolfi, 2017). Die hier untersuchten Ektoenzyme wurden bereits auf verschiedenen Zelltypen nachgewiesen. Die räumliche Anordnung der Ektoenzyme wird entweder als kontinuierlich beschrieben, insofern verschiedene Typen simultan auf der gleichen Zelle vorkommen, oder als diskontinuierlich für den Fall einer Aufteilung auf verschiedene Zellen (Horenstein et al., 2013). Eine Besonderheit der Achse CD38/CD203a/CD73 ist, dass sie bimodale Operation aufweisen kann. Für die diskontinuierliche Ektoenzymanordnung der Achse konnte gezeigt werden, dass sich deren Wechselwirkungen in räumlich begrenzten Systemen verstärken (Horenstein et al., 2013). Die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Daten sind im Einklang damit und sprechen dafür, dass die Achse CD38/CD203/Cx43 ebenfalls eine diskontinuierliche Verteilung aufweist.

Die extrazelluläre Nukleotidhydrolyse wird durch mehrere Familien von Ektonukleotidasen gesteuert, die hier bei Patienten mit einem HCC und einer Leberresektion im Gegensatz zu der Kontrollgruppe, im Blut signifikant erniedrigt nachgewiesen werden konnten. Gleichzeitig liegt eine signifikant erniedrigte NAD^+ -Konzentration vor. Unter diversen pathologischen Bedingungen ist sowohl die Freisetzung von Nukleotiden als auch die Expression der purinergen Rezeptoren in geschädigten oder gestressten Zellen deutlich erhöht (Luthje, 1989). Die HCC-Patienten zeigten konträre Ergebnisse. Die erniedrigte NAD^+ -Konzentration bei HCC-Patienten könnte Folge eines verstärkten Abbaus von NAD^+ zu Adenosin sein, mit dem Ergebnis, dass eine hypoxische und immunsuppressive Immunreaktion begünstigt wird. Die Erniedrigung der Ektoenzymexpression in dieser Untersuchung kann als Reaktion auf die niedrige NAD^+ -Konzentration im Serum interpretiert werden. Zukünftige Untersuchungen weiterer prä- und postoperativer Messzeitpunkte könnten den zeitlichen Verlauf der Ektoenzymexpressionen klären und feststellen, ob dessen Bestimmung die diagnostische und prognostische Wertigkeit erhöht.

Ferner zeigte sich, dass ein höherer Anteil an CD38 exprimierenden Tr1- und CD4^+ Treg sowie CD203a exprimierenden Th17-Zellen mit einer deutlich verringerten rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten nach einer Leberresektion verbunden war. Dies spricht ebenfalls für den bekannten Zusammenhang zwischen pathologisch erhöhtem Abbau von NAD^+ zur Schaffung einer hypoxischen und immunsuppressiven Immunreaktion durch die

gesteigerte Expression der Ektoenzyme, welche die Tumorprogression fördern. Die prognostische Bedeutung von Th17-Zellen und CD4⁺ Treg bei HCC-Patienten ist bereits bekannt. Eine erhöhte Anzahl an Th17-Zellen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Yan et al., 2014) und auch Patienten mit einer erhöhten Anzahl an CD4⁺ Treg zeigen ein reduziertes Gesamtüberleben (Gao et al., 2007, Lin et al., 2013, Mathai AM, 2012, Zhou et al., 2009). Den CD4⁺ Treg und Th17-Zellen mit zusätzlicher Expression der Ektoenzyme CD38 und CD203a kann ebenfalls eine prognostische Bedeutung zugesprochen werden.

Des Weiteren konnte sowohl das Auftreten als auch die prognostische Bedeutung der Tr1-Zellen bei HCC-Patienten in der vorliegenden Untersuchung erstmalig nachgewiesen werden. Die prognostische Bedeutung der Tr1-Zellen kann, wie bei den CD4⁺ Treg, in der Ausübung IL-10 vermittelter immunsuppressiver Funktionen begründet liegen. Die Produktion von Adenosin gilt als einer der wichtigsten immunsuppressiven Mechanismen, der vor allem von CD4⁺ Tregs genutzt wird, um Immunantworten zu hemmen (Deaglio et al., 2007, Schuler et al., 2014). Sie sind damit eine bedeutende Quelle für extrazelluläres Adenosin und exprimieren gleichzeitig Adenosinrezeptoren, durch welche sie sensitiv für autokrine sowie parakrine Adenosinstimulation sind (Allard et al., 2016). In dieser Untersuchung konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sowohl eine erhöhte Expression des Anteiles an IL-10⁺ CD4⁺ Treg als auch IL-10⁺ IFN- γ ⁺ Tr1-Zellen das Auftreten eines Rezidivs deutlich erhöht. Es ist nicht vollständig geklärt, warum im Zusammenhang mit einem HCC die immunsuppressive Funktion der Tr1-Zellen zu überwiegen scheint. Eine Möglichkeit könnte der Einfluss der purinergen Stoffwechselwege und der hypoxischen Immunreaktion auf Tr1-Zellen sein, da sie im Gegensatz zu anderen Subpopulationen der T-Zellen, einzigartige Stoffwechsellanforderungen haben. Tr1-Zellen sind von der Glykolyse abhängig und werden durch Hypoxie und extrazelluläres ATP funktionell gehemmt (Mascanfroni et al., 2015), während z.B. CD4⁺ Treg von der Fettsäureoxidation abhängig sind (Newton et al., 2016). Ein weiterer Einfluss auf Tr1-Zellen übt die IL-10 vermittelte Signalgebung selbst aus, da sie bei Tr1-Zellen für die Aufrechterhaltung einer hohen IL-10-Produktion erforderlich ist, sodass Tr1-Zellen in Abwesenheit der IL-10 vermittelten Signalgebung ihre Fähigkeit IL-10 zu sezernieren verlieren (Brockmann et al., 2017). Die prognostische Bedeutung der Tr1-Zellen scheint bei HCC-Patienten wie bei CD4⁺ Treg IL-10 vermittelt zu sein.

IL-10 gehört ebenfalls zu den Stimulatoren von CD163. Aber auch CD163 kann reziprok ein Stimulator der IL-10 Expression sein, da beim Abbau der Erythrozyten durch die Hämoxigenasen Biliverdin, CO und Eisen entstehen (Etzerodt and Moestrup, 2013). CO ist wiederum ein Inhibitor für proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF- α und ein Stimulator für IL-10 (Zhu et al., 2020). Eine hohe Anzahl an CD163 exprimierenden Makrophagen im Serum von HCC-Patienten

ist mit einem schlechten Gesamtüberleben assoziiert (Ding et al., 2019). Ebenso ist die Anzahl an TEMs im Blut bereits vor dem radiologischen Nachweis eines Rezidivs bei Patienten mit einem HCC erhöht (Matsubara et al., 2013). In der vorliegenden Untersuchung konnte ebenfalls ein sehr deutlich erhöhtes Rezidivrisiko sowie reduziertes Gesamtüberleben bei Patienten mit einem erhöhten Anteil an CD163 exprimierenden TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten nachgewiesen werden.

Des Weiteren geht bei Patienten mit HCC bedingter Leberresektion eine postoperativ erhöhte Konzentration von NAD⁺ mit einer erhöhten Anzahl an Th17-Zellen (CCR6⁺ CCR4⁺) mit IL-17 und/oder IL-22 Expression einher. Die Funktion der Th17-Zellen in der Tumorphathogenese ist teilweise noch unklar und widersprüchlich (Wang et al., 2009). Th17-Zellen können unter bestimmten Umständen zu CD4⁺ Treg (IL-10⁺) konvertieren, wobei diese Differenzierung auch bidirektional ablaufen kann (Zhu et al., 2010, Hawiger and Flavell, 2009). CD4⁺ Treg (IL-10⁺) wurden *in-vitro* mit steigenden NAD⁺-Konzentrationen kultiviert (Elkhal et al., 2016). Dabei zeigte sich, dass eine hohe NAD⁺-Konzentration die Umwandlung von CD4⁺ Treg in CD4⁺ IL-17 produzierende Th17-Zellen, unabhängig von der Zytokinumgebung induzieren konnte. CD4⁺ Treg verändern in der Anwesenheit von NAD⁺ ihr Zytokin- und Transkriptionsprofil und erwerben eine typische Th17-Zytokinexpression. Damit haben steigende NAD⁺-Konzentrationen die Fähigkeit die Proliferation von immunsuppressiven Treg zu Th17-Zellen zu bewirken und können so ein vielversprechender neuer Ansatz im Verständnis der Pathogenese des HCC sein (Elkhal et al., 2016). Dieser Mechanismus konnte durch die vorliegende Studie nun erstmal bei Patienten mit einem HCC durch die Korrelation *in vivo* bestätigt werden. Die IL-10 vermittelte Signalgebung sowie die daraus folgende Beeinflussung mehrere Rezeptoren und Subtypen der T-Zellen sowie Monozyten scheint für HCC-Patienten von großer prognostische Bedeutung zu sein und muss weitergehend untersucht werden.

Folgend steht die Betrachtung der verschiedenen Subtypen der T-Zellen im Fokus. Die signifikanten Unterschiede in der Expression der Ektoenzyme ließen sich in dieser Untersuchung nicht für immunsuppressive T-Zellen, wie CD4⁺ und CD8⁺ Treg nachweisen, sondern beschränkten sich auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie IFN- γ exprimierenden Th1-Zellen und CTL, welche nicht immunsuppressive, sondern antitumorale Funktionen ausüben. Ferner zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der CTL (IFN- γ ⁺) und des Anteils an IFN- γ ⁺ Th1-Zellen. Die Beeinflussung der Immunantwort durch IFN- γ basiert unter anderen auf der Stimulation zur Expression von Tumorantigen präsentierenden MHC-Molekülen, welche die Tumorzellerkennung durch die Immunzellen erleichtert sowie der hemmenden Wirkung auf den Zellzyklus und der

Induktion von apoptotischen Prozessen (Cornetta et al., 1994, Martini et al., 2010, Street et al., 1997). Die Bindung von extrazellulärem Adenosin wirkt sich nicht nur gegenüber dem Tumorwachstum als fördernd, sondern auch stark einschränkend in der Überwachung des Tumors durch das Immunsystem aus (Allard et al., 2012). Es ist bekannt, dass die Bindung von Adenosin am A2a-Rezeptor die IFN- γ Produktion sowie die zytotoxische Funktion der CD8⁺ T-Zellen und CTL inhibiert und die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in Treg förderte. Dieser Zusammenhang könnte die erniedrigte Anzahl an antitumoral wirkenden T-Zellen (IFN- γ ⁺) mit zusätzlicher Expression der Ektoenzyme in der vorliegenden Untersuchung erklären. Allerdings scheinen nicht nur die IFN- γ Produktion der CTL einer Beeinflussung der TME zu unterliegen. In der vorliegenden Studie lag bei HCC-Patienten ein erniedrigter Anteil an IFN- γ ⁺ exprimierenden Th1-Zellen und nicht der CTL vor. Es sind weitere Untersuchungen zu den genauen Prozessen der Beeinflussung der T-Zellen notwendig, da vor allem die Rolle von Th1-Zellen in der antitumoralen Immunität bei Patienten mit einem HCC noch nicht abschließend geklärt werden konnte und widersprüchliche Ergebnisse zeigte. So wurden neben Personen aus der gesunden Kontrollgruppe auch für Patienten mit HCC bereits eine reduzierte oder erhöhte Anzahl an Th1-Zellen gemessen (Yan et al., 2014).

Das Vorliegen des bereits erwähnten A2a-Rezeptors wurde in der Untersuchung erstmalig auf TEMs bei HCC-Patienten nachgewiesen. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede oder Korrelationen zwischen den Kohorten nachgewiesen werden.

Zusätzlich zeigte sich bei Patienten, die im Zuge der Lebertransplantation einen IRI erlitten, bereits präoperativ eine jeweils signifikant erhöhte Anzahl der Subpopulation der Th17-Zellen (CCR6⁺ IL-17⁺) mit Expression von CD38, CD203a und Cx43. Zum Zeitpunkt der vermuteten ACR ließ sich ein signifikanter Unterschied der Cx43 exprimierenden Th17-Zellen feststellen. Die Ektoenzyme CD38 und CD203a sowie Cx43 wurden bis zu der vorliegenden Studie noch nicht im Zusammenhang mit einem IRI nach Lebertransplantation untersucht doch weisen vielversprechende Eigenschaften als zukünftige prognostische Marker auf. Es wird vermutet, dass eine Störung des Gleichgewichts zwischen proinflammatorischen Th17-Zellen und antiinflammatorischen CD4⁺ Treg ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des IRI ist (Zhang et al., 2017). Die vorliegenden Messdaten sind damit im Einklang. Zu den Quellen extrazellulärer Nukleotide, den Substraten für die Ektoenzyme CD38 und CD203a gehören aggregierende Thrombozyten, degranulierte Makrophagen, geschädigte Zellen, die mechanischen oder oxidativem Stress ausgesetzt sind (Luthje, 1989, Dubyak and el-Moatassim, 1993). Da bei einem IRI die Hepatozyten zellulärer Schädigung und oxidativem Stress unterliegen ist insofern ein

Zusammenhang mit der erhöhten Anzahl der Ektoenzyme denkbar. Die vorliegenden Messergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass die erhöhte Anzahl an Cx43 exprimierende Th17-Zellen eine Unterscheidung zwischen einer ACR und einem IRI möglich macht. Auch in dem Zusammenhang einer ACR ist die Funktion von Cx43 und Th17-Zellen noch weitgehend unklar, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die prognostische Bedeutung zu validieren.

Die Transplantation setzt das Gefäßsystem des Transplantats einer warmen und kalten Ischämiezeit aus, gefolgt von der Reperfusion und der damit Verursachung von oxidativem Stress (Robson et al., 1995, Bilzer and Gerbes, 2000, Game et al., 2001). Zu den Risikofaktoren eines IRI zählen der Ernährungszustand des Spenders, ein fortgeschrittenes Spenderalter über 70 Jahre und die Steatose der Spenderleber sowie die Länge der kalten und warmen Ischämiezeit (Peralta et al., 2013). Die CIT ist in der Patientengruppe mit einem IRI im Vergleich zu der Gruppe mit bioptisch nachgewiesener ACR als auch zur Gruppe ohne ACR signifikant erhöht. Dies spricht für eine funktionelle Bedeutung der CIT im Rahmen der Pathogenese des IRI.

Diese Studie konnte erstmalig die Expression von CD39 auf im Blut zirkulierenden TEMs nachweisen. Der Anteil der CD39 exprimierenden TEMs bei HCC-Patienten beträgt fast 100% (MW 99,6 %) und ist damit höher als auf anderen Monozyten Subpopulationen der Patienten mit Leberresektion und ebenso im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen aktivierte Endothelzellen Angiopoetine sezernieren, wodurch TEMs in die hypoxische TME migrieren und dort am Prozess der Vaskularisation des Tumors teil haben (Atanasov et al., 2018). Dies zeigt die Bedeutung der Angiopoetin-TIE-2-Achse und der TEMs im Kontext der Entstehung von gefäßreichen Tumoren wie dem HCC (Dapas et al., 2014, Murdoch et al., 2007). Damit könnten CD39 exprimierende TEMs durch den Abbau von ATP zu ADP oder ADP zu AMP mit dazu beitragen, die Hypoxie in der TME zu verstärken. Die daraus folgende Erhöhung des Adenosins verstärkt die Hypoxie in der TME und führt zu einer Zunahme der Angiogenese, die wiederum das Tumorwachstum begünstigt (Kazemi et al., 2018). Zum anderen ein fördert erhöhtes Adenosin zusätzlich die Sekretion von vaskulärem endotheliale Wachstumfaktor (VEGF) und die Proliferation von Endothelzellen (Grant et al., 1999). Auch TEMs exprimieren angiogene Faktoren, wie VEGF und Fibroblasten-Wachstumfaktor (FGF), wodurch sie kausal an der Progression des HCC beteiligt sind (Fiedler et al., 2006). Der signifikant erhöhte Anteil der CD39 exprimierenden TEMs scheint in der Entwicklung eines HCC ein gewichtiger Faktor zu sein, dessen genaue Rolle zukünftiger Aufklärung bedarf.

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit Lebertransplantation zeigte sich zusätzlich, dass sowohl der Anteil CD39 exprimierender TEMs als auch CD39 exprimierender Monozyten (CD16⁺ CD14⁺) bereits präoperativ bei denjenigen Patienten erniedrigt war, die nach der Transplantation eine ACR zeigten, verglichen mit den Patienten ohne zukünftige ACR. Ein Zusammenhang zwischen ACR und einer erhöhten Anzahl an Monozyten im Blut wurde bereits postuliert (Deng et al., 2018). Obwohl vorliegend die Anzahl der Monozyten an den Gesamtblutzellen nicht erhöht war, scheinen sie jedoch relevante Funktionen bei einer en ACR zu übernehmen.

Bei der ACR handelt es sich um eine T-Zell vermittelte inflammatorische Reaktion auf die HLA-Spender-Antigene, die sich den T-Zellen des Empfängers präsentieren (Hale, 2006). TEMs haben ebenfalls durch ihre Fähigkeit IL-10 und VEGF in großen Mengen zu sezernieren eine immunsuppressive Aktivität und konnten *in vitro* die tumorspezifische T-Zell-Proliferation dämpfen (Ibberson et al., 2013). Des Weiteren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Bindung von Ang2 am TIE-2-Rezeptor die TEMs dazu stimuliert die T-Zell-Proliferation deutlich zu unterdrücken (Coffelt et al., 2011). Das immunsuppressive IL-10 wird durch die TEMs als Reaktion auf die Ang2 Stimulation hochreguliert, unterdrückt die T-Zell-Proliferation, und induziert im Gegenzug die Umwandlung von CD4⁺ T-Zellen in supprimierende Treg. Damit scheinen TEMs nicht nur die Tumorprogression durch angiogene Stimulation zu fördern, sondern auch die Suppression der antitumoralen Immunität und die Expansion der Treg Populationen (Coffelt et al., 2011). Ein Einfluss von TEMs auf die T-Zell-vermittelte ACR ist deshalb möglich, wobei der zu Grunde liegende Mechanismus noch ungeklärt ist. Die Expression von CD39 wurde bereits bei Patienten mit einer Lebertransplantation, Gefäßentzündungen und Thrombosen nach Transplantationen untersucht (Robson et al., 2005), jedoch nicht im Zusammenhang ACR. Die Expression von CD39 zeigt sich relevant für die Thrombozytenaktivierung, die Thrombo- und Angiogenese sowie den vaskulären Umbau und das metabolische Milieu als Reaktion auf entzündlichen Stress. ACR gehen mit parenchymalen und vaskulären Entzündungsprozessen einher, die bioptisch nachgewiesen werden können. Nachgewiesenermaßen kann die Induktion von CD39 kann auch durch die Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen sowie oxidativem Stress und Hypoxie gefördert werden (Allard et al., 2017). Der signifikant erniedrigte Anteil der CD39 exprimierenden CD14⁺ CD16⁺ Monozyten und TEMs scheint daher auch im Rahmen der ACR ein gewichtiger Faktor zu sein, dessen genaue Rolle zukünftiger Aufklärung bedarf.

9.2. Diskussion der Methodik

9.2.1. Qualitätsbeurteilung der potenziellen Biomarker

Die Beurteilung einer wirksamen Therapie kann anhand des Patientenüberlebens sowie dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen erfolgen. Die Patienten der Kohorte Leberresektion befinden sich in ambulanter Nachsorge und erhielten regelmäßig MRT-Untersuchungen des Abdomens. Das Auftreten eines Lokalrezidivs, welches hier primär beobachtet wurde, trat zwischen dem vorangegangenen und dem Nachsorgetermin auf, an dem die Diagnose eines Rezidivs gestellt wurde. So wurde dieser Nachsorgetermin als Auftreten des Rezidivs verwendet. Dieses Vorgehen erscheint bei dem entsprechend dichten und für alle Patienten einheitlichen Nachsorgeschema als zweckmäßig und akzeptabel. Bei Patienten, bei denen kein Rezidiv diagnostiziert wurde, entspricht der Termin der aktuellen Nachsorge der längsten rezidivfreien Überlebenszeit.

Die Qualitätsbeurteilung eines Biomarkes ist für seine Anwendung in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung unabdingbar. Der Biomarker muss sowohl eine Unterscheidung zwischen erkrankten und nicht erkrankten Personen ermöglichen, die anhand eines Grenzwertes getroffen wird, als idealerweise auch eine Korrelation mit dem Erkrankungsstadium des Patienten aufweisen (Ruopp et al., 2008). Die Wahl des optimalen Grenzwertes ist von seinem Anwendungsgebiet abhängig. Im Rahmen der HCC-Diagnostik kann eine zu hohe Falsch-Negativ-Rate eine ungünstigen Krankheitsverlauf für den Patienten bedeuten, da der Diagnosezeitpunkt und der anschließenden Therapiebeginn zu spät gestellt werden.

In der vorliegenden Studie wurde in der Kohorte Leberresektion eine Unterteilung in zwei Subgruppen anhand des Auftretens bzw. Nicht-Auftretens eines Rezidivs vorgenommen, eine ROC-Kurve erstellt und mit Hilfe des Youden-Index der bestmögliche Grenzwert bewertet. Dabei zeigte sich, dass der Anteil der CD163 exprimierenden TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten mit einem 19- bzw. 17-fach erhöhten Risiko für das Auftreten eines Rezidivs sowie einer reduzierten Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist und somit die größte prognostische Bedeutung aller untersuchten Immunzellen (Tabelle 11) aufweist. Der ROC-AUC der CD163⁺ TEMs liegt bei 0,77 und der CD163⁺ CD14⁺ CD16⁺ Monozyten bei 0,78. Der Youden-Index der TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten liegt bei 0,67. Damit zeigt die Genauigkeit der potenziellen prognostischen Biomarker eine akzeptable Abgrenzbarkeit sowie eine gute potenzielle Wirksamkeit zur Unterscheidung zwischen HCC- Patienten mit und ohne Auftreten eines Rezidivs (vgl. Kapitel 7.14.).

Des Weiteren wurde für die zwischen den Kohorten Leberresektion und Kontrollgruppe signifikant unterschiedlichen Populationsstärken der T-Zellen und Monozyten eine ROC-Kurve erstellt und mit Hilfe des Youden-Index der bestmögliche Grenzwert bewertet. Die ROC-AUC und der Youden-Index sind mit einem maximalen Wert von 1 bei der Betrachtung des Anteils der CD39 exprimierenden TEMs am höchsten (Tabelle 12). Damit zeigt die Genauigkeit des potenziellen diagnostischen Biomarkers eine herausragende Abgrenzbarkeit sowie potenzielle Wirksamkeit zur Unterscheidung zwischen an einem HCC erkrankten und gesunden Personen auf (vgl. Kapitel 7.14.).

Der bis heute am besten untersuchte Biomarker bei Patienten mit einem HCC ist das α -Fetoprotein (AFP). AFP ist ein Glykoprotein, das von fetalen Hepatozyten oder schlecht differenzierten Zellen des HCC exprimiert wird (van Meer et al., 2013). AFP kann sowohl im Rahmen von chronischen Lebererkrankungen wie viralen Hepatitiden als auch nicht-hepatozellulären Karzinomen wie intrahepatischen Cholangiokarzinomen oder Lebermetastasen intestinaler Karzinome erhöht sein und folglich zu falsch positiven Ergebnissen führen (Adachi et al., 2003, Sato et al., 1994, Tao et al., 2010). Die Bestimmung von AFP bei Patienten mit Leberzirrhose-assoziiertem HCC weist eine Sensitivität von 41%-65% sowie eine Spezifität von 80%-94% auf (Di Bisceglie et al., 2005). Die Sensitivität von AFP bei einem HCC in der Frühphase ist mit nur 32%-49% geringer. Aufgrund dieser vergleichsweise geringen Sensitivität wird AFP nicht in der Primärdiagnostik eingesetzt. Da AFP vor und nach Therapie mit dem Behandlungserfolg bzw. der Rezidivrate korreliert, kann der Marker insbesondere im Rahmen der Verlaufsbeurteilung eingesetzt werden (Kobayashi et al., 2011, N'Kontchou et al., 2009).

Die Sensitivität und Spezifität des Anteils der CD39 exprimierenden TEMs beträgt 100 %. Die Sensitivität und Spezifität des Anteils der CD163 exprimierenden TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten liegt bei 77 % und 90%. Damit liegen die Sensitivität und Spezifität der potenziellen diagnostischen und prognostischen Biomarker deutlich über der des AFP.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine kleine Patientengruppe (n=20) mit zwei unterschiedlichen Messzeitpunkten betrachtet. Eine nachfolgende Studie ist daher notwendig, um zu untersuchen, ob sich die vielversprechenden Sensitivitäten und Spezifitäten der prognostischen und diagnostischen Marker bestätigen. Zudem sind Untersuchungen unter Einschluss zusätzlicher Messzeitpunkte notwendig, um eine Beurteilung der Anwendbarkeit der Marker zur Verlaufsbeurteilung sowie des Behandlungserfolgs oder der potenziellen Eignung zur Detektion eines HCC in der Frühphase zu treffen. Außerdem benötigt es Studien an weiteren

Patientengruppen um eine etwaige Korrelation des Markers beispielsweise mit allgemeinen chronischen Lebererkrankungen (falsch positive) auszuschließen.

9.2.2. Probengewinnung und -weiterverarbeitung

Für die Probengewinnung bietet die periphere BE bei Patienten den Vorteil einer minimal-invasiven, ubiquitär durchführbaren und anschließend einfach zu transportierenden und weiterzuverarbeitenden Methode. Zusätzlich ist die Entnahme nicht nur während einer stationären, sondern während einer ambulanten Versorgung möglich. Die Gewinnung der Patientenproben erfolgte anhand klinikinterner Standards (Standard Operating Procedures, SOP), dennoch können präanalytische Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dazu zählen unter anderen die unterschiedliche Wahl des Entnahmeortes, die Dauer der venösen Stauung sowie die Dauer der nachfolgenden Lagerung und des Transportes.

Eine Besonderheit in der Probenweiterverarbeitung stellte die Messung der NAD^+ -Konzentration im Serum der Patienten dar. Die entnommenen Blutproben müssen nach der BE direkt im Labor verarbeitet werden, um eine Verfälschung der gemessenen Konzentration zu vermeiden, da NAD^+ von mehreren Enzymen im Plasma hydrolysiert oder abgebaut werden kann. Die Stabilität der Plasmaproben konnte für eine Zeit von 5-25 Minuten bestätigt werden (Brunnbauer et al., 2018). Dies stellt in der stationären sowie auch ambulanten Patientenversorgung zum jetzigen Zeitpunkt einen limitierenden Faktor in der Möglichkeit der Anwendbarkeit dar.

Die für die Studie gewonnenen Blutproben wurden über einen Zeitraum von 14 Monaten gesammelt. Die PBMC jeder Probe wurden nach der Isolierung bei -156°C über einen Zeitraum von mehr als 12 Monaten kryokonserviert. Dies erlaubte eine gleichzeitige Messung der ausgewählten Patientenproben. Zudem wurde durch die Methode sichergestellt, dass die Proben alle identisch behandelt wurden. Die Kryokonservierung und das anschließende Auftauen ist in klinischen Studien ein etabliertes Verfahren, das sowohl in der biologischen, als auch biomedizinischen Forschung eine breite Anwendung findet, da es eine langfristige Lagerung bei Aufrechterhaltung der Funktionalität und Viabilität der Zellen ermöglicht (Germann et al., 2011). Die Stabilität von NAD^+ in gefrorenem humanem heparinisiertem Plasma konnte für mindestens drei Monate nachgewiesen werden (Brunnbauer et al., 2018); alle im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Messdaten beruhen auf Proben mit einem Alter von weniger als 3 Monaten. Als wichtigste Qualitätsfaktoren für den Prozess der Kryokonservierung und des Auftauens von PBMC haben sich ein standardisiertes Einfrier- und Auftauprotokoll sowie die verwendete Gefriermethode und die Länge der Kryokonservierung erwiesen (Tompa et al., 2018). Trotz der

bedarfsgerechten Lagerung der Proben sind lagerungs- und zeitbedingte Veränderungen und somit Verfälschungen des Gesamtergebnisses nicht vollständig auszuschließen.

Bei der Kryokonservierung von T-Zellen ist der Aspekt der Erhaltung der Funktionalität bei der Bildung von Zytokinen sowie Interleukinen für diese Studie von zentraler Bedeutung. Bei einer optimierten Zellkryokonservierung und einer kontinuierlichen Lagerung bei unter -130°C ohne Temperaturschwankungen konnte nach dem Auftauen eine Aufrechterhaltung der Viabilität und Funktionalität von T-Zellen in Immunassays nachgewiesen werden (Angel et al., 2016). Der zweite zentrale Qualitätsaspekt ist die Länge der T-Zell-Kultur, die in dieser Untersuchung vier Stunden betrug. Sie ist für die Erholung der Zellen sowie die Bildung von Zytokinen und Interleukinen in dieser Studie von Relevanz. Eine T-Zell-Kultur über einen Zeitraum länger als 12 Stunden führt zu einer Abnahme der Viabilität und Funktionalität, im Vergleich zu Messungen direkt nach dem Auftauen (Angel et al., 2016). Daher ist in dieser Untersuchung mit einem Zeitraum der Kultur von vier Stunden und bei einer gemessenen Viabilität der T-Zellen nach der Isolation zwischen 70 % bis 87 % nicht von einer signifikanten Abnahme der Funktionalität und Viabilität auszugehen.

9.2.3. Einschränkungen des Studiendesigns

Die periphere BE erfolgte laut Protokoll bei allen Patienten zu den vorgegebenen prä- und postoperativen Zeitpunkten. In der Kohorte der Lebertransplantation wurde bei Verdacht auf eine ACR zusätzlich eine Blutprobe entnommen. Eine Problematik der klinischen Symptomatik einer ACR ist die fehlende Abgrenzbarkeit zu anderen postoperativen Komplikationen. Daher wurde erst durch eine Leberbiopsie die ACR histopathologisch als solche identifiziert. Eine Zuordnung der Patienten in die Kohorte mit einer gesicherten ACR oder eines IRI, erfolgte anhand dieses Ergebnisses. Eine Zuordnung zu den beiden Gruppen ohne das Ergebnis der Leberbiopsie ist nicht möglich, sodass Patientendaten ohne Biopsie nicht berücksichtigt werden konnten, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Die dritte Gruppe bildeten Patienten, bei denen postoperativ zu keinem Zeitpunkt der Verdacht auf eine ACR bestand. Aus den genannten Gründen ist die Anzahl der eingeschlossenen Patienten sehr gering. Der weitere Einfluss durch andersartige postoperative Transplantatfunktionsstörungen ist in allen Gruppen nicht auszuschließen.

Bei einem Vergleich der Patientengruppen ist ferner zu berücksichtigen, dass es sich bei der Kontrollgruppe um Probanden ohne Vorerkrankungen der Leber, Karzinome oder andere entzündlichen Grunderkrankungen handelt. Dadurch entstehen bei der Betrachtung der

verschiedenen Kohorten sowohl prä- als auch postoperativ signifikante Unterschiede, die in Kapitel 8.2. beschrieben wurden. Diese Unterschiede betreffen vor allem leberspezifische Blutwerte sowie die postoperative Aufenthaltsdauer im Krankenhaus oder den Zeitpunkt der postoperativen BE. Diese Unterschiede zwischen den Kohorten gründen in den hier spezifisch untersuchten Entitäten der Erkrankungen und können nicht beeinflusst werden. Da die Patienten der Kontrollgruppe in dieser Studie ebenfalls operiert wurden, ist der Störfaktor chirurgischer Eingriff und dessen potenzieller Einfluss auf die untersuchten Immunzellen kontrolliert worden. Ein signifikanter Unterschied besteht allerdings in der Dauer der Operation, deren Einflussnahme auf das Ergebnis nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Die Genese der Leberzirrhose bei Patienten mit einem HCC (vgl. Kapitel 8.2.) und der in dieser Untersuchung betrachteten Kohorten entspricht der in Deutschland am häufigsten auftretenden Lebererkrankungen, sodass hier eine repräsentative Stichprobe ausgewählt wurde.

Die Gruppe der Patienten mit Lebertransplantation zeigten postoperativ aufgrund der Immunsuppression signifikante Unterschiede in der Anzahl an T-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (vgl. Kapitel 8.4.1.). Steroide sind die Basis aller immunsuppressiven Therapien und werden bereits vor der Reperfusion des transplantierten Organs intraoperativ verabreicht. Während der Lebertransplantation erhielten die Patienten intraoperativ einmalig Methylprednisolon sowie postoperativ initial Prednisolon in absteigender Dosierung. Die Wirkung der Steroide erfolgt über die Hemmung der T-Zell-Aktivierung und einer Blockierung der IL-1 und IL-2 Synthese (Farkas et al., 2014). In der frühen postoperativen Phase werden Steroide in hohen Dosen verabreicht und anschließend schrittweise reduziert. Zusätzlich erhielten die Patienten postoperativ Tacrolimus. Tacrolimus gehört zu den Calcineurininhibitoren, wie auch z.B. Cyclosporin. Sie hemmen ebenfalls die T-Zell-Produktion und die Sekretion von IL-2 (Farkas et al., 2014). Bei Verdacht auf eine ACR wurde zusätzlich mit Mycophenolat-Mofetil (CellCept) behandelt. CellCept ist ein reversibler Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase in der Purinsynthese und reduziert durch die Hemmung der Purinsynthese die Verbreitung von B- und T-Zellen (Schlitt et al., 2013). Diese Medikation erklärt die signifikanten postoperativen Unterschiede in der Anzahl der T-Zellen der Patienten mit einer Lebertransplantation.

9.2.4. Statistische Einschränkungen

In der hier vorliegenden Studie beträgt der Stichprobenumfang der Patientenkohorten zwischen drei und 20 Patienten. Bei kleinen Patientenkohorten reduziert sich die statistische Trennschärfe und Power. Bei kleinen Studienpopulationen steigt folglich das Risiko für einen Fehler 2. Art, dem

Nichterkennen eines Effekts, sowie für einen Fehler 1. Art, dem Erkennen eines Effekts, der nicht existiert. Ob ein Effekt signifikant ist, hängt vom Ergebnis sowie von der Verteilung der Ergebnisse ab. Die Gauß-Verteilung von Stichproben in kleinen Kohorten stellt sich flacher und schmalgipfliger dar als bei einem großen Stichprobenumfang. Dies bedeutet, dass die Standardabweichung des Mittelwerts in einer großen Kohorte kleiner ist als bei einem kleinen Stichprobenumfang. Zusätzlich erhöht sich in kleinen Gruppen mit einem flacheren Kurvenverlauf die Fläche unter der Kurve und damit die Auftretenswahrscheinlichkeit für einen Effekt durch einen Fehler 1. Art. Andererseits macht es ein großer Stichprobenumfang wahrscheinlicher, dass die Null-Hypothese aufgrund eines schwachen Effekts abgelehnt wird und ein geringer Unterschied als signifikant gewertet wird, obwohl seine biologische Relevanz und klinische Wertigkeit potenziell gering sind. Deshalb spricht das Verwerfen der Null-Hypothese bei einer kleinen Patientenkohorte i.d.R. für einen substanziellen Effekt. Dies muss bei der Betrachtung der in dieser explorativen Studie kleinen Patientenkohorten und bei der Beurteilung der Aussagekraft der Ergebnisse berücksichtigt werden.

10. Zusammenfassung und verbleibende Herausforderungen

Bei Patienten mit Leberresektion konnte sowohl prä- als auch postoperativ eine niedrigere NAD⁺-Konzentration nachgewiesen werden. Verschiedene durch Expression von Ektoenzymen und weiteren Regulatoren des purinergen Stoffwechsels (CD38, CD203a, Cx43) charakterisierte T-Zell-Subpopulationen waren in dieser Patientengruppe deutlich verringert, wohingegen ein höherer Anteil an TEMs das Ektoenzym CD39 exprimierten. Patienten mit hohem Anteil an CD163 exprimierenden TEMs und CD14⁺ CD16⁺ Monozyten wiesen eine erheblich kürzere rezidivfreie - und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit auf. Auch Transplantationspatienten mit einem IRI zeigten präoperativ eine Erhöhung der Ektoenzym exprimierenden Th17-Zellen. Dagegen wiesen Patienten mit ACR präoperativ verringerte Anteile an CD39 exprimierenden Monozyten und TEMs auf.

Die Behandlung des HCC ist anspruchsvoll und komplex, da es an der Schnittstelle mehrerer pathologischer Prozesse entsteht: eine zugrunde liegende chronische Erkrankung der Leber, die die therapeutischen Möglichkeiten einschränkt sowie ein hohes onkogenes Potential des HCC, welches in der Tumorbilogie selbst begründet liegt (Lurje et al., 2019). Durch die Verwendung der in dieser Studie untersuchten Ektoenzyme als neue potenzieller Biomarker erscheint eine Verbesserung von Diagnose, Prognose, Therapieoptionen und -entscheidungen bei HCC vielversprechend. Größere Kohortenstudien sind nötig, um die hier nachgewiesene Eignung der Ektoenzyme auf T-Zellen und Monozyten als auch die NAD⁺-Konzentration im Blut als Biomarker für die Diagnose und Prognose des HCC zu validieren. In der Diagnostik der ACR werden wahrscheinlich letztendlich Logistik, Verfügbarkeit, der klinische Verlauf des Patienten und die Kosten die Wahl eines geeigneten Markers bestimmen. Obwohl die Histologie der Leberbiopsie bei ACR immer noch den Goldstandard darstellt, ist es wahrscheinlich, dass eine sinnvolle Kombination aus Biopsie und Biomarkern in Zukunft die klinische Entscheidungsfindung mit einem hohen Grad an Genauigkeit unterstützen und die Häufigkeit von invasiven Biopsien reduzieren kann (Kumar et al., 2018).

11. Literaturverzeichnis

- AARHUS R, G. R., DICKEY DM, WALSETH TF, LEE HC 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem.*, Dec 22;270(51), 30327-33.
- AASEN, T. 2015. Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation. *Cell Tissue Res*, 360, 685-99.
- ADACHI, Y., TSUCHIHASHI, J., SHIRAIISHI, N., YASUDA, K., ETOH, T. & KITANO, S. 2003. AFP-producing gastric carcinoma: multivariate analysis of prognostic factors in 270 patients. *Oncology*, 65, 95-101.
- AKDIS, M., VERHAGEN, J., TAYLOR, A., KARAMLOO, F., KARAGIANNIDIS, C., CRAMERI, R., THUNBERG, S., DENIZ, G., VALENTA, R., FIEBIG, H., KEGEL, C., DISCH, R., SCHMIDT-WEBER, C. B., BLASER, K. & AKDIS, C. A. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*, 199, 1567-75.
- ALLARD, B., BEAVIS, P. A., DARCY, P. K. & STAGG, J. 2016. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 29, 7-16.
- ALLARD, B., LONGHI, M. S., ROBSON, S. C. & STAGG, J. 2017. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev*, 276, 121-144.
- ALLARD, B., TURCOTTE, M. & STAGG, J. 2012. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 485156.
- ANGEL, S., VON BRIESEN, H., OH, Y. J., BALLER, M. K., ZIMMERMANN, H. & GERMANN, A. 2016. Toward Optimal Cryopreservation and Storage for Achievement of High Cell Recovery and Maintenance of Cell Viability and T Cell Functionality. *Biopreserv Biobank*, 14, 539-547.
- ANTHONY J. DEMETRIS, K. P. B., AMAR P. DHILLON, LINDA FERRELL, JOHN FUNG, S. A. G., JOHN HART, PEKKA HAYRY, WALTER J. HOFMANN, STEPHAN HUBSCHER, JOSEF KEMNITZ, GEORGE KOUKOULIS, R. G. L., KLAUS J. LEWIN, JURGEN LUDWIG, ROD S. MARKIN, LIDIJA M. PETROVIC, M. JAMES PHILLIPS, B. P., JORGE RAKELA, PARMJEET RANDHAWA, FINN P. REINHOLT, MICHEL REYNE` S., MARIE ROBERT, H. S., KIM SOLEZ, DALE SNOVER, EERO TASKINEN, SWAN N. THUNG, G. WELDON TILLERY, & RUSSELL H. WIESNER, D. G. D. W., JAMES W. WILLIAMS, AND HIROHIKO YAMABE 1997. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology*. :25(3).
- ASSMANN, S. F., HOSMER, D. W., LEMESHOW, S. & MUNDT, K. A. 1996. Confidence intervals for measures of interaction. *Epidemiology*, 7, 286-90.
- ATANASOV, G., DIETEL, C., FELDBRUGGE, L., BENZING, C., KRENZIEN, F., BRANDL, A., KATOU, S., SCHIERLE, K., ROBSON, S. C., SPLITH, K., WILTBERGER, G., REUTZEL-SELKE, A., JONAS, S., PASCHER, A., BAHRA, M., PRATSCHKE, J. & SCHMELZLE, M. 2018. Angiogenic miRNAs, the angiopoietin axis and related TIE2-expressing monocytes affect outcomes in cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 9, 29921-29933.
- ATANASOV, G., DINO, K., SCHIERLE, K., DIETEL, C., AUST, G., PRATSCHKE, J., SEEHOFER, D., SCHMELZLE, M. & HAU, H. M. 2019. Immunologic cellular characteristics of the tumour microenvironment of hepatocellular carcinoma drive patient outcomes. *World J Surg Oncol*, 17, 97.
- ATANASOV, G., HAU, H. M., DIETEL, C., BENZING, C., KRENZIEN, F., BRANDL, A., ENGLISCH, J. P., WILTBERGER, G., SCHIERLE, K., ROBSON, S. C., REUTZEL-SELKE, A., JONAS, S., PASCHER, A., PRATSCHKE, J. & SCHMELZLE, M. 2016. Prognostic significance of TIE2-expressing monocytes in hilar cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol*, 114, 91-8.
- AUDRITO, V., VAISITTI, T., ROSSI, D., GOTTARDI, D., D'ARENA, G., LAURENTI, L., GAIDANO, G., MALAVASI, F. & DEAGLIO, S. 2011. Nicotinamide blocks proliferation and induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the p53/miR-34a/SIRT1 tumor suppressor network. *Cancer Res*, 71, 4473-83.
- BAETEN, D., MOLLER, H. J., DELANGHE, J., VEYS, E. M., MOESTRUP, S. K. & DE KEYSER, F. 2004. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum*, 50, 1611-23.

- BALKWILL, F., CHARLES, K. A. & MANTOVANI, A. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7, 211-7.
- BELDI, G., ENJYOJI, K., WU, Y., MILLER, L., BANZ, Y., SUN, X. & ROBSON, S. C. 2008. The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. *Front Biosci*, 13, 2588-603.
- BENSON, A. B., 3RD, ABRAMS, T. A., BEN-JOSEF, E., BLOOMSTON, P. M., BOTHA, J. F., CLARY, B. M., COVEY, A., CURLEY, S. A., D'ANGELICA, M. I., DAVILA, R., ENSMINGER, W. D., GIBBS, J. F., LAHERU, D., MALAFA, M. P., MARRERO, J., MERANZE, S. G., MULVIHILL, S. J., PARK, J. O., POSEY, J. A., SACHDEV, J., SALEM, R., SIGURDSON, E. R., SOFOCLEOUS, C., VAUTHEY, J. N., VENOOK, A. P., GOFF, L. W., YEN, Y. & ZHU, A. X. 2009. NCCN clinical practice guidelines in oncology: hepatobiliary cancers. *J Natl Compr Canc Netw*, 7, 350-91.
- BEYER, E. C. & BERTHOUD, V. M. 2018. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860, 5-8.
- BILZER, M. & GERBES, A. L. 2000. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol*, 32, 508-15.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BROCKMANN, L., GAGLIANI, N., STEGLICH, B., GIANNOU, A. D., KEMPSKI, J., PELCZAR, P., GEFFKEN, M., MFARREJ, B., HUBER, F., HERKEL, J., WAN, Y. Y., ESPLUGUES, E., BATTAGLIA, M., KREBS, C. F., FLAVELL, R. A. & HUBER, S. 2017. IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo. *J Immunol*, 198, 1130-1141.
- BRONKHORST, I. H., LY, L. V., JORDANOVA, E. S., VROLIJK, J., VERSLUIS, M., LUYTEN, G. P. & JAGER, M. J. 2011. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 643-50.
- BRUIX, J., SHERMAN, M. & AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER, D. 2011. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 53, 1020-2.
- BRUNNBAUER, P., LEDER, A., KAMALI, C., KAMALI, K., KESHI, E., SPLITH, K., WABITSCH, S., HABER, P., ATANASOV, G., FELDBRUGGE, L., SAUER, I. M., PRATSCHKE, J., SCHMELZLE, M. & KRENZIEN, F. 2018. The nanomolar sensing of nicotinamide adenine dinucleotide in human plasma using a cycling assay in albumin modified simulated body fluids. *Sci Rep*, 8, 16110.
- BRUZZONE, S., FRANCO, L., GUIDA, L., ZOCCHI, E., CONTINI, P., BISSO, A., USAI, C. & DE FLORA, A. 2001. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 276, 48300-8.
- BUDHU, A. & WANG, X. W. 2006. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol*, 80, 1197-213.
- BUECHLER C, R. M., ORSÓ E, LANGMANN T, KLUCKEN J, SCHMITZ G 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol.* , Jan;67(1), 97-103.
- BUELL, J. F., CHERQUI, D., GELLER, D. A., O'ROURKE, N., IANNITTI, D., DAGHER, I., KOFFRON, A. J., THOMAS, M., GAYET, B., HAN, H. S., WAKABAYASHI, G., BELLI, G., KANEKO, H., KER, C. G., SCATTON, O., LAURENT, A., ABDALLA, E. K., CHAUDHURY, P., DUTSON, E., GAMBLIN, C., D'ANGELICA, M., NAGORNEY, D., TESTA, G., LABOW, D., MANAS, D., POON, R. T., NELSON, H., MARTIN, R., CLARY, B., PINSON, W. C., MARTINIE, J., VAUTHEY, J. N., GOLDSTEIN, R., ROAYAIE, S., BARLET, D., ESPAT, J., ABECASSIS, M., REES, M., FONG, Y., MCMASTERS, K. M., BROELSCH, C., BUSUTTLIL, R., BELGHITI, J., STRASBERG, S., CHARI, R. S. & WORLD CONSENSUS CONFERENCE ON LAPAROSCOPIC, S. 2009. The international position on laparoscopic liver surgery: The Louisville Statement, 2008. *Ann Surg*, 250, 825-30.
- BUNDESÄRZTEKAMMER 2019. Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation.

- CAI, X. Y., NI, X. C., YI, Y., HE, H. W., WANG, J. X., FU, Y. P., SUN, J., ZHOU, J., CHENG, Y. F., JIN, J. J., FAN, J. & QIU, S. J. 2016. Overexpression of CD39 in hepatocellular carcinoma is an independent indicator of poor outcome after radical resection. *Medicine (Baltimore)*, 95, e4989.
- CHADET, S., JELASSI, B., WANNOUS, R., ANGOULVANT, D., CHEVALIER, S., BESSON, P. & ROGER, S. 2014. The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway. *Carcinogenesis*, 35, 1238-47.
- CHAN, S. L., MO, F. K., WONG, C. S., CHAN, C. M., LEUNG, L. K., HUI, E. P., MA, B. B., CHAN, A. T., MOK, T. S. & YEO, W. 2012. A study of circulating interleukin 10 in prognostication of unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 118, 3984-92.
- CHAPUT, N., LOUAFI, S., BARDIER, A., CHARLOTTE, F., VAILLANT, J. C., MENEGAUX, F., ROSENZWAJG, M., LEMOINE, F., KLATZMANN, D. & TAIEB, J. 2009. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut*, 58, 520-9.
- CHEN, D. S. & MELLMAN, I. 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39, 1-10.
- CHOUDHARY, N. S., SAIGAL, S., BANSAL, R. K., SARAF, N., GAUTAM, D. & SOIN, A. S. 2017. Acute and Chronic Rejection After Liver Transplantation: What A Clinician Needs to Know. *J Clin Exp Hepatol*, 7, 358-366.
- CHUNG, Y., YANG, X., CHANG, S. H., MA, L., TIAN, Q. & DONG, C. 2006. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell Res*, 16, 902-7.
- COFFELT, S. B., CHEN, Y. Y., MUTHANA, M., WELFORD, A. F., TAL, A. O., SCHOLZ, A., PLATE, K. H., REISS, Y., MURDOCH, C., DE PALMA, M. & LEWIS, C. E. 2011. Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. *J Immunol*, 186, 4183-90.
- CORNETTA, K., BEREBITSKY, D., BEHNIA, M., TRAYCOFF, C., SROUR, E. F. & SLEDGE, G. W. 1994. A retroviral vector expressing human interferon gamma upregulates MHC antigen expression in human breast cancer and leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther*, 1, 91-8.
- COULON, S., HEINDRYCKX, F., GEERTS, A., VAN STEENKISTE, C., COLLE, I. & VAN VLIERBERGHE, H. 2011. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int*, 31, 146-62.
- CROCETTI, L., DE BAERE, T. & LENCIONI, R. 2010. Quality improvement guidelines for radiofrequency ablation of liver tumours. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 33, 11-7.
- DAPAS, B., GRASSI, M. & GRASSI, G. 2014. Can TIE-2 expressing monocytes represent a novel marker for hepatocellular carcinoma? *Hepatobiliary Surg Nutr*, 3, 175-8.
- DE VUYST, E., WANG, N., DECROCK, E., DE BOCK, M., VINKEN, M., VAN MOORHEM, M., LAI, C., CULOT, M., ROGIERS, V., CECHELLI, R., NAUS, C. C., EVANS, W. H. & LEYBAERT, L. 2009. Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium*, 46, 176-87.
- DEAGLIO, S., DWYER, K. M., GAO, W., FRIEDMAN, D., USHEVA, A., ERAT, A., CHEN, J. F., ENJOYOJI, K., LINDEN, J., OUKKA, M., KUCHROO, V. K., STROM, T. B. & ROBSON, S. C. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204, 1257-65.
- DEAGLIO, S. & ROBSON, S. C. 2011. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv Pharmacol*, 61, 301-32.
- DENG, J., ZHOU, B., LIN, B., GENG, L., SHEN, T., SHU, R., XIE, H. & ZHENG, S. 2018. Prediction of CD16(+) Monocyte in Acute Rejection after Liver Transplantation. *Ann Clin Lab Sci*, 48, 328-332.
- DI BISCEGLIE, A. M., STERLING, R. K., CHUNG, R. T., EVERHART, J. E., DIENSTAG, J. L., BONKOVSKY, H. L., WRIGHT, E. C., EVERSON, G. T., LINDSAY, K. L., LOK, A. S., LEE, W. M., MORGAN, T. R., GHANY, M. G., GRETCH, D. R. & GROUP, H.-C. T. 2005. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol*, 43, 434-41.
- DI VIRGILIO, F. & ADINOLFI, E. 2017. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, 36, 293-303.
- DIMITROULIS, D., DAMASKOS, C., VALSAMI, S., DAVAKIS, S., GARMPI, N., SPARTALIS, E., ATHANASIOU, A., MORIS, D., SAKELLARIOU, S., KYKALOS, S., TSOUROUFLIS, G., GARMPI, A., DELLADETSIMA, I., KONTZOGLU, K. & KOURAKLIS, G. 2017. From

- diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. *World J Gastroenterol*, 23, 5282-5294.
- DING, W., TAN, Y., QIAN, Y., XUE, W., WANG, Y., JIANG, P. & XU, X. 2019. Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-associated macrophages in patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *PLoS One*, 14, e0223971.
- DONG H, Z. G., TAMADA K, CHEN L 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* , Dec;5(12), 1365-9.
- DUBYAK, G. R. & EL-MOATASSIM, C. 1993. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*, 265, C577-606.
- DUHEN, T., GEIGER, R., JARROSSAY, D., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*, 10, 857-63.
- DUMOUTIER, L., LOUAHED, J. & RENAULD, J. C. 2000. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol*, 164, 1814-9.
- DZHANDZHUGAZYAN KN, K. A., THOR STRATEN P, ZEUTHEN J 1998. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett.*, Jul 3;430(3), 227-30.
- EL-HOUSEINI ME, M. M., ELSHEMEY WM, HUSSEIN TD, DESOUKY OS, ELSAYED AA. 2005. Enhanced detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Control.* , Oct;12(4), 248-53. .
- EL-SERAG, H. B. 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142, 1264-1273 e1.
- ELKHAL, A., RODRIGUEZ CETINA BIEFER, H., HEINBOKEL, T., UEHARA, H., QUANTE, M., SEYDA, M., SCHUITENMAKER, J. M., KRENZIEN, F., CAMACHO, V., DE LA FUENTE, M. A., GHIRAN, I. & TULLIUS, S. G. 2016. NAD⁺ regulates Treg cell fate and promotes allograft survival via a systemic IL-10 production that is CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent. *Scientific Reports*, 6.
- ESCARTIN, A., SAPISOCHIN, G., BILBAO, I., VILALLONGA, R., BUENO, J., CASTELLS, L., DOPAZO, C., CASTRO, E., CARALT, M. & BALSELLS, J. 2007. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transplant Proc*, 39, 2308-10.
- ETZERODT, A. & MOESTRUP, S. K. 2013. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal*, 18, 2352-63.
- EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. ELECTRONIC ADDRESS, E. E. E. & EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE, L. 2018. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 69, 182-236.
- FARKAS, S., HACKL, C. & SCHLITT, H. J. 2014. Overview of the indications and contraindications for liver transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4.
- FERRETTI, E., HORENSTEIN, A. L., CANZONETTA, C., COSTA, F. & MORANDI, F. 2019. Canonical and non-canonical adenosinergic pathways. *Immunol Lett*, 205, 25-30.
- FIEDLER, U., REISS, Y., SCHARPFENECKER, M., GRUNOW, V., KOIDL, S., THURSTON, G., GALE, N. W., WITZENRATH, M., ROSSEAU, S., SUTTORP, N., SOBKE, A., HERRMANN, M., PREISSNER, K. T., VAJKOCZY, P. & AUGUSTIN, H. G. 2006. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*, 12, 235-9.
- FILACI, G., FENOGLIO, D., FRAVEGA, M., ANSALDO, G., BORGONOVO, G., TRAVERSO, P., VILLAGGIO, B., FERRERA, A., KUNKL, A., RIZZI, M., FERRERA, F., BALESTRA, P., GHIO, M., CONTINI, P., SETTI, M., OLIVE, D., AZZARONE, B., CARMIGNANI, G., RAVETTI, J. L., TORRE, G. & INDIVERI, F. 2007. CD8⁺ CD28⁻ T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol*, 179, 4323-34.
- FONDEVILA, C., BUSUTTIL, R. W. & KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. 2003. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Experimental and Molecular Pathology*, 74, 86-93.
- FONSECA, J. E., EDWARDS, J. C., BLADES, S. & GOULDING, N. J. 2002. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4⁺ T lymphocyte-rich microenvironments. *Arthritis Rheum*, 46, 1210-6.

- FREDHOLM, B. B., AP, I. J., JACOBSON, K. A., LINDEN, J. & MULLER, C. E. 2011. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev*, 63, 1-34.
- FREEMAN GJ, L. A., IWAI Y, BOURQUE K, CHERNOVA T, NISHIMURA H, FITZ LJ, MALENKOVICH N, OKAZAKI T, BYRNE MC, HORTON HF, FOUSSER L, CARTER L, LING V, BOWMAN MR, CARRENO BM, COLLINS M, WOOD CR, HONJO T 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, Oct 2;192(7), 1027-34.
- GAJEWSKI, T. F. 2007. The Expanding Universe of Regulatory T Cell Subsets in Cancer. *Immunity*, 27, 185-187.
- GAME, D. S., WARRENS, A. N. & LECHLER, R. I. 2001. Rejection mechanisms in transplantation. *Wien Klin Wochenschr*, 113, 832-8.
- GAO, Q., QIU, S. J., FAN, J., ZHOU, J., WANG, X. Y., XIAO, Y. S., XU, Y., LI, Y. W. & TANG, Z. Y. 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol*, 25, 2586-93.
- GERMANN, A., SCHULZ, J. C., KEMP-KAMKE, B., ZIMMERMANN, H. & VON BRIESEN, H. 2011. Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium. *Biopreserv Biobank*, 9, 229-236.
- GLEISSNER, C. A., SHAKED, I., ERBEL, C., BOCKLER, D., KATUS, H. A. & LEY, K. 2010. CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res*, 106, 203-11.
- GODING, J. W., GROBBEN, B. & SLEGGERS, H. 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1638, 1-19.
- GOODENOUGH, D. A. & PAUL, D. L. 2009. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002576.
- GORNICKA, B., ZIARKIEWICZ-WROBLEWSKA, B., BOGDANSKA, M., OLDAKOWSKA-JEDYNAK, U., WROBLEWSKI, T., MORTON, M., ZIOLKOWSKI, J., PACZEK, L., KRAWCZYK, M. & WASIUTYNSKI, A. 2006. Pathomorphological features of acute rejection in patients after orthotopic liver transplantation: own experience. *Transplant Proc*, 38, 221-5.
- GRANT, M. B., TARNUZZER, R. W., CABALLERO, S., OZECK, M. J., DAVIS, M. I., SPOERRI, P. E., FEOKTISTOV, I., BIAGGIONI, I., SHRYOCK, J. C. & BELARDINELLI, L. 1999. Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res*, 85, 699-706.
- GREGORI, S. & RONCAROLO, M. G. 2018. Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application. *Front Immunol*, 9, 233.
- GRETEN, T. F., MALEK, N. P., SCHMIDT, S., ARENDS, J., BARTENSTEIN, P., BECHSTEIN, W., BERNATIK, T., BITZER, M., CHAVAN, A., DOLLINGER, M., DOMAGK, D., DROGNITZ, O., DUX, M., FARKAS, S., FOLPRECHT, G., GALLE, P., GEISSLER, M., GERKEN, G., HABERMEHL, D., HELMBERGER, T., HERFARTH, K., HOFFMANN, R. T., HOLTSMANN, M., HUPPERT, P., JAKOBS, T., KELLER, M., KLEMPNAUER, J., KOLLIGS, F., KORBER, J., LANG, H., LEHNER, F., LORDICK, F., LUBIENSKI, A., MANN, M. P., MAHNKEN, A., MOHLER, M., MONCH, C., NEUHAUS, P., NIEDERAU, C., OCKER, M., OTTO, G., PEREIRA, P., POTT, G., RIEMER, J., RINGE, K., RITTERBUSCH, U., RUMMENY, E., SCHIRMACHER, P., SCHLITT, H. J., SCHLOTTMANN, K., SCHMITZ, V., SCHULER, A., SCHULZE-BERGMANN, H., VON SCHWEINITZ, D., SEEHOFER, D., SITTER, H., STRASSBURG, C. P., STROSZCZYNSKI, C., STROBEL, D., TANNAPFEL, A., TROJAN, J., VAN THIEL, I., VOGEL, A., WACKER, F., WEDEMEYER, H., WEGE, H., WEINMANN, A., WITTEKIND, C., WORMANN, B. & ZECH, C. J. 2013. [Diagnosis of and therapy for hepatocellular carcinoma]. *Z Gastroenterol*, 51, 1269-326.
- GROUX H, O. G. A., BIGLER M, ROULEAU M, ANTONENKO S, DE VRIES JE, RONCAROLO MG 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, Oct 16;389(6652), 737-42.

- GUSE AH, D. S. C., BERG I, SKAPENKO AL, WEBER K, HEYER P, HOHENEGGER M, ASHAMU GA, SCHULZE-KOOPS H, POTTER BV, MAYR GW 1999. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature.* , Mar 4;398(6722), 70-3.
- HALE, D. A. 2006. Basic transplantation immunology. *Surg Clin North Am*, 86, 1103-25, v.
- HANAHAH, D. & COUSSENS, L. M. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21, 309-22.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D., MANGAN, P. R., TURNER, H., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M. & WEAVER, C. T. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6, 1123-32.
- HAUSLER, S. F., MONTALBAN DEL BARRIO, I., STROHSCHNEIN, J., CHANDRAN, P. A., ENGEL, J. B., HONIG, A., OSSADNIK, M., HORN, E., FISCHER, B., KROCKENBERGER, M., HEUER, S., SEIDA, A. A., JUNKER, M., KNEITZ, H., KLOOR, D., KLOTZ, K. N., DIETL, J. & WISCHHUSEN, J. 2011. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother*, 60, 1405-18.
- HAWIGER, D. & FLAVELL, R. A. 2009. Regulatory T cells that become autoaggressive. *Nat Immunol*, 10, 938-9.
- HORENSTEIN, A. L., CHILLEMI, A., ZACCARELLO, G., BRUZZONE, S., QUARONA, V., ZITO, A., SERRA, S. & MALAVASI, F. 2013. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology*, 2, e26246.
- HORWITZ, D. A., ZHENG, S. G. & GRAY, J. D. 2003. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol*, 74, 471-8.
- HOWARD M, G. J., BAZAN JF, LUND FE, SANTOS-ARGUMEDO L, PARKHOUSE RM, WALSETH TF, LEE HC 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*, Nov 12;262(5136), 1056-9.
- HOWARD M, O. G. A., ISHIDA H, DE WAAL MALEFYT R, DE VRIES J 1992. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol.*, Jul;12(4), 239-47.
- IBBERSON, M., BRON, S., GUEX, N., FAES-VAN'T HULL, E., IFTICENE-TREBOUX, A., HENRY, L., LEHR, H. A., DELALOYE, J. F., COUKOS, G., XENARIOS, I. & DOUCEY, M. A. 2013. TIE-2 and VEGFR kinase activities drive immunosuppressive function of TIE-2-expressing monocytes in human breast tumors. *Clin Cancer Res*, 19, 3439-49.
- IKEDA H, O. L., SCHREIBER RD 2002. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* , Apr;13(2), 95-109.
- IKEDA T, Y. K., KISHIKAWA K, KAKIZOE S, SHIMADA M, SUGIMACHI K. 1992 Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats *Hepatology.* , Aug;16(2), 454-61.
- JARA PI, B. M., SÁEZ JC 1995. Leukocytes express connexin 43 after activation with lipopolysaccharide and appear to form gap junctions with endothelial cells after ischemia-reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , Jul 18;92(15), 7011-5.
- JIANG, R., TAN, Z., DENG, L., CHEN, Y., XIA, Y., GAO, Y., WANG, X. & SUN, B. 2011. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology*, 54, 900-9.
- JOHNSON K, G. J., VAN ETTEN D, SALI A, HU SI, FARLEY D, KRUG H, HESSLE L, MILLÁN JL, TERKELTAUB R 2003. Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression. *J Bone Miner Res.* , Jun;18(6), 994-1004.
- JOHNSON K, M. A., CHEN Y, PRITZKER K, GODING J, TERKELTAUB R 1999. Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *J Bone Miner Res.*, Jun;14(6), 883-92.
- KATKHOUDA N, F. P., BENIZRI E, MOUIEL J 1992. Laser resection of a liver hydatid cyst under videolaparoscopy. *Br J Surg.*, Jun;79(6), 560-1.
- KAZEMI, M. H., RAOOFI MOHSENI, S., HOJJAT-FARSANGI, M., ANVARI, E., GHALAMFARSA, G., MOHAMMADI, H. & JADIDI-NIARAGH, F. 2018. Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cancer. *J Cell Physiol*, 233, 2032-2057.

- KHALIL, D. N., SMITH, E. L., BRENTJENS, R. J. & WOLCHOK, J. D. 2016. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 13, 273-90.
- KINIWA, Y., MIYAHARA, Y., WANG, H. Y., PENG, W., PENG, G., WHEELER, T. M., THOMPSON, T. C., OLD, L. J. & WANG, R. F. 2007. CD8⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 6947-58.
- KOBAYASHI, M., HOSAKA, T., IKEDA, K., SEKO, Y., KAWAMURA, Y., SEZAKI, H., AKUTA, N., SUZUKI, F., SUZUKI, Y., SAITOH, S., ARASE, Y. & KUMADA, H. 2011. Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment pre- and postoperatively. *Hepatol Res*, 41, 1036-45.
- KODELJA V, G. S. 1994. Dissection of macrophage differentiation pathways in cutaneous macrophage disorders and in vitro. *Exp Dermatol.*, Dec;3(6), 257-68.
- KOJIMA T, Y. M., MOCHIZUKI C, MITAKA T, SAWADA N, MOCHIZUKI Y 1997. Different changes in expression and function of connexin 26 and connexin 32 during DNA synthesis and redifferentiation in primary rat hepatocytes using a DMSO culture system. *Hepatology*, Sep;26(3), 585-97.
- KOK, B., DONG, V. & KARVELLAS, C. J. 2019. Graft Dysfunction and Management in Liver Transplantation. *Critical Care Clinics*, 35, 117-133.
- KOO, J. & WANG, H. L. 2018. Acute, Chronic, and Humoral Rejection: Pathologic Features Under Current Immunosuppressive Regimes. *Surg Pathol Clin*, 11, 431-452.
- KREBS, C., KOESTNER, W., NISSEN, M., WELGE, V., PARUSEL, I., MALAVASI, F., LEITER, E. H., SANTELLA, R. M., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. 2003. Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Analytical Biochemistry*, 314, 108-115.
- KRENÁCS T, R. M. 1995. Immunohistological detection of gap junctions in human lymphoid tissue: connexin43 in follicular dendritic and lymphoendothelial cells. *J Histochem Cytochem.* , Nov;43(11), 1125-37.
- KRENZIEN, F., SCHMELZLE, M., STRUECKER, B., RASCHZOK, N., BENZING, C., JARA, M., BAHRA, M., OLLINGER, R., SAUER, I. M., PASCHER, A., PRATSCHKE, J. & ANDREOU, A. 2018. Liver Transplantation and Liver Resection for Cirrhotic Patients with Hepatocellular Carcinoma: Comparison of Long-Term Survivals. *J Gastrointest Surg*, 22, 840-848.
- KRISTIANSEN M, G. J., JACOBSEN C, SONNE O, HOFFMAN HJ, LAW SK, MOESTRUP SK 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor *Nature*, Jan 11;409(6817), 198-201.
- KUEMMERLE JF, M. G. 1995. Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in intestinal longitudinal muscle. *J Biol Chem.*, Oct 27;270(43), 25488-94.
- KUKULSKI F, L. S., LAVOIE EG, LECKA J, BIGONNESSE F, KNOWLES AF, ROBSON SC, KIRLEY TL, SÉVIGNY J 2005. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*, Jun;1(2), 193-204.
- KUMAR, S., MOHAPATRA, N., BORLE, D. P., CHOUDHURY, A., SARIN, S. & GUPTA, E. 2018. Non invasive diagnosis of acute cellular rejection after liver transplantation - Current opinion. *Transpl Immunol*, 47, 1-9.
- KÜNZLI, B. M., BERBERAT, P. O., GIESE, T., CSIZMADIA, E., KACZMAREK, E., BAKER, C., HALACELI, I., BÜCHLER, M. W., FRIESS, H. & ROBSON, S. C. 2007. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292, G223-G230.
- KUNZLI, B. M., BERNLOCHNER, M. I., RATH, S., KASER, S., CSIZMADIA, E., ENJOYOJI, K., COWAN, P., D'APICE, A., DWYER, K., ROSENBERG, R., PERREN, A., FRIESS, H., MAURER, C. A. & ROBSON, S. C. 2011. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. *Purinergic Signal*, 7, 231-41.
- LAN, Y. T., FAN, X. P., FAN, Y. C., ZHAO, J. & WANG, K. 2017. Change in the Treg/Th17 cell imbalance in hepatocellular carcinoma patients and its clinical value. *Medicine (Baltimore)*, 96, e7704.
- LANGOWSKI, J. L., ZHANG, X., WU, L., MATTSO, J. D., CHEN, T., SMITH, K., BASHAM, B., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A. & OFT, M. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442, 461-5.

- LEE, I. C., HUANG, Y. H., CHAU, G. Y., HUO, T. I., SU, C. W., WU, J. C. & LIN, H. C. 2013. Serum interferon gamma level predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients after curative treatments. *Int J Cancer*, 133, 2895-902.
- LEE YM, O. B. C., YAMASHIKI N, BEHRO M, WEPPLER D, TZAKIS AG, SCHIFF ER. 2003. Preservation injury patterns in liver transplantation associated with poor prognosis *Transplant Proc.*, Dec;35(8):, 2964-6.
- LEONE, R. D. & EMENS, L. A. 2018. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 6, 57.
- LI, C. & ZUO, W. 2019. IL-10 in vitro could enhance IFN γ expression and suppress PD-1 expression in CD8 T cells from esophageal cancer patients. *Exp Cell Res*, 379, 159-165.
- LI, L., YIN, Q., KUSS, P., MALIGA, Z., MILLAN, J. L., WU, H. & MITCHISON, T. J. 2014. Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat Chem Biol*, 10, 1043-8.
- LI, W. H., QIU, Y., ZHANG, H. Q., LIU, Y., YOU, J. F., TIAN, X. X. & FANG, W. G. 2013. P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. *Br J Cancer*, 109, 1666-75.
- LI, W. H., QIU, Y., ZHANG, H. Q., TIAN, X. X. & FANG, W. G. 2015a. P2Y2 Receptor and EGFR Cooperate to Promote Prostate Cancer Cell Invasion via ERK1/2 Pathway. *PLoS One*, 10, e0133165.
- LI, X., PENG, J., PANG, Y., YU, S., YU, X., CHEN, P., WANG, W., HAN, W., ZHANG, J., YIN, Y. & ZHANG, Y. 2015b. Identification of a FOXP3(+)/CD3(+)/CD56(+) population with immunosuppressive function in cancer tissues of human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, 5, 14757.
- LIANG, S. C., TAN, X. Y., LUXENBERG, D. P., KARIM, R., DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., COLLINS, M. & FOUSSER, L. A. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*, 203, 2271-9.
- LIN, S. Z., CHEN, K. J., XU, Z. Y., CHEN, H., ZHOU, L., XIE, H. Y. & ZHENG, S. S. 2013. Prediction of recurrence and survival in hepatocellular carcinoma based on two Cox models mainly determined by FoxP3+ regulatory T cells. *Cancer Prev Res (Phila)*, 6, 594-602.
- LIN, Z. W., WU, L. X., XIE, Y., OU, X., TIAN, P. K., LIU, X. P., MIN, J., WANG, J., CHEN, R. F., CHEN, Y. J., LIU, C., YE, H. & OU, Q. J. 2015. The expression levels of transcription factors T-bet, GATA-3, ROR γ and FOXP3 in peripheral blood lymphocyte (PBL) of patients with liver cancer and their significance. *Int J Med Sci*, 12, 7-16.
- LIU, Y., YANG, B., MA, J., WANG, H., HUANG, F., ZHANG, J., CHEN, H. & WU, C. 2011. Interleukin-21 induces the differentiation of human Tc22 cells via phosphorylation of signal transducers and activators of transcription. *Immunology*, 132, 540-8.
- LURJE, I., CZIGANY, Z., BEDNARSCH, J., RODEBURG, C., ISFORT, P., NEUMANN, U. P. & LURJE, G. 2019. Treatment Strategies for Hepatocellular Carcinoma (-) a Multidisciplinary Approach. *Int J Mol Sci*, 20.
- LUTHJE, J. 1989. Origin, metabolism and function of extracellular adenosine nucleotides in the blood. *Klin Wochenschr*, 67, 317-27.
- MADSEN, M., MOLLER, H. J., NIELSEN, M. J., JACOBSEN, C., GRAVERSEN, J. H., VAN DEN BERG, T. & MOESTRUP, S. K. 2004. Molecular characterization of the haptoglobin-hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J Biol Chem*, 279, 51561-7.
- MAHONEY, K. M., RENNERT, P. D. & FREEMAN, G. J. 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov*, 14, 561-84.
- MALAVASI, F., DEAGLIO, S., ZACCARELLO, G., HORENSTEIN, A. L., CHILLEMI, A., AUDRITO, V., SERRA, S., GANDIONE, M., ZITTELLA, A. & TIZZANI, A. 2010. The hidden life of NAD⁺-consuming ectoenzymes in the endocrine system. *J Mol Endocrinol*, 45, 183-91.
- MANDAPATHIL, M., SZCZEPANSKI, M., HARASYMCZUK, M., REN, J., CHENG, D., JACKSON, E. K., GORELIK, E., JOHNSON, J., LANG, S. & WHITESIDE, T. L. 2012. CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4(+) T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncimmunology*, 1, 659-669.
- MANDAPATHIL, M., SZCZEPANSKI, M. J., SZAJNIK, M., REN, J., JACKSON, E. K., JOHNSON, J. T., GORELIK, E., LANG, S. & WHITESIDE, T. L. 2010. Adenosine and prostaglandin E2

- cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J Biol Chem*, 285, 27571-80.
- MANDAPATHIL, M., SZCZEPANSKI, M. J., SZAJNIK, M., REN, J., LENZNER, D. E., JACKSON, E. K., GORELIK, E., LANG, S., JOHNSON, J. T. & WHITESIDE, T. L. 2009. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 15, 6348-57.
- MANDREKAR, J. N. 2010. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*, 5, 1315-6.
- MANTOVANI, A., ROMERO, P., PALUCKA, A. K. & MARINCOLA, F. M. 2008. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet*, 371, 771-83.
- MARGARIT C, L. J., BALSELLS J, CHARCO R, MURIO E, EDO A, GIFRE E 1994. Recipient hepatectomy with preservation of inferior vena cava reduces the need for veno-venous bypass in liver transplantation. *Transpl Int.* , 1, S152-4.
- MARTIN, J. C., BERIOU, G., HESLAN, M., CHAUVIN, C., UTRIAINEN, L., AUMEUNIER, A., SCOTT, C. L., MOWAT, A., CEROVIC, V., HOUSTON, S. A., LEBOEUF, M., HUBERT, F. X., HEMONT, C., MERAD, M., MILLING, S. & JOSIEN, R. 2014. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol*, 7, 101-13.
- MARTINI, M., TESTI, M. G., PASETTO, M., PICCHIO, M. C., INNAMORATI, G., MAZZOCCO, M., UGEL, S., CINGARLINI, S., BRONTE, V., ZANOVELLO, P., KRAMPERA, M., MOSNA, F., CESTARI, T., RIVIERA, A. P., BRUTTI, N., BARBIERI, O., MATERA, L., TRIDENTE, G., COLOMBATTI, M. & SARTORIS, S. 2010. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine*, 28, 3548-57.
- MASCANFRONI, I. D., TAKENAKA, M. C., YESTE, A., PATEL, B., WU, Y., KENISON, J. E., SIDDIQUI, S., BASSO, A. S., OTTERBEIN, L. E., PARDOLL, D. M., PAN, F., PRIEL, A., CLISH, C. B., ROBSON, S. C. & QUINTANA, F. J. 2015. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1-alpha. *Nat Med*, 21, 638-46.
- MATHAI AM, K. M., ALEXANDER J, KERNOCHAN LE, SWANSON PE, YEH MM 2012 Role of Foxp3-positive tumor-infiltrating lymphocytes in the histologic features and clinical outcomes of hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol.* , Jul;36(7), 980-6.
- MATSUBARA, T., KANTO, T., KURODA, S., YOSHIO, S., HIGASHITANI, K., KAKITA, N., MIYAZAKI, M., SAKAKIBARA, M., HIRAMATSU, N., KASAHARA, A., TOMIMARU, Y., TOMOKUNI, A., NAGANO, H., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. 2013. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis. *Hepatology*, 57, 1416-25.
- MAZZAFERRO, V., REGALIA, E., DOCI, R., ANDREOLA, S., PULVIRENTI, A., BOZZETTI, F., MONTALTO, F., AMMATUNA, M., MORABITO, A. & GENNARI, L. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*, 334, 693-9.
- MÉSZÁROS LG, B. J., CHU A 1993 Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Nature*, Jul 1;364(6432), 76-9.
- MOESTRUP, S. 1994. The alpha 2-macroglobulin receptor and epithelial glycoprotein-330: two giant receptors mediating endocytosis of multiple ligands. *Biochim Biophys Acta*, Jun 29;1197(2), 197-213.
- MOJIC, M., TAKEDA, K. & HAYAKAWA, Y. 2017. The Dark Side of IFN-gamma: Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci*, 19.
- MORISE, Z. & WAKABAYASHI, G. 2017. First quarter century of laparoscopic liver resection. *World J Gastroenterol*, 23, 3581-3588.
- MORRA M, Z. M., TERHORST C, SANCHO J, MALAVASI F 1998 CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. *FASEB J*, May;12(7), 581-92.
- MULLER, C. E. & JACOBSON, K. A. 2011. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 1290-308.
- MURDOCH, C., TAZZYMANN, S., WEBSTER, S. & LEWIS, C. E. 2007. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol*, 178, 7405-11.

- N'KONTCHOU, G., MAHAMOUDI, A., AOUT, M., GANNE-CARRIE, N., GRANDO, V., CODERC, E., VICAUT, E., TRINCHET, J. C., SELLIER, N., BEAUGRAND, M. & SEROR, O. 2009. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis. *Hepatology*, 50, 1475-83.
- NAMASIVAYAM, V., LEE, S.-Y. & MÜLLER, C. E. 2017. The promiscuous ectonucleotidase NPP1: molecular insights into substrate binding and hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861, 603-614.
- NEIL, D. A. & HUBSCHER, S. G. 2001. Are parenchymal changes in early post-transplant biopsies related to preservation-reperfusion injury or rejection? *Transplantation*, 71, 1566-72.
- NEWTON, R., PRIYADHARSHINI, B. & TURKA, L. A. 2016. Immunometabolism of regulatory T cells. *Nat Immunol*, 17, 618-25.
- NIKIFOROV, A., DOLLE, C., NIERE, M. & ZIEGLER, M. 2011. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem*, 286, 21767-78.
- NOGRALES, K. E., ZABA, L. C., SHEMER, A., FUENTES-DUCULAN, J., CARDINALE, I., KIKUCHI, T., RAMON, M., BERGMAN, R., KRUEGER, J. G. & GUTTMAN-YASSKY, E. 2009. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 1244-52 e2.
- OVIEDO-ORTA, E., HOY, T. & EVANS, W. H. 2000. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology*, 99, 578-90.
- PAHL, J. & CERWENKA, A. 2017. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology*, 222, 11-20.
- PASSLICK, B., FLIEGER, D. & ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 74, 2527-34.
- PERALTA, C., JIMENEZ-CASTRO, M. B. & GRACIA-SANCHO, J. 2013. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol*, 59, 1094-106.
- PERUSINA LANFRANCA, M., LIN, Y., FANG, J., ZOU, W. & FRANKEL, T. 2016. Biological and pathological activities of interleukin-22. *J Mol Med (Berl)*, 94, 523-34.
- PORTOLANI, N., CONIGLIO, A., GHIDONI, S., GIOVANELLI, M., BENETTI, A., TIBERIO, G. A. & GIULINI, S. M. 2006. Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Ann Surg*, 243, 229-35.
- PULTE, D., FURMAN, R. R., BROEKMAN, M. J., DROSOPOULOS, J. H., BALLARD, H. S., OLSON, K. E., KIZER, J. R. & MARCUS, A. J. 2011. CD39 expression on T lymphocytes correlates with severity of disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 11, 367-72.
- QUARONA, V., ZACCARELLO, G., CHILLEMI, A., BRUNETTI, E., SINGH, V. K., FERRERO, E., FUNARO, A., HORENSTEIN, A. L. & MALAVASI, F. 2013. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom*, 84, 207-17.
- RATCLIFFE NR, K. S., MORGANELLI PM 2001. Immunocytochemical detection of Fc gamma receptors in human atherosclerotic lesions *Immunol Lett*, Jul 2;77(3), 169-74.
- REICH, H., MCGLYNN, F., DECAPRIO, J. & BUDIN, R. 1991. Laparoscopic excision of benign liver lesions. *Obstet Gynecol*, 78, 956-8.
- ROBSON, S. C., CANDINAS, D., HANCOCK, W. W., WRIGHTON, C., WINKLER, H. & BACH, F. H. 1995. Role of endothelial cells in transplantation. *Int Arch Allergy Immunol*, 106, 305-22.
- ROBSON SC, K. E., SIEGEL JB, CANDINAS D, KOZIAK K, MILLAN M, HANCOCK WW, BACH FH 1997. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med.* , Jan 6;185(1), 153-63.
- ROBSON, S. C., WU, Y., SUN, X., KNOSALLA, C., DWYER, K. & ENJOJI, K. 2005. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost*, 31, 217-33.
- RODRIGUEZ-PERALVAREZ, M., RICO-JURI, J. M., TSOCHATZIS, E., BURRA, P., DE LA MATA, M. & LERUT, J. 2016. Biopsy-proven acute cellular rejection as an efficacy endpoint of randomized trials in liver transplantation: a systematic review and critical appraisal. *Transpl Int*, 29, 961-73.

- RUOPP, M. D., PERKINS, N. J., WHITCOMB, B. W. & SCHISTERMAN, E. F. 2008. Youden Index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biom J*, 50, 419-30.
- RUTZ S, E. C., OUYANG W 2013. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev.*, Mar;252(1), 116-32.
- SAEZ JC, B. V., BRANES MC, MARTINEZ AD, BEYER EC 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.*, Oct;83(4), 1359-400.
- SATO, Y., SEKINE, T. & OHWADA, S. 1994. Alpha-fetoprotein-producing rectal cancer: calculated tumor marker doubling time. *J Surg Oncol*, 55, 265-8.
- SCHLITT, H. J., JONAS, S., GANTEN, T. M., GRANNAS, G., MOENCH, C., RAUCHFUSS, F., OBED, A., TISONE, G., PINNA, A. D., GERUNDA, G. E. & BECKEBAUM, S. 2013. Effects of mycophenolate mofetil introduction in liver transplant patients: results from an observational, non-interventional, multicenter study (LOBSTER). *Clin Transplant*, 27, 368-78.
- SCHMELZLE, M., KRENZIEN, F., SCHONING, W. & PRATSCHKE, J. 2018. [Treatment of hepatocellular carcinoma in the cirrhotic and non-cirrhotic liver]. *Chirurg*, 89, 851-857.
- SCHONFELD, I. & KRAYWINKEL, K. 2018. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Germany. *Onkologie*, 24, 653-658.
- SCHULER, P. J., SAZE, Z., HONG, C. S., MULLER, L., GILLESPIE, D. G., CHENG, D., HARASYMCZUK, M., MANDAPATHIL, M., LANG, S., JACKSON, E. K. & WHITESIDE, T. L. 2014. Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol*, 177, 531-43.
- SCURR, M., LADELL, K., BESNEUX, M., CHRISTIAN, A., HOCKEY, T., SMART, K., BRIDGEMAN, H., HARGEST, R., PHILLIPS, S., DAVIES, M., PRICE, D., GALLIMORE, A. & GODKIN, A. 2014. Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP(+) Foxp3(-) T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3(+) regulatory T cells. *Mucosal Immunol*, 7, 428-39.
- SHAKED, A., GHOBRIAL, R. M., MERION, R. M., SHEARON, T. H., EMOND, J. C., FAIR, J. H., FISHER, R. A., KULIK, L. M., PRUETT, T. L., TERRAULT, N. A. & GROUP, A. A. S. 2009. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am J Transplant*, 9, 301-8.
- SHANG XY, C. H., ZHANG HG, PANG XW, QIAO H, PENG JR, QIN LL, FEI R, MEI MH, LENG XS, GNJATIC S, RITTER G, SIMPSON AJ, OLD LJ, CHEN WF 2004. The spontaneous CD8+ T-cell response to HLA-A2-restricted NY-ESO-1b peptide in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res.*, Oct 15;10(20), 6946-55.
- SHAW BW JR, M. D., MARQUEZ JM, KANG YG, BUGBEE AC JR, IWATSUKI S, GRIFFITH BP, HARDESTY RL, BAHNSON HT, STARZL TE 1984. Venous bypass in clinical liver transplantation. *Ann Surg.*, Oct;200(4), 524-34. .
- STARZL TE, M. T., VONKAULLA KN, HERMANN G, BRITAIN RS, WADDELL WR 1963. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet.*, Dec;117, 659-76.
- STREET, D., KAUFMANN, A. M., VAUGHAN, A., FISHER, S. G., HUNTER, M., SCHRECKENBERGER, C., POTKUL, R. K., GISSMANN, L. & QIAO, L. 1997. Interferon-gamma enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells. *Gynecol Oncol*, 65, 265-72.
- SULAHIAN, T. H., HOGGER, P., WAHNER, A. E., WARDWELL, K., GOULDING, N. J., SORG, C., DROSTE, A., STEHLING, M., WALLACE, P. K., MORGANELLI, P. M. & GUYRE, P. M. 2000. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*, 12, 1312-21.
- TABRIZIAN, P., JIBARA, G., SHRAGER, B., SCHWARTZ, M. & ROAYAIE, S. 2015. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Ann Surg*, 261, 947-55.
- TAKASAWA S, T. A., NOGUCHI N, KOGUMA T, NATA K, SUGIMOTO T, YONEKURA H, OKAMOTO H 1993. Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. *J Biol Chem.*, Dec 15;268(35), 26052-4.
- TAO, L. Y., CAI, L., HE, X. D., LIU, W. & QU, Q. 2010. Comparison of serum tumor markers for intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Am Surg*, 76, 1210-3.
- TERKELTAUB, R. 2001. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol.*, Jul;281(1), C1-C11.

- THIMME, R., NEAGU, M., BOETTLER, T., NEUMANN-HAEFELIN, C., KERSTING, N., GEISLER, M., MAKOWIEC, F., OBERMAIER, R., HOPT, U. T., BLUM, H. E. & SPANGENBERG, H. C. 2008. Comprehensive analysis of the alpha-fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48, 1821-33.
- TOMPA, A., NILSSON-BOWERS, A. & FARESJO, M. 2018. Subsets of CD4(+), CD8(+), and CD25(hi) Lymphocytes Are in General Not Influenced by Isolation and Long-Term Cryopreservation. *J Immunol*, 201, 1799-1809.
- TSAI, K. Y., CHEN, H. A., WANG, W. Y. & HUANG, M. T. 2019. Long-term and short-term surgical outcomes of laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma: might laparoscopic approach be better in early HCC? *Surg Endosc*, 33, 1131-1139.
- VAN DEN EYNDE BJ, V. D. B. P. 1997. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol.* , Oct;9(5), 684-93.
- VAN DEN HEUVEL MM, T. C., VAN AS JH, VAN DEN BERG TK, FLUITSMA DM, DIJKSTRA CD, DÖPP EA, DROSTE A, VAN GAALEN FA, SORG C, HÖGGER P, BEELEN RH 1999. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol.* , Nov;66(5), 858-66.
- VAN MEER, S., DE MAN, R. A., SIERSEMA, P. D. & VAN ERPECUM, K. J. 2013. Surveillance for hepatocellular carcinoma in chronic liver disease: evidence and controversies. *World J Gastroenterol*, 19, 6744-56.
- VENNERI, M. A., PALMA, M. D., PONZONI, M., PUCCI, F., SCIELZO, C., ZONARI, E., MAZZIERI, R., DOGLIONI, C. & NALDINI, L. 2007. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*, 109, 5276-5285.
- VINKEN, M. 2015. Introduction: connexins, pannexins and their channels as gatekeepers of organ physiology. *Cell Mol Life Sci*, 72, 2775-8.
- VOLPE, E., SERVANT, N., ZOLLINGER, R., BOGIATZI, S. I., HUPE, P., BARILLOT, E. & SOUMELIS, V. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, 9, 650-7.
- WANG, H. Y. & WANG, R. F. 2007. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol*, 19, 217-23.
- WANG, L., YI, T., KORTYLEWSKI, M., PARDOLL, D. M., ZENG, D. & YU, H. 2009. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med*, 206, 1457-64.
- WANG, Z. S., WU, L. Q., YI, X., GENG, C., LI, Y. J. & YAO, R. Y. 2013. Connexin-43 can delay early recurrence and metastasis in patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma and low serum alpha-fetoprotein after radical hepatectomy. *BMC Cancer*, 13, 306.
- WEST, J., CARD, T. R., AITHAL, G. P. & FLEMING, K. M. 2017. Risk of hepatocellular carcinoma among individuals with different aetiologies of cirrhosis: a population-based cohort study. *Aliment Pharmacol Ther*, 45, 983-990.
- WIDMER, J. D., SCHLEGEL, A., GHAZALY, M., RICHIE DAVIDSON, B., IMBER, C., SHARMA, D., MALAGO, M. & POLLOK, J. M. 2018. Piggyback or Cava Replacement: Which Implantation Technique Protects Liver Recipients From Acute Kidney Injury and Complications? *Liver Transpl*, 24, 1746-1756.
- WOLK, K., KUNZ, S., ASADULLAH, K. & SABAT, R. 2002. Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members? *The Journal of Immunology*, 168, 5397-5402.
- XU, X., TAN, Y., QIAN, Y., XUE, W., WANG, Y., DU, J., JIN, L. & DING, W. 2019. Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 98, e13923.
- XU, Y., LI, H., GAO, R. L., ADEYEMO, O., ITKIN, M. & KAPLAN, D. E. 2011. Expansion of interferon-gamma-producing multifunctional CD4+ T-cells and dysfunctional CD8+ T-cells by glypican-3 peptide library in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Immunol*, 139, 302-13.
- YAN, J., LIU, X. L., XIAO, G., LI, N. L., DENG, Y. N., HAN, L. Z., YIN, L. C., LING, L. J. & LIU, L. X. 2014. Prevalence and clinical relevance of T-helper cells, Th17 and Th1, in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 9, e96080.
- YANG, J. D., HAINAUT, P., GORES, G. J., AMADOU, A., PLYMOTH, A. & ROBERTS, L. R. 2019a. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16, 589-604.

- YANG, J. D. & ROBERTS, L. R. 2010. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7, 448-58.
- YANG, Y. M., KIM, S. Y. & SEKI, E. 2019b. Inflammation and Liver Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Semin Liver Dis*, 39, 26-42.
- YAO, W., HE, J. C., YANG, Y., WANG, J. M., QIAN, Y. W., YANG, T. & JI, L. 2017. The Prognostic Value of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma: a Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*, 7, 7525.
- YEH HI, R. S., DUPONT E, COPPEN SR, SEVERS NJ 1998. Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium. *Circ Res.*, Dec 14-28;83(12), 1248-63.
- ZERBINI, A., PILLI, M., SOLIANI, P., ZIEGLER, S., PELOSI, G., ORLANDINI, A., CAVALLO, C., UGGERI, J., SCANDROGLIO, R., CRAFA, P., SPAGNOLI, G. C., FERRARI, C. & MISSALE, G. 2004. Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+ cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 40, 102-109.
- ZHAI, Y., BUSUTTIL, R. W. & KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. 2011. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant*, 11, 1563-9.
- ZHAI, Y., PETROWSKY, H., HONG, J. C., BUSUTTIL, R. W. & KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. 2013. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10, 79-89.
- ZHANG, Y., WANG, X., MAO, L., YANG, D., GAO, W., TIAN, Z., ZHANG, M., YANG, X., MA, K., WU, Y. & NI, B. 2017. Dual roles of IL-22 at ischemia-reperfusion injury and acute rejection stages of rat allograft liver transplantation. *Oncotarget*, 8, 115384-115397.
- ZHAO, F., KORANGY, F. & GRETEN, T. F. 2012. Cellular immune suppressor mechanisms in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis*, 30, 477-82.
- ZHONG, C., SONG, Z. & LI, M. 2019. Gastric cancer patients display a distinctive population of IFN γ (+)IL10(+) double positive CD8 T cells, which persists longer during prolonged activation. *Exp Cell Res*, 382, 111487.
- ZHOU, J., DING, T., PAN, W., ZHU, L. Y., LI, L. & ZHENG, L. 2009. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer*, 125, 1640-8.
- ZHU, J., YAMANE, H. & PAUL, W. E. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-89.
- ZHU, Z., ZHANG, X., DONG, W., WANG, X., HE, S., ZHANG, H., WANG, X., WEI, R., CHEN, Y., LIU, X. & GUO, C. 2020. TREM2 suppresses the proinflammatory response to facilitate PRRSV infection via PI3K/NF-kappaB signaling. *PLoS Pathog*, 16, e1008543.
- ZIEGLER-HEITBROCK, L., ANCUTA, P., CROWE, S., DALOD, M., GRAU, V., HART, D. N., LEENEN, P. J., LIU, Y. J., MACPHERSON, G., RANDOLPH, G. J., SCHERBERICH, J., SCHMITZ, J., SHORTMAN, K., SOZZANI, S., STROBL, H., ZEMBALA, M., AUSTYN, J. M. & LUTZ, M. B. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116, e74-80.
- ZOCCHI E, F. L., GUIDA L, CALDER L, DE FLORA A 1995. Self-aggregation of purified and membrane-bound erythrocyte CD38 induces extensive decrease of its ADP-ribosyl cyclase activity. *FEBS Lett.* , Feb 6;359(1), 35-40.
- ZOU, W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5, 263-74.

12. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Babigian, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Analyse purinergischer Stoffwechselwege und NAD⁺-Konzentration in Patienten mit hepatozellulärem Karzinom nach Leberresektion und Lebertransplantation/Analysis of purinergic metabolic pathways and NAD⁺ concentration in patients with hepatocellular carcinoma after liver resection and liver transplantation 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

13. Lebenslauf

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

14. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Erstbetreuer Herrn PD Dr. med. Felix Krenzien und meinem Zweitbetreuer Herrn Dr. med. Georgi Atanasov für die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes mit optimalen Arbeitsbedingungen. Insbesondere möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung, die sehr gute Betreuung und die vielen förderlichen Ratschläge sowie für die stets offene Tür bedanken.

Danken möchte ich außerdem dem gesamten Team der AG Krenzien, insbesondere Dr. rer. medic. Dipl. Ing. Annekatri Leder, Dr. rer. nat. Katrin Splith sowie Dr. rer. nat. Jörg Mengwasser.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Günter und Christine Babigian, die mir das Studium ermöglichten, sowie meiner Schwester Laura bedanken. Speziell bin ich für ihre Geduld, Rücksichtnahme und für die unaufhörliche Unterstützung in aller Hinsicht dankbar.

An letzter, doch eigentlich an erster Stelle möchte ich meinem Freund Raphael Brandt, der immer an meiner Seite stand und steht, danken. Vornehmlich bin ich für sein unermüdliches geduldiges Zuhören, seine Hilfe in Wort und Tat, für seine Rücksichtnahme und uneingeschränkten Aufmunterungen sehr dankbar.