

Spezifische MikroRNA-Profile als Biomarker zur Diagnose des hepatozellulären
Karzinoms auf dem Boden einer äthyltoxischen Leberzirrhose in der
Indikationsstellung zur Lebertransplantation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

Eingereicht von: **Philipp Felgendreff**

Geboren am: 11.08.1987 in Wernigerode

Angefertigt am: Klinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und
Gefäßchirurgie, Universitätsklinik Leipzig

Betreuer: Professor Dr. med. Michael Bartels

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.05.2016

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Uwe Eichfeld
2. Prof. Dr. med. Hüseyin Bektas

Mit herzlichem Dank an
Jonas, Carolin,
Susann und Hartmut Felgendreff

Inhaltsverzeichnis

I BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG	6
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	9
1.1 AUFBAU DER LEBER	9
1.2 ETHANOLABBAU	10
1.3 DER NUTRITIV TOXISCHE LEBERSCHADEN	12
1.4 LEBERFIBROSE UND LEBERZIRRHOSE	13
1.5 HEPATOZELLULÄRES KARZINOM	14
1.6 DIE LEBERTRANSPLANTATION	17
1.7 MIKRO-RIBONUCLEIC ACID (miRNA)	20
2 FRAGESTELLUNG	23
3 METHODEN	24
3.1 MATERIALLISTE	24
3.2 STUDIENAUFBAU	27
3.3 PROBENENTNAHME	28
3.4 BESTIMMUNG DER LABORPARAMETER	29
3.5 HISTOPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER GEWEBEPROBEN UND GRUPPENBILDUNG	29
3.6 RNA-ISOLIERUNG AUS GEWEBEPROBEN	29
3.7.1 RNA-AUFREINIGUNG MIT TRIZOL®	30
3.7.2 RNA-AUFREINIGUNG MITTELS miRNEASY MINI KIT®	33
3.8 QUALITATIVE- UND QUANTITATIVE VERMESSUNG DER RNA-PROBEN	34
3.8.1 NANODROP™-MESSUNG	34
3.8.2 GELELEKTROPHORESE	35
3.8.3 BIOANALYZER	36
3.9 MICROARRAY ANALYSE	36
3.10 STATISTISCHE ANALYSE	37
4 ERGEBNISSE	38
4.1 PATIENTENDATEN	38
4.1.1 ALLGEMEINE PATIENTENDATEN	38
4.1.2 SPEZIELLE PATIENTENDATEN	39
4.2 ETABLIERUNG DER RNA-ISOLATION	42
4.3 AUFREINIGUNG DER GESAMT-RNA ZUR miRNA-ANALYSE	46
4.4 ERGEBNISSE DER miRNA-ANALYSE	48
4.4.1 miRNA-EXPRESSIONSVERGLEICH ZWISCHEN T-GEWEBE UND ST-GEWEBE	48
4.4.2 miRNA-EXPRESSIONSVERGLEICH ZWISCHEN T-GEWEBE UND EX-GEWEBE	51
4.4.3 miRNA-EXPRESSIONSVERGLEICH ZWISCHEN EX-GEWEBE UND ST-GEWEBE	52
5 DISKUSSION	54
6 ZUSAMMENFASSUNG	65
7 QUELLENVERZEICHNIS	68
8 ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT	77

9 LEBENSLAUF	78
10 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	80
11 DANKSAGUNG	82

I Bibliographische Beschreibung

Name: Philipp Felgendreff

Titel: Spezifische MikroRNA-Profile als Biomarker zur Diagnose des hepatozellulären Karzinoms auf dem Boden einer äthyltoxischen Leberzirrhose in der Indikationsstellung zur Lebertransplantation

Universität Leipzig AöR, Dissertation

82 S., 109 Lit., 11 Abb., 15 Tab.

Die Inzidenz chronischer Lebererkrankungen und des hepatozellulären Karzinoms (HCC) mit nutritiv toxischer Genese ist in den vergangenen Jahren in den Industrienationen stetig angestiegen. Daher wird bereits seit längerem über eine Stadien-basierte Therapie bis hin zur Lebertransplantation intensiv diskutiert. In diesem Kontext zeigt die Stadien-spezifische Analyse der MikroRNA-(miRNA)-Profile ein großes Potenzial. In der vorliegenden Studie wurden erstmals die miRNA-Profile in Gewebeproben von Patienten mit einem hepatozellulärem Karzinom (HCC) und Leberzirrhose analysiert. Von 189 lebertransplantierten Patienten zeigten 93 eine nutritiv toxische Genese. Die Aufteilung der Patienten in zwei Studiengruppen erfolgte nach histopathologischer Beurteilung. So konnte bei 59 Patienten eine äthyltoxische Leberzirrhose ohne HCC (Gruppe A) und bei 34 Patienten ein HCC in äthyltoxischer Leberzirrhose (Gruppe B) nachgewiesen werden. In Gruppe B erfolgte die Probenentnahme aus dem HCC-Tumor („T“) und dem umgebenden Leberzirrhosegewebe („sT“). Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben von 30 Patienten mit nutritiv toxischem Leberschaden, wurde Trizol[®] genutzt (16 Gruppe A „Ex“, 14 Gruppe B „sT“, 7 Gruppe B „T“). Die miRNA-Analyse dieser Gewebeproben wurde mittels miRCURY LNA Array (6. und 7. Generation) und Agilent G2565BA Microarray Scanner durchgeführt. Die Untersuchung der laboranalytischen Parameter und des präoperativen Lab-MELD ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Untersuchungsgruppen. Die Patienten der Gruppe A war signifikant jünger als die Patienten der Gruppe B. 40 miRNA zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen T- und sT-Gewebe, 29 miRNA zwischen T- und Ex-Gewebe und 56 miRNA zwischen Ex- und sT-Gewebe. Unter Berücksichtigung der bekannten Zielproteine der identifizierten miRNA wird das diagnostische Potenzial der miRNA-Profiländerungen bei der nutritiv toxischen Genese der Leberzirrhose mit und ohne HCC diskutiert.

II Abkürzungsverzeichnis

A	Absorptionskoeffizient
A (260/230)	Absorptionsquotient 260/230 nm
A (260/280)	Absorptionsquotient 260/280 nm
ALT	Alanin-Aminotransferase
AML	Akute myeloische Leukämie
ASH	Alkohol-bedingte Steatohepatitis
AST	Aspartat-Aminotransferase
AZ	Aktenzeichen
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer Staging Classification</i>
bp	Basenpaar
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CDC	<i>Cell division cycle homolog</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CRP	C-reaktives Protein
CTDSP	<i>Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase family</i>
DDR1	<i>Discoidin domain receptor-1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
Ex	Zirrhosegewebe der Gruppe A
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2 Protein</i>
FC	Absolute Änderung der miRNA-Expression zwischen den jeweiligen Untersuchungsgruppen
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom
INR	<i>International normalized ratio</i>
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
Log ₂	Logarithmus zur Basis 2
MELD	<i>Model of endstage liver disease</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	MikroRNA
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
PST	<i>Performance Status</i>

qRT-PCR	<i>quantitative-real-time-Polymerase-Chain reaction</i>
Ras	<i>Rat-Sarcoma</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RISC-Komplex	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>ribosomale ribonucleic acid</i>
SD	Standardabweichung
SNORD-RNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>
sT	Tumor-umgebendes Gewebe der Gruppe B
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
T	Tumorgewebe der Gruppe B
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA- Puffer
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
UNOS	<i>United network for organ sharing</i>

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Leber

Als Ort der Metabolisierung von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden sowie des Abbaus toxischer Produkte ist die Leber das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Organismus [1].

Im Rahmen der embryonalen Entwicklung bildet sich zu Beginn der vierten Woche aus dem Endoderm des Vorderdarms, dem späteren Duodenum, das *Diverticulum hepaticum*. Aus dieser Leberknospe entstehen zwei Abschnitte, die *Pars hepatica* und die *Pars cystica*, die durch den *Ductus hepatopancreaticus* mit dem Duodenum verbunden sind [1][2]. Der Verbindungsgang bildet später den *Ductus hepaticus communis*, wobei die *Vesica biliaris* und der *Ductus cysticus* aus der Anlage der *Pars cystica* hervorgehen. Der embryonale Ursprung der *Vena portae* ist die Anlage der Dottervenen. Im Rahmen der Embryonalentwicklung kommt es zur Einsprossung von Endodermalzellen in das *Mesogastrium ventrale* und in das *Septum transversum*, aus dem sich das Leberparenchym entwickelt. Die *Venae omphalomesentericae*, Bestandteile des *Septum transversum*, bilden das spätere intrahepatische Gefäßnetz [3] sowie Teile der *Vena cava inferior* [1].

Die makroskopische Gliederung der Leber in vier Lappen (*Lobus dexter*, *Lobus quadratus*, *Lobus caudatus*, *Lobus sinister*) hat auf funktioneller Ebene keine Bedeutung. Von chirurgischer Relevanz ist die Gliederung nach Couinaud [4], bei der die Leber in acht Segmente aufgeteilt wird. Die Einteilung orientiert sich an den Aufzweigungen der *Vena portae*, der *Arteria hepatica*, der *Gallengänge* und der Lebervenen. Dabei bildet der *Lobus caudatus* das Segment I. Der linke Leberlappen beinhaltet die Segmente II bis IV. Die Segmente II und III liegen links lateral des *Ligamentum falciforme*. Das Segment IV wird linksseitig durch das *Ligamentum falciforme* und rechtsseitig durch die Cantril-Linie, einer gedachten Linie zwischen dem Gallenblasenbett und der *Vena cava inferior*, begrenzt. Dabei liegt die mittlere mittlere Lebervene zentral im Segment IV. Im rechten Leberlappen befinden sich die Segmente V bis VIII. Die Segmente V und VIII werden von der Cantril-Linie und der rechten Lebervene begrenzt. Die Segmente VI und VII befinden sich rechtsseitig der rechten Lebervene [5][6].

Mikroskopisch besteht die Leber aus 1–1,5 Millionen polyedrischen *Lobuli hepatis* mit einem Durchmesser von 1–1,3 mm. In den *Lobuli hepatis* ordnen sich die Hepatozyten und Lebersinusoiden in einem radiären Muster um die mittig gelegene *Vena centralis* an. Bei den

Lebersinusoiden handelt es sich um erweiterte Kapillaren mit gefenstertem Endothel, die parallel zu den Leberzellbälkchen liegen und Blut aus der zuführenden *Arteria hepatica* und der *Vena portae* zu der dränierenden *Vena centralis* leiten. Der Raum zwischen der Endothelzellschicht der Lebersinusoiden und den Hepatozyten wird als Disse-Raum bezeichnet. Das von drei *Lobuli* umschlossene Periportalfeld enthält die Glisson-Trias, mit Ausläufern der *Arteria hepatica*, *Vena portae* und der Gallengänge.

Neben den Hepatozyten kommen noch weitere Zelltypen in den *Lobuli hepatis* vor. Dazu gehören lebereigene antigenpräsentierende Makrophagen, die sogenannten Kupffer-Zellen, die im Zellverband mit den Sinusendothelzellen stehen und leberspezifische Lymphozyten, die sogenannten Pit-Zellen. Weiterhin befinden sich im Disse-Raum Fett- und Vitamin-A-speichernde Ito-Zellen. In der Endothelzellschicht der intrahepatischen Gallenwege liegen darüber hinaus als Ovalzellen bezeichnete hepatische Vorläuferzellen [7].

1.2 Ethanolabbau

Der Abbau von Alkohol in der Leber (Abbildung 1, S. 11) erfolgt größtenteils durch das Schlüsselenzym Alkohol-Dehydrogenase. Im ersten Reaktionsschritt oxidiert die Alkohol-Dehydrogenase den Alkohol an seiner Hydroxylgruppe zu Acetaldehyd. In einer zweiten Reaktion wird Acetaldehyd durch die Aldehyd-Dehydrogenase weiter zu Acetat umgesetzt. Unter Beteiligung der Acetyl-Coenzym-A-Synthetase, sowie Coenzym-A und Adenosintriphosphat wird das Acetat zu Acetyl-Coenzym-A umgewandelt. Dieser Thioester ist der Ausgangspunkt für die Fettsäuresynthese und den Citratzyklus [8]. Intrazellulär werden die Reaktionsschritte parallel in verschiedenen zellulären Kompartimenten durchgeführt. Die erste Oxidation durch die Alkohol-Dehydrogenase erfolgt im Zytosol, die zweite Oxidation durch die Aldehyd-Dehydrogenase und die Bildung des Acetyl-Coenzym-A in den Mitochondrien. Beide Dehydrogenasen nutzen Nicotinamidadenindinukleotid als Oxidationsmittel [9]. Über die beschriebenen Reaktionsschritte wird ein Großteil des Ethanols abgebaut. Ein weitaus geringerer Teil des Alkohols wird durch Peroxidasen in den Peroxisomen der Hepatozyten zu Wasserstoffperoxid und Acetat oxidiert. Das dabei entstehende zytotoxische Wasserstoffperoxid wird im Anschluss durch Katalasen zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt. Das dritte Alkohol-abbauende System, das mikrosomale Ethanol-oxidierende System (MEOS), wird bei Alkoholspiegeln ab 1 mg/l aktiviert [10] und ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Dabei katalysiert ein Enzym der Cytochrom-P-450-Familie den Abbau von Ethanol zu Acetat, wobei sowohl reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat als auch Sauerstoff verbraucht wird. Das entstehende

Acetat kann nach Kopplung mit Coenzym-A für den Fett- und Energiestoffwechsel genutzt werden.

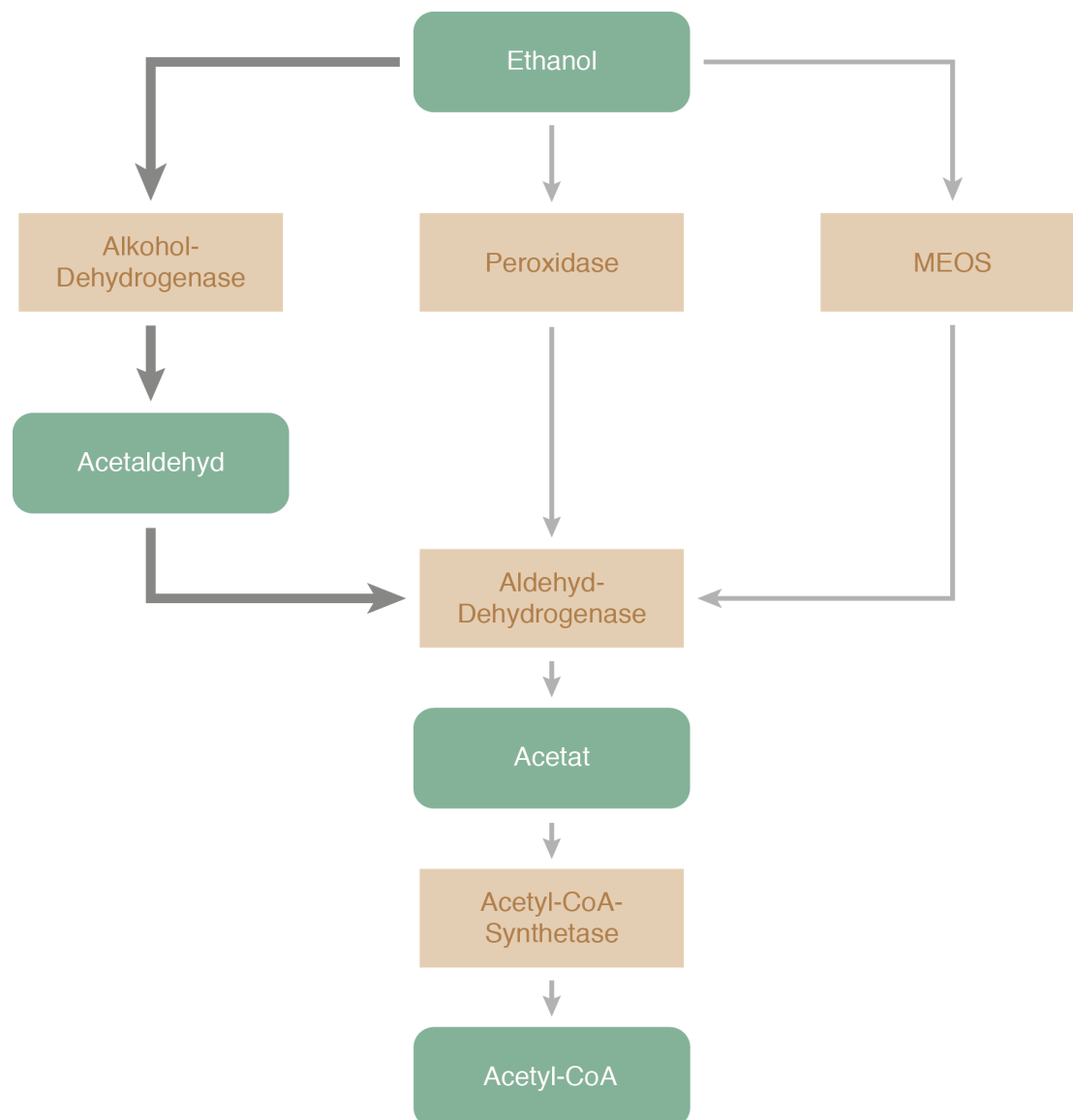


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Abbauwege des Ethanols in der Leber bis zum Acetyl-Coenzym-A
MEOS = mikrosomales Ethanol-oxidierendes System

1.3 Der nutritiv toxische Leberschaden

Die nutritiv toxische Leberzellschädigung ist in den Industrienationen eine der häufigsten Ursachen von chronischen Leberschäden. Als lebertoxische Substanz spielt Ethanol die wichtigste Rolle [11]. Konsumierte Ethanolmengen von über 60 g/Tag bei Männern und 40 g/Tag bei Frauen gelten als Risikofaktor für die Entstehung einer Leberzirrhose [12]. Bei dauerhafter Überschreitung dieser Alkoholmenge kommt es zur Akkumulation von Acetyl-Coenzym-A und oxidiertem Nicotinamidadenindinukleotid (NAD). Letzteres hemmt den Citratzyklus, einen möglichen Abbauweg des Acetyl-Coenzym-A. Dadurch kann es zu einer pathologischen Induktion der Fettsäuresynthese und einer Steatose der Leber kommen. Ferner führt ein erhöhter Ethanolabbau auch zu einer Anhäufung von Acetaldehyd. Dieses Acetaldehyd induziert in der Leber eine chronische Inflammationsreaktion und über die Aktivierung der Ito-Zellen eine Fibrosierung des Organs [12].

Neben der Bedeutung für die Pathogenese des nutritiv toxischen Leberschadens sind Ethanol und seine Abbauprodukte bedeutende Risikofaktoren für die Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC). Ethanol hat selber ein hohes mutagenes Potential [12]. Beim Abbau des Ethanols entstehen Hydroxyl-Radikale, die beim chronischen Alkoholkonsum nur langsam abgebaut werden und zur Schädigung der *Desoxyribonucleic acid* (DNA) beitragen [13]. Der Mechanismus der karzinogenen Wirkung des Ethanol-Abbauprodukts Acetaldehyd ist noch nicht vollständig verstanden.

Die Folge der unterschiedlichen Einflüsse von Alkohol auf den Lebermetabolismus kann eine *Steatosis hepatis* sein, die nicht nur zu einer makroskopischen Vergrößerung der Leber, sondern auch zur zytoplasmatischen Einlagerung von Fettvakuolen besonders in perizentralen Leberzellen, führt [12]. Aus der progredienten Verfettung der Leberzellen resultiert schließlich eine Steatohepatitis. Diese zeichnet sich durch eine Leberzellnekrose sowie durch die Infiltration des Lebergewebes mit granulozytären Lymphozyten, als Marker für eine inflammatorische Reaktion, aus. Intrazellulär findet man Mallory-Denk-Körper, die eine Anreicherungen von Kreatinen darstellen. Gleichzeitig treten Anzeichen einer Cholestase und einer perizentralen Fibrosierung des Lebergewebes auf. Treten diese Veränderungen im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 oder einer Adipositas *per magna* auf, spricht dies für eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Histologisch ist es nicht möglich, die Alkohol-bedingte Steatohepatitis (ASH) von der NASH zu unterscheiden [14].

1.4 Leberfibrose und Leberzirrhose

Sowohl die Leberfibrose als auch die Leberzirrhose sind Folgen einer chronischen Leberzellschädigung. Als Ursachen für diese Erkrankungen kommen nicht nur die nutritiv toxische Leberzellschädigungen in Betracht, sondern auch virale Hepatitiden sowie Autoimmun-, Gallenwegs- und angeborene Leberstoffwechselerkrankungen. Bei der Leberfibrose wird als Folge kompensatorischer Prozesse die Kollagensynthese aktiviert. Alkohol und seine Abbauprodukte regen über die Aktivierung des *Transforming growth factor- α* und *- β* (TGF) Ito-Zellen zur Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix an [12]. Damit einher geht eine Strukturänderung des Kollagens von Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I im Interzellularspalt. Die eigentliche Struktur der *Lobuli hepatis* bleibt aber erhalten. Kollagen Typ I zeichnet sich durch eine besondere mechanische Festigkeit aus, was besonders im portalen Stromgebiet zu einer Zunahme des intrahepatischen Flusswiderstandes führt. Durch den erhöhten intrahepatischen Flusswiderstand in den Lebersinusoiden reagieren diese mit einer Kapillarisation des Endothels und der Aufhebung der Fenestrierung der Endothelzellen, wodurch die portale Hypertension noch verstärkt wird [12].

Bei der Leberzirrhose kommt es zusätzlich zu der Veränderung der Kollagenzusammensetzung innerhalb des Organs zu einem Umbau der physiologischen Leberarchitektur. Die durch die schwere Entzündungsreaktion hervorgerufene kompensatorische Reaktion führt zu einer Ausbildung von Bindegewebssepten. Die gleichzeitig auftretende knotige Proliferation der Leberzellen weist nicht die organisatorische Struktur der *Lobuli hepatis* auf, sondern imponiert makroskopisch als Regeneratknoten. Bei der histomorphologischen Betrachtung finden sich gehäuft Mono- und Granulozyten sowie Kupffer-Zellen, deren Anwesenheit mit einer Funktionsstörung des Organs einhergeht. In 60–70 % der Fälle geht eine nutritiv toxische *Steatosis hepatis* im Verlauf mit einer Leberzirrhose einher [12].

Die Folgen dieser Funktions- und Aufbaustörung der Leber sind, in Verbindung mit einer Erhöhung des portalvenösen Drucks, die Entstehung von Aszites und die Bildung von Kollateralkreisläufen. Bei einer Blutung aus diesen Kollateralkreisläufen oder bei einer Dekompensation der Leberfunktionen steigt das Mortalitätsrisiko deutlich an [14]. Die Studie von Ginés *et al.* belegt, dass 50 % der Patienten mit einer asymptomatischen Leberzirrhose im Laufe von zehn Jahren eine dekompensierte Leberzirrhose mit Aszitesbildung entwickeln [15]. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung des Aszites als Komplikation der Leberzirrhose. In Kombination mit anderen Folgeerkrankungen, wie dem hepatorenenalen

Syndrom, kann ein Aszites zu einer Reduktion der Fünfjahres-Überlebensrate auf 15 % führen [16].

Das in der Klinik am häufigsten verwendete System zur Klassifizierung der Leberzirrhose wurde 1964 von Child *et al.* [17] eingeführt und später durch Pugh *et al.* [18] modifiziert. Der Child-Pugh-Score beinhaltet Parameter wie das Serumbilirubin, das Serumalbumin, dem Quick-Wert, den Aszites und die hepatische Enzephalopathie, um die Leberfunktion des Patienten zu quantifizieren [19].

Um die Überlebensprognose von Patienten mit Leberzirrhose nach Anlage eines **transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts** abzuschätzen, wurde im Jahr 2000 durch Malinchoc *et. al* der *Model of endstage liver disease*-(MELD)-Score entwickelt [20]. Ab dem Jahr 2002 wurde dieser Score durch die *United network for organ sharing* (UNOS) ebenso für die Allokation von Spenderorganen übernommen und stellt aktuell auch die Grundlage für die Organallokation im EUROTRANSPLANT-Bereich dar. Der MELD-Score berechnet sich aus den drei laboranalytischen Parametern: Serumbilirubin, Serumkreatinin und *International Normalized Ratio* (INR). Der MELD-Score kann Zahlenwerte zwischen 6 und 40 Punkte annehmen, die die Dreimonats-Mortalität für Patienten mit Leberzirrhose abbilden.

1.5 Hepatozelluläres Karzinom

Das HCC ist weltweit mit 90 % das häufigste primäre Leberzellkarzinom und bei Männern die dritthäufigste maligne Tumorentität [21]. Mit einer globalen Inzidenz von 632.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Männer und Frauen) steht das HCC auf Platz fünf der häufigsten Tumorarten. Die Inzidenz des HCC ist abhängig von den geographischen Regionen. Hohe Inzidenzen mit 386.000 Neuerkrankungen pro Jahr finden sich in Asien, was der hohen Infektionsrate mit Hepatitisviren geschuldet ist [21]. In Europa sind nur etwa 6 % aller Tumorerkrankungen durch maligne Entartungen der Leber bedingt, wobei in den letzten Jahren eine steigende Tendenz zu verzeichnen ist [22][23]. Der Anstieg des HCC und der chronischen Lebererkrankungen beruht auf dem zunehmenden Einfluss nutritiv toxischer Leberschäden. Der am häufigsten vorkommende Risikofaktor bei dem HCC ist in Europa und Nordamerika mit bis zu 57 % der Alkoholkonsum [24]. Demgegenüber sind in Asien nur 20 % der HCC-Fälle mit einer nutritiv toxischen Komponente verbunden. Die Wahrscheinlichkeit bei einer Leberzirrhose, unabhängig von deren Genese, ein HCC zu entwickeln liegt bei 6,6 % pro Jahr und damit deutlich höher als bei Patienten ohne Zirrhose (0,2 %) [25]. In einer retrospektiven *single-center*-Studie in Deutschland mit 458 HCC-

Patienten zeigten Kirchner *et al.* 2010, dass das mittlere Erkrankungsalter der Patienten bei 62,5 Jahren lag [26]. Das mittlere Gesamtüberleben dieser Patienten wird mit 19 Monaten nach Diagnosestellung beschrieben. Auch in dieser Studie konnte in 57,2 % der Fälle Alkohol als ätiologischer Faktor identifiziert werden.

In einer asiatischen Studie mit 257 Patienten betrug das mediane Gesamtüberleben dagegen nur 10,8 Monate [27]. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Forschungsbemühungen zur Identifikation klinischer Parameter mit dem Ziel, die Früherkennung des HCC für Patienten mit Leberzirrhose zu verbessern und ein optimales therapeutisches Vorgehen anbieten zu können.

Die aktuelle Leitlinie zur Früherkennung des HCC in Deutschland empfiehlt bei Patienten mit bekannter Leberzirrhose, Virushepatitis oder Steatohepatitis eine halbjährliche Sonographie der Leber [28]. Von einer Bestimmung des α_1 -Fetoprotein-Wertes zur primären Diagnostik des HCC wird dagegen bei diesen Patienten abgeraten, da Studien belegen, dass diese Bestimmung der Ultraschalluntersuchung hinsichtlich Sensitivität (55 %) und Spezifität (87 %) klar unterlegen ist [29][30]. Der α_1 -Fetoprotein-Wert kann aber, nach erfolgter Primärdiagnostik des Tumors, als Verlaufsparemeter genutzt werden. Entsprechend der Leitlinie können zum diagnostischen Nachweis eines HCC eine Reihe von bildgebenden Verfahren verwendet werden. Die typische Vaskularisation des HCC und das damit verbundene charakteristische Kontrastmittelverhalten wird für den radiologischen Nachweis des HCC genutzt. Für die sichere Diagnostik von HCC-Knoten mit einem Durchmesser von ≤ 2 cm und fehlendem charakteristischen Kontrastmittelverlauf wird eine Feinnadelbiopsie angeraten [28].

Eines der ältesten Scoring-Systeme zur Einteilung von HCC-Tumoren ist die Okuda-Klassifikation. Basierend auf einer retrospektiven Studie mit 850 Patienten wurden für dieses Scoring-System Parameter wie Ausmaß des Tumorbefalles, Aszites, Serumbilirubin und Serumalbumin etabliert, mit deren Hilfe die Überlebenszeit abgeschätzt werden kann [31]. Das klassische, im Jahr 2010 aktualisierte TNM-Klassifikationssystem beinhaltet die Größe und Anzahl der Tumorknoten, die Gefäßinvasion und den regionalen Lymphknotenbefall sowie Fernmetastasen des Tumors [32]. Bei diesen Klassifikationssystemen wird jedoch die zugrundeliegende Ätiologie der Lebererkrankung nicht berücksichtigt. Ein weiterer Nachteil dieser Systeme ist, dass in der Regel eine Resektion und mikroskopische Beurteilung des Tumors notwendig ist [33].

Für das therapeutische Management des HCC hat die von Llovet *et al.* definierte *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging Classification* (BCLC) (Tabelle 1, S. 16) die größte Bedeutung

[34]. Hierbei werden neben der Leberfunktion des Patienten (Child-Pugh-Score), der Ausdehnung und Anzahl der HCC-Knoten (TNM-Klassifikation) auch der *Performance Status* (PST) der *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) [35] berücksichtigt und die Patienten in entsprechende Stadien (Stadium A–D) eingeteilt [36][37]. Damit stellt dieses Klassifikationssystem erstmals eine Verbindung von Leberfunktion, Allgemeinzustand des Patienten und Größe des Tumors mit einem stadienspezifischen Therapiekonzept her (Tabelle 2, S. 17).

Basierend auf dem BCLC-System wurden auch andere Klassifikationssysteme, wie die *French Classification* [38], der *Chinese University Prognostic Index* (CUPI) [39] und der *Cancer of the Liver Italian Program* (CLIP) [40] mit ähnlichen Ansatzpunkten entwickelt. Alle diese Systeme versuchen anhand von retrospektiven Analysen und unter Einbeziehung unterschiedlicher Scoring-Parameter, wie Serumbilirubin, Serumalbumin, α_1 -Fetoprotein-Wert, TNM-Klassifikation oder dem Child-Pugh-Score die Überlebensprognose und stadienspezifische Behandlungsstrategien abzuleiten [41][42].

Tabelle 1: Patientenspezifische Einteilung der Tumorstadien des HCC auf der Basis des *Performance Status* (PST), der Tumorausdehnung und der Leberfunktion entsprechend der *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging Classification* (BCLC), nach: Llovet *et al.* [34][37]

Stadium	PST	Tumor	Leberfunktion
0	0	solitär <2 cm	keine portale Hypertension, normales Bilirubin
A1	0	solitär <5 cm	keine portale Hypertension, normales Bilirubin
A2	0	solitär <5 cm	portale Hypertension, normales Bilirubin
A3	0	solitär <5 cm	portale Hypertension, erhöhtes Bilirubin
A4	0	max. 3 Tumoren <3	Child-Pugh-Stadium A-B
B	0	groß/multinodulär	Child-Pugh-Stadium A-B
C	1-2	Gefäßeinbruch oder extrahepatische Ausdehnung	Child-Pugh-Stadium A-B
D	3-4	jeder	Child-Pugh-Stadium C

Tabelle 2: Behandlungsstrategien für das HCC nach der *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging Classification* (BCLC), nach: Llovet *et al.* [34][37]

Stadium	Behandlungsabsicht	Behandlung
0	Kurativ	Resektion
A1	Kurativ	Resektion/ Lebertransplantation
A2	Kurativ	Resektion/ Lebertransplantation/ perkutane Behandlung
A3	Kurativ	Lebertransplantation/ perkutane Behandlung
A4	Kurativ	Lebertransplantation/ perkutane Behandlung
B	Palliativ	Transarterielle Chemoembolisation
C	Palliativ	Systemische Chemotherapie
D	Symptomatisch	Symptomatische Behandlung

1.6 Die Lebertransplantation

Seit der Einführung der effektiven Immunsuppression mittels Cyclosporin A hat sich die Lebertransplantation als standardisierte Therapie bei einem chronischen Leberschaden etabliert [43]. 2014 wurden bundesweit 879 Lebertransplantationen zumeist bei Patienten mit Leberzirrhose oder HCC (Tabelle 3, S. 19) durchgeführt. Im gleichen Jahr wurden 1336 Patienten zur Lebertransplantation angemeldet, was eine deutliche Diskrepanz zwischen Organangebot und dem Organbedarf erkennen lässt (Abbildung 2, S. 19).

Die Allokation der Spenderorgane im EUROTRANSPLANT-Bereich erfolgt auf der Grundlage des Lab-MELD-Scores. Bei einigen Erkrankungen, wie beispielsweise dem HCC, erfolgt die Zuteilung der Spenderorgane nicht nach dem berechneten Lab-MELD-Score. Bei diesen Erkrankungen wird die Dringlichkeit einer Organtransplantation durch spezifische Kriterien (*standard-exceptional-MELD*) bewertet. Der *standard-exceptional-MELD* ist bei Patienten mit HCC zusätzlich abhängig von den radiologischen Befunden. Nach den sogenannten Milan-Kriterien dürfen lediglich ein Tumor zwischen 2 und 5 cm bzw. bis zu drei Tumoren mit einem Einzeldurchmesser ≤ 3 cm vorliegen. Zur Diagnose des HCC sind neben dem histopathologischen Nachweis eines HCC mittels Biopsie, die Bestimmung des α_1 -Fetoprotein > 400 ng/ml oder der Nachweis einer HCC-verdächtigen Raumforderung durch zwei unabhängige kontrastmittelverstärkte radiologische Methoden (kontrastmittelverstärkte Computertomographie, -Magnetresonanztomographie oder Angiographie) vorgeschrieben [44].

Die Patienten bekommen dann bei der Erstanmeldung einen MELD-Score von 22 Punkten, was einer Dreimonats-Mortalitätsrate von 15 % entspricht. Im vierteljährigen Intervall wird der MELD-Score automatisch entsprechend einer 10 %igen Steigerung der Dreimonats-Mortalitätsrate angepasst. Damit haben die Patienten bei der derzeitigen Allokation eine

realistische Chance, innerhalb von 12 bis 18 Monaten, ein geeignetes Spenderorgan zu erhalten [45][46][47].

Nach Einführung des MELD-Systems untersuchten Schlitt *et al.* [48] die Konsequenzen des neuen Allokationsverfahrens in Deutschland. Sie konnten zeigen, dass die Mortalitätsrate auf der Warteliste von 20 % auf 10 % gesenkt werden konnte. Jedoch lag die Einjahres-Überlebensrate bei Patienten nach einer Transplantation mit einem MELD >35 im EUROTRANSPLANT-Bereich nur bei 57,1 % und damit deutlich unter den 80,8 % der UNOS. Weismüller *et al.* zeigten an 323 Patienten, dass die Einjahres-Überlebensrate nach Einführung des MELD-Scores bei Lebertransplantationen von 90 % auf 80 % abgefallen ist [49].

Laut Mazzaferro *et al.* überleben bei Anwendung der Milan-Kriterien 80 % der Lebertransplantierten mindestens vier Jahre, ohne ein Rezidiv zu entwickeln [50]. In den vergangenen Jahren wurden die Kriterien für die Lebertransplantation beim HCC immer weiter entwickelt. Bei Verwendung der *University of California San Francisco*-(UCSF)-Kriterien (ein Tumor < 6,5 cm, oder drei Tumore mit dem größten Tumor < 4,5 cm und die Summe der Tumordurchmesser < 8 cm) zeigten Yao *et al.* eine Einjahres-Überlebensrate von 90 % und eine Fünfjahres-Überlebensrate von 75,2 % [51]. Mazzaferro *et al.* konnten mit den *up-to-7*-Kriterien (Durchmesser des größten HCC plus Anzahl der Tumorknoten ohne mikrovaskuläre Invasion ≤ 7) im Jahre 2009 die Indikation für die Lebertransplantation bei HCC erweitern. In einer *Multi-Center*-Studie betrug die Fünfjahres-Überlebensrate der Patienten, deren Tumor außerhalb der Milan-Kriterien, aber innerhalb der *Up-to-7*-Kriterien lag, 71,2 %. Patienten außerhalb dieser neuen Kriterien hatten dagegen nur eine Fünfjahres-Überlebensrate von 48,1 % [52].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Indikation zur Lebertransplantation ein komplexes Problem darstellt, deren Optimierung noch lange im Zentrum klinischer Forschung stehen wird. Eine individualisierte Indikationsstellung ist neben dem Verständnis der Tumorbiologie richtungsweisend für die Wahl des therapeutischen Vorgehens.

Tabelle 3: Indikationen nach „Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme-(ICD)-10 für eine Lebertransplantation“ (Daten aus dem Jahre 2014, bei einem Patienten sind mehreren Diagnosen möglich); nach: Deutsche Stiftung Organtransplantation, www.dso.de, 12.07.2015

Erkrankungen	Häufigkeiten
Fibrose und Zirrhose der Leber	365
Alkoholische Leberkrankheit	301
Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge	223
Leberversagen, anderenorts nicht klassifiziert	135
Sonstige Krankheiten der Gallenwege, der Gallengänge und der Leber	112
Angeborene Fehlbildungen der Gallenblase	85
Sonstige Krankheiten der Leber	39
Sonstige Stoffwechselstörungen	20
Störungen des Mineralstoffwechsels	18
Sonstige venöse Embolie und Thrombosen	9
Indikationen Gesamt	1307

Neuanmeldungen und Lebertransplantationen

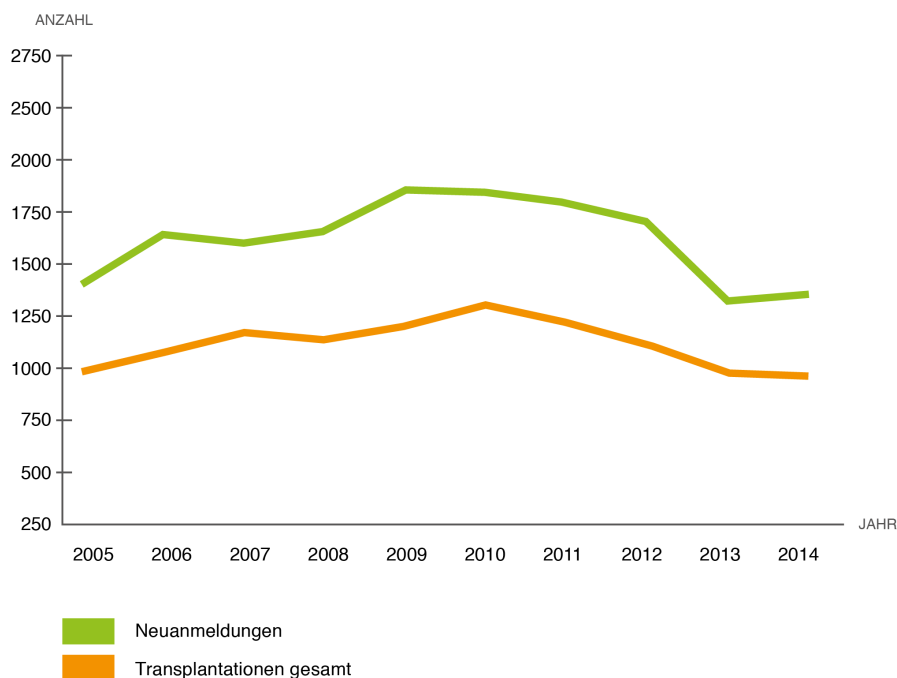


Abbildung 2: Neuanmeldungen zur Lebertransplantation sowie durchgeführte Lebertransplantationen von 2005 bis 2014 in Deutschland; nach: Deutsche Stiftung Organtransplantation, www.dso.de, 12.07.2015

1.7 Mikro-Ribonucleic acid (miRNA)

Bei den miRNA handelt es sich um eine Gruppe von nicht-kodierenden RNAs mit einer Länge zwischen 18 und 22 Basenpaaren (bp). Das regulatorische Potential dieser RNA-Moleküle liegt auf der post-transkriptionellen Ebene der Genregulation. MiRNA sind sowohl in der Lage die Translation spezifischer *messenger* RNAs (mRNA) zu unterbinden (*silencing*), als auch zu beschleunigen (*enhancing*). Erstmals wurden diese RNAs 1993 in *Caenorhabditis elegans* bei Untersuchungen zur Regulation des Proteins *lin-14* beschrieben [53]. Die Bedeutung der miRNA für verschiedene humanmedizinische Fragestellungen wurde aber erst in den letzten Jahren erkannt. Man schätzt, dass die Expression von etwa 30 % aller humanen Gene durch miRNA reguliert werden [54]. Im Genom machen die miRNA-kodierenden Bereiche nur etwa 3 % aus [55].

Die Synthese (Abbildung 3, S. 22) der miRNA beginnt mit der Transkription durch die RNA-Polymerasen II und III [56]. Das primäre Transkript, die *primary*-(pri)-miRNA verfügt über eine Hairpinstruktur, eine Polyadenylierung am 3'-Ende (Poly-A Schwanz) und eine Cap-Struktur am 5'-Ende. Sie weist eine Länge von bis zu 3000 bp auf und wird intranukleär prozessiert. Dabei bindet die pri-miRNA an das Pasha-Protein (DGCR8) und wird unter der Katalyse der Ribonuklease Drosha (RNase-III-Enzym) weiter umgebaut. Die entstehende *precursor*-(pre)-miRNA hat eine Länge von etwa 70 bp und kann unter Verbrauch von Ras-related nuclear protein-Guanosintriphosphat (Ran-GTP) den Zellkern mit Hilfe des Proteins Exportin-5 verlassen. Im Zytoplasma wird die Hairpinstruktur durch eine weitere Ribonuklease (*Dicer*) gekürzt. Das „fertige“ miRNA-Molekül hat dann eine Länge von 18–22 bp. In dieser Form wird die miRNA in den *RNA-induced silencing complex* (RISC-Komplex) integriert. Dieser Komplex besteht aus dem *Dicer*-Protein, der Hairpinstruktur der miRNA, dem Argonaut-Protein und dem *TAR RNA binding protein* (TRBP). Durch Abbau der Hairpinstruktur der miRNA im RISC-Komplex entstehen zwei RNA-Fragmente (3'-Fragment, 5'-Fragment). Der 3'-Strang fungiert als Bindungsmatrix für die entsprechende mRNA im RISC-Komplex [57]. Andere Ergebnisse belegen, dass auch das 5'-Fragment mit der mRNA interagieren kann [58].

Der RISC-Komplex beeinflusst die Translation der mRNA über verschiedene Mechanismen und kontrolliert so die Proteinkonzentrationen in der Zelle. Die miRNA ist beispielsweise in der Lage, die Initiation der mRNA-Translation zu inhibieren. Zu diesem Zweck interagiert die miRNA mit der CAP-Struktur des 5'-Endes der mRNA, wodurch die Anlagerung der ribosomalen Untereinheiten bei der Translation verhindert wird [59]. Gleichzeitig kann die

miRNA die Halbwertszeit der mRNA senken, indem sie den Abbau der 5'-CAP-Struktur und des 3'-Poly-A-Schwanzes induziert. Dadurch kann der Translationsvorgang der betreffenden mRNA nicht beginnen und es kommt zur Degradation der mRNA. Studien belegen aber, dass miRNA die Translation von Proteinen nicht nur hemmen, sondern auch unterstützen können [58].

MiRNA spielen bei multiplen zellulären Prozessen, wie Zelldifferenzierung, Apoptose, und Proliferation, eine bedeutende Rolle. MiRNA-Profile beeinflussen das *Outcome* und die Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Insbesondere sind miRNA an der Pathogenese von Tumoren in unterschiedlichen Organsystemen beteiligt. Calin *et al.* stellten erstmals fest, dass bei mehr als 65 % der von einer chronischen lymphatischen Leukämie betroffenen Patienten ein Verlust des Chromosoms 13q14 vorliegt und damit von miRNA-15 und miRNA-16 [60]. In den folgenden Jahren zeigten Untersuchungen, dass miRNA auch bei der Pathogenese von Lungen- [61], Brust- [62] und Prostatakarzinomen [63] eine Rolle spielen.

Die Analyse von miRNA-Profilen steht besonders beim HCC derzeit im Fokus der Forschung. Murakami *et al.* konnten 2006 belegen, dass sich miRNA-Konzentrationen in Zellen aus chronischen Hepatiden und aus HCC signifikant unterscheiden. Das Expressionslevel von miRNA-18, pre-miRNA-18, miRNA-20 und miRNA-92 korrelierte mit dem Differenzierungsgrad des HCC-Gewebes [64]. Damit verdeutlichten sie den Einfluss von miRNA-Profiländerungen bei der Pathogenese der Leberzirrhose und des HCC.

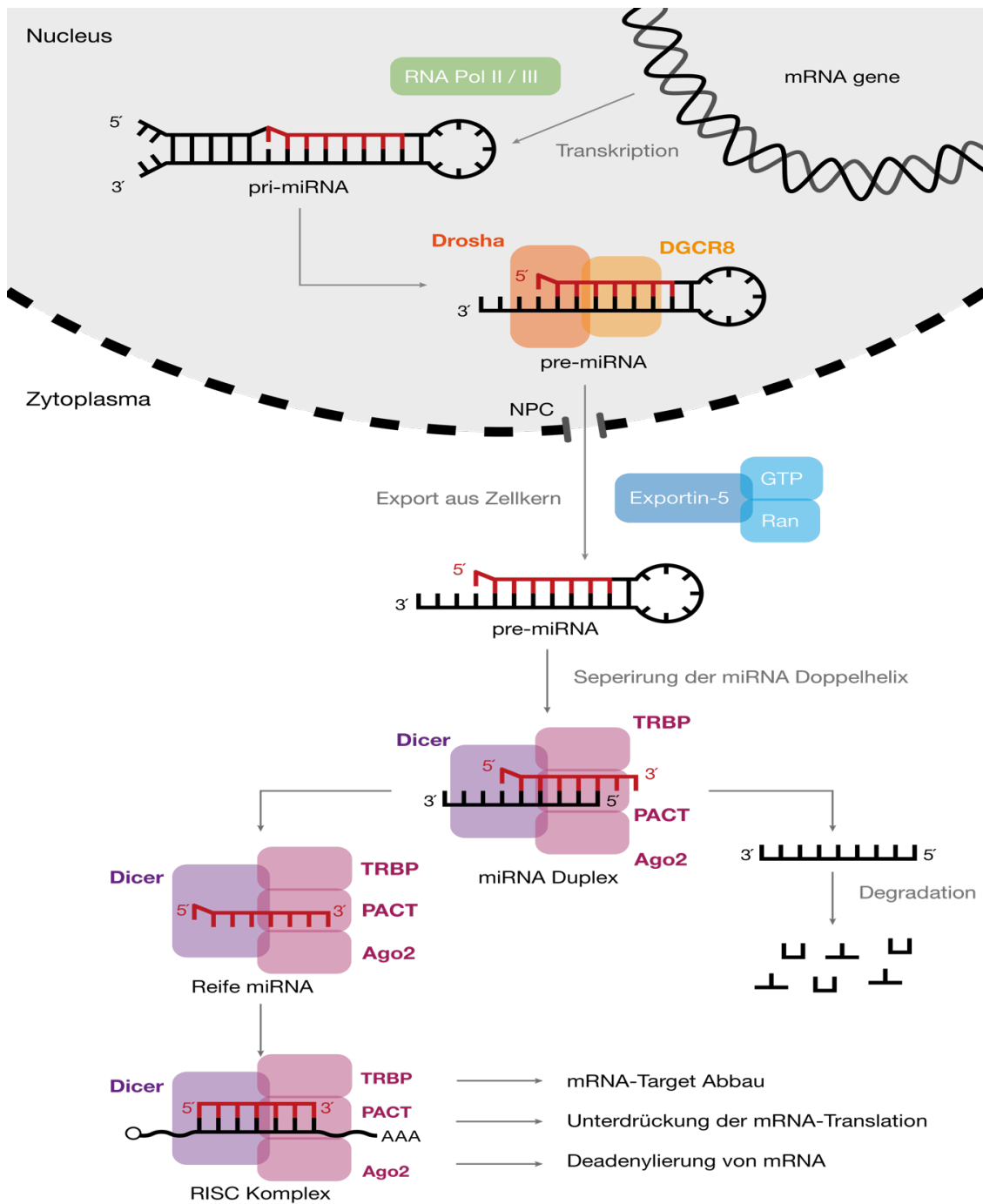


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transkription und intrazellulären Prozessierung der miRNA-Synthese in der humanen Zelle, nach Winter *et al.* [65]
 Ago2 = Argonautenprotein; miRNA = MikroRNA; PACT = *PKR activating protein*; RISC-Komplex = *RNA-induced Silencing Komplex*; TRBP = *TAR RNA Binding Protein*;

2 Fragestellung

Die Inzidenz der nutritiv toxischen Leberzirrhose mit und ohne HCC hat besonders in den Industrienationen in den vergangenen Jahren kontinuierlich zugenommen. Für die Weiterentwicklung von geeigneten Therapiestrategien ist die Etablierung einer Diagnostik unter Berücksichtigung individueller Patientenparameter notwendig.

Die Bedeutung der miRNA im Rahmen der Pathogenese des nutritiv toxischen Leberschadens ist noch weitgehend unbekannt. Daher soll in dieser Arbeit ein *Setting* zur Detektion von miRNA beim HCC auf dem Boden eines nutritiv toxischen Leberzellschadens im Rahmen einer Lebertransplantation entwickelt werden. Dabei sollen möglichen Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen dem Leberzirrhosegewebe (Ex), dem HCC-Gewebe (T) und dem umgebendem Gewebe des HCC (sT) anhand ihrer miRNA-Profile aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse sollen unter Berücksichtigung der Pathogenese des HCC und der Leberzirrhose diskutiert werden.

3 Methoden

3.1 Materialliste

S-Monovette [®] Serum-Gel	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
PaxGene Blood [™] RNA Tube	PreAnalytiX GmbH; Hombrechtikon, Schweiz
Cryo.s [™] , PP 2,0 ml	Greiner BIO-ONE GmbH; Frickenhausen, Deutschland
HERAfreeze [™]	Thermo Scientific [™] ; Waltham, USA
Microm [™] HM 560	Thermo Scientific [™] ; Waltham, USA
MC6 KG	Waldner Laboreinrichtungen GmbH und Co Wangen im Allgäu, Deutschland
Biosphere [®] SafeSeal Tube 2,5 ml	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Biosphere [®] Filter Tips	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Trizol [®] -Reagent	Ambion RNA life technologies; Carlsbad, USA
Zentrifugen-Röhrchen [®] 50 ml	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Ultra-Turrax [®] T25	Janke & Kunkel IKA Labortechnik; Staufen, Deutschland
SonoPLUS [®] HD2070	Bandelin electronic; Berlin, Deutschland
Biofuge Fresco Heraeus [™]	Kendro Laboratory products; Osterode, Deutschland
Roti [®] -Chloroform	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol Molecular biology grade	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland

Liebherr® profi line FKS 5000	Liebherr ; Biberach an der Riss, Deutschland
75 % Ethanol	Dr. K. Hollborn & Söhne; Leipzig, Deutschland
BioScience-Grade, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser	Carl Roth® GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer® comfort	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg, Deutschland
Biosphere® SafeSeal Tube 0,5 ml	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
miRNeasy mini Kit®	Qiagen GmbH Hilden, Deutschland
QIAzol® Lysis Reagent	Qiagen GmbH Hilden, Deutschland
Ethanol 100 %, vergällt	Dr. K. Hollborn & Söhne; Leipzig, Deutschland
Buffer RWT Wash buffer®	Qiagen GmbH Hilden, Deutschland
Buffer RPE Wash buffer®	Qiagen GmbH Hilden, Deutschland
NanoDrop™ Spectrophotometer ND-1000	Thermo Scientific™; Waltham, USA
Agarose TopVision™ LE GQ	Fermentas™; St. Leon-Rot, Deutschland
50 x 2 M-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan + 50 mM EDTA	Carl Roth® GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland

Ethidiumbromid	Carl Roth® GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
PowerPac® Basic Power Supply	Bio-RAD; KakiBukit View, Singapur
2x RNA-loading Dye	Thermo Scientific™; Waltham, USA
Bioanalyzer Agilent 2100	Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland
miRCURA LNA microRNA Hi-Power Labelig Kit Hy3/Hy5	Exiqon; Vedbaek, Dänemark
miRCURY LNA™ Array 7 th and 6 th Gen	Exiqon; Vedbaek, Dänemark
Tecan HS4800™	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Agilent G2565BA Microarray Scanner System	Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland

3.2 Studienaufbau

Die miRNA-Studie wurde als eine bizenrische Studie an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Campus Virchow, Charité Universitätsmedizin Berlin und an der Klinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Leipzig geplant und durchgeführt. Der Forschungsplan wurde sowohl von der Ethikkommission der Charité, Universitätsmedizin Berlin, als auch von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig unter dem Titel: „Aufbau einer multizentrischen klinischen Datenbank zur mikroRNA-Expression nach Lebertransplantation: mikroRNA als neue Biomarker in der Lebertransplantation“ bewilligt (AZ: EA2/123/10; 10.11.2010). Damit sind die Helsinki-Kriterien für die Durchführung dieser Studie erfüllt.

Alle in die Studie aufgenommenen Patienten unterzogen sich zwischen dem 01.05.2011 und dem 31.12.2012 einer Lebertransplantation an einer der beiden oben genannten Kliniken. Eingeschlossen wurden männliche und weibliche, nicht schwangere Patienten, die das 18. Lebensjahr vollendet hatten und deren schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie vorlag.

Die teilnehmenden Patienten wurden nach der histopathologischen Beurteilung des Leberexplantats in zwei Studiengruppen (A und B) aufgeteilt (Abbildung 4, S. 27).

- Gruppe A: Leberzirrhose aller Ätiologien ohne HCC,
- Gruppe B: Leberzirrhose aller Ätiologien mit HCC

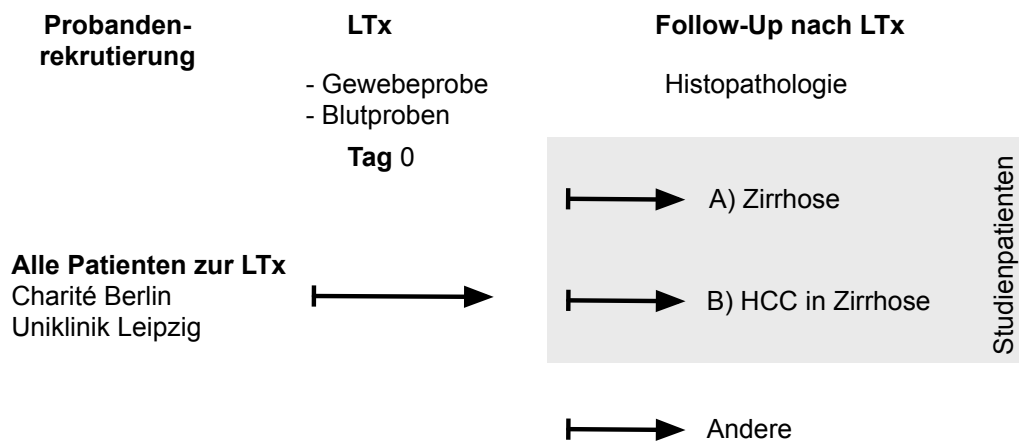


Abbildung 4: Einteilung der Patientengruppen nach pathologischem Befund in die beiden Untersuchungsgruppe A (Leberzirrhose ohne HCC) und B (Leberzirrhose mit HCC).

Zur Charakterisierung der Patienten wurden folgende Daten erhoben:

- Alter und Geschlecht
- Child-Pugh-Score
- Milan-Kriterien
- interventionelle Vorbehandlungen (transarterielle Chemoembolisation oder Radiofrequenzablation)

3.3 Probenentnahme

Im Rahmen der Lebertransplantation wurde jedem Patienten eine Studiennummer zugeordnet und seine Daten pseudonymisiert in die Studiendatenbank aufgenommen. Unmittelbar vor der Lebertransplantation erfolgte die Abnahme von Serum- und Vollblutproben. Im direkten Anschluss an die Hepatektomie wurden die Gewebeproben gewonnen. Bestand bei einem Patienten der radiologische Verdacht auf das Vorliegen eines HCC in einem Leberlappen, wurde in einem ersten Schritt aus dem kontralateralen Leberlappen eine Gewebeprobe der Größe 1 x 1 x 1 cm entnommen. Diese Probe wurde als umgebendes Gewebe des Tumors („sT“) definiert und in ein 2,0 ml Kryoröhrchen (Cryo.s™, PP 2,0 ml) überführt. Danach wurde eine Gewebeprobe der gleichen Größe aus dem primären HCC-Gewebe entnommen („T“). Bei Patienten ohne radiologische Hinweise auf ein HCC, bei denen bei der makroskopischen Betrachtung des explantierten Organs ein HCC-verdächtiges Gewebeareal auftrat, wurde ebenso verfahren. Fehlten sowohl radiologische als auch makroskopische Anzeichen auf das Vorliegen eines HCC, erfolgte die Entnahme einer Gewebeprobe aus einem repräsentativen Areal der Leber. Diese Proben wurden als „Ex“ definiert. Alle Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff herunter gekühlt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C (HERAfreeze™) in den Laboren der beiden Transplantationszentren gelagert.

3.4 Bestimmung der Laborparameter

Die Serum- und Vollblutproben wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Leipzig und dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité Universitätsmedizin Berlin mit den dort üblichen Standardmethoden untersucht.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- INR-Wert
- Lab-MELD
- Albumin
- γ -Glutamyltransferase
- Alanin-Aminotransferase (ALT)
- Aspartat-Aminotransferase (AST)
- Bilirubin
- Kreatinin
- Alkalische Phosphatase
- α_1 -Fetoprotein
- C-reaktives Protein (CRP)
- Thrombozytenzahl
- Leukozytenzahl

3.5 Histopathologische Untersuchung der Gewebeproben und Gruppenbildung

Die histologische Untersuchung der explantierten Organe erfolgte am Institut für Pathologie, Campus Mitte Rudolf-Virchow-Haus, Charité Universitätsmedizin Berlin und am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Leipzig. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde eine Bewertung der Probenlokalisierung vorgenommen, um eine Fehlklassifizierung der Proben zu korrigieren und das Vorliegen eines HCC zu bestätigen. Gleichzeitig wurde die Ätiologie der Lebererkrankung bestimmt. Anhand der gewonnenen Informationen wurden alle eingeschlossenen Patienten endgültig ihrer Gruppe (siehe Abbildung 4, S. 27) zugeteilt.

3.6 RNA-Isolierung aus Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden vor der RNA-Isolation im Kryostaten (MicromTM HM 560) bei -20°C für die weitere Analyse vorbereitet. Die Proben wurden in etwa 4 x 4 x 2 mm große Analysestücke mit einem Probengewicht von 50 mg aufgeteilt. Die RNA-Aufreinigung

erfolgte unter einem geeigneten Abzug (MC6 KG) unter Verwendung von RNase-freier Reaktionsröhrchen (Biosphere® SafeSeal Tube 2,5 ml) und von RNase-freien Pipettenspitzen (Biosphere® Filter Tips) bei ständiger Kühlung der Proben, um eine Degradation der RNA durch Nukleasen zu verhindern. Zur Auswahl einer geeigneten RNA-Aufreinigungsmethode wurden zunächst vier Methoden, zwei Trizol®-basierte (Probengruppe I und II) und zwei Kit-basierte Ansätze (miRNeasy mini Kit®) (Probengruppe III und IV), verglichen (Tabelle 4, S. 30) und statistisch ausgewertet.

Tabelle 4: Verwendete RNA-Isolationsmethoden

Bezeichnung	Methode
Probengruppe I	Trizol®-basiert, Homogenisierung mit Ultra-Turrax
Probengruppe II	Trizol®-basiert, Homogenisierung des Gewebes mit Ultra-Turrax + Ultraschall
Probengruppe III	miRNeasy mini Kit®, einmalige Säulenelution
Probengruppen IV	miRNeasy mini Kit®, zweimalige Säulenelution

3.7.1 RNA-Aufreinigung mit Trizol®

Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach einem angepassten Protokoll von Chomczynski und Sacchi [66] unter Verwendung von Trizol®-Reagenz (Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat). Die Proben wurden in gefrorenem Zustand in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen mit 1 ml Trizol® versetzt. In der Probengruppe I wurden die Gewebestücke unter ständiger Kühlung und mit maximaler Leistung des Ultra-Turrax® (Ultra-Turrax® T25) aufgeschlossen (Abbildung: 5.A, S. 32). Da die Gewebe durch den Ultra-Turrax® nicht vollständig homogenisiert werden konnten, wurde die Probengruppe bis zur vollständigen Homogenisierung zusätzlich mit Ultraschall (1 Minute mit 90 % der Leistung des SonoPLUS® HD2070) behandelt. Im weiteren Verlauf der RNA-Aufreinigung wurden die beiden Probengruppen gleich bearbeitet. Das Homogenisat wurde bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C (Biofuge Fresco Heraeus™) zentrifugiert, wodurch die Zellfragmente pelletierten (Abbildung: 5.B, S. 32). Der Überstand wurde in ein neues 2,5 ml Reagenz-Röhrchen übertragen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Überstand wurden 200 µl Chloroform (Roti®-Chloroform) pipettiert. Dann wurden die Reagenz-Röhrchen mit der Hand invertiert (Abbildung: 5.C, S. 32) und nochmals für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C bildeten sich drei Phasen mit den RNA-, DNA- und Protein-Fraktionen (Abbildung:

5.D, S. 32): eine obere farblose Phase mit der zu isolierenden RNA, eine weiße Interphase mit der DNA und unten eine rote organische Phase mit den Zellproteinen. Die obere farblose Phase wurde mittels Pipette in ein neues 2,5 ml Reaktion-Röhrchen überführt. Auf diesen farblosen Überstand wurden dann 500 µl Isopropylalkohol (2-Propanol Molecular *biology grade*) pipettiert. Nach vorsichtigem Invertieren und 30-minütiger Inkubation der Lösung bei 4 °C (Liebherr® profi line FKS 5000) wurden die Proben erneut bei 12000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die RNA präzipitierte als weißes Pellet (Abbildung: 5.E, S. 32) am Boden des Reaktionsröhrchens. Im Anschluss wurde der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgezogen, ohne dabei das Pellet zu beschädigen. Das RNA-Präzipitat wurde danach mit 75 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 7500 g bei 4 °C für 5 Minuten, wurde der Überstand verworfen, die RNA bei Raumtemperatur für 5–10 Minuten getrocknet und in 40 µl RNase-freiem Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei, autoklaviert, Diethyldicarbonat-(DEPC)-behandeltes Wasser) (Abbildung: 5.F, S. 32) resuspendiert. Dazu wurde die Lösung bei 55 °C im Thermomixer (Thermomixer® comfort) bei einer Oszillationsfrequenz von 400 rpm inkubiert. Das Aliquotieren der Proben erfolgte in RNase-freien 0,5 ml Reaktionsröhrchen (Biosphere® SafeSeal Tube 0,5 ml). Die Stammlösung (40 µl) wurde dabei in 1 x 30 µl für die miRNA-Analyse und in 1 x 10 µl für die qualitätssichernde Analyse aufgeteilt. Nach Beendigung der Aufreinigung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff herunter gekühlt und anschließend bei -80°C gelagert.

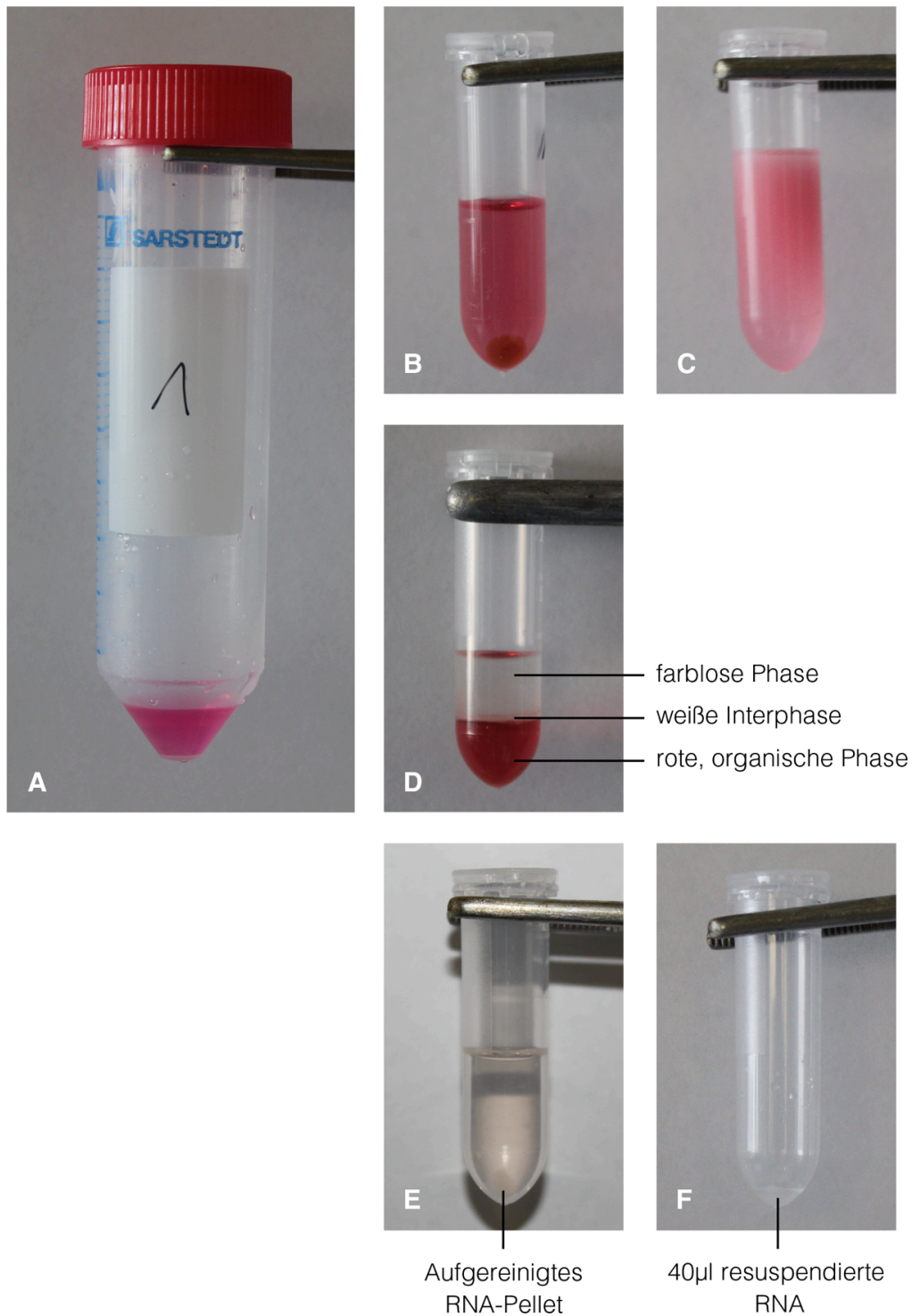


Abbildung 5: Aufreinigungsschritte zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben mittels Trizol[®]-Reagenz

A: Homogenisiertes Gewebestückchen; B: abzentrifugierte Gewebefragmente; C: Trizol[®]-Reagenz mit RNA nach Zugabe von 200 µl Chloroform zur Vorbereitung der Phasentrennung; D: Phasentrennung der Probelösung in wässrige-, weiße-, und organische Phase zur Separation der RNA; E: aufgereinigter RNA-Plaquet nach Zugabe von 500 µl Isopropylalkohol; F: resuspendierte Gesamt-RNA

3.7.2 RNA-Aufreinigung mittels miRNeasy mini Kit[®]

Beim miRNeasy mini Kit[®] handelt es sich um eine Aufreinigung der RNA über eine Silikat-Säulen-Matrix. Die Silikat-Matrix bindet die RNA (Abbildung 6.G, S. 34) reversibel in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Salzkonzentration [67]. Das gefrorene Probengewebe wurde in einem 50 ml Röhrchen mit 700 µl Qiazol (QIAzol[®] Lysis Reagent) versetzt, um es mit dem Ultra-Turrax[®] bei maximaler Leistung zu homogenisieren. Zur Separation der Zellfragmente wurde die Lösung bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein 2,5 ml Probenröhrchen pipettiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 140 µl Chloroform versetzt und vorsichtig invertiert. Nach einer erneuten Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Probenröhrchen bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Phasen: eine obere farblose Phase, die auch die RNA enthielt, eine weißen Interphase und unten eine rote, organischen Phase. Die obere farblose Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt. Zu dem Überstand wurden 525 µl 100 %-iges Ethanol (Ethanol 100 %, vergällt) hinzugefügt und vorsichtig invertiert. Von der Lösung wurden 700 µl auf die Silikat-Säule gegeben und bei 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Die Silikat-Matrix mit der RNA wurde so vom Durchfluss separiert (Abbildung 6.H, S. 34), der anschließend verworfen wurde. Zum Waschen der Säule wurde 700 µl RWT-Puffer (Buffer RWT Wash buffer[®]) auf die Säule gegeben und bei 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Im zweiten Waschschriff wurden 500 µl RPE Puffer (Buffer RPE Wash buffer[®]) auf die Säule pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 8.000 g für 15 Sekunden wurde der Waschschriff nochmals wiederholt. Anschließend wurde die Säule für 2 Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde nach allen Waschschriffen verworfen.

In der Probengruppe III wurde die Säule einmalig mit 30 µl RNase-freiem Wasser bei 8.000 g für 1 Minute eluiert (Abbildung 6.I, S. 34). In Probengruppe IV wurde die Säule zuerst mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Dieser Durchfluss wurde nochmals auf die Silikat-Säule aufgetragen und erneut bei 8000 g für 1 Minute eluiert. Danach wurden die RNA-Lösungen beider Probengruppen in flüssigem Stickstoff herunter gekühlt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

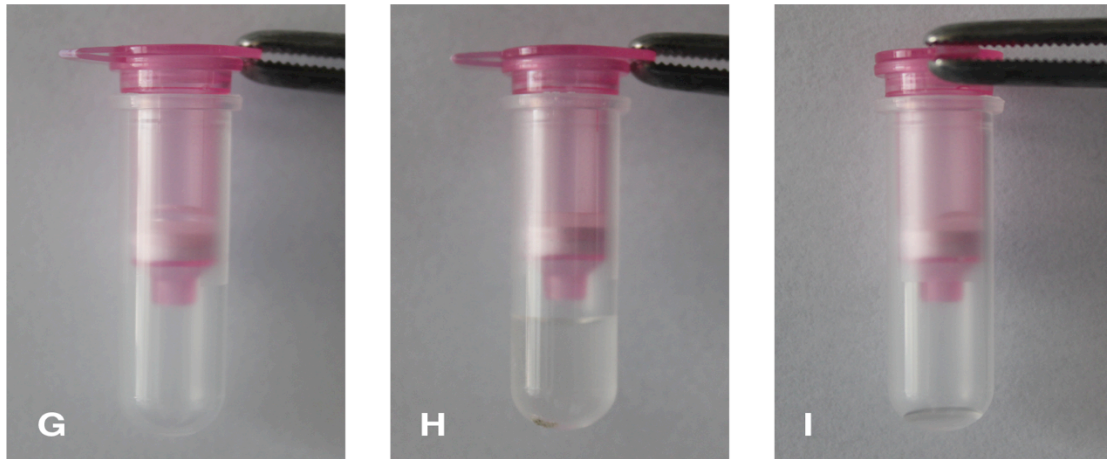


Abbildung 6: Aufreinigungsschritte zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben mittels Silikat -basierter Säulenaufreinigung;
 G: Silikat-Säule vor der Bindung der RNA; H: Silikat-Säule mit gebundener RNA und wässriger farblosen Phase; I: isolierte GesamtRNA nach Extraktion

3.8 Qualitative- und quantitative Vermessung der RNA-Proben

3.8.1 NanoDrop™-Messung

Zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der isolierten Gesamt-RNA erfolgten Messungen mit Hilfe des NanoDrop™ Spectrophotometers ND-1000. Bei dieser Methode wird die Absorption (A) der RNA über den Bereich von 220 nm bis 350 nm bestimmt (Abbildung 7, S. 35). Die Absorption der Messlösung bei der Wellenlänge von 260 nm ist die Grundlage der RNA-Konzentrationsbestimmung, da definitionsgemäß [68] ein A (260) nm von 1,0 einer Konzentration von 40 µg RNA/ml entspricht:

$$c (\mu\text{g RNA/ml}) = A (260) \times 40 (\mu\text{g RNA/ml}).$$

Der Quotient der Absorption 260/280 nm (A (260/280)) sollte als Referenz bei kontaminationsfreien Proben zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Reinheit von RNA und DNA in der Lösung wird durch den Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 230 nm (A (260/230)) bestimmt. Der hier angestrebte Referenzbereich sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen [68].

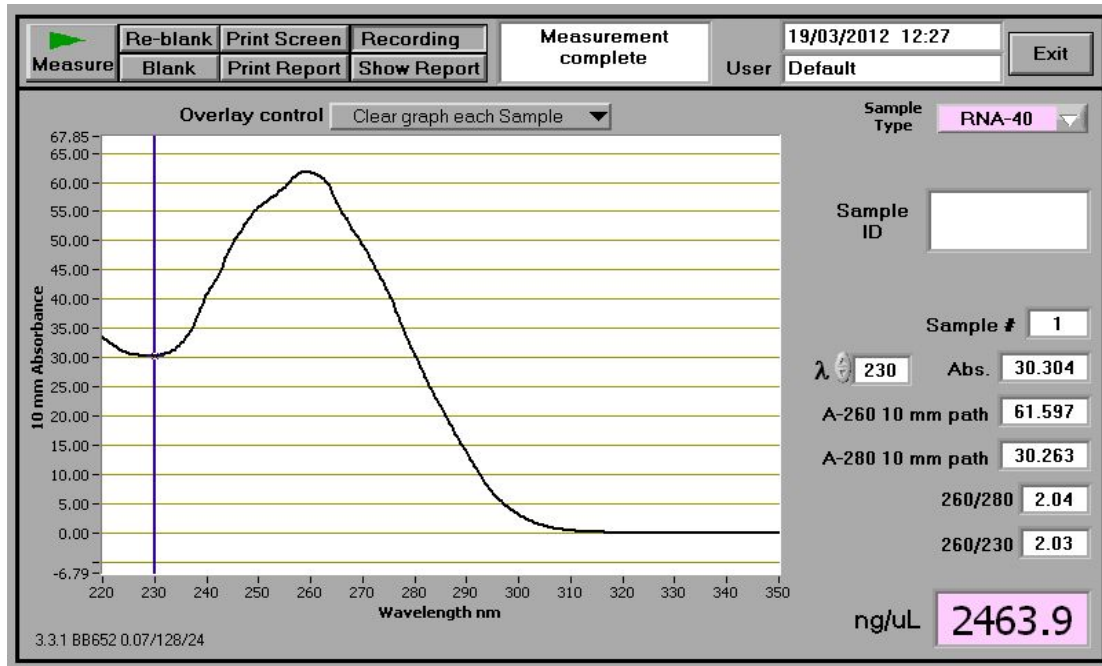


Abbildung 7: Ideale Absorptionskurve eines RNA-Isolates aus einer Gewebeprobe mit dem NanoDrop™ Spectrophotometer ND-1000

3.8.2 Gelelektrophorese

Das verwendete Gelelektrophorese-Gel enthielt 1,2 % Agarose (1,2 g Agarose TopVision™ LE GQ und 100 ml Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer (50 x 2 M-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan + 50 mM Ethylendiamintetraacetat). Nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid wurde das Gel blasenfrei in eine Gelelektrophoreseform gegossen. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interagiert mit der RNA und ermöglicht so nach der Elektrophorese die Detektion der RNA im Gel. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophorese-Einheit (PowerPac® Basic Power Supply) gelegt und mit TAE-Puffer übergossen. In das Elektrophoresebad wurden nochmals 8 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die RNA-Proben (Volumen entsprechend 5000 ng RNA bestimmt mit dem NanoDrop™ Spectrophotometer ND-1000) wurde mit dem gleichen Volumen RNA-loading Dye (2 x RNA-loading Dye) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V für 1,5 Stunden. Die durch ihre Phosphatgruppe negativ geladene RNA bewegte sich dabei zur Anode des Elektrophoresebades. Die Wanderungsgeschwindigkeit war abhängig von der Größe der RNA. Nach der Elektrophorese wurden die RNA-Banden im UV-Licht in der G: Box F3 analysiert. Die Banden der 18S-ribosomalen RNA (rRNA) und der 28S-rRNA dienten als Marker für Intaktheit der aufgereinigten RNA [69]. Das Verhältnis der 28S/18S-rRNA-Fraktion sollte bei 2 liegen.

3.8.3 Bioanalyser

Die weitere Analyse der RNA-Proben erfolgt mit dem Bioanalyser Agilent 2100. Diese Chip-basierte Technologie beruht auf einer elektrophoretischen RNA-Proben-Auftrennung und Vermessung mittels eines Laser-induzierten Fluoreszenzsignals. Zu diesem Zweck wurden die RNA-Proben mit einem fluoreszierenden Partikel hybridisiert, mit deren Hilfe das Elektropherogramm der einzelnen Proben erstellt wurde [70]. Basierend auf diesem Elektropherogramm wurde der *RNA integrity number* (RIN)-Quotient bestimmt, welcher auf einer Skala zwischen 1 und 10 ein relatives Maß für die Degradation der RNA angibt. Ein RIN-Quotient von > 7 gilt als optimal für die Bestimmung von miRNA-Expressionsprofilen [71].

3.9 Microarray Analyse

Die Microarray Analyse zur miRNA-Detektion wurde auf der standardisierten Plattformen der Firma Exiqon durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 750 µg isolierte RNA einer Probe mit Hilfe des miRCURA LNA microRNA Hi-Power Labelig Kit Hy3/Hy5 mit einem fluoreszierenden Partikel hybridisiert. Dieser wird an das 3'-Ende des RNA-Strangs angekoppelt. Für den Vergleich der Gewebetypen wurde eine Probe mit dem Hy3-Fluoreszenz-Partikel (Absorptionswellenlänge: 550 nm; emittierte Wellenlänge: 570 nm) und die andere zu vergleichende Probe mit dem Hy5-Fluoreszenz-Partikel (Absorptionswellenlänge: 650 nm; emittierte Wellenlänge: 670 nm) markiert [72]. Die Vermessung der Proben erfolgte mittels miRCURY LNA Array (6. und 7. Generation) auf der miRBASE 17 und 18. *Locked Nucleic Acid* (LNA)-Nukleotide sind synthetisch produzierte Nukleotid-Analoga, die eine Methylenbrücke zwischen dem 2'-O-Atom und dem 4'-C-Atom des ribosomalen Ringes aufweisen und RNA, hochspezifisch nach der Watson-Crick Basenpaarung-bindet [73]. Die Hybridisierung der LNA-Nukleotide mit der miRNA wurde im Tecan HS4800TM nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Detektion der gebundenen RNA erfolgte mittels Agilent G2565BA Microarray Scanner System unter ozonreduzierten Umgebung (Ozon Level unter 2,0 ppb). Dabei detektierten die integrierten Laser die spezifischen emittierten Wellenlängen der fluoreszierenden Partikel an den RNA-Strängen. Im Anschluss normalisierte die ImaGene 9.0 Software das Messsignal aller Proben. Die Darstellung der miRNA-Expression erfolgte als Logarithmus zur Basis 2 ($\text{Log}_2(X)$). Nach Berechnung der Mittelwerte der miRNA-Expression der Proben in den jeweiligen Patientengruppen wurde die Differenz ($\text{Log}(FC)$) zwischen beiden Untersuchungsgruppen ($\text{Log}(FC) = \text{Log}_2(X_1) - \text{Log}_2(X_2)$) bestimmt. Aus der durch Delogarithmisierung entstandenen

mittleren absoluten Expressionsdifferenzen (FC) wurde die prozentuale Änderung der miRNA-Expression zwischen beiden Untersuchungsgruppen berechnet.

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der klinischen Parameter sowie der miRNA-Konzentrationen erfolgte mit dem zweizeitigen T-Test mit dem Programm *Microsoft® Excel® for Mac 2011* Version 14.3.6 und *SigmaPlot®* Version 12.3. Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Mittelwerte wird immer die Standardabweichung mit angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung (SD)).

4 Ergebnisse

4.1 Patientendaten

4.1.1 Allgemeine Patientendaten

Im Zeitraum vom 01.05.2011 bis 31.12.2012 wurden in beiden Zentren in der Summe 198 Lebertransplantationen bei 189 Patienten durchgeführt (Tabelle 5, S. 38). 145 Männer und 44 Frauen erhielten in dem Zeitraum eine Spenderleber. Neun Patienten erhielten eine Re-Transplantation. Die Patienten hatten ein mittleres Alter von $54,13 \pm 10,68$ Jahren. Der mittlere präoperative Lab-MELD aller eingeschlossenen Patienten betrug $17,86 \pm 9,53$. Bei 21 Patienten lag der Lab-MELD höher als 34 Punkte und bei weiteren elf Patienten zwischen 30 und 34 Punkten. Die übrigen 157 Patienten hatten einen Lab-MELD zum Zeitpunkt der Transplantation von weniger als 30 Punkten.

Tabelle 5: Patientenprofil der in die Studie eingeschlossenen Patienten

Gesamtzahl Lebertransplantation	198
Gesamtzahl Patienten	189
Anzahl Re-Transplantationen	9
mittleres Alter der Patienten (Jahre)	$54,13 \pm 10,68^*$
Geschlecht	
männlich	145
weiblich	44
mittlerer Lab-MELD aller Patienten	$17,86 \pm 9,53^*$
Lab-MELD ≥ 35	21
Lab-MELD 30-34	11
Lab-MELD <30	157

(*: Mittelwert \pm Standardabweichung)

Nach der histopathologischen Untersuchung wurden die Patienten entsprechend ihrer Diagnose in die Studiengruppen eingeteilt (Tabelle 6, S. 39). In Gruppe A (Leberzirrhose ohne HCC) wurden 83 Patienten, in Gruppe B (Leberzirrhose mit HCC) wurden 72 Patienten eingeschlossen. Bei 34 Patienten konnte nach der histologischen Befundung keine Zuordnung in die beiden Studiengruppen erfolgen. Bei diesen Patienten erfolgte die Lebertransplantation aus anderen Indikationen (primär sklerosierende Cholangitis, Morbus Wilson, Budd-Chiari-Syndrom). In Gruppe A zeigten die Patienten ein mittleres Alter von $51,47 \pm 9,93$ Jahren und in Gruppe B von $60,83 \pm 6,5$ Jahren. Mit einem $p \leq 0,001$ war der Altersunterschied zwischen den Gruppen signifikant. In Gruppe A befanden sich 60 Männer und 23 Frauen und in Gruppe

B 63 Männer und neun Frauen. Die häufigste zur Transplantation führende Erkrankung, war in beiden Gruppen die nutritiv toxische Genese. In Gruppe A wurden 59 Patienten und Gruppe B 34 Patienten mit dieser Ätiologie identifiziert. In Gruppe B resultierte bei 20 Patienten das HCC aus einer viralen Infektion. In der Gruppe A konnten sieben Patienten mit einer viral induzierten Leberzirrhose identifiziert werden. Die Patienten ohne ein HCC zeigten einen mittleren Lab-MELD von $19,97 \pm 8,29$. Der präoperative Lab-MELD bei den Patienten mit einem HCC lag mit $13 \pm 7,73$ signifikant niedriger ($p \leq 0,001$). In der HCC-Gruppe zeigten über 50 % der Patienten eine Zirrhose im Child-Pugh-Stadium A, weitere 28,2 % im Child-Pugh-Stadium B und 12,6 % im Child-Pugh-Stadium C. Die Patienten ohne ein HCC hatten in 22,2 % der Fälle ein Child-Pugh-Stadium A, in 43,2 % der Fälle ein Child-Pugh-Stadium B und in 34,58 % der Fälle ein Child-Pugh-Stadium C.

Tabelle 6: Patientenprofile nach Untersuchungsgruppen
Gruppe A: Zirrhose ohne HCC, Gruppe B Zirrhose mit HCC

	Gruppe A	p-Wert	Gruppe B
Anzahl der Patienten	83		72
Geschlecht			
männlich	60		63
weiblich	23		9
Alter	$51,47 \pm 9,93^*$	$\leq 0,001$	$60,83 \pm 6,5^*$
Ätiologie			
viral	7		20
nutritiv toxisch	59		34
kryptogen	2		8
Mix	15		10
Lab-MELD	$19,97 \pm 8,29^*$	$\leq 0,001$	$13,0 \pm 7,73^*$
Lab-MELD >35	10		3
Lab-MELD 30–34	5		2
Child-Pugh-Stadium			
A	22,20 %		59,2 %
B	43,20 %		28,2 %
C	34,58 %		12,6 %

*: Mittelwert \pm Standardabweichung

4.1.2 Spezielle Patientendaten

Für die miRNA-Analyse wurden von den 189 Patienten 30 Patienten anhand ihrer histopathologischen Befunde in Verbindung mit ihren anamnestischen Angaben zur nutritiv toxischen Ätiologie ihrer Lebererkrankung ausgewählt (Tabelle 7, S. 41). Dabei konnten in Gruppe A 16 Proben (Ex) ausgewertet werden. In der Gruppe B stammten 14 Proben aus dem

kontralateral zum HCC-Tumor gelegenen Leberlappen (sT). Bei histopathologischem Nachweis vitaler Tumorzellen und eindeutiger Lokalisation der Entnahmestelle, konnten 7 Proben aus dem Primärtumor (T) selbst entnommen werden. Die Patienten der Gruppe B zeigten ein mittleres Alter von $59,93 \pm 4,08$ Jahren, die der Gruppe A von $50,31 \pm 11,03$ Jahren. Damit waren die Patienten der Gruppe A signifikant jünger als die der Gruppe B ($p = 0,029$). In Gruppe A wurden die meisten Patienten mit einer Zirrhose im Child-Pugh-Stadium B (56,25 %) transplantiert, in Gruppe B mit einer Zirrhose im Child-Pugh-Stadium A Zirrhose (50 %). Weitere 21,42 % dieser Gruppe hatten eine Child-Pugh-Stadium B und 28,57 % eine Child-Pugh-Stadium C-Zirrhose. In Gruppe A zeigten hingegen 25 % der Patienten eine Zirrhose im Child-Pugh-Stadium A und 18,75 % eine Zirrhose im Child-Pugh-Stadium C.

Bei den Laborparametern ergab der statistische Vergleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Auch der Lab-MELD-Score war bei beiden Gruppen mit einem $p = 0,55$ statistisch nicht signifikant verschieden. In Gruppe A hatten die Patienten einen mittleren Lab-MELD von $15,93 \pm 5,01$ und in Gruppe B einen Lab-MELD von $14,92 \pm 7,93$. Bei elf Patienten der Gruppe B konnte in der explantierten Leber ein solitärer HCC-Knoten identifiziert werden. Bei zwei Patienten fanden sich drei Tumorknoten in der erkrankten Leber. Elf Patienten der Gruppe B erhielten in der präoperativen Periode eine interventionelle Behandlung in Form einer transarteriellen Chemoembolisation oder Radiofrequenzablation. Bei allen Patienten der Gruppe B konnten Tumorzellen im Explantat nachgewiesen werden, jedoch konnte bei einem Patienten die genaue Anzahl und Ausdehnung des HCC-Knotens nicht bestimmt werden. Eine Einteilung nach Milan-Kriterien war damit bei diesem Patienten nicht möglich. Elf Patienten der Gruppe B erfüllten nach der histopathologischen Auswertung die Milan-Kriterien, zwei Patienten nicht.

Tabelle 7: Charakteristika und klinische Parameter der Patienten, die für die primäre miRNA-Analyse ausgewählt wurden

	Gruppe A	p-Wert	Gruppe B
Anzahl der Proben			
Zirrhosegewebe (Ex)	16		
Tumor-umgebendes Gewebe (sT)			14
Tumorgewebe (T)			7
Alter (Jahre)	50,31 ± 11,03*	0,029	59,93 ± 4,08*
Geschlecht			
männlich	15		14
weiblich	1		0
Lab-MELD (Punkte)	15,93 ± 5,01*	0,55	14,92 ± 7,93*
Child-Pugh-Stadium			
A	25 %		50 %
B	56,25 %		21,42 %
C	18,75 %		28,57 %
Anzahl Tumorknoten nach Histologie			
1			11
2			
3			2
unbekannt**			1
Milan-Kriterien erfüllt			
ja			11
nein			2
unbekannt**			1
Interventionelle Vorbehandlung			
ja			11
nein			3
Klinisches Labor			
Albumin (g/l)	37,57 ± 5,64*	0,06	32,4 ± 11,63*
γ-GT (μkat/l)	1,68 ± 0,88*	0,07	2,91 ± 1,89*
ALT (μkat/l)	0,76 ± 1,17*	0,65	0,69 ± 0,39*
AST (μkat/l)	1,89 ± 4,34*	0,4	1,06 ± 0,49*
Bilirubin (μmol/l)	81,87 ± 95,67*	0,15	41,64 ± 36,55*
INR	1,43 ± 0,36*	0,82	1,43 ± 0,56*
alkalische Phosphatase (μkat/l)	2,84 ± 1,39*	0,74	2,59 ± 1,18*
Kreatinin (μmol/l)	86,06 ± 31,53*	0,26	99,53 ± 54,89*
α1-Fetoprotein (ng/ml)	4,08 ± 2,34*	0,14	59,88 ± 117,29*
Thrombozyten (x 10 ⁹ /l)	89,93 ± 35,73*	0,6	104,29 ± 73,52*
Leukozyten (x 10 ⁹ /l)	5,75 ± 2,46*	0,58	6,71 ± 4,22*
CRP (mg/dl)	9,61 ± 8,18*	0,8	11,78 ± 20,01*

*: Mittelwert ± Standardabweichung; **: Nach der präoperativen interventionellen Behandlung war eine Aussage über Größe und Anzahl der vorhandenen Tumorknoten nicht möglich

4.2 Etablierung der RNA-Isolation

Im Rahmen der Arbeit wurden vier verschiedenen Methoden zur RNA-Isolation miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.6, Tabelle 4). Bei der RNA-Aufreinigung in Probengruppe I wurde eine mittlere RNA-Gesamtmenge von $101650 \text{ ng} \pm 16913,55$ ermittelt (Tabelle 8, S. 44). Der A (260/280) Quotient lag im Mittel bei $1,72 \pm 0,21$ und der mittlere A (260/230) Quotient bei $1,48 \pm 0,19$. Bei der folgenden Gelelektrophorese (Abbildung 8, S. 45) wurde jeweils 5000 ng der isolierten RNA auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung der isolierten Gesamt-RNA konnten die beiden 18S-rRNA- und 28S-rRNA-Banden klar dargestellt werden. Hinweise für eine Degradation der RNA ergaben sich nicht.

In der Probengruppe II wurde eine mittlere RNA-Gesamtmenge von $45132 \text{ ng} \pm 7145,18$ ermittelt. Der A (260/280) Quotient wurde mit $1,94 \pm 0,03$ und der A (260/230) Quotient mit $1,35 \pm 0,15$ bestimmt (Tabelle 8, S. 44). Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung zeigte Probe 3 eine massive Schlierenbildung zwischen der 28S-rRNA- und 18S-rRNA-Bande (Abbildung 8, S. 45). Eine mögliche Degradation der RNA konnte damit nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei den anderen beiden Proben waren die ribosomalen Banden gut zu erkennen und es gab nur geringe Anzeichen einer Degradation der RNA.

Die statistische Auswertung der beiden experimentellen Ansätze (Probengruppe I vs. Probengruppe II) zur Extraktion der RNA mit Hilfe der Trizol[®]-Methode ergab mit einem p-Wert von 0,03 einen signifikanten Unterschied bei der isolierten RNA-Gesamtmenge. Die qualitativen Marker des Isolationsprozesses zeigten dagegen keinen statistisch signifikanten Unterschied (p-Wert > 0,05) zwischen Isolationsmethode I und II (Tabelle 9, S. 44).

Bei der Aufreinigung mit Hilfe des miRNeasy mini Kits[®], wurde in Probengruppe III (Tabelle 8, S. 44) eine mittlere RNA-Gesamtmenge von $58920 \text{ ng} \pm 14015,19$ bestimmt. Der A (260/280) Quotient dieser Probengruppe lag bei $2,04 \pm 0,01$ und das A (260/230) Verhältnis bei $1,48 \pm 0,43$. Zur weiteren qualitativen Kontrolle wurden im Anschluss durchschnittlich 6026,66 ng RNA auf ein Gel aufgetragen und separiert (Abbildung 8, S. 45). Beide rRNA-Banden wurden in den Proben leicht inhomogen exprimiert. Ebenso war eine verstärkte Schlierenbildung zu erkennen. Die Schlierenbildung war in Probe 3 am deutlichsten. Eine mögliche Degradation der RNA im Rahmen der Extraktion kann somit nicht ausgeschlossen werden.

In Probengruppe IV betrug die mittlere isolierte RNA-Gesamtmenge $27708 \text{ ng} \pm 6027,55$ (Tabelle 8, S. 44). Der A (260/280) Quotient lag im Mittel bei $2,11 \pm 0,01$ und der A

(260/230) Quotient bei $2,11 \pm 0,31$. Nach der Gelelektrophorese konnten die 28S-rRNA- und 18S-rRNA-Banden eindeutig identifiziert werden (Abbildung 8, S. 45). Die geringe Schlierenbildung in den Proben lieferte keinen Hinweis auf eine nennenswerte Degradation. Zwischen den beiden experimentellen Reinigungsansätzen mit dem miRNeasy mini Kit[®] (Probengruppe III vs. Probengruppe IV) bestand nur beim A (260/280) Quotient mit einem p-Wert von 0,003 ein statistisch signifikanter Unterschied. Die RNA-Gesamtmenge und der A (260/230) Quotient zeigten einen p-Werte $> 0,05$ und waren damit nicht statistisch signifikant verschieden (Tabelle 9, S. 44).

Der statistische Vergleich der beiden grundlegenden Methoden (Trizol[®]-Methode Probengruppe I + II vs. miRNeasy mini Kit[®] Probengruppe III + IV) ergab nur bei dem A (260/280) Quotient mit einem p-Wert von 0,03 einen signifikanten Unterschied. Keine der im Rahmen der Etablierung der RNA-Extraktion untersuchten Methoden zeigte sich hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Anforderungen den anderen experimentellen Ansätzen als klar überlegen. Allerdings konnte das Auftreten einer RNA-Degradation bei der Methode II, III und IV nicht völlig ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Vergleich der RNA-Isolierungsmethoden mittels qualitativem und quantitativem photometrischem Nachweis der RNA (NanoDrop™).

Probengruppe I: Homogenisierung des Gewebes mit dem Ultra-Turrax® in der Trizol®-Methode, Probengruppe II: Kombination von Ultra-Turrax® und Ultraschall in der Trizol®-Methode; Probengruppe III: miRNeasy mini Kit® mit einmaliger Spülung der Silikat-Säule; Probengruppe IV: miRNeasy mini Kit® mit zweimaliger Spülung der Silikat-Säule
Bei der Analyse wurden jeweils drei Parallelansätze pro Probengruppe bearbeitet.

Proben- gruppen	Proben	1	2	3	Mittelwert ± SD
	Probenvolumen	30	30	30	
I	Konzentration (ng/µl)	4008	3513	2644	3388,33 ± 563,79
	RNA-Gesamtmenge (ng)	120240	105390	79320	101650 ± 16913,55
	A (260/280)	1,44	1,78	1,95	1,72 ± 0,21
	A (260/230)	1,26	1,46	1,73	1,48 ± 0,19
II	Konzentration (ng/µl)	1213,1	1503,6	1796,5	1504,4 ± 238,17
	RNA-Gesamtmenge (ng)	36393	45108	53895	45132 ± 7145,18
	A (260/280)	1,95	1,97	1,9	1,94 ± 0,03
	A (260/230)	1,29	1,21	1,57	1,36 ± 0,15
III	Konzentration (ng/µl)	2088	2464	1340	1964 ± 467,17
	RNA-Gesamtmenge (ng)	62640	73920	40200	58920 ± 14015,19
	A (260/280)	2,05	2,04	2,02	2,04 ± 0,01
	A (260/230)	1,42	2,03	0,98	1,48 ± 0,43
IV	Konzentration (ng/µl)	988,1	1131	651,7	923,6 ± 200,92
	RNA-Gesamtmenge (ng)	29643	33930	19551	27708 ± 6027,55
	A (260/280)	2,11	2,13	2,11	2,11 ± 0,01
	A (260/230)	2,25	2,4	1,69	2,11 ± 0,31

Tabelle 9: Vergleich der quantitativen und qualitativen Parameter der RNA-Isolationsmethoden mittels doppelseitigem T-Test.

Probengruppe I: Homogenisierung des Gewebes mit dem Ultra-Turrax® in der Trizol®-Methode, Probengruppe II: Kombination von Ultra-Turrax® und Ultraschall in der Trizol®-Methode; Probengruppe III: miRNeasy mini Kit® mit einmaliger Spülung der Silikat-Säule; Probengruppe IV: miRNeasy mini Kit® mit zweimaliger Spülung der Silikat-Säule.

In die Analyse gingen die Mittelwerte aus drei Parallelansätzen pro Probengruppe ein.

p-Werte			
Methoden	Probengruppe I vs. Probengruppe II	Probengruppe III vs. Probengruppe IV	Trizol®-Methode vs. miRNeasy mini Kit®
RNA-Gesamtmenge (ng)	0,03	0,07	0,1
A (260/280)	0,28	0,003	0,03
A (260/230)	0,51	0,17	0,16

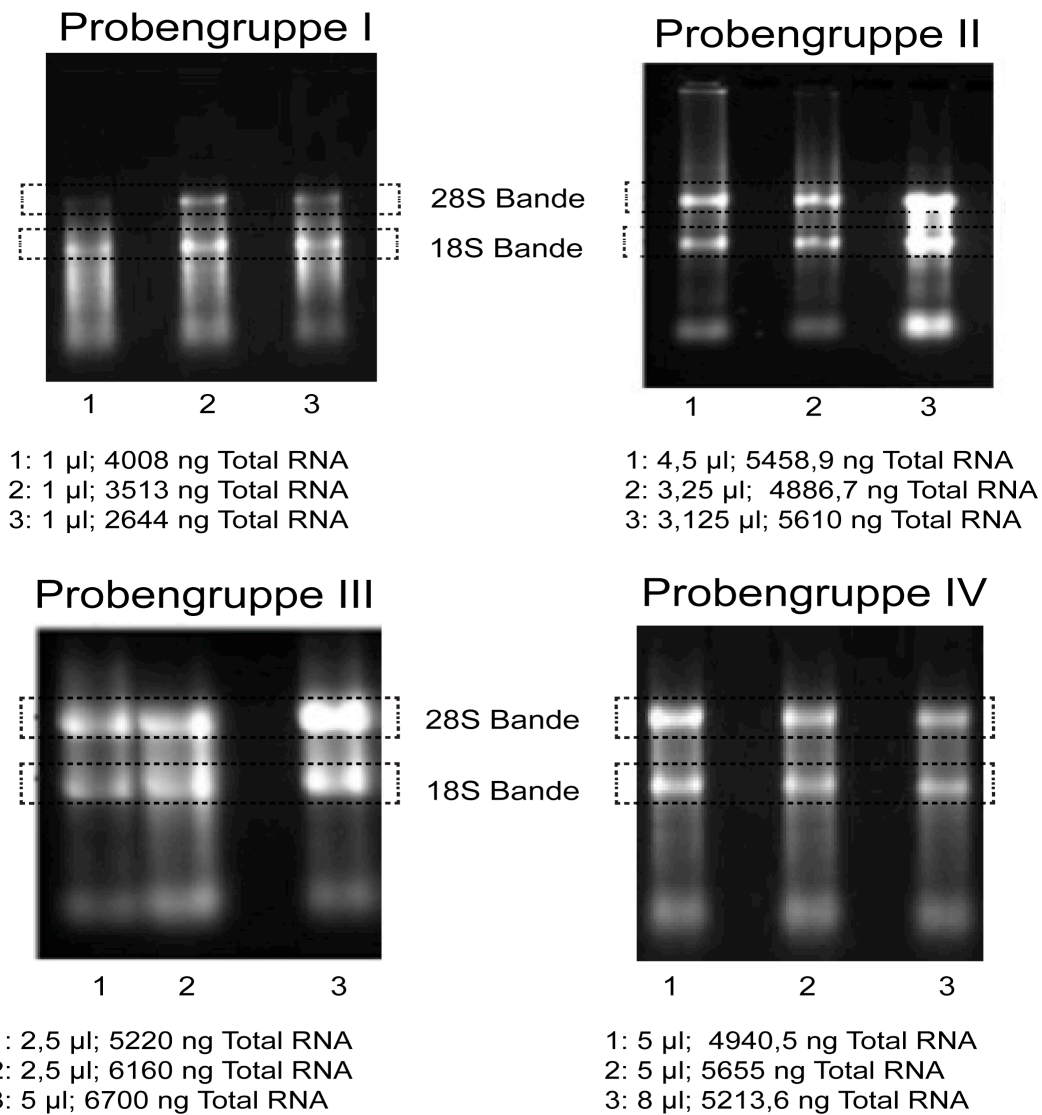


Abbildung 8: Vergleich verschiedener RNA-Aufreinigungsmethoden mittels Gelelektrophorese

Probengruppe I: Homogenisierung des Gewebes mit dem Ultra-Turrax[®] in der Trizol[®]-Methode, Probengruppe II: Kombination von Ultra-Turrax[®] und Ultraschall in der Trizol[®]-Methode; Probengruppe III: miRNeasy mini Kit[®] mit einmaliger Spülung der Silikat-Säule; Probengruppe IV: miRNeasy mini Kit[®] mit zweimaliger Spülung der Silikat-Säule B. Bei der Analyse wurden jeweils drei Parallelansätze pro Probengruppe untersucht.

4.3 Aufreinigung der Gesamt-RNA zur miRNA-Analyse

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurde zur Aufreinigung der RNA der Patienten in den beiden Untersuchungsgruppen die Trizol[®]-Methode verwendet. Dabei wurden die Gewebeprobe ausschließlich mit dem Ultraturax homogenisiert (Methode: Probengruppe I). Zur qualitativen und quantitativen Analyse wurden bei allen Proben der A (260/280) Quotient und der A (260/230) Quotient bestimmt. Im Anschluss erfolgte eine weitere qualitative Analyse aller Proben durch den Bioanalyser Agilent 2100 mit Bestimmung des RIN-Wertes. In den Proben der Gruppe A (Tabelle 10, S. 47, n = 16, Bezeichnung: Ex) wurde eine mittlere RNA-Gesamtmenge von $81984,79 \text{ ng} \pm 104498,71$ gemessen. Der A (260/280) Quotient lag im Mittel bei $1,79 \pm 0,12$ und der A (260/230) Quotient bei $1,32 \pm 0,88$. Der RIN-Wert betrug im Mittel $7,62 \pm 1,86$. Bei drei Proben (P15-Ex, P17-Ex, P21-Ex) war es nicht möglich mit Hilfe des Bioanalyzers eine Bestimmung der RIN-Werte durchzuführen. Spectrometrisch zeigten diesen Proben einen hohen RNA-Gehalt ($>12000 \text{ ng}$). Die Abweichung des A (260/280) Quotienten lag im Rahmen des Referenzbereiches bzw. in der Nähe des Mittelwerts dieser Patientengruppe. Daher wurden die drei Proben zur weiteren Analyse der miRNA-Profile herangezogen.

In der Patientengruppe B wurden sieben Proben aus dem primären Tumorgewebe (T) und 14 Proben aus dem kontralateral zum HCC-Tumor gelegenen Leberlappen (sT) analysiert. Der RNA-Gehalt der sieben T-Proben betrug im Mittel $114228,83 \text{ ng} \pm 77607,55$ (Tabelle 11, S. 47). Der A (260/280) wurde im Mittel bei $1,82 \pm 0,05$ und der A (260/230) Quotient bei $1,37 \pm 0,47$ bestimmt. Der RIN-Wert lag im Mittel bei $7,26 \pm 2,02$, wobei den geringsten Wert mit 2,6 die Probe P2-T aufwies. Die isolierte RNA-Menge in Probe P2-T betrug $82801,8 \text{ ng}$ und der A (260/280) Quotient 1,91.

In den 14 sT-Proben, des tumorumgebenden Gewebes lag der mittlere RNA-Gehalt bei $50466,19 \text{ ng} \pm 43570,26$ (Tabelle 12, S. 48). Der mittlere A (260/230) Quotient betrug $1,39 \pm 0,87$ und der A (260/280) Quotient $1,8 \pm 0,12$. Auffällig war, dass die Proben P2-sT, P4-sT, P9-sT und P11-sT, einen A (260/230) Quotienten von unter 1,0 aufwiesen. Jedoch enthielten diese Proben einen hohen RNA-Gehalt mit einem entsprechend hohen A (260/280) Quotienten.

Tabelle 10: Analyse der Menge, Reinheit (A (260/280), A (260/230) und der Integrität der RNA-Isolate der Gewebeproben-Ex aus Patientengruppe A

Proben Ex	NanoDrop™			Bioanalyser
	RNA-Menge (ng)	A (260/280)	A (260/230)	RIN
P15-Ex	58791	1,87	0,53	N/A
P16-Ex	87448,5	1,99	0,8	4,8
P17-Ex	12947,7	2,07	1,13	N/A
P18-Ex	25100,7	1,67	0,29	7,3
P19-Ex	57967,2	1,85	0,54	6,7
P20-Ex	33672,6	1,73	0,32	2,5
P21-Ex	31497	1,72	0,31	N/A
P22-Ex	131880	1,87	3,38	9
P23-Ex	10892	1,85	0,82	8,2
P24-Ex	469280	1,83	1,35	8,5
P25-Ex	44240	1,82	2,08	8,9
P26-Ex	70000	1,71	2,23	8,6
P27-Ex	92960	1,72	2,09	8,9
P28-Ex	66360	1,66	2,3	8,5
P29-Ex	69160	1,66	1,82	8,2
P30-Ex	49560	1,68	1,05	8,9
Mittelwert	81984,79	1,79	1,32	7,62
SD	104498,71	0,12	0,88	1,86

* N/A = not available

Tabelle 11: Analyse der Menge, Reinheit (A (260/280), A (260/230) und der Integrität der RNA-Isolate der Gewebeproben-T der Patientengruppe B

Proben T	NanoDrop™			Bioanalyser
	RNA-Menge (ng)	A (260/280)	A (260/230)	RIN
P02-T	82801,8	1,91	0,77	2,6
P07-T	38360	1,84	0,77	8,3
P08-T	108920	1,8	1,34	7,4
P09-T	89600	1,79	2,2	7,7
P10-T	55720	1,75	1,64	8,9
P11-T	267680	1,84	1,31	8,9
P12-T	156520	1,78	1,56	7
Mittelwert	114228,83	1,82	1,37	7,26
SD	77607,55	0,05	0,47	2,02

Tabelle 12: Analyse der Menge, Reinheit (A (260/280), A (260/230) und der Integrität der RNA-Isolate der Gewebeproben-sT der Patientengruppe B

Proben sT	NanoDrop™			Bioanalyser
	RNA-Menge (ng)	A (260/280)	A (260/230)	RIN
P01-sT	16137,6	1,92	1,03	8,4
P02-sT	22218,9	1,66	0,21	2,6
P03-sT	30809,7	1,94	1,34	7,4
P04-sT	12957,3	1,85	0,97	8,6
P05-sT	21642,9	1,93	1,06	8,6
P06-sT	8190,3	1,59	0,75	8,1
P07-sT	86400	1,73	3,84	8,9
P08-sT	178640	1,81	1,25	8,5
P09-sT	70000	1,81	0,62	8,7
P10-sT	77560	1,76	1,75	8,3
P11-sT	58800	1,71	0,72	8,8
P12-sT	57680	1,64	1,75	8,3
P13-sT	50130	2	2,07	7,3
P14-sT	15360	1,91	2,11	7,4
Mittelwert	50466,19	1,8	1,39	7,85
SD	43570,26	0,12	0,87	1,54

4.4 Ergebnisse der miRNA-Analyse

Die Array-Analysen der Gewebeproben wurden durch die Firma Exiqon (Vedbaek, Dänemark) durchgeführt. Die Rohdaten für die statistische Analyse wurden im Excel-Format geliefert. Anhand der Expressionsdifferenzen zwischen den Untersuchungsgruppen (LogFC) wurden über die Delogarithmisierung (FC) die prozentualen Unterschiede der miRNA-Expression zwischen den Untersuchungsgruppen bestimmt. Um die miRNA mit relevanten Unterschieden zwischen den untersuchten Gruppen zu detektieren, wurden nur miRNA mit einer Expressionsänderung über 40 % analysiert.

4.4.1 miRNA-Expressionsvergleich zwischen T-Gewebe und sT-Gewebe

Im Vergleich der sieben Proben aus den HCC-Knoten und der 14 sT-Proben der Gruppe B konnten 40 miRNA als statistisch signifikant identifiziert werden. Bei 32 miRNA betrug die Expressionsdifferenz mehr als 40 % zwischen den beiden Untersuchungsgruppen (Tabelle 13, S. 50). Bei neun miRNA (miRNA-125b-5p, miRNA-199a-5p, miRNA-139-5p, miRNA-144-3p, let-7b-5p, miRNA-100-5p, miRNA-101-3p, let-7c, miRNA-130a-3p) betrug die Expressionsunterschiede mehr als 100 %, bei acht miRNA (miRNA-19b-3p, miRNA-181a-5p, let7g-5p, miRNA-585, miRNA-3653, miRNA-767-5p, miRNA-638, miRNA-574-3p)

weniger als 50 %. Die Expression der übrigen 15 miRNA zeigte eine Differenz der miRNA-Expression zwischen 50 % und 100 % zwischen beiden Gruppen. Die miRNA-585 und miRNA-638 nahmen eine Sonderstellung ein, da sie als einzige miRNA im sT-Gewebe im Vergleich zum T-Gewebe vermindert exprimiert wurden. Die miRNA-125b-5p zeigte mit einem FC von 2,59 zwischen dem T- und dem sT-Gewebe der Gruppe B die größte Expressionsdifferenz (Abbildung 9, S. 49).

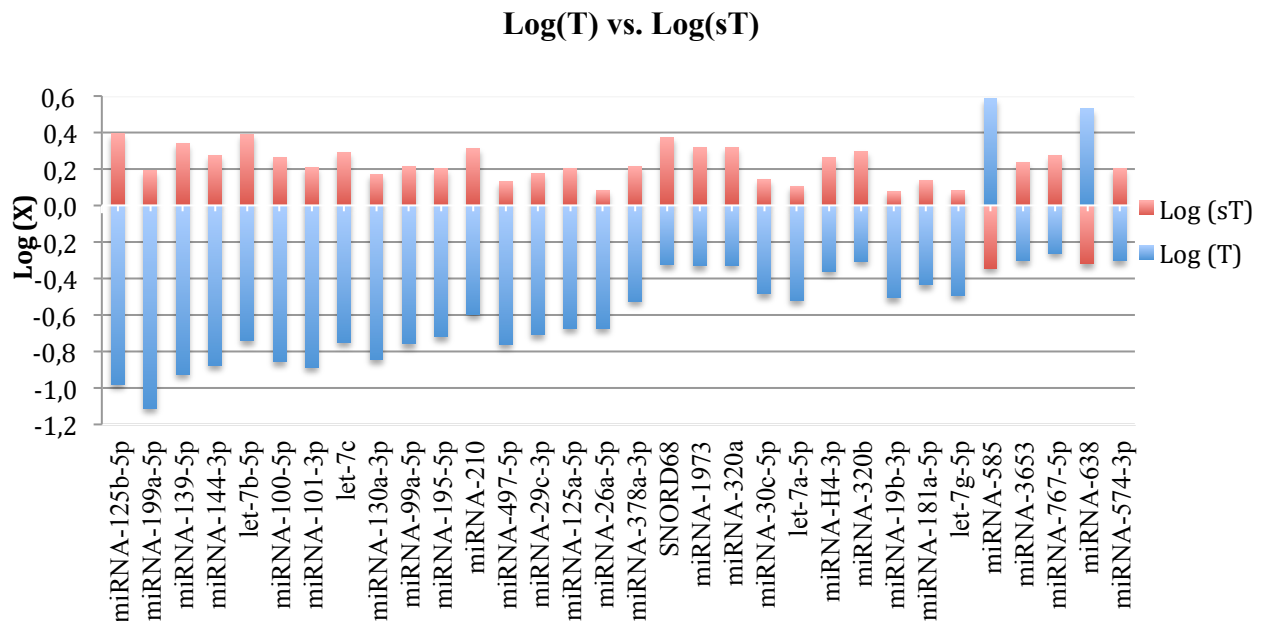


Abbildung 9: miRNA-Arrayanalyse der Gewebeproben sT (n = 14) vs. T (n = 7). Gezeigt werden die Mittelwerte der miRNA-Expression beider Untersuchungsgruppen als $\text{Log}_2(X)$

Tabelle 13: miRNA-Arrayanalyse der Gewebeproben T (n = 7) vs. sT (n = 14). Gezeigt werden die Mittelwerte der miRNA-Expression (Log (T), Log (sT)) mit Standardabweichung (SD (T), SD (sT)) sowie die mittleren Änderungen der miRNA zwischen beiden Untersuchungsgruppen (FC). Gleichzeitig werden die prozentualen Änderungen beider Untersuchungsgruppen und die p-Werte dargestellt.

miRNA	Log(T)	SD(T)	Log(sT)	SD(sT)	FC	% Änderung	p
miRNA-125b-5p	-0,980	1,06	0,393	0,45	2,59	159,06	0,019
miRNA-199a-5p	-1,112	1,21	0,190	0,61	2,47	146,54	0,040
miRNA-139-5p	-0,927	0,74	0,339	0,37	2,40	140,49	0,005
miRNA-144-3p	-0,875	0,57	0,276	1,54	2,22	122,09	0,029
let-7b-5p	-0,739	0,83	0,389	0,54	2,19	118,50	0,015
miRNA-100-5p	-0,855	1,07	0,261	0,32	2,17	116,79	0,044
miRNA-101-3p	-0,888	0,83	0,207	0,50	2,14	113,72	0,017
let-7c	-0,751	0,79	0,290	0,44	2,06	105,72	0,018
miRNA-130a-3p	-0,844	1,00	0,172	0,40	2,02	102,13	0,047
miRNA-99a-5p	-0,759	0,96	0,212	0,20	1,96	96,06	0,049
miRNA-195-5p	-0,719	0,77	0,200	0,48	1,89	89,15	0,026
miRNA-210	-0,599	0,81	0,312	0,56	1,88	87,94	0,035
miRNA-497-5p	-0,762	0,72	0,131	0,47	1,86	85,64	0,023
miRNA-29c-3p	-0,708	0,68	0,175	0,44	1,84	84,41	0,019
miRNA-125a-5p	-0,675	0,79	0,204	0,70	1,84	83,99	0,040
miRNA-26a-5p	-0,672	0,74	0,082	0,40	1,69	68,63	0,049
miRNA-378a-3p	-0,526	0,49	0,214	0,55	1,67	66,99	0,011
SNORD68	-0,326	0,41	0,374	0,56	1,62	62,49	0,008
miRNA-1973	-0,331	0,51	0,317	0,64	1,57	56,70	0,033
miRNA-320a	-0,327	0,53	0,318	0,45	1,56	56,34	0,028
miRNA-30c-5p	-0,485	0,54	0,142	0,28	1,55	54,51	0,029
let-7a-5p	-0,521	0,59	0,106	0,35	1,54	54,41	0,043
miRNA-H4-3p	-0,363	0,54	0,260	0,60	1,54	54,04	0,042
miRNA-320b	-0,307	0,54	0,298	0,42	1,52	52,01	0,038
miRNA-19b-3p	-0,506	0,43	0,075	0,40	1,50	49,54	0,017
miRNA-181a-5p	-0,436	0,54	0,138	0,46	1,49	48,88	0,048
let-7g-5p	-0,493	0,51	0,079	0,37	1,49	48,71	0,037
miRNA-585	0,584	0,68	-0,343	0,55	0,53	-47,42	0,015
miRNA-3653	-0,302	0,44	0,237	0,33	1,45	45,26	0,026
miRNA-767-5p	-0,264	0,49	0,272	0,34	1,45	45,07	0,040
miRNA-638	0,530	0,72	-0,319	0,51	0,56	-44,48	0,030
miRNA-574-3p	-0,303	0,43	0,203	0,29	1,42	42,07	0,030

4.4.2 MiRNA-Expressionsvergleich zwischen T-Gewebe und Ex-Gewebe

Beim Vergleich der sieben Proben aus den HCC-Knoten (T) mit den 16 Proben der Gruppe A (Ex) konnte die Expression von 29 miRNA mit p-Werten $\leq 0,05$ als statistisch signifikant verschieden bestimmt werden. Jedoch zeigten nur 23 miRNA (79,3 %) eine Expressionsdifferenz von mehr als 40 % zwischen beiden Untersuchungsgruppen (Tabelle 14, S. 52). Der deutlichste Unterschied bestand bei der miRNA-199a-5p ($\text{Log}_2(\text{T}) = -1,112$, $\text{Log}_2(\text{Ex}) = 0,188$, prozentuale Differenz 146 %, (Abbildung 10, S. 51). Auffällig war, dass bei allen 23 miRNA die Expression im Ex-Gewebe im Vergleich zum T-Gewebe höher lag. Die miRNA-199a-5p, miRNA-199a/b-3p, miRNA-139-5p, miRNA-125b-5p und miRNA-130a-3p zeigten einen Expressionsunterschied von mehr als 100 %. Lediglich bei let-7g-5p und miRNA-20b-5p betrug die Expressionsdifferenz zwischen 40 % und 50 %. Bei neun miRNA (miRNA-126-3p, miRNA-126-5p, miRNA-422a, miRNA-214-5p, miRNA-378a-p, miRNA-26b-5p, miRNA-30e-3p, miRNA-29c-4p, miRNA-195-5p) lag der Unterschied zwischen 50 % und 75 %. Die übrigen sieben miRNA (miRNA-1297, miRNA-26a-5p, miRNA-378c, miRNA-143-3p, miRNA-497-5p, miRNA-101-3p, miRNA-99a-5p) zeigten eine Differenz zwischen 75 % bis 100 %.

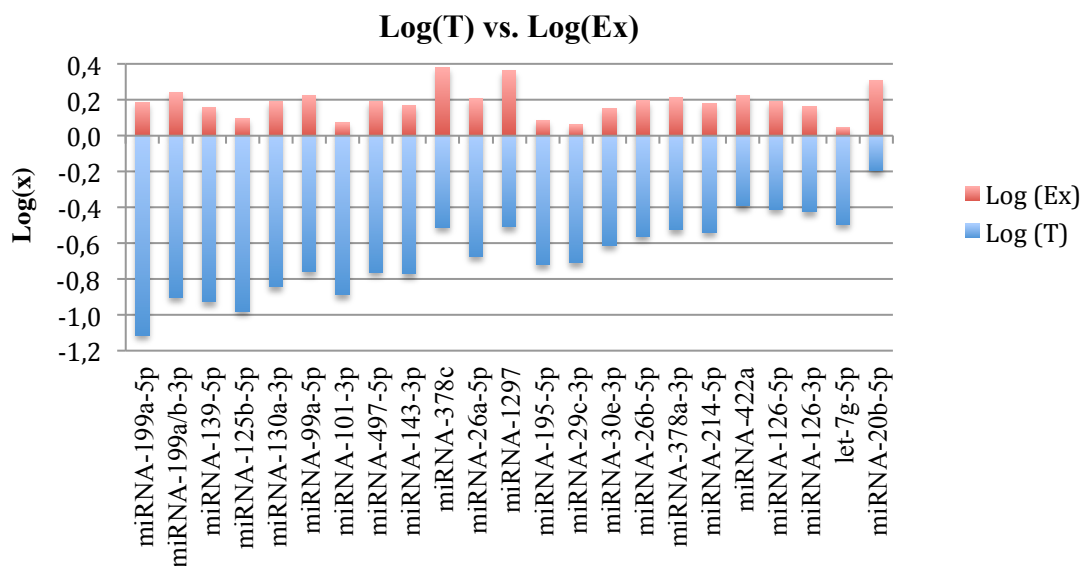


Abbildung 10: miRNA-Arrayanalyse der Gewebeproben T (n = 7) vs. Ex (n = 16). Gezeigt werden die Mittelwerte der miRNA-Expression beider Untersuchungsgruppen als $\text{Log}_2(\text{X})$

Tabelle 14: miRNA-Arrayanalyse der Gewebeproben T (n = 7) vs. Ex (n = 16).

Gezeigt werden die Mittelwerte der miRNA-Expression (Log (T), Log (Ex)) mit Standardabweichung (SD (T), SD (Ex)) sowie die mittleren Änderungen der miRNA zwischen beiden Untersuchungsgruppen (FC). Gleichzeitig werden die prozentualen Änderungen beider Untersuchungsgruppen und die p-Werte dargestellt.

miRNA	Log(T)	SD(T)	Log(Ex)	SD(Ex)	FC	% Änderung	p
miRNA-199a-5p	-1,112	1,21	0,188	0,65	2,46	146,12	0,040
miRNA-199a/b-3p	-0,900	1,12	0,241	0,58	2,20	120,41	0,048
miRNA-139-5p	-0,927	0,74	0,160	0,43	2,12	112,38	0,011
miRNA-125b-5p	-0,980	1,06	0,098	0,40	2,11	111,07	0,047
miRNA-130a-3p	-0,844	1,00	0,189	0,54	2,05	104,57	0,045
miRNA-99a-5p	-0,759	0,96	0,226	0,28	1,98	97,86	0,047
miRNA-101-3p	-0,888	0,83	0,072	0,67	1,95	94,51	0,032
miRNA-497-5p	-0,762	0,72	0,190	0,68	1,93	93,38	0,019
miRNA-143-3p	-0,771	0,93	0,170	0,48	1,92	91,96	0,048
miRNA-378c	-0,511	0,59	0,380	0,48	1,85	85,44	0,009
miRNA-26a-5p	-0,672	0,74	0,207	0,36	1,84	83,94	0,027
miRNA-1297	-0,509	0,71	0,364	0,40	1,83	83,18	0,023
miRNA-195-5p	-0,719	0,77	0,086	0,55	1,75	74,75	0,045
miRNA-29c-3p	-0,708	0,68	0,062	0,50	1,70	70,48	0,035
miRNA-30e-3p	-0,611	0,73	0,154	0,32	1,70	69,84	0,042
miRNA-26b-5p	-0,561	0,61	0,195	0,36	1,69	68,91	0,022
miRNA-378a-3p	-0,526	0,49	0,211	0,60	1,67	66,70	0,011
miRNA-214-5p	-0,539	0,66	0,182	0,55	1,65	64,82	0,040
miRNA-422a	-0,392	0,37	0,226	0,50	1,53	53,42	0,008
miRNA-126-5p	-0,410	0,53	0,190	0,42	1,52	51,59	0,034
miRNA-126-3p	-0,424	0,44	0,162	0,34	1,50	50,14	0,016
let-7g-5p	-0,493	0,51	0,048	0,39	1,46	45,51	0,046
miRNA-20b-5p	-0,195	0,35	0,310	0,44	1,42	41,90	0,016

4.4.3 MiRNA-Expressionsvergleich zwischen Ex-Gewebe und sT-Gewebe

Der miRNA-Expressionsvergleich zwischen der Zirrhose der Gruppe A (Ex) und der Zirrhose der Gruppe B (sT) ergab für 56 miRNA einen signifikanten Unterschied (p-Wert $\leq 0,05$). Bei elf miRNA betrug die Differenz zwischen beiden Untersuchungsgruppen mehr als 40 % (Tabelle 15, S. 53). Der größte Unterschied wurde bei der miRNA-1973 ($\text{Log}_2(\text{Ex}) = -0,578$ und $\text{Log}_2(\text{sT}) = 0,317$, prozentuale Differenz: 86 %, Abbildung 11, S. 53) beobachtet. Bei fünf miRNA (miRNA-3646, miRNA-PLUS-A1015, miRNA-32-3p, miRNA-423-5p, miRNA-3178) betrug die Differenz zwischen 40 % und 50 %. Die übrigen sechs miRNA (miRNA-1973, miRNA-3667-5p, SNORD3@, SNORD68, miRNA-3196, miRNA-3611) zeigten Unterschiede von mehr als 50 %.

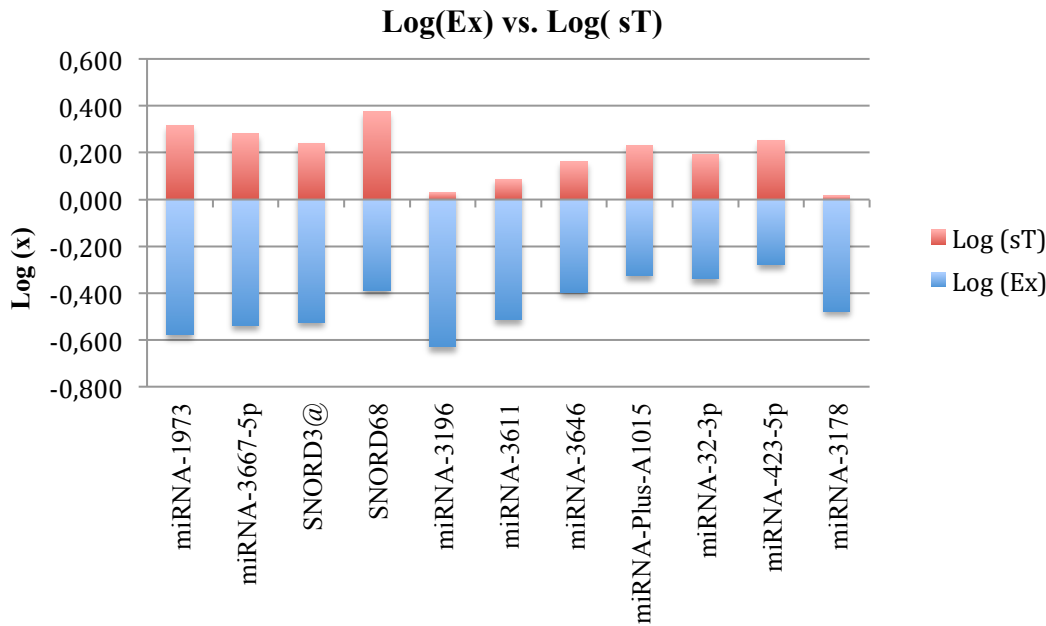


Abbildung 11: miRNA-Arrayanalyse der Gewebeproben Ex (n = 16) vs. sT (n = 14). Gezeigt werden die Mittelwerte der miRNA-Expression beider Untersuchungsgruppen als $\text{Log}_2(X)$

Tabelle 15: miRNA-Arrayanalyse der Gewebeproben Ex (n = 16) vs. sT (n = 14).

Gezeigt werden die Mittelwerte der miRNA-Expression (Log (Ex), Log (sT)) mit Standardabweichung (SD (Ex), SD (sT)) sowie die mittleren Änderungen der miRNA zwischen beiden Untersuchungsgruppen (FC). Gleichzeitig werden die prozentualen Änderungen beider Untersuchungsgruppen und die p-Werte dargestellt.

miRNA	Log(Ex)	SD (Ex)	Log(sT)	SD (sT)	FC	% Änderung	p
miRNA-1973	-0,578	0,58	0,317	0,64	1,86	85,92	0,001
miRNA-3667-5p	-0,539	0,83	0,280	0,60	1,76	76,38	0,006
SNORD3@	-0,525	0,56	0,239	0,51	1,70	69,84	0,001
SNORD68	-0,388	0,43	0,374	0,56	1,70	69,54	0,001
miRNA-3196	-0,629	0,74	0,031	0,88	1,58	58,00	0,043
miRNA-3611	-0,512	0,38	0,086	0,46	1,51	51,41	0,001
miRNA-3646	-0,396	0,71	0,161	0,40	1,47	47,12	0,016
miRNA-Plus-A1015	-0,325	0,74	0,230	0,66	1,47	46,88	0,047
miRNA-32-3p	-0,339	0,36	0,192	0,43	1,45	44,56	0,002
miRNA-423-5p	-0,277	0,32	0,251	0,38	1,44	44,11	0,001
miRNA-3178	-0,477	0,41	0,016	0,70	1,41	40,75	0,037

5 Diskussion

In den vergangenen Jahren ist die Inzidenz der alkoholbedingten Leberzirrhose und des HCC in den Industrienationen kontinuierlich angestiegen. Beide Erkrankungen stellen damit ein zunehmendes medizinisches, sozioökonomisches und ethisches Problem dar [21][22][23]. Zur Behandlung beider Entitäten ist die Lebertransplantation ein etabliertes therapeutisches Verfahren. Jedoch besteht seit längerer Zeit eine wachsende Diskrepanz zwischen Bedarf und Angebot von geeigneten Spenderorganen. Durch den Einsatz objektiverer Risikoparameter, die die individuellen Pathomechanismen der Patienten berücksichtigen, können vorhandene Spenderorgane prognosespezifisch verteilt werden sowie Patienten mit bekannter Leberzirrhose und erhöhtem Tumorrisiko frühzeitig identifiziert werden.

Das aktuell in Europa meistgenutzte Staging-System zur Festlegung einer adäquaten, individuell auf den Patienten abgestimmten Behandlungsstrategie für das HCC ist das BCLC-System. Alternative Systeme, wie die *French classification* [38], der *Chinese university prognostic index* (CUPI) [39] oder das *Cancer of the Liver Italian Program* (CLIP) [40] werden ebenfalls genutzt. Die Klassifikationssysteme haben gemeinsam, dass die therapeutische Empfehlung auf der Basis verschiedener diagnostischer Parameter, unter anderem den Milan-Kriterien, ausgesprochen wird, ohne die histopathologischen und genetischen Eigenschaften des Tumors zu berücksichtigen [50][51][52]. Befunde mehrten sich, dass die Abschätzung des biologischen Verhaltens allein auf der Basis der räumlichen Ausdehnung des Tumors nur eine unzureichende Grundlage für die Wahl einer optimalen Behandlungsstrategie bietet. Die Nutzung des MELD-Scores für die Allokation von Spenderorganen führt zu einer Verschlechterung des postoperativen Überlebens nach Organtransplantation [48]. Vor diesem Hintergrund wird die Notwendigkeit der Optimierung des therapeutischen Vorgehens unter Berücksichtigung des pathogenetischen Hintergrundes und des biologischen Verhaltens der Lebererkrankung deutlich. Nur so kann eine optimale Versorgung der betroffenen Patienten gewährleistet werden.

Im Rahmen der Pathogenese chronischer Lebererkrankungen scheinen Änderungen im miRNA-Profil eine große Rolle zu spielen. Beispielsweise detektierten Murakami *et al.* [64] bereits die miRNA-Expressionsänderungen bei viralen Hepatitiden, wohingegen die miRNA-Profile des nutritiv toxischen Leberschadens noch weitgehend unbekannt sind. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit erstmals mit der Analyse der miRNA-Profile bei der nutritiv toxischen Lebererkrankung im Rahmen der Lebertransplantation.

Zur Analyse der miRNA-Profile wurden 189 Patienten, die sich in den

Transplantationszentren in Berlin und Leipzig einer Lebertransplantation unterzogen, in die Studie eingeschlossen. In dieser Population war die nutritiv toxische Genese die häufigste Ursache für eine Leberzirrhose (59 von 83 Patienten, Gruppe A) oder für ein HCC (34 von 72 Patienten, Gruppe B).

Die Patienten der Gruppe A und B unterschieden sich signifikant hinsichtlich ihres Alters (Gruppe A 51,47 Jahre vs. Gruppe B 60,83 Jahre, $p \leq 0,001$) und ihres Lab-MELD (Gruppe A 19,97 vs. Gruppe B 13,0, $p \leq 0,001$). Für die spezifische miRNA-Analyse wurden 30 Patienten (Gruppe A 16 Patienten, Gruppe B 14 Patienten) aus der Gesamtpopulation ausgewählt, deren Ätiologie eindeutig einer nutritiv toxischen Genese zuzuordnen war. In dieser Subgruppe blieb der signifikante Unterschied beim Alter bestehen (Gruppe A 50,31 Jahre vs. Gruppe B 59,93 Jahre, $p = 0,029$) jedoch war die Differenz im Lab-MELD statistisch nicht mehr signifikant (Gruppe A 15,93 vs. Gruppe B 14,92, $p = 0,55$). Bei der Analyse des Leberschadens zeigte Gruppe A eine Child-Pugh-Score Verteilung von 25 % zu 56,25 % zu 18,75 % (Kategorie A, B, C) und Gruppe B von 50 % zu 21,42 % zu 28,57 %. Eine Analyse der laboranalytischen Parameter ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, so dass von einer Vergleichbarkeit ausgegangen werden kann. Der erste, grundlegende Schritt bei der miRNA-Analyse ist die Extraktion der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Trizol[®]-Methode und eine Säulen-basierte RNA-Extraktionsmethode (miRNeasy mini Kit[®]) mit verschiedenen Modifikationen (Probengruppe I: Trizol[®]-Methode, Homogenisierung mit Ultraturrax, Probengruppe II: Trizol[®]-Methode, Homogenisierung mit Ultraturrax + Ultraschall; Probengruppe III: miRNeasy mini Kit[®], einmalige Elution der RNA, Probengruppe IV: miRNeasy mini Kit[®], zweimalige Elution der RNA) verglichen. Beide Methoden sind, nach aktueller Datenlage, für die RNA-Extraktion aus Gewebe geeignet [74][67][75].

Für die Evaluation der geeigneten Methode für das humane Lebergewebe wurden qualitative (spectrophotometrische Analyse auf Verunreinigungen, gelelektrophoretische Analyse auf Degradation) sowie quantitative Marker analysiert. Keine der analysierten Methode erwies sich bei der Aufreinigung von RNA aus Lebergewebe als klar überlegen. Allerdings zeigten die gelelektrophoretischen Analysen der Probengruppe II, III und IV Anzeichen für eine Degradation der RNA. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und unter Betrachtung der aktuellen Daten [74][67][75] erfolgte die Extraktion der RNA zur miRNA-Analyse mit Hilfe der Trizol[®]-Methode. Das Gewebe wurde ausschließlich mit einem Ultraturrax homogenisiert (Probengruppe I),

Die molekularbiologischen Mechanismen der HCC-Entstehung wurden von zahlreichen

Arbeitsgruppen untersucht. Derzeit fehlen aber Studien, die eine Beteiligung spezifischer miRNA an der Leberzirrhose sowie dem HCC in Zirrhose nutritiv toxischer Genese belegen [76]. Die beiden wichtigsten Signaltransduktionswege, die zu einer Proliferation der Hepatozyten führen, sind der *rat-sarcoma*-(Ras)-Signalweg mit seinem wichtigsten Effektor, der *mitogen activated protein*-(MAP)-Kinase, und der Akt-Signalweg mit der Proteinkinase B als zentraler Akteur. Beide Signalwege haben Einfluss auf den *mechanistic Target of Rapamycin*-mTOR-Signalweg, der für das Wachstum, den Zellzyklus und Apoptoseprozesse in der Zelle zuständig ist [76]. Sui *et al.* sowie Nakaishi *et al.* konnten zeigen, dass Mutationen in Proteinen beider Signalwege im primären HCC mit einem verstärkten Wachstum und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit für das HCC korrelieren [77][78]. Untersuchungen zu miRNA-Expressionsänderungen lassen vermuten, dass verschiedene miRNA bei der Entstehung lebereigener Tumoren eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass miRNA-100, die let-7-Familie, miRNA-195 und miRNA-497 an verschiedenen Stellen der beschriebenen Signalkaskaden regulatorische Funktionen besitzen [79][80][81]. Cairo *et al.* [79] entdeckte einen Zusammenhang zwischen der Expressionsreduktion des miRNA-100/miRNA-125b/let-7a-Clusters und der Dysregulation des Myc-Gens im Hepatoblastom. Bei einem miRNA-Cluster handelt es sich um mehrere miRNA, die in räumlicher Nähe auf einem Chromosom liegen. Durch die gemeinsame Transkription dieser miRNA wird ein synergetischer Effekt bei der Regulation von zellulären Prozessen erzielt. Gleichzeitig beschrieben die Autoren einen Anstieg von miRNA-371-3 bei diesen Tumoren. Das miRNA-100/miRNA-125b/let-7a-Cluster beeinflusst die Myc-Gen-Aktivität. Das Genprodukt des Myc-Gens beeinflusst sowohl den Wnt-β-Catenin-Signalweg als auch die MAP-Kinase. Damit erklärt sich die Funktion dieses Clusters als Regulator der Hepatozytendifferenzierung. Die vorliegenden Messergebnisse unterstützen die Befunde von Cairo *et al.* [79] nur teilweise. Die miRNA des Clusters (miRNA-100/miRNA-125b/let-7a) wurden im Tumorgewebe (T) deutlich geringer (> 50 %) exprimiert als im umgebenden Lebergewebe (sT). Am stärksten war der Unterschied bei der miRNA-125 betroffen. Allerdings konnte in den vorliegenden Ergebnissen, im Gegensatz zu Cairo *et al.* [79], kein Expressionsunterschied bei der miRNA-371-3 nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich zwischen T- und Ex-Gewebe konnte nur für die miRNA-125 (110 % höher im Ex-Gewebe) ein Expressionsunterschied detektiert werden. Die anderen miRNA des miRNA-Clusters wiesen keine Expressionsdifferenzen auf. Die Befunde deuten darauf hin, dass möglicherweise miRNA-125 bei der HCC-Entstehung aus einer zirrhotisch bedingten Lebererkrankung von besonderer Relevanz ist. Eine Dysregulation der miRNA-100-

Expression wurde in weiteren klinischen Studien festgestellt. Bai *et al.* [82] zeigten in einer Studie mit 106 Kindern mit akuter myeloischer Leukämie (AML), dass eine Überexpression von miRNA-100 im Knochenmarksgewebe der Patienten, unabhängig von anderen zytogenetischen Aberrationen, zu einer schlechteren Überlebensprognose und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit führt. Auch in gynäkologischen Tumoren wurde eine veränderte miRNA-100 Expression abhängig der Ätiologie festgestellt[83][84][85].

Die Rolle von miRNA-100 in der Pathogenese oder Prognose des HCC bleibt auf der Basis der aktuellen Datenlage unklar. Aufgrund der in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde sollte die potentielle Bedeutung dieser miRNA gerade durch ihre Expressionsänderung zwischen sT- und T-Gewebe intensiv untersucht werden, da hier ein Erklärungsansatz für die maligne Transformation von der Leberzirrhose zum HCC identifiziert werden kann.

Let-7a, ein anderes Mitglied dieses Clusters, nimmt über die Regulation der *Ras*-Signalkaskade Einfluss auf die Proliferation von Zellen [80]. Ein Abfall der Konzentration von let-7 wurde bei Lungen- [86], Mamma- [87] und Pankreastumoren [88] gefunden. Untersuchungen mit Hepatozyten-Zelllinien belegen, dass es bei einer Überexpression von let-7 und der damit verbundenen Regulation multipler an der Regulation des Zellzyklus beteiligter Proteine (CDK-Proteine) (z.B.: Cell division cycle 25 homolog A (CDC25a), Cyclin dependent kinase (CDK) 6, und Cyclin D) zu einem Arrest der Zellen am G₁/S Mitosepunkt kommt. Let-7 kann sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss auf die Aktivität von CDK-Proteinen haben und steuert über mehrere Wege die Proliferation der Zellen [89]. Zhu *et al.* [90] untersuchten die klinische Bedeutung der let-7 Expression in HCC-Tumoren. In einer Studie mit 32 HCC-Patienten unterschiedlicher Ätiologie wiesen sie nach, dass eine geringere Konzentration von let-7c im HCC-Gewebe mit einem schlechteren *Grading* des Tumors korreliert. Eine Verbindung zu anderen Parametern, wie dem Alter des Patienten, dem Geschlecht, der α_1 -Fetoprotein-Konzentration, dem Hepatitis-B-Virus-(HBV)-Status oder anderen Tumorcharakteristika konnte nicht aufgezeigt werden. Auch in der vorliegenden Untersuchung kam es im HCC-Gewebe bei nutritiv toxischer Genese zu einer verminderten Expression von let-7, was das allgemeine kanzerogene Potenzial dieser miRNA unterstreicht. Der Befund ist besonders interessant, weil signifikante Expressionsdifferenzen zwischen sT- und Ex-Gewebe fehlten.

Ein weiteres Beispiel für ein miRNA-Cluster, das über die Regulation unterschiedlicher Signaltransduktionswege Einfluss auf die Zellproliferation nimmt, ist das miRNA-195/miRNA-497-Cluster. Die beiden miRNA werden durch ihre räumliche Nähe auf Chromosom 17p13.1, gemeinsam exprimiert. Furuta *et al.* [81] konnten in HCC-Zelllinien

sowie in humanen HCC- und Leberzirrhoseproben, einen Abfall der Expression von miRNA-195 und miRNA-497 im HCC-Gewebe beschreiben. In Folge kommt es zu einem Expressionsabfall von verschiedenen Zellzyklusproteinen (Cyclin E1 (CCNE1), CDC25A, CDK4, CDK6), die am G₁/S Mitosekontrollpunkt die Zellproliferation regulieren [81][76].

Bei der Analyse der Expression des miRNA-195/miRNA-497-Clusters in HCC-Gewebe mit nutritiv toxischer Ätiologie zeigte das T-Gewebe im Vergleich zum sT-Gewebe eine um 85 % geringere Expression, im Vergleich zum Ex-Gewebe betrug der Unterschied 74 %. Diese Befunde lassen vermuten, dass das miRNA-195/miRNA-497-Cluster auch in der nutritiv toxischen Ätiologie des HCC eine Rolle spielt. Für spezifische Aussagen bezüglich der genauen Bedeutung dieses Clusters bei der Entstehung des HCC, ist jedoch eine Validierung mittels *quantitativer-real-time-Polymerase-Chain reaction* (qRT-PCR) und die Analyse der Zielproteine notwendig.

Die extrazellulären Liganden des Wnt-β-Catenin-Signaltransduktionsweges sind auf dem *wingless*-Gen und dem *Int*-Gen kodiert und beeinflussen über die Anreicherung von β-Catenin im Zytosol diverse Abschnitte der Zellteilung. Beispielsweise steuert der Wnt-β-Catenin-Signalweg durch die Regulation von Cyclin A und E in HCC-Zellen den G₁/G₀ Kontrollpunkt des Zellzyklus [91]. Eine dysregulierte Expression der miRNA-100 [79] und miRNA-26a [92][93] beeinflusst wiederum den Wnt-β-Catenin-Signalweg. Andere Effekte einer Expressionsdysregulation der miRNA-100 wurden bereits weiter vorne beschrieben. Damit wird klar, dass eine einzelne miRNA mehrere Signaltransduktionskaskaden reguliert, was ihre komplexe Funktion im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse unterstreicht.

Der regulatorische Effekt von miRNA-26 in HCC-Zelllinien wurde unter anderem in der Arbeit von Zhu *et al.* [93] beschrieben. Die Autoren zeigten, dass miRNA-26 zusammen mit der *carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide a small phosphatase family* (CTDSP) transkribiert wird. Eine physiologische Expression führt zu einer Inhibierung des Zellzyklus am G₁/S Mitosekontrollpunktes. Die Konzentration an miRNA-26 ist folglich in ruhenden Hepatozyten erhöht und in mitoseaktiven- sowie HCC-Zellen reduziert.

Die miRNA-26 beeinflusst darüber hinaus auch die Entstehung anderer in der Leber lokalisierter Tumoren. Zhang *et al.* fanden eine Überexpression von miRNA-26a in Cholangiokarzinomen (CCC) [92] und belegten ihre Bedeutung beim Tumorwachstum im Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Signaltransduktionsweg sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die bisher zur Verfügung stehenden Daten belegen eindeutig die Relevanz der miRNA-26 bei der Entstehung von Tumoren in der Leber und bei der Zellteilung und

Zellplastizität. Auch in der vorliegenden Arbeit unterschied sich die Expression der miRNA-26 zwischen dem HCC-Gewebe (T) und dem Zirrhosegewebe (sT, Ex). Da die Vertreter der miRNA-26-Familie gerade hier verstärkt exprimiert wurden, eignet sich die miRNA-26 möglicherweise nicht nur als diagnostisches Hilfsmittel zur Abgrenzung eines HCC von zirrhotischem Gewebe, sondern auch zur Differenzierung zwischen HCC und CCC. Zur Evaluation dieser Befunde ist vor allem noch die Aufklärung der regulatorischen Prozesse in beiden Tumorentitäten und ein direkter Vergleich der Expression der miRNA-26 in HCC, CCC sowie gesundem Lebergewebe erforderlich.

Bei der Entstehung von Karzinomen nimmt die Neoangiogenese als Grundlage für Wachstum, Metastasierung und Invasivität von Tumoren eine bedeutende Rolle ein. Auch die Neoangiogenese stellt daher ein potenzielles Ziel für eine Regulation durch miRNA dar. Bei der Entstehung des HCC spielen die Wachstumsfaktoren *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *fibroblast growth factor*-(FGF)-Signalmolekül eine große Rolle [94][95][96]. Shen *et al.* [97] zeigten an 23 HCC-Patienten, dass eine Expressionsänderung von miRNA-199a-5p mit der Invasivität von HCC-Tumoren korreliert. Mittels qRT-PCR wiesen die Autoren nach, dass die verminderte miRNA-199a-5p Expression zu einer Dysregulation der Aktivität des Discoidin domain receptor-1 (DDR1) führt. Der DDR1 ist eine Tyrosinkinase und an Signalwegen beteiligt, die die Zellmigration und das Zellwachstum regulieren. Die miRNA-199a-5p hat auch für andere chronische Lebererkrankungen eine signifikante Relevanz. Murakami *et al.*[98] untersuchten den Einfluss der miRNA-199a-5p auf die Hepatitis-C-Virus--induzierte Leberfibrose im Mausmodell und im humanen Lebergewebe. Sie zeigten eine Überexpression der miRNA-199a-5p in Kombination mit anderen miRNA (miRNA-199*, miRNA-199b, miRNA-200a und miRNA-200b) in verschiedenen Stadien der Leberfibrose. Das Ausmaß der Überexpression dieser miRNA korrelierte mit dem histopathologischen Grad der Leberfibrose.

In der vorliegenden Untersuchung der nutritiv toxischen Ätiologie von Leberzirrhose und HCC wurde eine Expressionsänderung der miRNA-199a-5p im Tumorgewebe (T) sowohl im Vergleich zum umgebenden Gewebe (sT) als auch zu Gewebe aus Patienten ohne HCC (Ex) festgestellt. Mit einer Abnahme der Expression um 146,54 % (T- vs. sT-Gewebe) beziehungsweise 146,12 % (T- vs. Ex-Gewebe) gehörte die miRNA-199a-5p zu den miRNA mit der stärksten Expressionsänderung. Damit ist die miRNA-199a-5p einer der interessantesten Kandidaten weitere Aspekte der Pathogenese des nutritiv toxischen Leberschadens auf zu decken. Insbesondere sollte ein möglicher Zusammenhang der miRNA-199a-5p-Expressionsänderung mit dem DDR1 und mit dem klinischen Verlauf

analysiert werden. Solche Untersuchungen könnten verifizieren, ob sich miRNA-199a-5p als Prognoseparameter beispielsweise für die Invasivität von HCC-Tumoren eignet. Zwischen den beiden Zirrhosegeweben (Ex vs. sT) trat in der vorliegenden Untersuchung kein Expressionsunterschied für miRNA-199a-5p auf.

Die anderen miRNA, die Murakami *et al.* [98] in ihrer Untersuchung als potenzielle Differenzierungsmarker für Zirrhosegewebe beschrieben, zeigten in der vorliegenden Studie keine Expressionsunterschiede.

Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen sind eine häufige Ursache für die Entstehung von HCC-Tumoren. Das von dem p53-Gen kodierte Protein ist maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Mutationen im p53-Gen führen zu einer ungehemmten Proliferation und fehlender Induktion apoptotischer Prozesse in den Zellen. P53-Genmutationen treten in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren auf (z. B. Nebennierenrindenzarzinom, Ösophaguskarzinom). Für eine p53-Mutation beim HCC mit nutritiv toxischer Ätiologie sind mehrere Mechanismen beschrieben. Dazu gehören die direkte mutagene Wirkung des Ethanol, aber auch die erhöhte Konzentration von Hydroxyl-Radikalen, die vermehrt durch die Hemmung intrazellulärer Systeme beim Abbau des Alkohols entstehen. In der Folge einer solchen Interaktion kommt es zur unmittelbaren Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden [13]. Acetaldehyd, ein Abbauprodukt des Ethanol, führt hier zu multiplen epigenetischen Modifikationen [99]. Es bildet mit der ϵ -Amino-Gruppe des Lysins oder der α -Amino-Gruppe der N-terminalen Aminosäuren einen Komplex und verändert dadurch die Proteinstrukturen von Histonen. Gleichzeitig bewirkt Acetaldehyd eine Hypermethylierung der DNA. Diese Mechanismen haben eine dysregulierte Expression des p53-Tumorsuppressorgenes zur Folge. In ähnlicher Weise können auch DNA-Abschnitte, die für miRNA kodieren, modifiziert werden.

Au *et al.*[100] konnten eine Kausalkette ausgehend von der toxischen Wirkung von Ethanolabbauprodukten über die Hypermethylierung von DNA und die Deacetylierung von Histonen bis hin zur Dysregulation der miRNA-125b- und miRNA-139-5p-Expression herstellen. Die Dysregulation der miRNA-125b- und miRNA-139-5p-Expression bewirkt über eine Modifikation der Expression des *polycomb repressive complex*, dessen bedeutendste Komponente das *enhancer of zeste homolog 2 protein* (EZH2) ist, eine Suppression der Sternzelldifferenzierung. Der *polycomb repressive complex* ist ein zentraler Akteur in der Karzinogenese des HCC und die Expression des EZH2-Proteins stellt einen Marker für die Progression dieser Tumoren dar.

Auch in der vorliegenden Untersuchung gehörten die miRNA-125b und miRNA-139-5p zu

den miRNA mit den größten Expressionsunterschieden zwischen Tumorgewebe (T) und der umgebenden Leberzirrhose (sT). Die Expression der miRNA-125b bzw. miRNA-139-5p lag im T-Gewebe um 159 % bzw. 140 % niedriger als im sT-Gewebe. Das war in der vorliegenden Untersuchung die drittgrößte Differenz zwischen den beiden Geweben. Der Expressionsunterschied zwischen T- und Ex-Gewebe betrug für beide miRNA mehr als 110 % (Ex > T). Noch unklar ist jedoch, ob neben dem EZH2-Protein noch weitere Proteine durch die beiden miRNA reguliert werden. Ebenso sollten die exakte Funktion des EZH2-Proteins im Pathomechanismus der Leberzirrhose und den Einfluss dieses Proteins und der miRNA auf die Transformation der benignen Leberzirrhose hin zum HCC-Gewebe aufgeklärt werden. Dieser Ansatz ist wiederum von besonderem Interesse, weil keine der beiden miRNA Expressionsunterschiede zwischen dem Ex- und dem sT-Gewebe erkennen ließen. Klinische Untersuchungen sollten darüber hinaus den Einfluss einer veränderten Expression des EZH2-Proteins auf das Überleben von HCC-Patienten und eine mögliche Anwendung des Proteins als Biomarker im klinischen Management klären.

Über die bereits beschriebenen Mechanismen hinaus werden noch weitere Auslöser für die Entstehung von HCC-Tumoren diskutiert. Dazu zählt die Induktion der chronischen Inflammationsreaktion durch das Zytokin Interleukin 6 im Rahmen von entzündlichen Prozessen. Im Kontext der HCC-Entstehung steht vor allem der Einfluss von Interleukin 6 auf die *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*-(STAT3)- und *TGF-β*-Signalwege im Fokus [101]. Die Rolle der miRNA in diesen zellulären Regulationskreisläufen ist aber noch unzureichend untersucht. Die hohe Relevanz der chronischen Entzündung sowohl bei der nutritiv toxischen Genese als auch bei anderen Ursachen der Leberzirrhose und des HCC machen die Dringlichkeit weiterführender Analysen zur dieser Thematik deutlich.

Mit der vorliegenden Untersuchung der miRNA-Profile im HCC-Gewebe und im zirrhotischen Lebergewebe sollten eventuelle Zusammenhänge zwischen der HCC-Entstehung und der miRNA-Expression aufgedeckt werden. Es wurden zahlreiche miRNA definiert die in dem Tumorgewebe im Vergleich zum zirrhotischen Gewebe differentiell exprimiert werden. Einige der identifizierten miRNA besitzen möglicherweise z. B. als Prognosefaktoren ein erhebliches klinisches Potenzial.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die miRNA-Expression des Tumorgewebes sowohl mit der von zirrhotischem Gewebe von HCC-Patienten (sT) als auch von zirrhotischem Gewebe von Patienten ohne HCC (Ex) verglichen. Dabei konnten elf miRNA (miRNA-199a-5p, miRNA-139-5p, miRNA-125b-5p, miRNA-130a-3p, miRNA-99a-5p, miRNA-101-3p, miRNA-497-5p, miRNA-26a-5p, miRNA-195-5p, miRNA-29c-3p, miRNA-378a-3p)

identifiziert werden, bei denen Expressionsunterschiede in beiden Auswertungen auftraten. Es wurden aber auch miRNA detektiert, die im Vergleich nur zu einer der beiden Kontrollgruppen (sT oder Ex) einen signifikanten Expressionsunterschied aufzeigten. Diese Befunden deuten auf einen Unterschied zwischen dem sT- und Ex-Gewebe hin. Um diesen Expressionsunterschied genauer zu analysieren wurden die zirrhotischen Gewebe von HCC- und Nicht-HCC-Patienten (Ex vs. sT) miteinander verglichen. Dabei zeigten elf miRNA (miRNA-1973, miRNA-3667-5p, SNORD3@, SNORD68, miRNA-3196, miRNA-3611, miRNA-PLUS-A1015, miRNA-32-3p, miRNA-423-5p, miRNA-3178) eine signifikante Expressionsdifferenz. Von diesen miRNA wurden bisher in der Literatur nur einige im Zusammenhang mit der Karzinogenese diskutiert. Beispielsweise nimmt die miRNA-423 durch die Regulation der Expression des CDK-*inhibitors* 1 (p21Cip1/Waf1) Einfluss auf das Wachstum von HCC Zellen [102]. Wu *et al.* identifizierten die miRNA-32-3p als Regulator für das Zellwachstum, die Zellmigration und die Apoptoserate bei kolorektalen Karzinomen [103]. In ihren Versuchen korrelierte die Expression der miRNA-32-3p mit dem Differenzierungsgrad des Kolonkarzinoms. Im vorliegenden Patientengut mit HCC-Tumoren auf dem Boden einer nutritiv-toxischen Leberzirrhose war die Expression von miRNA-32-3p im sT- im Vergleich zum Ex-Gewebe um 40 % erhöht.

Die Etablierung einer miRNA-basierten Stadieneinteilung der Leberzirrhose könnte in Zukunft die Beobachtung der klinischen Verläufe, die weitere Therapieplanung oder der Indikationsstellung zur Lebertransplantation verbessern.

Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung vieler miRNA, die in der vorliegenden Auswertung Expressionsunterschiede aufwiesen, ist noch weitgehend unbekannt. In einigen Fällen sind jedoch Proteine beschrieben, deren Expression durch diese miRNA reguliert werden. Mögliche Effektorproteine der miRNA-1973 sind F8A3 (*factor VII intron protein 22*), FGFR1 (*FGF receptor-like protein 1*) und GDAP1 (*gangliosid-induced differentiation-associated protein*) [104]. Durch die Regulation der Expression eines Bestandteils der FGF-Signalkaskade wird eine mögliche Verbindung zur Karzinogenese und Neoangiogenese des HCC hergestellt [94][95][96].

Mit *Small nuclear ribonucleic acid 3@* (SNORD3@) und SNORD68 konnten zwei RNAs mit Expressionsdifferenzen (Ex vs. sT) detektiert werden, deren Bedeutung bei chronischen Lebererkrankungen bekannt ist. Die beiden RNAs beeinflussen die Translation und Transkription von Proteinen, werden aber zur Gruppe der SNORD-RNAs gezählt [105][106]. Sie entfalten ihre Wirkung primär im Zellkern, wodurch sie sich von miRNA unterscheiden. Die Detektion von Expressionsdifferenzen bei SNORD-RNAs verdeutlicht die Komplexität

der Pathogenese chronischer Lebererkrankungen. Die Befunde eröffnen aber gleichzeitig neue diagnostische Möglichkeiten und Erklärungsansätze für das Verständnis der Leberzirrhose und des HCC.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich die miRNA-Profile der drei untersuchten Gewebetypen bei der nutritiv toxischen Ätiologie des Leberschadens signifikant unterscheiden. Dabei traten mehr Unterschiede zwischen dem Tumorgewebe (T) und den beiden zirrhotischen Geweben (sT und Ex) auf als zwischen sT und Ex. Die identifizierten miRNA mit Expressionsunterschieden liefern neue Ansatzpunkte für die Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Erkrankung.

Die Existenz abweichender miRNA-Profile in der tumorumgebenden Leberzirrhose und in der Leberzirrhose ohne HCC veranschaulicht den Unterscheid dieser beiden Gewebetypen. Die Veränderung der miRNA-Profile in den beiden zirrhotischen Geweben kann einen Beitrag zum Verständnis der Entstehung dieser Erkrankung leisten. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass ein HCC-Tumor möglicherweise auch das umgebende Lebergewebe beeinflusst. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Änderung im miRNA-Profil zwischen Ex- und sT-Gewebe eine Voraussetzung in der Entstehung des HCC darstellt und vor allem von prognostische Relevanz bezüglich der malignen Transformation sein kann. Die vorgelegten Beobachtungen tragen nicht nur zum Verständnis der Biologie des HCC und der Leberzirrhose bei, sondern wirken sich möglicherweise in Zukunft auch auf das therapeutische Management bis hin zur Indikationsstellung einer Lebertransplantation aus. So könnten Patienten mit einem radiologisch nicht diagnostizierbaren HCC oder Patienten mit einem hohen Risiko für ein HCC über ihr miRNA-Profil frühzeitig identifiziert werden und elektiv einer Lebertransplantation zugeführt werden. Zur Evaluation der klinischen Bedeutung der Befunde müssten die erhobenen miRNA-Profile im Kontext klinischer Parameter wie beispielsweise das Langzeitüberleben nach Organtransplantation analysiert werden. So konnten schon ähnliche Arbeiten den Einfluss genetischer Modifikationen auf das Langzeitüberleben von Patienten nach Lebertransplantation belegen. Dabei zeigten vor allem Jonas *et al.*, dass der DNA-Index, als Parameter des genetischen Polymorphismus, eine wichtige prognostische Relevanz bei Patienten mit HCC in Leberzirrhose haben kann [107]. Zur Bestätigung der gewonnenen Daten sollte eine Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR erfolgen. In Kombination mit der histopathologischen Untersuchung der vorhandenen Gewebeproben wäre die Schaffung einer miRNA-basierten Stadieneinteilung des chronischen Leberschadens möglich. Durch die weiterführende Analyse der Zielproteine der miRNA, die in der vorliegenden Analyse Expressionsunterschiede zeigten und durch die

Aufklärung von Regulationskreisläufen kann ein Beitrag zur HCC- und Leberzirrhoseentstehung bei einer nutritiv toxischen Ätiologie geleistet werden. Gleichzeitig sollte auch ein Vergleich der hier dargelegten miRNA-Profile mit gesundem Lebergewebe folgen, um eine umfassende Untersuchung beider Erkrankungen zu gewährleisten.

Bei weiterführenden Untersuchungen sollten einige Verbesserungen am Studiendesign vorgenommen werden. So sollte beispielsweise auf eine gleichmäßige Berücksichtigung aller Stadien der Leberzirrhose geachtet werden, um Verfälschungen der Ergebnisse durch eine Minderrepräsentation einzelner Patientengruppen vorzubeugen. Gleichzeitig lassen sich die verschiedenen Stadien anhand der miRNA-Profile vollständig nachverfolgen. Weiter sollte die Anzahl der HCC-Gewebeproben aus Patienten, die eine präoperative interventionelle Behandlung durchlaufen haben, reduziert werden, da ein Einfluss der Therapie auf das miRNA-Profil nicht auszuschließen ist.

Die vorgelegten Ergebnisse basieren ausschließlich auf der Analyse von Gewebeproben, die im Rahmen der Lebertransplantation entnommen wurden. Für die Etablierung einer Stadieneinteilung anhand des miRNA-Profils wäre eine weniger invasive Methode zu bevorzugen. In diesem Kontext wären Analysen von miRNA-Profilen im Serum sinnvoll. Einige Arbeiten haben sich bereits mit der Möglichkeit der Verwendung von miRNA aus Serum als Biomarker beschäftigt [108][109]. Auch bei solchen Analysen muss die Ätiologie der Erkrankung eindeutig bestimmt werden. Aktuell wurde noch keine Biomarker-Studie basierend auf Serum-miRNA in der Transplantationsmedizin veröffentlicht.

Die vorliegende Arbeit liefert einerseits einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Hintergründe des chronischen nutritiv toxischen Leberschadens und andererseits Ansatzpunkte zur Etablierung der miRNA-Diagnostik in der Klinik.

6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des medizinischen akademischen Grades **Dr. med.**

Titel: Spezifische MikroRNA-Profile als Biomarker zur Diagnose des hepatozellulären Karzinoms äthyltoxischer Genese in der Indikationsstellung zur Lebertransplantation

Eingereicht von: Philipp Felgendreff

Angefertigt an: Klinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Leipzig AöR

betreut durch: Professor Dr. med. Michael Bartels

November 2015

Die Inzidenz chronischer Lebererkrankungen und des hepatozellulären Karzinoms (HCC) mit nutritiv toxischer Genese hat in den vergangenen Jahren stetig zugenommen. Seit geraumer Zeit wird die Etablierung einer stadienadaptierten Therapie, die auf dem Verständnis des Pathomechanismus der Leberzirrhose und des HCC sowie auf patientenspezifischen Parametern basiert, gefordert. Die derzeit auf den Milan-Kriterien beruhende Indikationsstellung zur Lebertransplantation steht aufgrund der mangelnden Berücksichtigung der Biologie und Ätiologie der Erkrankung in der Kritik. Prinzipiell ist die gesamte primäre Diagnostik des HCC bei Patienten mit Leberzirrhose durch das Fehlen eines verlässlichen klinischen Biomarkers und der limitierten Sensitivität und Spezifität der etablierten Verfahren erschwert.

Ein neuartiger Ansatz zum Verständnis des Pathomechanismus dieser Erkrankungen sind MikroRNA-(miRNA)-Analysen. MiRNA können auf der Translationsebene die Synthese von Proteinen und damit zelluläre Prozesse steuern. Die Analyse von miRNA-Profilen bei

Lebererkrankungen viraler Ätiologie ergab vielversprechende Ansätze für die klinische Verwendung. Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals die miRNA-Profile bei Lebererkrankungen mit nutritiv toxischer Ätiologie.

Hierfür wurden zwischen dem 01.05.2011 und dem 31.12.2012 in den Transplantationszentren der Charité Berlin und des Universitätsklinikums Leipzig 189 Patienten, bei denen eine Lebertransplantation durchgeführt wurde, untersucht. Hiervon zeigten 93 Patienten eine nutritiv toxische Genese des Leberschadens. Bei 59 Patienten konnte eine äthyltoxische Leberzirrhose ohne HCC (Gruppe A) und bei 34 Patienten ein HCC auf dem Boden einer äthyltoxischen Leberzirrhose (Gruppe B) nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der miRNA-Profile bei nutritiv toxischer Leberzirrhose mit und ohne HCC wurden 16 Patienten der Gruppe A und 14 Patienten der Gruppe B ausgewählt. Von diesen 30 Patienten wurden folgende Gewebeproben aus der explantierten Leber entnommen: Ex = Leberprobe Gruppe A (n=16), T = Tumorgewebeprobe Gruppe B (n=7); sT = Probe aus dem kontralateral zum HCC-Tumor gelegenen Leberlappen Gruppe B (n=14). Die Untersuchung der klinischen Parameter ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied in den laboranalytischen Parametern und dem präoperativen Lab-MELD beider Untersuchungsgruppen. Jedoch waren die Patienten der Gruppe A signifikant jünger als die Patienten der Gruppe B ($p = 0,029$).

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den Probegeweben wurden vier Methoden (zwei Trizol[®]-basierte Ansätze und zwei miRNeasy mini Kit[®]-basierte Ansätze) evaluiert. An Hand von qualitativen und quantitativen Markern konnte gezeigt werden, dass die Trizol-Methode mit einmaligem Einsatz des Ultraturax für die Aufreinigung der Gesamt-RNA am geeignetsten ist. Basierend auf den Ergebnissen wurde zur Extraktion der RNA beider Untersuchungsgruppen die Trizol[®]-Methode verwendet und die Konzentration mittels NanoDrop[™] Spectrophotometer ND-1000 bestimmt. Die miRNA-Analyse erfolgte im Anschluss mit Hilfe des miRCURY LNA Arrays (6. und 7. Generation) und des Agilent G2565BA Microarray Scanner Systems. Bei der miRNA-Analyse zeigten 40 miRNA im Vergleich zwischen T- und sT-Gewebe signifikante Unterschiede. Davon waren nur zwei miRNA (miRNA-585 und miRNA-638) im T-Gewebe stärker exprimiert als im sT-Gewebe. 29 miRNA zeigten signifikante Expressionsunterschiede zwischen T- und Ex-Gewebe, 56 miRNA zwischen Ex- und sT-Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde damit erstmals die Expression von miRNA bei der nutritiv toxischen Leberzirrhose mit und ohne HCC in zwei vergleichbaren Patientenpopulationen dargestellt. Hierdurch kann möglicherweise ein Beitrag zur krankheitsspezifischen Risikoabschätzung für die Entstehung eines HCC bei Patienten

mit Leberzirrhose geleistet werden. Auch eine Optimierung vorhandener Therapieregime bei der Leberzirrhose und dem HCC ist denkbar.

Die Expressionsänderungen zwischen Ex- und sT-Gewebe sind von besonderem Interesse, da sie einen neuen Betrachtungsansatz zur Progredienz der chronischen Lebererkrankung hin zum HCC andeuten. Die unterschiedlichen miRNA-Profile vor allem zwischen Ex- und sT-Gewebe weisen darauf hin, dass das HCC als eine Erkrankung der gesamten Leber verstanden werden kann. Diese Erkenntnisse haben nicht nur großes diagnostisches Potenzial, sondern können auch eine Entscheidungshilfe bei der patienten- und krankheitsspezifischen Therapieplanung bis hin zur Indikationsstellung zur Lebertransplantation darstellen und zur optimalen Nutzung vorhandener Ressourcen beitragen.

7 Quellenverzeichnis

- [1] G. Aumüller, G. Aust, and A. Doll, “Duale Reihe: Anatomie,” in *Georg Thieme Verlag*, 2. Auflage., 2007, pp. 726–732.
- [2] H. Lippert, *Lehrbuch Anatomie*, 7. Auflage ed. Urban & Fischer Verlag, 2003, pp. 320–323.
- [3] P. Rother and D. Wendler, *Embryologie des Menschen*, 5. Auflage. Verlag wissenschaftliche Skripte, 2003, p. 49.
- [4] C. Couinaud, *Le foie: études anatomiques et chirurgicales*. Masson & Cie, 1957.
- [5] K.-H. Deeg, V. Hofmann, and P. F. Hoyer, *Ultraschalldiagnostik in Pädiatrie und Kinderchirurgie: Lehrbuch und Atlas*, 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2005, p. 243.
- [6] D. Drenckhahn and A. Benninghoff, *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.*, 16. Auflag. Urban & Fischer Verlag, 2003, pp. 699–702.
- [7] Z. Li, J. Chen, L. Li, J. H. Ran, J. Liu, T. X. Gao, B. Y. Guo, X. H. Li, Z. H. Liu, G. J. Liu, Y. C. Gao, and X. L. Zhang, “In vitro proliferation and differentiation of hepatic oval cells and their potential capacity for intrahepatic transplantation.,” *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 46, no. 8, pp. 681–8, Aug. 2013.
- [8] R. F. Schmidt, F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Springer Verlag, 2007.
- [9] P. C. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage. Springer Verlag, 1997, pp. 724–725.
- [10] F. e. V., *Alkohol- kein Nutzen ohne Risiko*, 7. Auflage. Grin Verlag GmbH, 2013, p. 3.
- [11] J. F. Riemann, W. Fischbach, P. R. Galle, and J. Mössner, *Gastroenterologie: Das komplette Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Georg Thieme Verlag, 2008, pp. 1284–1297.
- [12] W. Böcker, H. Denk, P. U. Heutz, and H. Moch, *Pathologie*, 5. Auflage. Urban & Fischer Verlag, 2012, pp. 803–805.
- [13] I. H. McKillop and L. W. Schrum, “Role of alcohol in liver carcinogenesis.,” *Semin. Liver Dis.*, vol. 29, no. 2, pp. 222–32, May 2009.
- [14] U.-N. Rieder and H.-E. Schaefer, *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2004, p. 789.
- [15] P. Ginés, E. Quintero, V. Arroyo, J. Terés, M. Bruguera, A. Rimola, J. Caballería, J. Rodés, and C. Rozman, “Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors.,” *Hepatology*, vol. 7, no. 1, pp. 122–8, 1987.

- [16] R. Planas, S. Montoliu, B. Ballesté, M. Rivera, M. Miquel, H. Masnou, J. A. Galeras, M. D. Giménez, J. Santos, I. Cirera, R. M. Morillas, S. Coll, and R. Solà, “Natural history of patients hospitalized for management of cirrhotic ascites.,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1385–94, Nov. 2006.
- [17] C. G. Child and J. G. Turcotte, “Surgery and portal hypertension.,” *Major Probl. Clin. Surg.*, vol. 1, pp. 1–85, Jan. 1964.
- [18] R. N. Pugh, I. M. Murray-Lyon, J. L. Dawson, M. C. Pietroni, and R. Williams, “Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices.,” *Br. J. Surg.*, vol. 60, no. 8, pp. 646–9, Aug. 1973.
- [19] A. Propst, T. Propst, G. Zangerl, D. Ofner, G. Judmaier, and W. Vogel, “Prognosis and life expectancy in chronic liver disease.,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 40, no. 8, pp. 1805–15, Aug. 1995.
- [20] M. Malinchoc, P. S. Kamath, F. D. Gordon, C. J. Peine, J. Rank, and P. C. ter Borg, “A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts.,” *Hepatology*, vol. 31, no. 4, pp. 864–71, Apr. 2000.
- [21] “WHO | The global burden of disease: 2004 update.”
- [22] H. Nordenstedt, D. L. White, and H. B. El-Serag, “The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma.,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 42 Suppl 3, pp. S206–14, Jul. 2010.
- [23] A.-I. Gooma, S.-A. Khan, M.-B. Toledano, I. Waked, and S.-D. Taylor-Robinson, “Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis.,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, no. 27, pp. 4300–8, Jul. 2008.
- [24] M. Sherman, “Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis.,” *Semin. Liver Dis.*, vol. 30, no. 1, pp. 3–16, Feb. 2010.
- [25] A. Zidan, H. Scheuerlein, S. Schüle, U. Settmacher, and F. Rauchfuss, “Epidemiological pattern of hepatitis B and hepatitis C as etiological agents for hepatocellular carcinoma in iran and worldwide.,” *Hepat. Mon.*, vol. 12, no. 10 HCC, p. e6894, Oct. 2012.
- [26] G. Kirchner, G. Kirovski, A. Hebestreit, J. Schölmerich, H. J. Schlitt, O. Stoeltzing, and C. Hellerbrand, “Epidemiology and survival of patients with hepatocellular carcinoma in Southern Germany.,” *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 169–79, Jan. 2010.
- [27] S. S. Lee, H. S. Shin, H. J. Kim, S. J. Lee, H. S. Lee, K. H. Hyun, Y. H. Kim, B. W. Kwon, J. H. Han, H. Choi, B. H. Kim, J. H. Lee, H. Y. Kang, H. D. Shin, and I. H. Song, “Analysis of prognostic factors and 5-year survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a single-center experience.,” *Korean J. Hepatol.*, vol. 18, no. 1, pp. 48–55, Mar. 2012.

- [28] N. P. Malek, S. Schmidt, P. Huber, M. P. Manns, and T. F. Greten, "The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 111, no. 7, pp. 101–6, Feb. 2014.
- [29] J.-G. Chen, D. M. Parkin, Q.-G. Chen, J.-H. Lu, Q.-J. Shen, B.-C. Zhang, and Y.-R. Zhu, "Screening for liver cancer: results of a randomised controlled trial in Qidong, China.," *J. Med. Screen.*, vol. 10, no. 4, pp. 204–9, Jan. 2003.
- [30] L. Bolondi, "Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis," *J. Hepatol.*, vol. 39, no. 6, pp. 1076–1084, Dec. 2003.
- [31] K. Okuda, T. Ohtsuki, H. Obata, M. Tomimatsu, N. Okazaki, H. Hasegawa, Y. Nakajima, and K. Ohnishi, "Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients.," *Cancer*, vol. 56, no. 4, pp. 918–28, Aug. 1985.
- [32] L. H. Sobin and C. C. Compton, "TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer.," *Cancer*, vol. 116, no. 22, pp. 5336–9, Nov. 2010.
- [33] J. W. Marsh, I. Dvorchik, C. A. Bonham, and S. Iwatsuki, "Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome?," *Cancer*, vol. 88, no. 3, pp. 538–43, Feb. 2000.
- [34] J. M. Llovet, C. Brú, and J. Bruix, "Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification.," *Semin. Liver Dis.*, vol. 19, no. 3, pp. 329–38, Jan. 1999.
- [35] J. B. Sørensen, M. Klee, T. Palshof, and H. H. Hansen, "Performance status assessment in cancer patients. An inter-observer variability study.," *Br. J. Cancer*, vol. 67, no. 4, pp. 773–5, Apr. 1993.
- [36] J. M. Llovet, A. Burroughs, and J. Bruix, "Hepatocellular carcinoma.," *Lancet*, vol. 362, no. 9399, pp. 1907–17, Dec. 2003.
- [37] J. M. Llovet, A. M. Di Bisceglie, J. Bruix, B. S. Kramer, R. Lencioni, A. X. Zhu, M. Sherman, M. Schwartz, M. Lotze, J. Talwalkar, and G. J. Gores, "Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 100, no. 10, pp. 698–711, May 2008.
- [38] S. Chevret, J. C. Trinchet, D. Mathieu, A. A. Rached, M. Beaugrand, and C. Chastang, "A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire.," *J. Hepatol.*, vol. 31, no. 1, pp. 133–41, Jul. 1999.
- [39] T. W. T. Leung, A. M. Y. Tang, B. Zee, W. Y. Lau, P. B. S. Lai, K. L. Leung, J. T. F. Lau, S. C. H. Yu, and P. J. Johnson, "Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients.," *Cancer*, vol. 94, no. 6, pp. 1760–9, Mar. 2002.

- [40] “Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators.” *Hepatology*, vol. 31, no. 4, pp. 840–5, Apr. 2000.
- [41] S. Waly Raphael, Z. Yangde, and C. Yuxiang, “Hepatocellular carcinoma: focus on different aspects of management.” *ISRN Oncol.*, vol. 2012, p. 421673, Jan. 2012.
- [42] Y. Sirivatanauksorn and C. Tovikkai, “Comparison of staging systems of hepatocellular carcinoma.” *HPB Surg.*, vol. 2011, p. 818217, Jan. 2011.
- [43] H.-P. Bruch and O. Trentz, *Berchold: Chirurgie*, 6. Auflage. Urban & Fischer Verlag, 2008, pp. 301–304.
- [44] B. Bundesärztekammer, “Bundesärztekammer - Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG.” BÄK Bundesärztekammer, 21-Feb-2014.
- [45] J. H. Schlitt and S. A. Farkas, “HCC und Lebertransplantation,” *HepNet J.*, no. 1, pp. 6–7, 2011.
- [46] H. Schmidt, “Eine faire Chance für jeden,” *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 104, no. August, p. 2324, 2007.
- [47] A. Pascher, M. Nebrig, and P. Neuhaus, “Irreversible liver failure: treatment by transplantation: part 3 of a series on liver cirrhosis.” *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 110, no. 10, pp. 167–73, Mar. 2013.
- [48] H. J. Schlitt, M. Loss, M. N. Scherer, T. Becker, K.-W. Jauch, B. Nashan, H. Schmidt, U. Settmacher, X. Rogiers, P. Neuhaus, and C. Strassburg, “[Current developments in liver transplantation in Germany: MELD-based organ allocation and incentives for transplant centres].” *Z. Gastroenterol.*, vol. 49, no. 1, pp. 30–8, Jan. 2011.
- [49] T. J. Weismüller, A. Negm, T. Becker, H. Barg-Hock, J. Klempnauer, M. P. Manns, and C. P. Strassburg, “The introduction of MELD-based organ allocation impacts 3-month survival after liver transplantation by influencing pretransplant patient characteristics.” *Transpl. Int.*, vol. 22, no. 10, pp. 970–8, Oct. 2009.
- [50] V. Mazzaferro, E. Regalia, R. Doci, S. Andreola, A. Pulvirenti, F. Bozzetti, F. Montalto, M. Ammatuna, A. Morabito, and L. Gennari, “Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis.” *N. Engl. J. Med.*, vol. 334, no. 11, pp. 693–9, Mar. 1996.
- [51] F. Y. Yao, L. Ferrell, N. M. Bass, J. J. Watson, P. Bacchetti, A. Venook, N. L. Ascher, and J. P. Roberts, “Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival.” *Hepatology*, vol. 33, no. 6, pp. 1394–403, Jun. 2001.
- [52] V. Mazzaferro, J. M. Llovet, R. Miceli, S. Bhoori, M. Schiavo, L. Mariani, T. Camerini, S. Roayaie, M. E. Schwartz, G. L. Grazi, R. Adam, P. Neuhaus, M. Salizzoni, J. Bruix, A. Forner, L. De Carlis, U. Cillo, A. K. Burroughs, R. Troisi, M.

- Rossi, G. E. Gerunda, J. Lerut, J. Belghiti, I. Boin, J. Gugenheim, F. Rochling, B. Van Hoek, and P. Majno, "Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis.," *Lancet Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2009.
- [53] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–54, Dec. 1993.
- [54] B. P. Lewis, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.," *Cell*, vol. 120, no. 1, pp. 15–20, Jan. 2005.
- [55] I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, and Z. Bentwich, "Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs.," *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 7, pp. 766–70, Jul. 2005.
- [56] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim, "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.," *EMBO J.*, vol. 23, no. 20, pp. 4051–60, Oct. 2004.
- [57] M. Faller and F. Guo, "MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1779, no. 11, pp. 663–7, Nov. 2008.
- [58] J. I. Henke, D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schüttler, C. Fehr, C. Jünemann, and M. Niepmann, "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA.," *EMBO J.*, vol. 27, no. 24, pp. 3300–10, Dec. 2008.
- [59] M. Ul Hussain, "Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action.," *Cell Tissue Res.*, vol. 349, no. 2, pp. 405–13, Aug. 2012.
- [60] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce, "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 24, pp. 15524–9, Nov. 2002.
- [61] W.-C. Zhang, J. Liu, X. Xu, and G. Wang, "The role of microRNAs in lung cancer progression.," *Med. Oncol.*, vol. 30, no. 3, p. 675, Jan. 2013.
- [62] L. Mulrane, S. F. McGee, W. M. Gallagher, and D. P. O'Connor, "miRNA dysregulation in breast cancer.," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 22, pp. 6554–62, Nov. 2013.
- [63] W. T. Kim and W.-J. Kim, "MicroRNAs in prostate cancer.," *Prostate Int.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–9, Jan. 2013.
- [64] Y. Murakami, T. Yasuda, K. Saigo, T. Urashima, H. Toyoda, T. Okanoue, and K. Shimotohno, "Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in

- hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues.,” *Oncogene*, vol. 25, no. 17, pp. 2537–45, Apr. 2006.
- [65] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs, “Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 228–34, Mar. 2009.
- [66] P. Chomczynski and N. Sacchi, “Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.,” *Anal. Biochem.*, vol. 162, no. 1, pp. 156–9, Apr. 1987.
- [67] A. Technologies, *miRNeasy Mini Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies*, no. March. 2013.
- [68] T. F. Scientific, “NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3 . 7 User ’ s Manual,” 2008.
- [69] C. Becker, I. Riedmaier, and M. W. Pfaffl, “RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik,” *Biospektrum*, vol. 15, pp. 512–515, 2009.
- [70] O. Mueller and A. Schroeder, “RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application,” *Agil. Technol.*, no. 5989–1165 EN, 2004.
- [71] A. Schroeder, O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow, and T. Ragg, “The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.,” *BMC Mol. Biol.*, vol. 7, p. 3, Jan. 2006.
- [72] Exiqon, “miRCURY LNA TM microRNA Array Power Labeling kit,” 2011.
- [73] Exiqon, “Locked Nucleic Acid (LNA TM)- Custom Oligonucleotides fpr RNA and DNA Research,” no. August, 2009.
- [74] J. S. Sangha, K. Gu, J. Kaur, and Z. Yin, “An improved method for RNA isolation and cDNA library construction from immature seeds of *Jatropha curcas* L.,” *BMC Res. Notes*, vol. 3, no. 1, p. 126, Jan. 2010.
- [75] S. Eminaga, D. C. Christodoulou, F. Vigneault, G. M. Church, and J. G. Seidman, “Quantification of microRNA expression with next-generation sequencing.,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. Chapter 4, p. Unit 4.17, Jul. 2013.
- [76] L. Zender, A. Villanueva, V. Tovar, D. Sia, D. Y. Chiang, and J. M. Llovet, “Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma.,” *J. Hepatol.*, vol. 52, no. 6, pp. 921–9, Jun. 2010.
- [77] K. Nakanishi, M. Sakamoto, S. Yamasaki, S. Todo, and S. Hirohashi, “Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.,” *Cancer*, vol. 103, no. 2, pp. 307–12, Jan. 2005.

- [78] G. Sui, X. Ma, S. Liu, H. Niu, and Q. Dong, “Study of the correlation between H-ras mutation and primary hepatocellular carcinoma.,” *Oncol. Lett.*, vol. 4, no. 4, pp. 779–782, Oct. 2012.
- [79] S. Cairo, Y. Wang, A. de Reyniès, K. Duroure, J. Dahan, M.-J. Redon, M. Fabre, M. McClelland, X. W. Wang, C. M. Croce, and M.-A. Buendia, “Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 47, pp. 20471–6, Nov. 2010.
- [80] S. M. Johnson, H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, and F. J. Slack, “RAS is regulated by the let-7 microRNA family.,” *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 635–47, Mar. 2005.
- [81] M. Furuta, K. Kozaki, K. Tanimoto, S. Tanaka, S. Arii, T. Shimamura, A. Niida, S. Miyano, and J. Inazawa, “The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e60155, Jan. 2013.
- [82] J. Bai, A. Guo, Z. Hong, and W. Kuai, “Upregulation of microRNA-100 predicts poor prognosis in patients with pediatric acute myeloid leukemia.,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 5, pp. 213–9, Jan. 2012.
- [83] L. Huang, J.-X. Lin, Y.-H. Yu, M.-Y. Zhang, H.-Y. Wang, and M. Zheng, “Downregulation of six microRNAs is associated with advanced stage, lymph node metastasis and poor prognosis in small cell carcinoma of the cervix.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33762, Jan. 2012.
- [84] N. Dahiya, C. A. Sherman-Baust, T.-L. Wang, B. Davidson, I.-M. Shih, Y. Zhang, W. Wood, K. G. Becker, and P. J. Morin, “MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer.,” *PLoS One*, vol. 3, no. 6, p. e2436, Jan. 2008.
- [85] D.-X. Peng, M. Luo, L.-W. Qiu, Y.-L. He, and X.-F. Wang, “Prognostic implications of microRNA-100 and its functional roles in human epithelial ovarian cancer.,” *Oncol. Rep.*, vol. 27, no. 4, pp. 1238–44, Apr. 2012.
- [86] J. Takamizawa, H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, and T. Takahashi, “Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival.,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 11, pp. 3753–6, Jun. 2004.
- [87] L. F. Sempere, M. Christensen, A. Silahatoglu, M. Bak, C. V Heath, G. Schwartz, W. Wells, S. Kauppinen, and C. N. Cole, “Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer.,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 11612–20, Dec. 2007.
- [88] J. Torrisani, B. Bournet, M. C. du Rieu, M. Bouisson, A. Souque, J. Escourrou, L. Buscail, and P. Cordelier, “let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells

- inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression.,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 20, no. 8, pp. 831–44, Aug. 2009.
- [89] C. D. Johnson, A. Esquela-Kerscher, G. Stefani, M. Byrom, K. Kelnar, D. Ovcharenko, M. Wilson, X. Wang, J. Shelton, J. Shingara, L. Chin, D. Brown, and F. J. Slack, “The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 16, pp. 7713–22, Aug. 2007.
- [90] X.-M. Zhu, L.-J. Wu, J. Xu, R. Yang, and F.-S. Wu, “Let-7c microRNA expression and clinical significance in hepatocellular carcinoma,” *J. Int. Med. Res.*, vol. 39, no. 6, pp. 2323–9, Jan. 2011.
- [91] X. Wang, X. Meng, X. Sun, M. Liu, S. Gao, J. Zhao, F. Pei, and H. Yu, “Wnt/beta-catenin signaling pathway may regulate cell cycle and expression of cyclin A and cyclin E protein in hepatocellular carcinoma cells,” *Cell Cycle*, vol. 8, no. 10, pp. 1567–70, May 2009.
- [92] J. Zhang, C. Han, and T. Wu, “MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin,” *Gastroenterology*, vol. 143, no. 1, pp. 246–56.e8, Jul. 2012.
- [93] Y. Zhu, Y. Lu, Q. Zhang, J.-J. Liu, T.-J. Li, J.-R. Yang, C. Zeng, and S.-M. Zhuang, “MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 10, pp. 4615–25, May 2012.
- [94] S. H. Kwon, S. W. Jeong, J. Y. Jang, J. E. Lee, S. H. Lee, S. G. Kim, Y. S. Kim, Y. D. Cho, H. S. Kim, B. S. Kim, and S.-Y. Jin, “Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma,” *Clin. Mol. Hepatol.*, vol. 18, no. 3, pp. 287–94, Sep. 2012.
- [95] Z. Xiang, Z. Zeng, Z. Tang, J. Fan, H. Sun, W. Wu, and Y. Tan, “Increased expression of vascular endothelial growth factor-C and nuclear CXCR4 in hepatocellular carcinoma is correlated with lymph node metastasis and poor outcome,” *Cancer J.*, vol. 15, no. 6, pp. 519–25.
- [96] S. Miura, N. Mitsuhashi, H. Shimizu, F. Kimura, H. Yoshidome, M. Otsuka, A. Kato, T. Shida, D. Okamura, and M. Miyazaki, “Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma,” *BMC Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 56, Jan. 2012.
- [97] Q. Shen, V. R. Cicinnati, X. Zhang, S. Iacob, F. Weber, G. C. Sotiropoulos, A. Radtke, M. Lu, A. Paul, G. Gerken, and S. Beckebaum, “Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion,” *Mol. Cancer*, vol. 9, p. 227, Jan. 2010.
- [98] Y. Murakami, H. Toyoda, M. Tanaka, M. Kuroda, Y. Harada, F. Matsuda, A. Tajima, N. Kosaka, T. Ochiya, and K. Shimotohno, “The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16081, Jan. 2011.

- [99] N. Kotova, D. Vare, N. Schultz, D. Gradecka Meesters, M. Stepnik, J. Grawé, T. Helleday, and D. Jenssen, “Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair.,” *Carcinogenesis*, vol. 34, no. 2, pp. 325–30, Feb. 2013.
- [100] S. L.-K. Au, C. C.-L. Wong, J. M.-F. Lee, D. N.-Y. Fan, F. H. Tsang, I. O.-L. Ng, and C.-M. Wong, “Enhancer of zeste homolog 2 epigenetically silences multiple tumor suppressor microRNAs to promote liver cancer metastasis.,” *Hepatology*, vol. 56, no. 2, pp. 622–31, Aug. 2012.
- [101] L. Lin, R. Amin, G. I. Gallicano, E. Glasgow, W. Jogunoori, J. M. Jessup, M. Zasloff, J. L. Marshall, K. Shetty, L. Johnson, L. Mishra, and A. R. He, “The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF-beta signaling.,” *Oncogene*, vol. 28, no. 7, pp. 961–72, Mar. 2009.
- [102] J. Lin, S. Huang, S. Wu, J. Ding, Y. Zhao, L. Liang, Q. Tian, R. Zha, R. Zhan, and X. He, “MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma.,” *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 11, pp. 1641–7, Nov. 2011.
- [103] W. Wu, J. Yang, X. Feng, H. Wang, S. Ye, P. Yang, W. Tan, G. Wei, and Y. Zhou, “MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells.,” *Mol. Cancer*, vol. 12, p. 30, Jan. 2013.
- [104] “http://diana.cslab.ece.ntua.gr/micro-CDS/index.php?r=search/results_mature&mir=hsa-miR-1973&kwd=MIMAT0009448.”
- [105] D. Kressler, E. Hurt, and J. Bassler, “Driving ribosome assembly.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1803, no. 6, pp. 673–83, Jun. 2010.
- [106] S. L. Reichow, T. Hamma, A. R. Ferré-D’Amaré, and G. Varani, “The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 5, pp. 1452–64, Jan. 2007.
- [107] S. Jonas, H. Al-Abadi, C. Benckert, a Thelen, M. Hippler-Benscheid, K. Saribeyoglu, B. Radtke, J. Pratschke, and P. Neuhaus, “Prognostic significance of the DNA-index in liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis,” *Ann. Surg.*, 2009.
- [108] W. Ge, D.-C. Yu, Q.-G. Li, X. Chen, C.-Y. Zhang, and Y.-T. Ding, “Expression of serum miR-16, let-7f, and miR-21 in patients with hepatocellular carcinoma and their clinical significances.,” *Clin. Lab.*, vol. 60, no. 3, pp. 427–34, Jan. 2014.
- [109] Y. Fu, X. Wei, C. Tang, J. Li, R. Liu, A. Shen, and Z. Wu, “Circulating microRNA-101 as a potential biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma.,” *Oncol. Lett.*, vol. 6, no. 6, pp. 1811–1815, Dec. 2013.

8 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 20.11.2015

(Philipp Felgendreff)

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsverzeichnis

The 24th International Congress of the Transplantation Society

Vortrag: “microRNA as biomarker of diagnosis and prediction of recurrence of human hepatocellular carcinoma after liver transplantation – preliminary results from a multicenter database”

(M. H. Morgül, N. Raschzok, P. Felgendreff, C. Dietel, R. Schmuck, H. M. Hau, A. Thelen, C. Benckert, A. Reutzel-Selke, P. Neuhaus, I. Sauer, S. Jonas)

23rd European Students Conference

Poster: “Detection of specific microRNA profiles as biomarkers for diagnosis and prediction for hepatocellular carcinoma in liver transplantation”

(P. Felgendreff, M. H. Morgül, N. Raschzok, C. Dietel, R. Schmuck, A. Beeskow, A. Thelen, C. Benckert, A. Reutzel-Selke, I. M. Sauer, S. Jonas)

Poster: “Establishment a novel method for identifying microRNA of human cholangiocytes in hepatic tissue using laser capture micro dissection”

(A. Beeskow, M. H. Morgül, N. Raschzok, P. Felgendreff, C. Dietel, U. Schmiedek, M. Fügenschuh, A. Reutzel-Selke, I. M. Sauer, A. Thelen, S. Jonas)

4th International Conference on Transplantomics and Biomarkers in Organ Transplantation

Poster: “Tissue-based specific microRNAs in the development of hepatocellular carcinoma in case of alcohol induced cirrhosis in humans”

(M. H. Morgül, N. Raschzok, P. Felgendreff, C. Dietel, K. Kunze, H. M. Hau, R. Schmuck, A. Reutzel-Selke, M. Bartels, I. Sauer, S. Jonas)

12th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2013

Poster: “Detection of specific microRNA-profiles as biomarker for diagnosis and prediction of hepatocellular carcinoma in liver transplantation caused by alcoholic liver disease”

(K. Kunze , P. Felgendreff , C. Dietel, A. Faroch, S. Klunk, C. Leonhardt, A. Beeskow, R. Schmuck, A. Reutzel-Selke, N. Raschzok, M. H. Morgül, M. Bartels)

Poster: “Detection of specific microRNA profiles as biomarkers for diagnosis and prediction for hepatocellular carcinoma caused by virus infection in liver transplantation”

(S. Klunk, A. Faroch, C. Dietel, K. Kunze, P. Felgendreff, C. Leonhardt, A. Beeskow, R. Schmuck, A. Reutzel-Selke, N. Raschzok, M. H. Morgül, M. Bartels)

Poster: “Identification of tissue specific miRNA in liver samples using laser capture micro dissection and qPCR”

(A. Beeskow, C. Dietel, M. Fügenschuh, P. Felgendreff, A. Faroch, K. Kunze, S. Klunk, C. Leonhardt, A. Reutzel-Selke, N. Raschzok, M. H. Morgül, M. Bartels)

11 Danksagung

Mein größter Dank geht an meinen Mitbetreuer Dr. med. Haluk Morgül, der mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat dieses Thema zu bearbeiten, sondern auch meinem Horizont als Mediziner und Mensch neue Grenzen aufgezeigt hat. Er faszinierte mich für die Forschung und weckte in mir den Drang, bestehende Grenzen zu hinterfragen und über sie hinaus zu schauen.

Weiterhin möchte ich Dr. Corinna Dietel und Ulrike Schmiedek danken. Sie unterstützen mich vor allem bei der Arbeit im Labor. Sie halfen mir aber nicht nur die Methoden zu etablieren, sondern waren über die ganze Zeit auch eine wichtige moralische Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Bartels bedanken. Er unterstützte mich nicht nur bei der Forschung, sondern gab mir auch die Möglichkeit, erste Erfahrungen in der Viszeral- und Transplantationschirurgie zu sammeln.

Weiterhin möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe „Experimentelle Chirurgie“ der Charité, Berlin, bedanken. Im Besonderen bei Dr. med. Nathanael Raschok und Dr. med. Rosa Schmuck. Sie führten die Studie parallel in Berlin durch und waren immer verlässliche Partner.

Ich danke auch Mathias Heller, Laura Teschner, Dorothea Weinert, Simone Hausmann, Jerome Braun, Kerstin Kunze, Agrin Faroch und Sergej Klunk. Diese Menschen haben mich auf dem langen Weg der Dissertation immer unterstützt und meine Arbeit getragen.