

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wilko Weichert)

Molekulare Analyse präanalytischer Fluktuationen deregulierter Proteine und Phosphoproteine im humanen hepatozellulären Karzinom

Kai Tran

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

- 1. apl. Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker
- 2. Prof. Dr. Wilko Weichert

Die Dissertation wurde am 11.08.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.03.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abk	Abkürzungsverzeichnis5		
2.	Ein	leitur	ng	8
2	2.1.	Bioi	marker in der personalisierten Medizin	8
2	2.2.	Einf	fluss der Präanalytik auf die Gewebeprobenqualität für Diagnose und Thera	apie9
2	2.3.	Das	hepatozelluläre Karzinom	13
	2.3.	1.	Epidemiologie und Ätiologie	13
	2.3.	2.	Pathologie und Klassifikation	14
	2.3.	3.	Klinik, Diagnostik und Verlauf	17
	2.3.	4.	Molekulare und genetische Alterationen	18
	2	.3.4.1	1. Humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren	19
	2	.3.4.2	2. HGF/MET Signalweg	20
	2	.3.4.3	3. IGF Signalweg	20
	2	.3.4.4	4. PI3K/AKT Signalweg	21
	2	.3.4.5	5. MAPK Signalweg	21
	2	.3.4.6	6. Wingless/ß-Catenin Signalweg	21
	2	.3.4.7	7. TGF-ß Signalweg	22
	2	.3.4.8	3. Angiogenese	22
	2.3.	5.	Multimodale Therapiekonzepte	23
	2	.3.5.1	1. Kurative Strategien	23
	2	.3.5.2	2. Palliative Strategien	24
2	2.4.	Ziel	e der Arbeit	26
3.	Mat	terial	und Methoden	27
3	3.1.	Mat	erial	27
	3.1.	1.	Allgemeine Puffer und Lösungen	27
	3	.1.1.1	1. Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese	27
	3	.1.1.2	2. Lösungen für die Immundetektion	28
	3.1.	2.	Allgemeine Reagenzien und Materialien	28
	3	.1.2.1	1. Chemikalien	28
	3	.1.2.2	2. Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen	29
	3	.1.2.3	3. Verbrauchsmaterial	30
	3.1.	3.	Antikörper	31
	3.1.	4.	Gewebeproben	33
	3.1.	.5.	Geräte	36

	3.1.6.	Software	37
3	.2. Me	thodenthoden	37
	3.2.1.	Gewebeprozessierung und Ischämiezeiten	37
	3.2.2.	Herstellung von FFPE-Gewebeblöcken	39
	3.2.3.	Proteinextraktion	40
	3.2.3.	1. Proteinextraktion aus FFPE-Gewebe	40
	3.2.3.	2. Proteinextraktion aus schockgefrorenem Gewebe	40
	3.2.4.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
	3.2.5.	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	41
	3.2.5.	1. Bradford-Assay	41
	3.2.5.2	2. Sypro-Ruby-Färbung	41
	3.2.6.	Western Blot	42
	3.2.6.	1. SDS-PAGE	42
	3.2.6.2	2. Proteintransfer	42
	3.2.6.3	3. Immundetektion der Blots	42
	3.2.7.	Reverse Phase Protein Array	43
	3.2.7.	1. Herstellen von Verdünnungsreihen	44
	3.2.7.	2. Spotten der Proteinlysate	45
	3.2.7.	3. Immundetektion der Arrays	45
	3.2.7.	4. Quantifizierung der Intensität mit MicroVigene	45
	3.2.8.	Statistik	46
	3.2.8.	1. Friedman-Test	46
	3.2.8.2	2. Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	46
	3.2.8.		
4.	Ergebni	sse	47
4	.1. Ant	ikörpervalidierung	47
4	.2. Rep	oroduzierbarkeit des Reverse Phase Protein Array	49
4	.3. His	topathologische Beurteilung	50
		fluss unterschiedlicher Ischämiezeiten auf die Proteinspiegel humaner	
G	-	oben	
4		erindividuelle Biomarkervariabilität im HCC	
4		aindividuelle Unterschiede im Proteinlevel	60
		oressionsvergleich deregulierter Signalwegsmoleküle zwischen dem HCC und	<i>()</i>
	-	dierendem Referenzgewebe	
4		fluss der Fixierungsmethode auf die Proteinexpression	
	4.8.1.	Analyse der Proteinlevel im FFPE-Gewebe	66

	4.8.	2. Vergleich zwischen Kryogewebe und FFPE-Gewebe	69
5.	Disl	kussion	72
	5.1. der pe	Präanalytische Einflüsse während der Gewebeprozessierung als Herausforderung in ersonalisierten Medizin	
	5.2.	Individuelle Tumorvariabilität	74
	5.3.	Intratumorale Heterogenität	75
	5.4. korres	Molekulare Unterschiede zwischen dem hepatozellulären Karzinom und spondierendem Referenzgewebe	77
	5.4. Kar	1. ß-Catenin und HIF- 1α zeigen eine erhöhte Expression im hepatozellulären zinom	77
	5.4. sich	2. Proteinlevel von angiogenetischen Faktoren im HCC und Referenzgewebe gleich im Lauf der kalten Ischämie an	
	5.5.	Normalisierung der Biomarker auf das korrespondierende Referenzgewebe	80
	5.6.	Einfluss der Gewebefixierung auf die molekulare Signatur	81
	5.7.	Optimierung der Gewebequalität durch Standardisierung der präanalytischen Phase	84
	5.8. Gewel	RPPA als geeignete Methode zur objektivierten, quantitativen Analyse von Proteinen beproben	
6.	Aus	blick	89
7.	Sun	nmary/Zusammenfassung	91
	7.1.	Summary	91
	7.2.	Zusammenfassung	92
8.	Abb	oildungsverzeichnis	93
9.	Tab	ellenverzeichnis	94
10). L	iteraturverzeichnis	95
11	l. P	ublikationen1	09
12	2. D	anksagung1	10

1. Abkürzungsverzeichnis

ABL Abelson murine leukemia viral oncogene homolog

AFP Alpha-1-Fetoprotein

Akt Proteinkinase B

APC Adenomatosis Polyposis coli

APS Ammoniumpersulfat

BCLC Barcelona Clinic Liver Cancer

BCR breakpoint cluster region

BSA Rinderserumalbumin
BSC Best supportive care

CML Chronisch myeloische Leukämie

CT Computertomographie dH_2O Destilliertes Wasser

DNA Desoxyribonukleinsäure

DSH Dishevelled

DTT Dithiothreitol

EB Extraktionspuffer

ECOG Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

ELISA Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay

Erk Extrazellulär regulierte Proteinkinase

FFPE Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet

FGF Fibroblasten-Wachstumsfaktor

G Grading

GRB2 Wachstumsfaktor Rezeptor-gebundenes Protein 2

Gsk3ß Glykogensynthase-Kinase 3ß

HbS-Ag HBV-Oberflächenantigen

HbE-Ag HBV-exkretorisches-Antigen

HBV Hepatitis B Virus

HCC Hepatozelluläres Karzinom

HCV Hepatitis C Virus

HE Hämatoxylin-Eosin

HER Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2

HGF Hepatozyten-Wachstumsfaktor

HIF- 1α Hypoxie-induzierter Faktor 1α

HIV Humanes Immundefizienz-Virus

IHC Immunhistochemie

IRS Insulin Rezeptor Substrat

LEF Lymphoid-verstärkender Bindungsfaktor

LTx Lebertransplantation

M Metastasierungsstatus

MALDI-IMS matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry

MS Massenspektrometrie

MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MEK1 Mitogen-aktivierende Protein Kinase Kinase

MP Magermilchpulver

MRT Magnetresonanztomographie mTOR mechanistic target of rapamycin

N Nodalstatus

NAFLD Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

NSCLC Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

p- Phospho-

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PEI Perkutane Ethanolinstallation

PET Positronen-Emissions-Tomographie

PI3K Phosphoinositid-3-Kinasen

PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PKC Proteinkinase C
PLC Phospholipase C

PTEN Phosphatase und Tensin Homolog

PST Performance status

RITA Radiofrequenzinduzierte Thermoablation

RNA Ribonukleinsäure

RPPA Reverse Phase Protein Array

SDS Natriumdodecylsulfat

Smad mothers against DPP homolog

SOS son of sevenless

Stat3 Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription 3

T Tumorstatus

TACE Transarterielle Chemoembolisation
TBST Tris-gepufferte Saline und Tween 20

TEMED Tetramethylethylendiamin

Thr Threonin
Tyr Tyrosin

UICC Internationale Vereinigung gegen Krebs

VEGFR Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor

WHO Weltgesundheitsorganisation

2. Einleitung

2.1. Biomarker in der personalisierten Medizin

Seit einigen Jahren erleben wir einen Paradigmenwechsel in der Onkologie. Der Begriff der personalisierten Medizin hat nachhaltig die moderne Diagnostik und Behandlung krebskranker Patienten geprägt. Dabei handelt es sich weniger um die individuelle Versorgung einer einzelnen Person, sondern vielmehr um die Stratifizierung von Patienten in Subgruppen in Abhängigkeit definierter Kriterien, die zur Prognoseabschätzung und für Therapieentscheidungen herangezogen werden. Voraussetzung für die zielgerichtete personalisierte Medizin als Teil der Krebstherapie ist die molekularbiologische Identifizierung und Analyse von Biomarkern.

Der Begriff "Biomarker" wurde von der National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group als objektiv messbarer Parameter definiert, der einen normalen biologischen Prozess, einen pathologischen Prozess oder ein Ansprechen auf eine pharmakologische Therapie widerspiegelt (Biomarkers Definitions Working, 2001). Ein Biomarker wird dabei als Surrogatendpunkt bezeichnet, wenn er dazu geeignet ist, einen klinischen Endpunkt zu ersetzen (Sessa et al., 2008). Im klinischen Alltag können sie für diagnostische Zwecke (z.B. Blutglukose bei Diabetes mellitus), zur Bestimmung des Krankheitsstadiums (z.B. Blutdruck bei Hypertonie), zur Überwachung der Pharmakotherapie (z.B. HIV-Nukleinsäuren bei antiretroviraler Therapie) und für die Therapieauswahl (z.B. Imatinib bei BCR-ABL-positiver CML) herangezogen werden (Colburn, 2003). Krankheitsbezogene Biomarker sollten daher das individuelle Risiko einer Erkrankung und den Erfolg einer therapeutischen Intervention prognostizieren, Therapien mit Hinblick auf das Nutzen-Risiko-Verhältnis optimieren und Patientengruppen, höchstwahrscheinlich nicht von einem Medikament profitieren werden, bereits im Voraus von der Behandlung ausschließen. Ein Teil der identifizierten Biomarker kann dabei mit dem Krankheitsverlauf (prognostisch) korreliert oder mit der Vorhersage über ein Ansprechen auf eine klinische Intervention (prädiktiv) verwendet werden (Dancey et al., 2012). Insbesondere arzneimittelbezogene prädiktive Biomarker sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus von Pathologie, Onkologie und Pharmakologie gerückt. Eines von vielen Beispielen ist die zielgerichtete Therapie (targeted therapy) mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab bei einer Subpopulation von Her2-positiven Brustkrebspatientinnen. Hier zeigte sich eine Ansprechrate von 34%. Im Gegensatz dazu lag bei Her2-negativen Patientinnen die Ansprechrate nur bei 7% (Vogel et al., 2002). In vielen Studien konnte bei der Her2-positiven Gruppe eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens durch die Therapie mit Trastuzumab gezeigt werden (Piccart-Gebhart et al., 2005; Cameron et al., 2017). Ein weiteres

Beispiel für einen prädiktiven Biomarker sind Patientenpopulationen mit Kolonkarzinom, die eine Mutation im KRAS-Gen auf Codon 12 und 13 tragen (Lievre et al., 2006). Bei KRAS-Wildtyp konnte ein signifikanter Überlebensvorteil und ein längeres progressionsfreies Intervall durch die Behandlung mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab bei Kolonkarzinomen beobachtet werden (De Roock et al., 2008). Bei vielen weiteren Krebserkrankungen (u.a. beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und beim malignen Melanom) ist die Stratifizierung von Patienten anhand prädiktiver Biomarker heutzutage fest in der klinischen Routine implementiert (Dancey et al., 2012). Die rasante Entwicklung der individualisierten Medizin zeigt sich auch durch die ständig wachsende Fülle an pharmakologischen Optionen für zielgerichtete Therapien durch neue Wirkstoffe in der Antikörpertherapie, Immuntherapie und Therapie mit "small molecules".

Die Pathologie als Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und Klinik nimmt mit der Analyse von klinischen Gewebeproben eine Schlüsselrolle für die Identifizierung und Validierung von Biomarkern ein. Dabei müssen Biomarker ein wichtiges Kriterium erfüllen: sie müssen verlässlich sein. Sie sollen den Erfolg einer zielgerichteten Therapie und den Verlauf einer Krebserkrankung mit einer hohen Wahrscheinlichkeit prognostizieren können und die Betroffenen weder durch falsche Ergebnisse verunsichern noch in falscher Sicherheit wiegen.

Ein qualitativ guter Biomarker beginnt mit der Probe selbst. Erst eine ausreichend hohe Probenqualität ermöglicht eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse von Biomarkern. Da jeder Fehler während der Gewebeprozessierung externe Variabilität und somit eine Reduzierung der Ergebnisvalidität zur Folge hat, muss während der Gewebesammlung und Protokollabwicklung eine möglichst hohe Probenqualität angestrebt werden (Poste, 2011). Obwohl die Präanalytik einen hohen Stellenwert in der molekularen Diagnostik einnimmt, ist über ihren Einfluss auf die Gewebequalität bisher leider zu wenig bekannt.

2.2. Einfluss der Präanalytik auf die Gewebeprobenqualität für Diagnose und Therapie

Voraussetzung für die Entwicklung und den Erfolg individualisierter Tumortherapien ist die exakte quantitative und qualitative Erfassung potentieller Tumormarker aus klinischen Gewebeproben, deren Messgenauigkeit durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren verzerrt werden kann (Hewitt et al., 2012). Wünschenswert wäre, wenn der vorhandene Wert eines Biomarkers zum Zeitpunkt der Probengewinnung und während der nachfolgenden Probenprozessierung unverfälscht bleibt. Das würde bedeuten, dass die Konzentration des Biomarkers *in-vivo* der Konzentration *in-vitro* entspricht. In zahlreichen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass im Rahmen einer mehrstufigen Gewebeaufarbeitung unterschiedliche

präanalytische Variationen die Validität der Messergebnisse von diagnostischen Zielstrukturen eindeutig vermindert (Betsou et al., 2009; Pinhel et al., 2010). Diese Einflüsse zu identifizieren, richtig zu interpretieren und zu minimieren, stellt eine große Herausforderung in der personalisierten Medizin dar, und ist für die Gewährleistung einer verlässlichen und standardisierten Diagnostik von fundamentaler Bedeutung.

Die präanalytische Phase umfasst kontrollierbare und unkontrollierbare Faktoren (Hewitt et al., 2007). Neben der biologischen Patientenvariabilität wie Ausprägung und Schweregrad der Erkrankung, Komorbiditäten, Alter und Geschlecht, Konstitution, individuelle Lebensweise des Patienten sowie heterogene Beschaffenheit des Tumorgewebes, stellen auch iatrogene Einflüsse, wie die Prämedikation und Anästhesie, intraoperative Techniken und warme Ischämie in situ (Zeitpunkt der Gefäßligatur, in der die Perfusion des zu resezierenden Gewebsstücks unterbunden wird, bis zur Gewebeabsetzung) unkontrollierbare Faktoren dar. Im Gegensatz dazu stehen beeinflussbare Faktoren, die ab Absetzung des Resektats auf ein möglichst geringes Maß gehalten werden müssen, um Verfälschungen der zu untersuchenden Analyte zu verhindern. Dazu zählen die kalte Ischämie (Zeitpunkt ab Gewebeabsetzung bis zur Fixierung in Formalin bzw. in flüssigem Stickstoff), Umgebungstemperatur der Proben, manuelle bzw. instrumentelle Quetschung und Verformung des Präparats, Art der Fixierung, Einbettung, Probenlagerung und technische Aufarbeitung (Proteinextraktion) des Gewebes (Abb. 1), wobei insbesondere kalte Ischämie (Spruessel et al., 2004; Juhl, 2010) und Temperaturbedingungen (Chafin et al., 2013) während der Gewebeprozessierung erhebliche Einflüsse auf die Diagnostik haben können. Es scheint offensichtlich zu sein, dass Gewebe ex vivo reaktiven Veränderungen durch oxidativen, hypoxischen und metabolischen Stress ausgesetzt ist und sich dies auf die Expression von Biomarkern auswirkt (Espina et al., 2008; Espina et al., 2009; Gundisch et al., 2012).

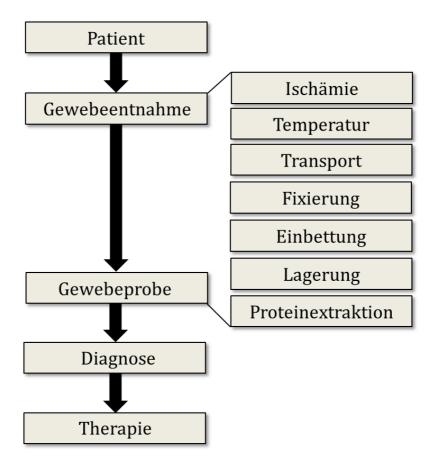


Abbildung 1: Einfluss präanalytischer Variationen während der Gewebeprozessierung.

An die Entnahme der Gewebeprobe schließt sich eine entsprechende Probenaufbereitung an. Diese besteht aus vielen manuellen Schritten, die fehleranfällig und zeitintensiv sind und verschiedenen externen Variationen (z.B. Ischämie, Umgebungstemperatur der Probe, Transport, Fixierung, Einbettung, Lagerung, Proteinextraktion) ausgesetzt ist.

In den letzten Jahren ist im Rahmen der Entdeckung und klinischen Implementierung neuer Biomarker, die Bedeutung präanalytischer Einflüsse auf die Qualität der molekularen Diagnostik immer mehr in das Bewusstsein von Forschung und Klinik gerückt.

Wie bereits erwähnt, haben insbesondere die kalte Ischämie und die Umgebungstemperatur der Proben einen Effekt auf die Integrität der Analyte. In einer Veröffentlichung von Espina *et al.* konnte gezeigt werden, dass sich Gewebeproben auch nach Resektion noch verändern und sich in ihrem mRNA und Proteinexpressionslevel erhebliche Schwankungen während der präanalytischen Phase beobachten lassen (Espina et al., 2008). Insbesondere Regulationsmechanismen von Kinasen und Phosphatasen scheinen noch aktiv zu sein und auf exogene Veränderungen zu reagieren. In Experimenten ihrer Arbeitsgruppe konnten mittels

quantitativer Reverse Phase Protein Arrays (RPPA) Veränderungen von 53 Phosphoproteinen in nicht-tumorösen humanen Gewebeproben analysiert und signifikante Fluktuationen von bis zu ±20%, ausgehend vom Zeitpunkt 0, beobachtet werden. Mit dem gleichen methodischen Ansatz konnten auch Gündisch et al. an humanen Darm- und Leberproben zeigen, dass einige Proteinlevel, beispielsweise p-Erk (Thr202/Tyr204), unabhängig von der Fixierungsart, im Verlauf der kalten Ischämie signifikant ansteigen. Interessanterweise blieben einige Moleküle in ihrem Proteinlevel konstant und wiesen eine gewisse Stabilität auf (Gundisch et al., 2012). In einer Folgearbeit derselben Arbeitsgruppe an Ratten- und Mausleberproben konnten für einige Biomarker sogar derart robuste Proteinlevel im Verlauf identifiziert werden, dass ihnen eine Rolle als potentielle Referenzmarker für die Entwicklung neuer Kinase- und Proteaseinhibitoren zukommen können (Gundisch et al., 2013). Dies lässt uns schlussfolgern, dass ein Teil der Analyte während der Gewebeaufbereitung starken Schwankungen ausgesetzt ist, während andere Analyte wiederum stabil sind und weniger auf exogene Einflüsse reagieren. Auch in Untersuchungen der Arbeitsgruppe von David et al. standen präanalytische Einflüsse auf Gewebeproben im Mittelpunkt des Interesses. In einem Zeitreihenversuch wurden normale humane kolorektale Gewebeproben und Kolonkarzinome nach definierten Zeitintervallen (präoperativ, 10, 20 und 45 Minuten) fixiert. Anschließend wurden Proteinanalysen von EGFR downstream Molekülen durchgeführt und ausgewertet (David et al., 2014). Es konnten starke Effekte durch die Gewebeentnahme und während der Gewebeprozessierung auf den Phosphorylierungsstatus von AKT und MAPK Signalwegsmolekülen (p-EGFR, p-AKT, p-Erk) beschrieben werden, die stärker im Tumorgewebe nachzuweisen waren als im nicht-tumorösen Gewebe.

Neben der kalten Ischämie hat auch die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Gewebequalität. Wie bereits erwähnt, wurde in vielen Arbeiten ein positiver Einfluss durch kalte Temperaturen vor und während der Probenfixierung auf die Stabilität von Biomarkern gezeigt. Bussolati *et al.* konnten allein durch eine Senkung der Umgebungstemperatur auf 4°C eine verbesserte Konservierung von RNA Molekülen in FFPE-Proben zeigen (Bussolati et al., 2011). Auch der temperaturabhängige Einfluss auf die Stabilität von Proteinbiomarkern (z.B. ER, Her2) konnte kürzlich in einer RPPA-basierenden Untersuchung von Brustkrebsgewebeproben demonstriert werden und wurde insbesondere bei der Analyse von phosphorylierten Proteinen (z.B. p-Her2, p-AKT) deutlich (Gundisch et al., 2015). Dieselben Phosphoproteine, p-Her2 und p-AKT, reagierten in einem Zeitreihenversuch auch sensibler auf die experimentelle Verzögerung der Gewebefixierung als andere, stabilere Phosphoproteine (z.B. p-S6RP, p-STAT5). Die kurze Nachweisbarkeitsgrenze von p-AKT (Ser473) ist bekannt und wurde bereits in Arbeiten von Baker *et al.* an einem Xenograft Modell auf 20 Minuten festgelegt, während die unphosphorylierte Form (AKT) ca. 180 Minuten lang nachweisbar bleibt (Baker et al., 2005). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass auch nach optimalen Abläufen der Probenaufbereitung die

immunhistologische Bestimmung von p-AKT (Ser473) an Tumorgewebe in der Routine für eine korrekte Diagnose kaum zulässig sein kann.

Allen Ergebnissen gemein ist der eindeutige Nachweis von präanalytischen Effekten auf die Stabilität und Integrität von Biomarkern. Bisher ist leider zu wenig über diese Einflüsse auf humane Tumoren bekannt, da die meisten Experimente an nicht-tumorösen oder tierischen Gewebeproben durchgeführt worden sind. Analysen an humanem malignem Gewebe, wie die von David *et al.*, sind bislang Raritäten. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Analysen von Proteinen und Phosphoproteinen während der kalten Ischämie speziell an menschlichem tumorösen Gewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurden Einflüsse einer verzögerten Gewebefixierung auf 29 Proteinund Phosphoproteinlevel mittels RPPA in humanen Tumorgeweben evaluiert. Hierfür wurde das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gewählt, da es im Vergleich zu anderen Tumorentitäten eine weitgehend morphologische Homogenität besitzt und eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Gewebeproben gewährleistet.

2.3. Das hepatozelluläre Karzinom

2.3.1. Epidemiologie und Ätiologie

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) sind mit über 80% die häufigsten malignen primären Menschen Lebertumoren des (El-Serag, 2012). Mit einer weltweit jährlichen Neuerkrankungsrate von über 520.000 (7,9% aller Karzinome) bei Männern und 220.000 (6,5% aller Karzinome) bei Frauen repräsentiert es die fünfthäufigste Tumorentität beim männlichen und die siebthäufigste beim weiblichen Geschlecht. Die Inzidenz des HCC zeigt eine sehr hohe geographische Variabilität. Über 80% aller Fälle treten mit einer Neuerkrankungsrate von über 20 pro 100.000 Individuen in Ostasien und Afrika südlich der Sahara auf, wogegen in Amerika und Europa weniger als 5 pro 100.000 jährlich beobachtet werden (Zhu et al., 2016). Während die Neuerkrankungsrate in den Hochinzidenzländern aufgrund der flächendeckenden Immunisierung gegen das Hepatitis B Virus rückläufig ist, wird ein Anstieg in den westlichen Ländern in den kommenden Jahrzehnten als Folge einer Infektionswelle mit Hepatitis C in den 1970er-Jahren prognostiziert (El-Serag & Mason, 1999).

Mehrere Risikofaktoren begünstigen die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms. Chronische Hepatitiden stellen eine der wichtigsten Ursachen des HCC dar (Sukowati et al., 2016). Eine akute Infektion mit dem Hepatitis C Virus, einem RNA-Virus aus der Familie der Flavivirae, chronifiziert sich in ca. 50 bis 80% der Fälle und hat das höchste Potential für die Entstehung eines HCC (Johnson & Williams, 1987; Liang & Heller, 2004). Chronische Infektionen mit dem Hepatitis B Virus, einem DNA-Virus, stellen weltweit die häufigste Ursache für ein HCC dar. Sowohl Patienten mit serologisch nachweisbarer Virusreplikation (HbS-Ag und HbE-Ag positiv) als auch HbS-Antigenträger (HbS-Ag positiv) haben ein eindeutig erhöhtes Risiko ein Karzinom zu entwickeln (Yang et al., 2002). Viele toxische Substanzen haben einen bedeutenden Stellenwert in der Ätiologie des HCC. Chronischer Alkoholabusus begünstigt wesentlich die Entstehung einer präkanzerotischen Leberzirrhose und ist in der westlichen Welt der häufigste Grund für ein durch leberzelltoxische Substanzen ausgelöstes HCC (Donato et al., 1997). Aflatoxin B₁, ein Metabolit des Schimmelpilzes Aspergillus flavius und Aspergillus parasiticus, das insbesondere in Entwicklungsländern über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen wird, stellt eine weitere hochpotente kanzerogene Substanz dar (Chen et al., 1996; Turner et al., 2002). Auch metabolische Erkrankungen, wie die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), die als Folge der Überernährung stark mit dem Auftreten von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 vergesellschaftet ist, werden in den folgenden Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung für die Entstehung von Leberzellkarzinomen gewinnen (Bugianesi, 2007; Baffy et al., 2012). Weitere stoffwechselbedingte Lebererkrankungen, insbesondere die Hämochromatose (Niederau et al., 1985), die die häufigste Ursache für ein HCC in Folge einer hereditären Lebererkrankung ist, stellen ebenso einen möglichen Risikofaktor dar, wie der Morbus Wilson, ein Alpha-1-Antitrypsinmangel, die Porphyria cutanea tarda, die Tyrosinämie und Glykogenosen (Salata et al., 1985; Propst et al., 1994).

2.3.2. Pathologie und Klassifikation

Das Leberzellkarzinom entsteht in den meisten Fällen stufenweise auf dem Boden einer Leberzirrhose, in der sich aus adenomatösen Regeneratknoten maligne Vorstufen entwickeln, die als dysplastische Foci ($\leq 0,1$ cm) und dysplastische Knoten (0,1 bis 2 cm) klassifiziert werden.

Die makroskopische Einteilung des HCC erfolgt in vier Wachstumsformen. Das diffuse HCC (infiltrierender Typ) entsteht in der Regel auf dem Boden einer Leberzirrhose und ist makroskopisch nur schwer von Regeneratknoten abzugrenzen. Das expansive HCC, auch HCC vom verdrängend wachsenden Typ, ist makroskopisch einfacher vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden, da es oft von einer fibrösen Kapsel umgeben ist. Multifokale HCC sind in der Regel unbekapselt und weisen eine ungünstige Prognose auf. Da der pendikuläre oder gestielte

Typ nur mit einer parenchymatösen Brücke mit der Leber verbunden ist, zeigt diese Wachstumsform aufgrund ihrer guten Resektabilität eine günstige Prognose. Etwa ein Viertel aller Karzinome sind Mischtypen und lassen sich keiner der genannten Wachstumsformen klar zuordnen (Ishak et al., 2001; Siewert, 2006).

Mikroskopisch wird das Leberzellkarzinom in verschiedene Subtypen klassifiziert, wobei die häufigste histologische Manifestation der *trabekuläre* Typ ist. Das sinusoidale Wachstumsmuster wird hier von meist gut differenzierten Tumorzellsträngen bestimmt. Mischtypen der *trabekulären* Art werden häufig mit *pseudoglandulären* Formen beobachtet, die durch ein drüsenartiges Wachstumsmuster gekennzeichnet sind. Histopathologisch wird noch der *szirrhöse* Typ, mit einem hohen sklerosierendem Bindegewebsanteil sowie der *solide* Typ definiert. Eine Sondervariante, die gehäuft bei jungen Patienten in nichtzirrhotischen Lebern auftritt, ist der *fibrolamelläre* Typ, der im Gegensatz zu den anderen histologischen Formen prognostisch günstiger ist (Ishak et al., 2001). Sowohl die makroskopische als auch die mikroskopische Einteilung ist umstritten und hat in der Klinik bisher keinen Stellenwert hinsichtlich Prognose und Therapie gefunden (Marrero et al., 2005).

Die häufigsten Prädilektionsstellen einer Fernmetastasierung des HCC stellen nach Einbruch von Krebszellen in die Pfortader und die Lebervenen die Lunge (bis zu 25%) und Knochen (5-20%) dar (Layer et al., 2008). Da der Differenzierungsgrad (Grad 1-4) in der Prognoseabschätzung eine untergeordnete Rolle spielt, hat die Stadieneinteilung des HCC einen weitaus höheren Stellenwert. Die TNM-Klassifikation und die UICC-Einteilung erfolgt nach Tumorgröße, Lokalisation, Gefäßinvasion und Metastasierung (Vauthey et al., 2002). Neuere Einteilungen nach Okuda (Okuda et al., 1985) und der CLIP-Score berücksichtigen zusätzlich die Leberfunktion und weitere Tumorparameter des Patienten.

Tabelle 1: Stadieneinteilung des hepatozellulären Karzinoms

Klassifikation	Stadium	Kriterien
TNM	T1	solitär, <2cm, ohne Gefäßinvasion
	T2	solitär, <2cm, mit Gefäßinvasion
		solitär, >2cm ohne Gefäßinvasion
		multipel, ein Leberlappen, <2cm ohne Gefäßinvasion
	Т3	solitär, >2cm mit Gefäßinvasion
		multipel, ein Leberlappen, <2cm mit und ohne Gefäßinvasion
	T4	multipel, mehr als ein Leberlappen
		Invasion der V. portae oder der Lebervenen
	N1	Peritonealinvasion, Invasion benachbarter Organe
		regionale Lymphknotenmetastasen
	M	Fernmetastasen
UICC 1997	I	T1 N0 M0
	II	T2 N0 M0
	IIIA	T3 N0 M0
	IIIB	T1-3 N0 M0
	IVA	T4, jedes N, M0
	IVB	jedes T, jedes N, M1
Okuda	I	0 Punkte
	II	1-2 Punkte
	III	3-4 Punkte
		je 1 Punkt für:
		Tumor >50% der Leber, Aszites, Albumin < 3 g/dl, Bilirubin >
		3mg/dl
CLIP-Score	Score 1-6	Child-Pugh Stadium:
		A = 0 Punkte, $B = 1$ Punkt, $C = 2$ Punkte
		Tumorausdehnung:
		uninodulär und Ausdehnung <50% = 0 Punkte
		multinodulär und Ausdehnung >50% = 1 Punkt
		diffus oder Ausdehnung >50% = 2 Punkte
		Portalvenenthrombose: nein = 0 Punkte, ja = 1 Punkt
		AFP: <400ng/dl = 0 Punkte, >400ng/dl = 1 Punkt

Seit einigen Jahren hat sich die BCLC-Klassifikation (Barcelona Clinic Liver Cancer) in der Klinik durchgesetzt. Diese Stadieneinteilung ergänzt den Child-Pugh-Score und den Okuda-Score mit der Tumorgröße, den Bilirubinwert, dem Vorliegen einer portalen Hypertension und den Leistungsindex des Patienten (ECOG-Status: *Eastern Cooperative Oncology Group*) (Llovet et al., 1999). Orientierend an diesem Algorithmus lassen sich die verschiedenen Therapiemodalitäten ableiten.

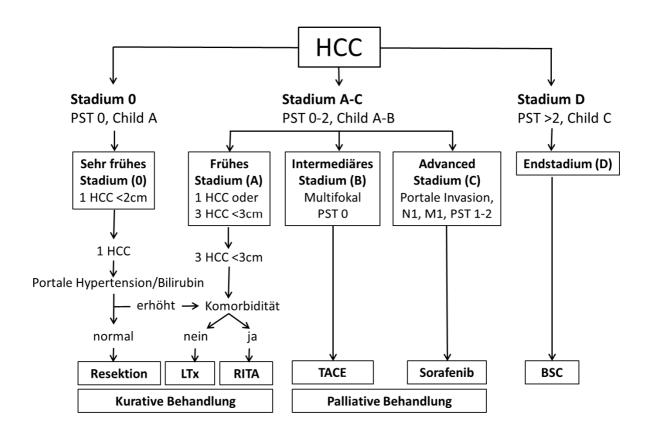


Abbildung 2: BCLC Klassifikation des hepatozellulären Karzinoms.

Abkürzungen: BSC (Best supportive care); LTx (Lebertransplantation); M (Metastasen); N (Lymphknoten); PST (performance status); RITA (Radiofrequenzinduzierte Thermoablation); TACE (Transarterielle Chemoembolisation); (modifiziert nach EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma, 2012).

2.3.3. Klinik, Diagnostik und Verlauf

Das HCC tritt erst im fortgeschrittenen Tumorstadium klinisch in Erscheinung, sofern nicht gleichzeitig eine Lebererkrankung zu Grunde liegt, die Anlass zur weiteren Diagnostik gibt. In den meisten Fällen wird das Karzinom im Rahmen einer sonographischen Kontrolluntersuchung

entdeckt. Nach langjähriger Lebererkrankung können vielfältige unspezifische Symptome auftreten, die von allgemeiner Schwäche, Gewichtsverlust, Übelkeit und Inappetenz bis zu abdominellen Beschwerden, Ikterus, Hepatomegalie, Fieber, Ödemen und Aszites reichen.

Die schnell verfügbare, kostengünstige und nichtinvasive Sonographie steht stets am Anfang der apparativen Diagnostik. Die Sensitivität dieser Untersuchungsmethode liegt bei ca. 60%, die Spezifität bei ca. 97% (Colli et al., 2006). Weiter können als Ergänzung die farbkodierte Duplexsonographie und die Kontrastmittelsonographie sinnvoll eingesetzt werden. Bei sonographisch suspektem Befund kann eine laborchemische, serologische Untersuchung des Alpha-1-Fetoproteins die Verdachtsdiagnose erhärten, sofern Werte gemessen werden, die höher als 200-400 ng/ml sind. Gerade bei kleinen, gut differenzierten Karzinomen werden jedoch häufig normale oder gering erhöhte AFP-Werte gemessen (Nomura et al., 1989). Aufgrund der geringen Sensitivität darf dieser Tumormarker als diagnostisches Mittel nicht überbewertet werden, sondern sollte vielmehr als Verlaufsparameter der Erkrankung seine Anwendung finden.

Als weitere radiologische Methoden haben sich die Computertomographie, die Magnetresonanztherapie, die Angiographie sowie die Positronen-Emissions-Tomographie etabliert. Bei kleinen Tumormanifestationen und unauffälligen AFP-Werten sollte eine histopathologische Sicherung angestrebt werden, sofern sich dadurch therapeutische Konsequenzen ergeben. Mittel der Wahl ist dabei die sonographisch oder CT-gesteuerte Feinnadelbiopsie (Bialecki et al., 2006).

Das klinisch manifeste Leberzellkarzinom hat einen rasch progredienten Verlauf und in Abhängigkeit vom Okuda-Stadium eine mediane Überlebenszeit von 11 Monaten (Stadium I), 3 Monaten (Stadium II) oder einem Monat (Stadium III) (Okuda et al., 1985). Häufig versterben die Patienten in Folge einer Dekompensation der zugrunde liegenden Lebererkrankung.

2.3.4. Molekulare und genetische Alterationen

Ähnlich wie bei anderen Tumorentitäten handelt es ich bei der Karzinogenese des HCC um ein mehrstufiges komplexes Geschehen, das durch genetische Prädisposition, äußere Umweltfaktoren und erworbenen Mutationen verursacht wird. Molekulare und genetische Alterationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führen zu einer Deregulation von Rezeptor- und Signalwegsmolekülen, die für die Zellzyklus-Kontrolle, DNA-Reparatur, Wachstum, Differenzierung und Zelladhäsion verantwortlich sind und zur Entstehung und Progression von Leberzellkarzinomen beitragen (Breuhahn et al., 2006). Im folgenden Abschnitt sollen HCC-relevante Signalwegskaskaden genauer erläutert werden.

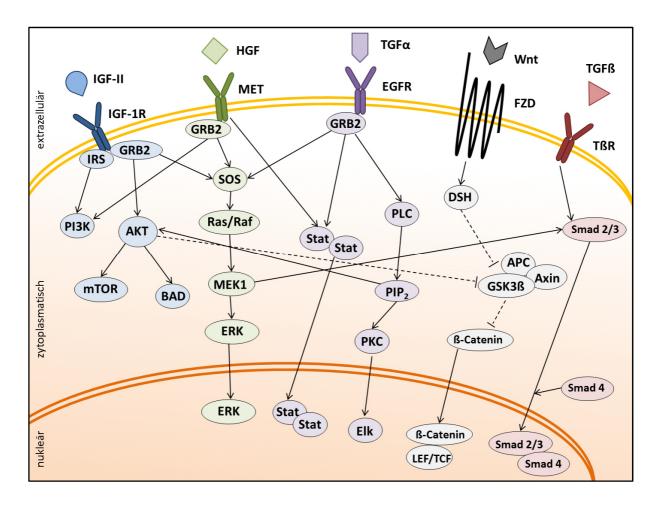


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema relevanter deregulierter Signalwegskaskaden in der Entstehung und Progression des hepatozellulären Karzinoms.

Abkürzungen: AKT (Proteinkinase B); APC (Adenomatosis Polyposis coli); DSH (Dishevelled); Elk (Mitglieder der Ets-Onkogen Familie); GRB2 (Wachstumsfaktor Rezeptor-gebundenes Protein 2); GSK3ß (Glykogen Synthase Kinase 3ß); IRS (Insulin Rezeptor Substrat); LEF (Lymphoid-verstärkender Bindungsfaktor); MEK1 (Mitogen-aktivierende Protein Kinase Kinase); PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase); PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat); PKC (Proteinkinase C); PLC (Phospholipase C); Smad (mothers against DPP homolog); SOS (son of sevenless); Stat (Signalgeber und Aktivator der Transkription); TCF (Transkriptionsfaktor) (modifiziert nach Breuhahn et al., 2006).

2.3.4.1. Humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Die Her-Familie besteht aus vier strukturell ähnlichen Transmembranproteinen, die als Her1 (EGFR/ErbB1), Her2 (ErbB2/neu), Her3 (ErbB3) und Her4 (ErbB4) definiert werden. Alle genannten Wachstumsfaktor-Rezeptoren zeigen eine Überexpression im HCC (Ito et al., 2001).

Mit Ausnahme von Her3 besitzen sie eine intrinsische Rezeptortyrosinkinaseaktivität. Die bedeutsamsten Vertreter extrazellulär bindender Liganden sind $TGF\alpha$ (Transformierender Wachstumsfaktor α) und EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor), die über eine Konformationsänderung und Dimerisierung der Rezeptoren eine Transphosphorylierung induzieren und nachgeschaltete tumorwachstumsfördernde Signalwegsmoleküle (z.B. PLC, Stats, PI3K, ERK) aktivieren. Her2 kann als einziger Vertreter unabhängig von extrazellulären Signalen dimerisieren (Tzahar et al., 1996). Insbesondere der MAPK (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase)-Signalweg und PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B)-Signalweg spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation von Migration und Proliferation der Zelle (Hynes & Lane, 2005).

2.3.4.2. HGF/MET Signalweg

Der HGF (Hepatozyten Wachstumsfaktor) oder *scatter factor* ist der potenteste Wachstumsfaktor von Leberzellen und bindet als einzig bekannter Ligand an der Rezeptortyrosinkinase MET (HGFR) (Breuhahn et al., 2006). Ähnlich wie bei der Her-Familie werden über Mechanismen der Multimerisierung und Autophosphorylierung nachgeschaltete Effektormoleküle (z.B. Stats, PI3K, PLC, ERK) aktiviert, die protumoröse Einflüsse auf die Regulation von Proliferation, Migration, Wachstum, Angiogenese und Regeneration von Zellen haben (Stuart et al., 2000; Efimova et al., 2004). Eine Überexpression von MET konnte im HCC vergleichsweise zum umliegenden Lebergewebe beobachtet werden (Suzuki et al., 1994) und korreliert mit erhöhter intrahepatischer Metastasierung sowie verringerter Überlebenszeit des Patienten (Ueki et al., 1997). Hohe HGF Serumwerte zeigen eine Korrelation zur steigenden Tumorgröße (Yamagamim et al., 2002) und gehen mit kürzerem Patientenüberleben einher (Vejchapipat et al., 2004).

2.3.4.3. IGF Signalweg

Der IGF (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)-Signalweg spielt aufgrund seiner proliferativen und antiapoptotischen Signale eine zentrale Rolle in der Embryogenese der fetalen Leber, wird postnatal stark herunterreguliert und scheint im Sinne einer Reaktivierung die Progression der Hepatokarzinogenese wesentlich zu beeinflussen (Breuhahn et al., 2006). Durch Bindung verschiedener Liganden (z.B. IGF-II) kommt es zu einer intrazellulären Phosphorylierung des IGF-1 Rezeptors, die ein Anschalten von downstream second messenger Molekülen wie IRS-1 und IRS-2 zur Folge hat, welche wiederum eine kaskadenartige Aktivierung nachgeschalteter Proteine (PI3K, AKT/PKB, MAPK) induziert (Foulstone et al., 2005). In verschiedenen Studien

konnten erhöhte Level von IGF-II (Breuhahn et al., 2004), IRS-1 (Nishiyama & Wands, 1992) und IRS-2 (Boissan et al., 2005) im Leberzellkarzinom beobachtet werden.

2.3.4.4. PI3K/AKT Signalweg

Die bereits erwähnte, aktivierte PI3K bindet an der zytosolischen Domäne des Rezeptors und phosphoryliert PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat). Das entstandene PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat) rekrutiert und aktiviert wiederum das protumoröse Effektormolekül AKT (Proteinkinase B), das insbesondere Gsk3ß (Glykogensynthase-Kinase 3ß), mTor (Rapamycin-Zielprotein) und BAD (Bcl-2-assoziierter Todespromotor) phosphoryliert und reguliert. Vermehrte Wachstumssignale, veränderter Glukosemetabolismus und eine Hemmung der Apoptose sind die Folge (Woodgett, 2005). Der Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase und Tensinhomolog) katalysiert die Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂ und fungiert als Inhibitor von AKT (Carnero et al., 2008).

2.3.4.5. MAPK Signalweg

Als Protoonkogen spielt die Serin/Threonin-Kinase ERK 1/2 (extrazellulär regulierte Kinase 1/2) im MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase)-Signalweg eine zentrale Rolle in der Entstehung des HCC (Delire & Starkel, 2015; Brito et al., 2016). Ein Komplex, bestehend aus dem intrazellulärem Rezeptoranteil und den Proteinen SOS und GRB2, vermittelt über das kleine G-Protein Ras die kaskadenartige Aktivierung von Raf, MEK und schließlich ERK (McCubrey et al., 2007).

2.3.4.6. Wingless/ß-Catenin Signalweg

Der Wnt Signalweg ist eine stark konservierte Signaltransduktionskaskade die während der Embryonalentwicklung wichtig für die Steuerung von Proliferation, Motilität, Zell-Zell-Interaktion und Organogenese ist (Kikuchi, 2003). Mutierte Formen Wnt-assoziierter Regulationsmechanismen werden häufig in Malignomen beobachtet. Wnt sind cysteinreiche Glykoproteine, die als interzelluläre Signalmoleküle am *Frizzled* Rezeptor (Fzd) und den LRP-Korezeptor binden und eine Phosphorylierung von *Dishevelled* (Dsh) induzieren. Dadurch wird die Phosphorylierung von ß-Catenin, einer zentralen Komponente dieses Signalwegs, durch den Abbaukomplex GSK-3ß (Glykogensynthase Kinase 3-ß), Axin und APC (*adenomatous polyposis coli*) gehemmt. Hypophosphoryliertes ß-Catenin wird in der Folge nicht mehr von einer Ubiquitin-Ligase ubiquitinyliert, kann durch das 26 S-Proteasom nicht degradiert werden und akkumuliert im Zellkern. Die Expression von Wnt-Zielgenen, wie beispielsweise Myc, Zyklin D1,

MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) und VEGF, mittels Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie (*T-cell specific trancription factor/lymphoid enhancer binding factor*) wird induziert. Folge sind Proliferation, Antiapoptose, Invasion und Angiogenese der Zelle (Breuhahn et al., 2006). In zahlreichen Studien konnte eine nukleäre Akkumulation von ß-Catenin im HCC beschrieben werden (Monga et al., 2002; Prange et al., 2003).

2.3.4.7. TGF-ß Signalweg

Die Wachstumsfaktoren der TGF-ß (Transformierender Wachstumsfaktor ß) Superfamilie binden an spezifische Rezeptor-Serin/Threoninkinasen, die über komplexe Mechanismen die Translokation von sogenannten Smad Proteinen in den Zellkern regulieren. Diese Moleküle steuern als Transkriptionsfaktoren kanzerogene Einflüsse auf Hepatozyten. Die genaue Rolle des TGF-ß Signalwegs und der nachgeschalteten Smad Proteine in der Entstehung von Neoplasien wird in der Literatur kontrovers diskutiert und ist bis heute noch nicht vollständig verstanden (Breuhahn et al., 2006).

2.3.4.8. Angiogenese

In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Angiogenese eine zentrale Rolle in der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms spielt (Alves et al., 2011; Brito et al., 2016). Die Bildung neuer Blutgefäße ist ein dynamischer Prozess und unterliegt Steuerungsmechanismen, die durch ein balanciertes Verhältnis von pro-angiogenen (z.B. Fibroblast Growth Factor) und anti-angiogenen Faktoren (z.B. Thrombospondin-1, Troponin I) reguliert wird. Sobald Tumorzellen durch alleinige Diffusion nicht mehr suffizient mit Blut versorgt werden können, kommt es intrazellulär zu Hypoxie, Glukosemangel, Azidose und freien Radikalen die den angiogenetic switch, eine Gleichgewichtsverschiebung zugunsten pro-angiogener Faktoren, initiieren können (Hanahan & Folkman, 1996). Man weiß heute, dass diese löslichen Faktoren nicht nur von den Tumorzellen selbst, sondern auch von umliegenden Bindegewebszellen (Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten) und Immunzellen (Makrophagen, Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen) produziert werden können. Durch die gestörte Regulation der Angiogenese in Tumormanifestationen weisen diejenigen Gefäße, die ständig den Umbauprozessen unterworfen sind, eine chaotische Architektur und eine lückenhafte Endothelauskleidung auf (Baluk et al., 2005). Bedeutende Vertreter der pro-angiogenen Faktoren sind VEGF (Vascular endothelial growth factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) und PDGF B (*Platelet-Derived Growth Factor B*). Über hypoxische Zustände in der Tumorzelle kommt es zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors Hif- 1α (Hypoxie-induzierter Faktor 1α), der an die Promotorregion des VEGF bindet und zu einer erhöhten Expression von VEGF führt. Dieser

bindet an spezifische Rezeptoren, VEGFR 1-3 (*Vascular endothelial growth factor receptor 1-3*), die über mehrstufige Signalkaskaden verschieden angiogenetische Prozesse aktivieren (Maxwell et al., 1997). Im HCC konnte eine Korrelation zwischen erhöhten HIF-1 α und VEGF Level und einer verkürzten medianen Überlebenszeit bei Patienten festgestellt werden (Tseng et al., 2008). Zudem konnte in tierexperimentellen Studien während der Hepatokarzinogenese steigende HIF-1 α und VEGF Werte gemessen werden, die mit einer erhöhten Mikrogefäßdichte assoziiert waren (Wang et al., 2009). Hypoxie-induzierte molekulare Veränderungen spielen eine tragende Rolle in der Proliferation, Angiogenese, Metastasierung und Therapieresistenz und müssen als potentielle therapeutische Angriffspunkte des Leberzellkarzinoms zukünftig besser verstanden und charakterisiert werden (Wu et al., 2007).

2.3.5. Multimodale Therapiekonzepte

2.3.5.1. Kurative Strategien

Kurative Ansätze in der Therapie des Leberzellkarzinoms sind neben der Tumorresektion auch die orthotope Lebertransplantation. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des HCC ist nur etwa jeder fünfte Tumor operabel. Dies liegt zum einen an der limitierten funktionellen Reserve des Restleberparenchyms durch eine meist fortgeschrittene Leberzirrhose (Child-C-Zirrhose stellt eine absolute Kontraindikation der Operation dar), zum anderen am Vorliegen extrahepatischer Metastasen und nicht zuletzt an schweren Begleiterkrankungen (kardiovaskulären, pulmonalen oder renalen Komorbiditäten) des Patienten, die ein zu hohes Risiko für einen operativen Eingriff darstellen. Relative Kontraindikationen sind ausgedehnte Tumormanifestationen und Infiltrationen größerer Gefäße (*V. cava, V. portae*), die eine multimodale Therapiestrategie erfordern und nicht allein chirurgisch beherrschbar sind (Poon & Fan, 2004). Postoperativ liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Tumorresektion bei ca. 50%, die abhängig von der funktionellen Restleberkapazität, dem Auftreten von Rezidiven sowie dem individuellen Risikoprofil des Patienten erhebliche Schwankungen aufweist (Song et al., 2004).

Durch die orthotope Lebertransplantation kann nicht nur das Tumorleiden, sondern auch die zugrunde liegende Zirrhose mit ihren Folgen der portalen Hypertension und ihrem hohen Rezidivrisiko therapiert werden (McCormack et al., 2005). Seit Einführung der Milan-Kriterien, die eine Transplantationsfähigkeit des Patienten einschätzen und ein damit einhergehendes rezidivfreies Überleben besser prognostizieren können, sollen nur noch selektierte Patienten transplantiert werden, die einen Tumor von kleiner als 5 cm oder bis zu drei Tumormanifestationen kleiner als 3 cm haben (Pascual et al., 2016). Patienten, die innerhalb

dieser Kriterien transplantiert werden, haben ein 4-Jahresüberleben von ca. 75% (Mazzaferro et al., 1996). In einer nachfolgenden Studie konnte ein ähnliches Überleben bei erweiterten Kriterien erzielt werden (Freeman, 2006).

2.3.5.2. Palliative Strategien

Bei Vorliegen eines inoperablen HCC oder bei Ablehnung eines chirurgischen Eingriffes kommen palliative Strategien zum Einsatz. Bei der perkutanen Ethanolinstallation (PEI) wird unter Lokalanästhesie eine 95%-Ethanol Lösung mittels ultraschallgesteuerter Feinnadelpunktion in den Tumorknoten injiziert. Eine Nekrose der Tumorzellen ist die Folge. Diese Methode ist in der Regel beliebig oft wiederholbar, kostengünstig und scheint das umliegende Leberparenchym nicht zu schädigen (Shiina et al., 1991). Ähnlich wie bei der PEI wird bei der radiofrequenzinduzierten Thermoablation (RITA) eine Feinnadel sonographiecomputertomographisch gesteuert im Tumorherd platziert. Im Gegensatz zu einer Ethanolinjektion erfolgt hier jedoch eine 5 bis 30 minütige Ablation von Radiofrequenzwellen, die eine Nekrose des Tumorgewebes durch Erhitzung von bis zu 100°C verursachen (Ni et al., 2005). Dieses Verfahren kann perkutan, laparoskopisch oder intraoperativ angewendet werden und bedarf oft nur einer einzigen Sitzung. Weitere Methoden, die zu einer lokalen Nekrose von Malignomgewebe führen, sind die laserinduzierte Thermoablation und die Kryotherapie. Das Phänomen der arteriellen Hyperperfusion des HCC macht man sich in dem Verfahren der Transarteriellen Chemoembolisation (TACE) zunutze, in der über tumorversorgenden Arterien ein Katheter positioniert und lokal eine Mischung aus diversen Chemotherapeutika appliziert wird. Häufig wird eine Emulsion aus den Substanzen Doxorubicin, Mitomycin C, Epirubicin und Cisplatin in Lipiodol verwendet. Vorteil des Lipiodols ist eine erhöhte transiente Gewebeanreicherung der chemotherapeutischen Wirkstoffe. Nachfolgend werden embolisch wirkende Materialien (z.B. Gelfoam-Partikel) verabreicht, die eine weitere suffiziente Gefäßversorgung des Tumors unterbinden sollen (Stuart, 2003; Marelli et al., 2007). Dieses Verfahren kann alle 6 bis 12 Wochen wiederholt werden. Aufgrund klarer Überlebensvorteile des Patienten stellt die TACE mittlerweile ein etabliertes Verfahren bei fortgeschrittenen, inoperablen, multiplen Lebertumoren dar (Llovet & Bruix, 2003). Eine weitere vielversprechende transarterielle Anwendung ist die selektive intraarterielle Radioembolisation mit Yttrium-90 (Kalogeridi et al., 2015). Neue Ergebnisse zeigen eine längere progressionsfreie Zeit bei geringerer Toxizität und ähnlichem Überleben im Vergleich zur TACE (Salem & Lewandowski, 2013).

Das HCC hat eine ausgesprochen schlechte Ansprechrate auf Chemotherapeutika (Yeo et al., 2005; Giglia et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für den geringen Nutzen liegt in der vielfältigen Genese und den damit einhergehenden unterschiedlichen molekularen

Veränderungen des HCC. Verschiedenste Mono- und Kombinationschemotherapien mit Anthrazyklinen, Topoisomerasehemmern, Platinverbindungen, Nukleosidanaloga, Interferonen und Hormonantagonisten wurden in den letzten Jahrzehnten angewandt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter Abwägung der Beeinträchtigung der Lebensqualität durch Nebenwirkungen, der fehlenden Wirksamkeit und der immensen Kosten, eine systemische Chemotherapie keinen Platz in den Therapieleitlinien des HCC gefunden hat (Nowak et al., 2004).

In den letzten Jahren ist eine erstaunliche Entwicklung von innovativen Therapien mit zielgerichteten Medikamenten, sogenannten targeted therapies, zu beobachten. Angriffspunkt verschiedene Wachstumsfaktoren, dieser Substanzen sind deren Rezeptoren, Signalwegsproteine und zellzyklusregulierende Moleküle, die unterschiedlichen molekularen Pathophysiologien zugrunde liegen. Leider konnten in der molekularen Therapie des HCC kaum erfolgsversprechende Ergebnisse erzielt werden. Ein Grund für den bisher ausbleibenden Erfolg von personalisierten Therapieansätzen beim HCC könnte darin liegen, dass sich therapeutische Zielstrukturen während der Therapie verändern. Das bisher einzig zugelassene systemische Medikament beim HCC ist der Multikinaseinhibitor Sorafenib. Durch die selektive Hemmung von Raf-1, B-Raf, VEGFR2 und PDGFR-ß unterdrückt dieser Wirkstoff die Proliferation und Angiogenese von Tumoren (Wilhelm et al., 2004; Wilhelm et al., 2008; Ibrahim et al., 2012). Dadurch konnte eine statistisch signifikante Erhöhung des medianen Überlebens um drei Monate und ein verlängertes progressionsfreies Intervall erzielt werden, was zur Zulassung von Sorafenib in der Therapie beim fortgeschrittenen HCC geführt hat (Llovet et al., 2008). Vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenz dieser Tumorerkrankung und den limitierten therapeutischen Optionen im inoperablen Stadium ist es daher dringend erforderlich neue molekulare Zielstrukturen für zielgerichtete Therapien zu identifizieren und neue Behandlungsstrategien zu entwickeln (Deng et al., 2015; Brito et al., 2016).

2.4. Ziele der Arbeit

In der personalisierten Medizin stellen Biomarker in klinischen Gewebeproben oft die Grundlage wichtiger Therapieentscheidungen, Verlaufskontrollen sowie prognostisch und prädiktiver Vorhersagen dar.

Bislang ist nur wenig über die Einflüsse möglicher präanalytischer Effekte während der Gewebeprozessierung von Tumoren auf die Stabilität von Proteinen und Phosphoproteinen bekannt.

Basierend auf dieser Erkenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, (1.) welchen Einfluss unterschiedliche Ischämiezeiten auf das Protein- und Phosphoproteinlevel wichtiger Signalwegsmoleküle im humanen hepatozellulären Karzinom und im korrespondierenden Lebergewebe haben, (2.) welche inter- und intraindividuellen Unterschiede der Patientenproben zu identifizieren sind und welche Bedeutung sie für die molekulare Diagnostik haben, (3.) welche quantitative Expressionsunterschiede HCC-relevanter deregulierter Signalwegsmoleküle zwischen Tumorgewebe und korrespondierendem Referenzgewebe zu evaluieren sind und (4.) welche Effekte Kryokonservierung und FFPE-Fixierung auf molekulare Signaturen der Gewebeproben haben.

Im Anschluss wird diskutiert, welche Bedeutung die Präanalytik in der Ära der personalisierten Medizin hat und wie sich aus den gewonnenen Erkenntnissen neue Ansätze für eine Optimierung der Analyse von Biomarkern in Gewebeproben ableiten lassen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Allgemeine Puffer und Lösungen

3.1.1.1. Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Laufpuffer für die SDS-PAGE

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Gelladepuffer (5x)

Tris (1,25 M; pH 6,8)	312,5 mM
Glycerin	50 % (v/v)
ß-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (v/v)

Sammelgel (5%)

Für ein 1,5 mm Gel des Mini-Protean3 Systems

dH_2O	1,5 ml
Tris (1 M; pH 6,8)	625 ml
Acrylamid (40%)	380 ml
SDS (20%)	12,5 μl
APS (10%)	$20\;\mu l$
TEMED	2 μl

Trenngel (10%)

Für ein 1,5 mm Gel des Mini-Protean3 Systems

dH_2O	3,6 ml
Tris (1 M; pH 8,8)	1,8 ml
Acrylamid (40%)	1,8 ml
SDS (20%)	37,5 μl
APS (10%)	45 µl
TEMED	4,5 μl

3.1.1.2. Lösungen für die Immundetektion

TBST

Tris 20 mMNaCl 137 mMTween20 0,1 % (v/v)

Auf pH = 7,4 einstellen

Transferpuffer

Tris 25 mMGlycin 192 mMSDS 0,1 % (w/v)Methanol 20 % (v/v)

5 % Rinderserumalbumin in TBST (5 % BSA)

Bovines Serumalbumin 2,5 g
TBST 50 ml

5 % Magermilchpulver in TBST (5 % MP)

Magermilchpulver 2,5 g
TBST 50 ml

3.1.2. Allgemeine Reagenzien und Materialien

3.1.2.1. Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.

Reagenz	Hersteller
40 % Acrylamid/Bis 37.5:1	Bio-Rad (Hercules, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Formalin	Merck (Darmstadt)

Genistein	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magermilchpulver (MP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mayers Hemalaun (Hämatoxylin)	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
N, N, N', N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Paraffin	Merck (Darmstadt)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Staurosporin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris	Merck (Darmstadt)
Triton-X100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Xylol	Merck (Darmstadt)

3.1.2.2. Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen.

Reagenz/Kit	Hersteller
Bio-Rad Proteinassay	Bio-Rad (Hercules, USA)
Bio-Rad Proteinassay <i>dye reagent</i> -Konzentrat	Bio-Rad (Hercules, USA)
Bio-Rad Standard II c (1,48 mg/ml)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Complete, Mini Protease Inhibitor	Roche Applied Science (Mannheim)
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Health Care (Buckinghamshire, UK)
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Health Care (Buckinghamshire, UK)
ECL Prime Western Blotting Detection Reagents	GE Health Care (Buckinghamshire, UK)
peqGOLD Prestained Protein-Marker V	PeqLab (Erlangen)

Pertex	Medite Medizintechnik (Burgdorf)
PhosphoSTOP, Phosphatase Inhibitor	Roche Applied Science (Mannheim)
Qproteome FFPE Tissue Kit (EXB Plus)*	Qiagen (Hilden)
Real Peroxidase Blocking Solution	Dako (Glostrup, DK)
Sypro Ruby Protein Blot Stain	Invitrogen (Karlsruhe)

^{*}EXB Plus Puffer wurde mit PhosphoSTOP, Phosphatase Inhibitor und Complete (Mini Protease Inhibitor) versetzt.

3.1.2.3. Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verwendetes Verbrauchsmaterial.

Material	Hersteller		
384-Loch Platten	Biochrom (Berlin)		
Kryogefäße, Cryovial PK/100 Cryocaps	Roth (Karlsruhe)		
Deckgläser	Thermo Scientific (Surrey, UK)		
Einbettkassetten	Medim (Giessen)		
Fluid X Probenplatten (96-Lochplatten)	Fluid X (Cheshire, UK)		
Glasküvetten	Hartenstein (Würzburg)		
Glas Slides Superfrost	Thermo Scientific (Surrey, UK)		
Hyperfilm ECL	Amersham (Braunschweig)		
Kanülen 100 Sterican	Braun (Melsungen)		
Küvetten	Hartenstein (Würzburg)		
Nitrozellulosemembran BA85	Schleicher & Schuell (Dassel)		
Nitrozellulose Slides Oncyte Avid	Grace Biolabs (Bend, USA)		
Objektträger	Thermo Scientific (Surrey, UK)		
Objektträger Superfrost	Thermo Scientific (Surrey, UK)		
Oncyte Avid Nitrocellulose Slides	Grace Biolabs (Bend, USA)		
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company		
raiaiiiii	(Chicago, USA)		
Pasteurpipetten	Hartenstein (Würzburg)		

Pipettenspitzen	Fisher Scientific (Schwerte)
Reaktionsgefäße (1,5, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Skalpellklingen	Sapphire (Pocasset, USA)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)

3.1.3. Antikörper

Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte Primärantikörper und deren Verdünnungen im Western Blot und Reverse Phase Protein Array.

Protein	Größe (kDA)	Klon	Hersteller	Blockierungs- Lösung	Verdünnung Primärantikörper
EGFR	170	#2232	CST	5% MP	1:2000; 5% BSA
p-EGFR(Tyr1086)	170- 180	ZMD.504	Invitrogen	5% MP	1:500; 5% BSA
Her2	185	#A0485	Dako	5% MP	1:1000; TBST
Her3	185	ab40627	Abcam	5% MP	1:200; 5% MP
p-Her3(Tyr1289)	185	#4791	CST	5% MP	1:1000; 5% BSA
Her4	180	#4795	CST	5% MP	1:1000; TBST
HGF	29	SAB21010 33	Sigma	5% MP	1:5000; 5% MP
MET	145, 170	#3127	CST	5% MP	1:1000; TBST
p-MET ^(Tyr1234/1235)	145	#3077	CST	5% MP	1:500; 5% MP
Akt	60	#9272	CST	5% MP	1:1000; 5% BSA
p-Akt ^(Ser473)	60	#9271	CST	5% MP	1:1000; 5% BSA
PI3K	85	#4292	CST	5% MP	1:1000; 5% MP
p-PI3K(Tyr458/Tyr199)	85	#4228	CST	5% MP	1:1000; 5% MP

Erk	42; 44	#9102	CST	5% MP	1:1000; 5% BSA
p-Erk(Thr202/Tyr204)	42; 44	#9101	CST	5% MP	1:1000; 5% BSA
Pten	54	#9552	CST	5% MP	1:2000; 5% BSA
p-Pten ^(Ser380)	54	#9551	CST	5% MP	1:2000; 5% BSA
ß-Catenin	92	ab32572	Abcam	5% MP	1:5000; 5% MP
p-ß-Catenin ^(Tyr142)	92	ab27798	Abcam	5% MP	1:500; 5% MP
GSK-3ß	46	#9315	CST	5% MP	1:1000; 5% BSA
p-GSK-3ß(Ser9)	46	#9336	CST	5% MP	1:1000; 5% BSA
Axin	110	#2087	CST	5% MP	1:500; 5% MP
HIF1α	120	#610959	Becton, Dickinson and Company	5% MP	1:1000; 5% MP
VEGFR	210, 230	55B11	CST	5% MP	1:500; 5% MP
p-VEGFR ^(Tyr1175)	230	#2478	CST	5% MP	1:1000; 5% MP
Cleaved Caspase-3	17,19	#9664	CST	5% MP	1:500; 5% MP
Cyotkeratin 18	46	#sc-51582	Santa Cruz	5% MP	1:1000; 5% BSA
p-Cytokeratin 18 ^(Ser33)	46	sc-17031- R	Santa Cruz	5% MP	1:1000; 5% MP
GAPDH	37	#2118	CST	5% MP	1:2000; 5% MP

CST: Cell signaling technology (Danvers, USA); Invitrogen (Carlsbad, USA); Dako (Hamburg, Deutschland); Abcam (Cambridge, USA); Sigma (St. Louis, USA); Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA); Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper.

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	#7074	CST	1:2000; 5% MP
Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	NA 931	GE Healthcare	1:5000; 5% MP

CST: Cell signaling technology (Danvers, USA); GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

3.1.4. Gewebeproben

Alle in dieser Arbeit analysierten Leberzellkarzinome wurden mit peritumoralen Referenzgewebe im Zeitraum August 2011 bis September 2012 in der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar (München) reseziert. Die Tumorproben bestanden ausschließlich aus malignem Gewebe, das Referenzgewebe war umliegendes morphologisch unauffälliges Lebergewebe. Tumor- und Referenzgewebe wurde sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch begutachtet und von einer erfahrenen Pathologin (OÄ PD Dr. Slotta-Huspenina) befundet. Beide Gewebetypen wurden in Abhängigkeit der Operationstechnik und der experimentellen Vorgabe nach unterschiedlichen Ischämiezeiten sowohl in flüssigem Stickstoff (N₂) kryokonserviert als auch Formalin-fixiert und paraffineingebettet. Klinisch und histopathologisch wurden die Tumore nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC) klassifiziert (Sobin et al., 2010). Die Asservierung der Gewebeproben erfolgte in Kooperation mit dem Münchener Biotech Spitzencluster m4 in der Biobank des Instituts für Pathologie der Technischen Universität München. Alle Patienten gaben ihre Zustimmung zur Verwendung ihrer Gewebeproben zu Forschungszwecken ("informed consent"). Die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München hat mit Schreiben vom 05.11.2010 keine Einwände gegen die Tumorbank am Institut für Pathologie erhoben. Insgesamt wurden 54 verschiedene Gewebeproben von 6 Patienten für diese Arbeit analysiert.

Tabelle 7: Überblick über die verwendeten HCC-Gewebeproben.

Patienten ID (n=6)	22	43	47	57	69	87
Kalte Ischämie (min)	18	28	33	13	28	19
Experimentelle Verzögerung bis zur Fixierung (min)	0, 30, 60, 120	0, 30, 60	0, 30, 60	0, 30, 60	0, 30, 60	0, 30, 60, 120
Fixierung	LN _{2,} FFPE	LN_2	LN _{2,} FFPE	LN_2	LN_2	LN_2
Staging	pT3b, pNX, cM0, V1, R0	pT1, cN0, cM0, R0	pT2, pN0 (0/1), L1, R0	pT1, pN0 (0/1), R0	pT1, Nx, Mx, R0	yrpT3, NX, M1 (ADR), Rx
Grading	G2	G2	G2	G2	G2	G2
Größe Kryogewebe Tumor Omin	13x5mm	7x5mm	7x5mm	9x4mm	10x5mm	6x6mm
Größe Kryogewebe Tumor 30min	7x3mm	10x5mm	5x4mm	8x5mm	10x4mm	5x3mm
Größe Kryogewebe Tumor 60min	5x3mm	7x5mm	6x4mm	8x5mm	5x5mm	6x5mm
Größe Kryogewebe Tumor 120min	7x5mm					7x5mm
Größe Kryogewebe Referenz Omin	10x5mm	12x5mm	6x5mm	6x4mm	10x5mm	6x6mm
Größe Kryogewebe Referenz 30min	6x5mm	7x4mm	8x7mm	6x4mm	5x5mm	6x4mm
Größe Kryogewebe Referenz 60min	6x5mm	15x5mm	10x6mm	5x4mm	6x5mm	5x5mm
Größe Kryogewebe Referenz 120min	5x5mm					5x5mm
Größe FFPE Gewebe Tumor Omin	13x7mm		10x7mm			
Größe FFPE Gewebe Tumor 30min	19x15mm		11x8mm			
Größe FFPE Gewebe Tumor 60min	17x12mm		10x6mm			
Größe FFPE Gewebe Tumor 120min	20x15mm					
Größe FFPE Gewebe Referenz Omin	12x10mm		10x5mm			
Größe FFPE Gewebe Referenz 30min	15x8mm		7x7mm			
Größe FFPE Gewebe Referenz 60min	12x7mm		9x7mm			
Größe FFPE Gewebe Referenz 120min	11x9mm					

Patient 22	Gefrierschnitte	FFPE	Probenanzahl
Tumor	0 30 60 120 min	0 30 60 120 min	8
Referenz	0 30 60 120 min	0 30 60 120 min	8
Anzahl	8	8	Gesamt 16

Patient 43	Gefrierschnitte	FFPE	Probenanzahl
Tumor	0 30 60 min		3
Referenz	0 30 60 min		3
Probenanzahl	6	0	Gesamt 6

Patient 47	Gefrierschnitte	FFPE	Probenanzahl
Tumor	0 30 60 min	0 30 60 min	6
Referenz	0 30 60 min	0 30 60 min	6
Probenanzahl	6	6	Gesamt 12

Patient 57	Gefrierschnitte	FFPE	Probenanzahl
Tumor	0 30 60 min		3
Referenz	0 30 60 min		3
Probenanzahl	6	0	Gesamt 6

Patient 69	Gefrierschnitte	FFPE	Probenanzahl
Tumor	0 30 60 min		3
Referenz	0 30 60 min		3
Probenanzahl	6	0	Gesamt 6

Patient 87	Gefrierschnitte			FFPE	Probenanzahl
Tumor	0 30	60	120 min		4
Referenz	0 30	60	120 min		4
Probenanzahl		8		0	Gesamt 8

Abbildung 4: Überblick über die verwendeten Gewebeproben.

Insgesamt wurden 54 verschiedene Gewebeproben von 6 Patienten mit einem HCC untersucht. Bei Patient 22 wurden vier experimentell verzögerte kalte Ischämiezeiten (0, 30, 60 und 120 Minuten) für jeweils Tumor und Referenzgewebe erstellt. Beide Gewebetypen wurden sowohl schockgefroren als auch Formalin-fixiert und paraffineingebettet. Von Patient 47 wurden drei Ischämiezeiten (0, 30 und 60 Minuten) für Tumor und Referenzgewebe erstellt. Auch hier wurde Kryomaterial und FFPE-Material gewonnen. Patient 43, 57 und 69 haben jeweils drei Ischämiezeiten (0, 30 und 60 Minuten) für schockgefrorenes Gewebe, Patient 87 vier Ischämiezeiten (0, 30, 60 und 120 Minuten) für schockgefrorenes Gewebe.

3.1.5. Geräte

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Entwicklermaschine SRx-101A	Konica Minolta (Langenhagen)
Eismaschine	Scotsman Ice (Vernon Hills, USA)
E-BOX VX2 Geldokumentationssystem	PeqLab (Erfurt)
EpMotion 5075	Eppendorf (Hamburg)
Expert Plus Photometer	Asys (Eugendorf, Österreich)
Gelelektrophoresekammer Mini Sub Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
Histokinet Shandon Pathcentre	GMI (Denver, USA)
HPScanjet3770	Hewlett-Packard (Dornach)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Kryostat CM 1950	Leica (Wetzlar)
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laborwaage	Sartorius (Göttingen)
Mikrotom HM340E	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
MINIOTORI TIMISTOL	USA)
Mini Trans-Blot Cell System	Bio-Rad (Hercules, USA)
MS1 Minishaker	IKA Works (Wilmington, USA)
pH-Meter (pH 211)	HANNA instruments (Woonsocket, USA)
Pipette Pipetman (20, 100, 1000 μl)	Gilson (Middleton, USA)
Pipetten Eppendorf Research (10, 100, 1000 μl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipetus-akku Pipetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstad)
Scanner, Canon Scan 8800F	Canon (Krefeld)
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad (Hercules, USA)
SpotBot Extreme Microarray Spotter	Arrayit Corporation (USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tissuelyser TL	Qiagen (Venlo, Niederlande)
UV/Vis Spectrophotometer 530	Beckman Coulter (Brea, USA)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

3.1.6. Software

Tabelle 9: Für die Datenauswertung und Abbildungserstellung verwendete Software.

Software	Quelle
Adobe Photoshop Version C3	Adobe Systems (San Jose, USA)
Aperio Image ScanScope (Version 11.2.0.780)	Aperio (Vista, USA)
Cluster (Version 2.11)	http://rana.lbl.gov/EisenSoftware-htm
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html
Microsoft Office 2003	Microsoft (Redmond, USA)
MicroVigene (Version 3.5.0.0)	VigeneTech (Boston, USA)
SPSS für Windows (Version 23.0)	SPSS Inc. (Chicago, USA)
Tree View (Version 1.6)	http://rana.lbl.gov/EisenSoftware-htm

3.2. Methoden

3.2.1. Gewebeprozessierung und Ischämiezeiten

Sechs Patienten mit einem HCC wurde Tumorgewebe und jeweils korrespondierendes peritumorales Referenzgewebe im Rahmen von Lebersegmentresektionen bzw. Hemihepatektomien in der Chirurgischen Klinik des Klinikum rechts der Isar reseziert. Die Gewebeproben wurden bereits im OP durch einen Pathologen makroskopisch beurteilt und in malignes und nicht-malignes Gewebe unterteilt, in gleichmäßig große Probenstücke, von ca. 5 x 5 x 5 mm Größe aliquotiert und in flüssigem Stickstoff (N2) schockgefroren. Das Gewebematerial von zwei Patienten wurde zusätzlich in Formalin fixiert und Paraffin eingebettet (Patient 22 und 47). Limitiert wurde die Probenanzahl durch die Größe des Gesamtresektats. Daher stand teilweise nicht ausreichend Gewebe zur Erstellung weiterer FFPE-Blöcke zur Verfügung. Auch der Zeitraum der Ischämie musste aus diesem Grund auf 60 Minuten begrenzt werden. Lediglich bei zwei Patienten (Patient 22 und 87) war genug Material vorhanden um einen weiteren Zeitpunkt nach 120 Minuten zu etablieren. Durch die Begutachtung und das Bearbeiten der Gewebestücke variierte die Postresektionszeit zwischen 13 und 33 Minuten und betrug im Durchschnitt 23 Minuten. Diese Zeit konnte auf ein Minimum reduziert werden, da bereits im Operationssaal die Proben fixiert und eine Verzögerung durch den Transport in das Institut für

Pathologie verhindert werden konnte. Um eine verlängerte präanalytische Phase bis zur Fixierung zu simulieren, wurden die einzelnen Gewebepaare (Tumor und Referenzgewebe) nach unterschiedlich festgelegten experimentellen Zeiten (kalte Ischämie), 30, 60 und 120 Minuten nach Postresektionszeit, in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die vorgegebenen Zeiten sollen eine möglichst realistisch verzögerte Gewebeprozessierung in der klinischen Routine widerspiegeln. Bis zur molekularen Analyse mittels RPPA-Technologie wurden die Kryoproben in flüssigem Stickstoff und die FFPE-Proben bei 4°C im Dunkeln gelagert. Insgesamt wurden 54 Gewebeproben untersucht. Davon waren 40 Gefrierproben und 14 FFPE-Proben.

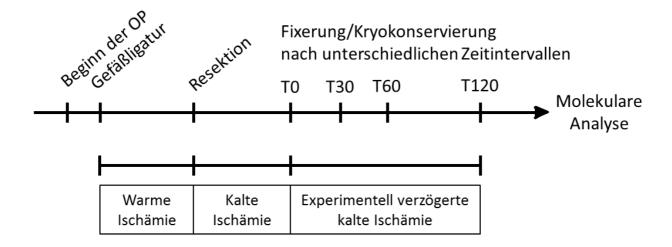


Abbildung 5: Präanalytische Phase von der Gewebegewinnung bis zur molekularen Analyse.

Die warme Ischämie ist die Zeit zwischen Gefäßligatur und Resektion. Die Postresektionszeit bis zur Fixierung/Kryokonservierung wird als kalte Ischämie definiert und wurde experimentell um 30 bis 120 Minuten verlängert (modifiziert nach Becker, 2015).

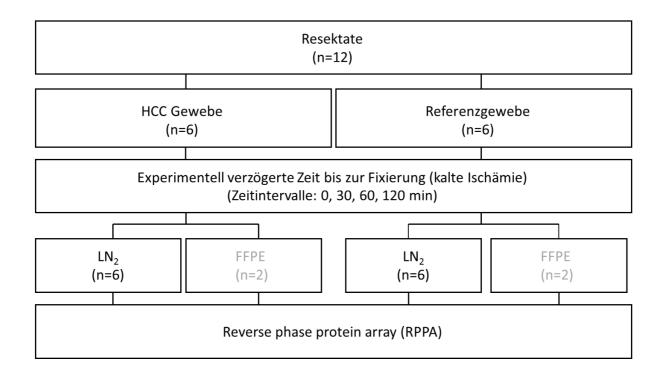


Abbildung 6: Studiendesign der klinischen Gewebeproben.

HCC Gewebe und korrespondierendes peritumorales Lebergewebe (Referenzgewebe) wurde gesammelt, aliquotiert, unterschiedlich kalten Ischämiezeiten ausgesetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe von zwei Patienten wurde zusätzlich in Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet. Die molekulare Analyse erfolgte mittels RPPA-Technologie.

3.2.2. Herstellung von FFPE-Gewebeblöcken

Die Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung (FFPE) von Gewebeproben gehört schon seit Jahrzehnten zum Standardverfahren der Gewebeverarbeitung in der Pathologie. Durch die Fixierung mit Formalin kommt es zu einer Quervernetzung von Proteinen und Nukleinsäuren und zu einer Konservierung der Gewebemorphologie. In Abhängigkeit der Resektatgröße und dem Operationszeitpunkt dauert die vollständige Fixierung 24-48 Stunden und durchläuft zur Entwässerung des Gewebes eine aufsteigende Alkoholreihe (1x 1 Std. 70% Ethanol, 2x 1 Std. 96% Ethanol, 3x 1 Std. 100% Isopropanol, 2x 1 Std. Xylol). Das im Gewebe vorhandene Wasser wird hierbei durch ein Einbettungsmedium (Xylol) ersetzt. Danach erfolgt die Einbettung in erwärmtem, verflüssigtem Paraffin. Das Paraffin lässt man in kleinen Formen erkalten und erstarren. Es entstehen kleine Paraffinquader, die die Gewebeproben beinhalten und an Spezialgeräten, sogenannten Mikrotomen, geschnitten werden können.

3.2.3. Proteinextraktion

3.2.3.1. Proteinextraktion aus FFPE-Gewebe

In vorangegangenen Arbeiten von Becker *et al.* konnte ein effizientes Extraktionsverfahren von Proteinen aus FFPE-Gewebe gezeigt und optimiert werden (Becker et al., 2007; Becker et al., 2008). Nachdem an einem Schlittenmikrotom 10 µm dicke Schnitte der FFPE-Gewebe angefertigt und auf einen Glasobjektträger aufgezogen wurden, wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (3x 10 Min. Xylol, 2x 10 Min. 100% Isopropanol, 2x 10 Min. 96% Ethanol, 2x 10 Min. 70% Ethanol) entparaffiniert, rehydriert und anschließend in destilliertem Wasser aufbewahrt. Zusätzlich wurden von jedem FFPE-Block 3 µm dicke Schnitte angefertigt, HE-gefärbt und von einer Fachärztin für Pathologie (OÄ PD Dr. Slotta-Huspenina) mikroskopisch als HCC und nicht-malignes Lebergewebe befundet. Das Tumorgewebe der ungefärbten Gewebeschnitte wurde in Extraktionspuffer EXB Plus (Qiagen, Hilden) überführt, 15 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Min. bei 100°C im Wasserbad gekocht. Zur Stabilisierung der Proteine wurden dem Extraktionspuffer spezielle Kinase-, Protease- und Phosphataseinhibitoren beigefügt. Nach weiteren zwei Stunden auf dem Heizblock bei 80°C und 750 rpm wurden die Proben 15 Min. bei 4°C und 12000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bei -80°C eingefroren.

3.2.3.2. Proteinextraktion aus schockgefrorenem Gewebe

Für die Proteinextraktion aus schockgefrorenem Gewebe wurden am Kryostat ebenfalls $10~\mu m$ dicke Schnitte angefertigt. Für die HE-Färbung betrug die Schnittdicke $5~\mu m$. Auch hier erfolgte eine histopathologische Begutachtung. Nach Überführung in Extraktionspuffer EXB Plus (Qiagen, Hilden) wurde das Gewebe in einem vorgekühlten Gewebehomogenisator (Tissue Lyser) für $4~\mu m$ Min. bei $50~\mu m$ homogenisiert und bei $4^{\circ} C$ und $12500~\mu m$ zentrifugiert. Das Lysat wurde vorsichtig abgenommen und bei $-80^{\circ} C$ gelagert.

3.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Standardfärbung in der Pathologie ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). In einem ersten Schritt färben sich die Zellkerne durch die Hämatoxylinlösung dunkelblau. Danach erfolgt die Gegenfärbung mit Eosin, welche Zytoplasma, Erythrozyten, Kollagen und Keratin rot erscheinen lässt.

Die FFPE-Schnitte wurden nach Inkubation über Nacht bei 56°C in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Nach 10 Minuten Färbung im Hämatoxylinbad, wurden die Schnitte in einem Waschschritt unter fließendem Wasser gespült und zehnminütig in Eosin gegengefärbt. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate durch ein mit Pertex beschichtetes Deckglas konserviert.

Die geschnittenen und aufgezogenen Kryopräparate wurden zunächst in einer Lösung aus Ethanol und Essigsäure (95 ml 100% Ethanol und 5 ml Essigsäure) für eine Minute fixiert. Nach einem kurzen Waschschritt in destilliertem Wasser erfolgte die eigentliche Färbung mit Hämatoxylin und Eosin, die äquivalent zur FFPE-Färbung ist.

3.2.5. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

3.2.5.1. Bradford-Assay

Die exakte Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate erfolgte mittels Bradford-Assay. Grundlage ist die photometrische Bestimmung der maximalen Absorption des Farbstoffes Coomassie Brillant Blue, der nach Bindung an basische und aromatische Aminosäuren im sauren Milieu einen Farbumschlag nach 595 nm zur Folge hat, der linear proportional zur Proteinmenge ist. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin zwischen 1,6 und 50 μ g/ml verwendet. Zur genauen Messung wurden 900 μ l des 1:5 verdünnten BioRad Proteinassay *dye reagent*-Konzentrat vorgelegt und mit 100 μ l einer 1:100 verdünnten Lösung der zu untersuchenden Probe in einer transparenten Küvette vermengt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben im UV/Vis Spectrophotometer 530 (Beckman Coulter) bei einer OD von 595 nm gemessen. Die Berechnung der genauen Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve in Microsoft Excel.

3.2.5.2. Sypro-Ruby-Färbung

Für die Normalisierung der Antikörpersignale auf das Gesamtprotein, erfolgte die Bestimmung der totalen Proteinmenge an einem repräsentativen *Reverse Phase Protein Array Slide* (vgl. 3.2.7.) mittels Sypro-Ruby-Färbung. Nach einer fünfminütigen Equilibrierung des gespotteten Nitrozellulose-beschichteten Objektträgers in TBST und einer Inkubation mit einer 10% Methanol/7% Essigsäure Lösung für 15 Minuten, wurde der Objektträger nach mehrmaligem Waschen in destilliertem Wasser für 10 Minuten in der Sypro-Ruby-Lösung gefärbt. Hintergrund des Färbeverhaltens sind nicht-kovalente Wechselwirkungen organmetallischer Ruthenium-

Metallkomplexe mit basischen Aminosäuren. Nach einem abschließendem Waschgang mit *Aqua dest.* erfolgte die Signaldetektion unter UV-Licht mit dem E-BOX VX2 Geldokumentationssystem (PeqLab).

3.2.6. Western Blot

3.2.6.1. SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyarylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein analytisches Verfahren, bei dem Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und negativ geladen. Ein Lösen der Disulfidbindungen, um eine weitgehende Linearisierung der Proteine zu erreichen, erfolgte durch das Reduktionsmittel ß-Mercaptoethanol, das dem Extraktionspuffer beigefügt wurde. Durch einen weiteren Thermoschritt für 5 Minuten bei 95°C konnten die Proben nahezu vollständig denaturiert werden.

Nach Anfertigung eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels, bestehend aus Trenn- und Sammelgel, wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gespannt und mit 1x SDS Laufpuffer befüllt. In eingelassene Geltaschen wurden die vorbereiteten Proben und ein Proteinmarker peqGOLD Prestained Protein-Marker V pipettiert. Die SDS-PAGE lief bei 100 Volt für etwa 2 Stunden.

3.2.6.2. Proteintransfer

Für die Immundetektion mit Antikörpern müssen die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. In einem geschichteten "Sandwich" aus Schwämmen, Filterpapier, Polyacrylamidgel und Nitrozellulosemembran, das im Mini Trans-Blot Cell System (BioRad) von gekühltem Transferpuffer umgeben ist, wandern die negativ geladenen Proteine bei 100V für 90 Minuten vom Gel auf die anodenseitige Membran.

3.2.6.3. Immundetektion der Blots

Nach erfolgreichem Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgt die Immundetektion mittels Antikörper. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran in 5% Magermilchlösung für mindestens eine Stunde geblockt. Nach einer halbstündigen Waschung in TBST, erfolgte unter Schütteln die Inkubation mit einer spezifischen primären Antikörperlösung

(vgl. 3.1.3.) über Nacht bei 4°C. Nach erneutem Waschen in TBST wurde die Membran für eine Stunde im Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterer Waschung und einem kurzen Trocknungsschritt der Membran erfolgte die eigentliche fünfminütige Detektion der Signale in einer Chemolumineszenz-Substratlösung (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare). Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase löst die Chemolumineszenzreaktion aus. Das enthaltene Luminol wird oxidiert, geht in den angeregten Zustand über, fällt in den Grundzustand zurück und setzt Energie in Form von Licht frei, welches mit einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Die Belichtungszeiten betrugen je nach Signalintensität zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten. Die Entwicklung der Filme erfolgte in der Entwicklermaschine SRx-101A (Konica Minolta).

Unspezifische Antikörper zeigen Abbauprodukte oder Proteinmodifikationen, die in Form von unerwünschten Signalen auf dem Western Blot erscheinen. Diese würden im Reverse Phase Protein Array unentdeckt bleiben und zu einer Fehlinterpretation der Signalintensität führen (Berg et al., 2010-1). Daher wurde jeder in dieser Arbeit genutzte Antikörper durch eine vorangegangene Western Blot Analyse auf seine Spezifität untersucht (vgl. 4.1.).

3.2.7. Reverse Phase Protein Array

Die Technologie des *Reverse Phase Protein Array* basiert auf dem Prinzip des Western Blots, jedoch ohne die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts. Nach dem Transfer denaturierter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran werden sie mittels spezifischer Antikörper immunologisch detektiert. Vorteil dieses Hochdurchsatz-Verfahrens ist die Analyse einer Vielzahl von Molekülen bei geringem Probeneinsatz in kürzester Zeit. Das Prinzip der RPPAs wurde 2001 von Paweletz *et al.* vorgestellt (Paweletz et al., 2001). Im Folgenden soll diese Technologie genauer beschrieben werden.

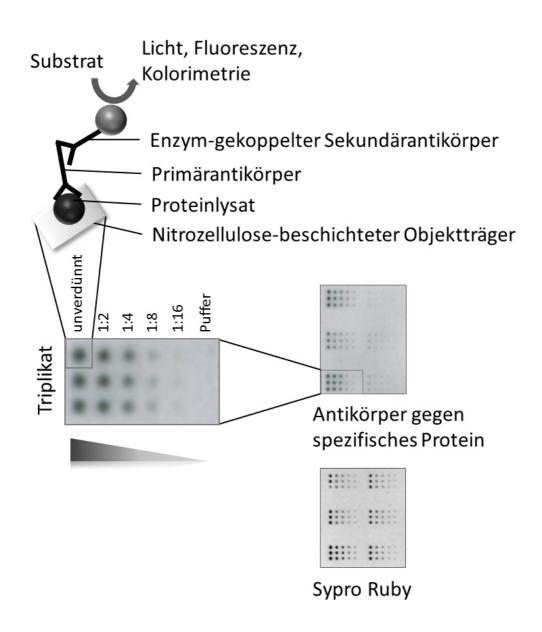


Abbildung 7: Prinzip des Reverse Phase Protein Array (RPPA).

Proteinlysate wurden als Triplikat in Verdünnungsreihen auf Nitrozellulose-beschichtete Objektträger gespottet und mittels hochspezifischer Antikörper detektiert. Eine Normalisierung auf das Gesamtprotein erfolgte mittels Sypro-Ruby-Färbung. Nach Bindung eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers können die Proteinlevel anhand der Signalstärke erfasst werden (modifiziert nach Berg et al., 2012).

3.2.7.1. Herstellen von Verdünnungsreihen

In einem vollautomatisierten Arbeitsschritt mit dem Pipettierroboter EpMotion 5075 (Eppendorf) erfolgte die exakte Befüllung einer 384-Loch Mikrotiterplatte mit den

Gewebelysaten. Hierfür wurden von jeder Probe Verdünnungsreihen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, Pufferkontrolle) mit exakten Volumina von 10 µl pro Loch erstellt, um später möglichst alle Antikörper/Protein-Kombinationen im optimalen, linearen Bereich zu erfassen. Alle Proteinlysate wurden im Vorfeld auf eine gemeinsame Ausgangskonzentration von 2mg/ml verdünnt, um eine Varianz der Signalintensitäten zu minimieren. Vorteile des automatischen Pipettierens sind der Ausschluss manueller Pipettierfehler und die Gewährleistung einer bestmöglichen Reproduzierbarkeit des Experiments.

3.2.7.2. Spotten der Proteinlysate

Die Proteinlysate wurden dann aus der 384-well Mikrotiterplatte mit Hilfe von Microarray Spotting Pins PTS200 (Point Technologies) in einer exakt festgelegten Reihenfolge auf einen Nitrozellulose-beschichteten Glasobjektträger gedruckt, wo sie über hydrophobe Wechselwirkung haften blieben. Jede einzelne Verdünnungsreihe wurde als Triplikat gespottet (18 Spots pro Probe). Dieser Prozess geschah ebenfalls vollautomatisiert mittels SpotBot Extreme Microarray Spotter (Arrayit). Das Volumen jeder aufgetragenen Proteinprobe auf die verwendeten Oncyte Avid Nitrozellulose Slides (Grace Bio-Labs) betrug nach Herstellerangaben exakt 1 nl.

3.2.7.3. Immundetektion der Arrays

Nach zehnminütiger Equilibrierung in TBST, wurden die Arrays zunächst für eine Stunde in einer Peroxidase Blocking Solution (Dako) inkubiert, um eine mögliche endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren. Nach Waschung in TBST erfolgte die Antikörperdetektion analog zum Western Blot Protokoll (3.2.6.3).

3.2.7.4. Quantifizierung der Intensität mit MicroVigene

Die eingescannten und digitalisierten Signale der Arrays wurden mit der Analysesoftware MicroVigene ausgewertet. Die Stärke der einzelnen Punkte wurde anhand des Schwärzungsgrades der einzelnen Pixel abzüglich des spotumgebenden Hintergrundes bestimmt sowie mit der Gesamtproteinintensität (Sypro-Ruby-Färbung) derselben Probe verrechnet und normalisiert. Aus den Triplikaten wurde der Mittelwert ermittelt und die Signalstärke der Proteine bestimmt.

3.2.8. Statistik

3.2.8.1. Friedman-Test

Der Friedman-Test (Theodorsson-Norheim, 1987) eignet sich als nichtparametrisches Verfahren zur Untersuchung von drei oder mehr gepaarten Proben. Voraussetzung ist, dass die Werte innerhalb der Stichproben unabhängig voneinander sind. Anstatt real gemessener Werte wird eine Rangfolge der Werte verwendet. Bei *p*-Werten kleiner 0,05 geht man davon aus, dass mindestens ein Medianwert einer getesteten Probe sich signifikant von den anderen Proben unterscheidet. Bei statistisch signifikanten *p*-Werten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet, um das genaue Wertepaar zu identifizieren.

3.2.8.2. Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Wilcoxon, 1946) ermöglicht den Vergleich zweier unabhängiger Untersuchungsgruppen hinsichtlich der unterschiedlichen Proteinlevel, unabhängig von Verteilungsannahmen. Auch hier beruht die Analyse auf einer Sortierung der Werte. Über die mittleren Rangsummen werden relevante Verteilungsunterschiede der entsprechenden Zielgrößen zwischen zwei Vergleichsgruppen festgestellt.

3.2.8.3. Hierarchische Clusteranalysen

Hierarchische Clusteranalysen wurden zur Darstellung von Zusammenhängen mehrerer Proteinlevel durchgeführt. Mit Hilfe des Softwarepakets Cluster/Treeview (Eisen et al., 1998) wurden die Cluster berechnet und die unterschiedlichen Proteinlevel in sog. *heat maps* dargestellt. Der Spearman Korrelationskoeffizient r_s berechnete die Abstände zweier Proben. Die Zusammenfassung der Cluster erfolgte nach dem *average linkage* Verfahren. Diese Methode berechnet den Abstand zweier Gruppen als Mittelwert der Abstände aller Gruppenpaare.

4. Ergebnisse

Exakte quantitative Bestimmungen von Biomarkern in klinischen Gewebeproben haben in den letzten Jahren für den Erfolg einer personalisierten Tumortherapie immer mehr an Bedeutung gewonnen. Bislang ist jedoch nur wenig über präanalytische Einflüsse während der Gewebeprozessierung auf die Integrität von Proteinbiomarker bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse einer verzögerten Gewebefixierung nach definierten Intervallen der kalten Ischämie (0, 30, 60 und 120 Minuten) und die Art der Fixierung (N₂ und FFPE) auf 29 Proteinund Phosphoproteinspiegel in 6 humanen hepatozellulären Karzinomen und dazu korrespondierendem Referenzgewebe zu erfassen.

Eine ideale Methode zur quantitativen, reproduzierbaren Erfassung der unterschiedlichen Proteinspiegel stellt der Reverse Phase Protein Array (RPPA) dar, der die simultane Untersuchung einer Vielzahl von Proteinen und Phosphoproteinen in verschiedenen klinischen Gewebeproben ermöglicht. Voraussetzung dieser Methode ist die Verwendung hochspezifischer Antikörper.

4.1. Antikörpervalidierung

Da bei der Technologie des Reverse Phase Protein Array im Gegensatz zum konventionellen Western Blot keine elektrophoretische Auftrennung der Analyte nach Molekulargewicht erfolgt, sondern die Auswertung nur auf einer Signalstärke des Proteins im Gesamtlysat beruht, müssen hochspezifische Antikörper verwendet werden. Kommt es zu unerwarteten, unspezifischen Signalen, die als Abbauprodukte oder Proteinmodifikationen auftreten können, wird die Auswertung in der RPPA-Analyse verfälscht und der Antikörper kann nicht verwendet werden. Daher muss jeder Antikörper vor seiner Anwendung im RPPA auf seine Spezifität validiert werden (Berg et al., 2010-1). Durch die kombinierte Anwendung von Antikörpern sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie gelang es mir, die Spezifität von Antikörpern in FFPE-Gewebeproben zu zeigen. So konnte ich in einem Mehrschrittprozess veranschaulichen, dass hochspezifische Antikörper exakt an das Antigen mit entsprechendem molekularem einer anschließenden Immunhistochemie Gewicht (Western Blot) und in Feingewebsschnitten derselben Gewebeprobe an den zu erwartenden zellulären Strukturen binden (Schuster et al., 2012). Die meisten in dieser Arbeit genutzten Antikörper wurden im Western Blot an humanen FFPE-Gewebeproben von Mammakarzinomen validiert. Problematisch war, dass einige große Proteine (Her2, Her3, p-Her3(Tyr1289), VEGFR,

p-VEGFR(Tyr1175)) kaum in das Polyacrylamidgel einwanderten und somit unspezifische Banden detektiert wurden. Dieses Phänomen kann durch die unvollständige Spaltung von Quervernetzungen während der Proteinextraktion aus FFPE-Gewebe erklärt werden, die insbesondere große Proteine betrifft. Um dennoch die Spezifität dieser Antikörper nachzuweisen, habe ich zusätzlich Extrakte aus schockgefrorenem Brustkrebsgewebeproben verwendet (Abb. 8, B). Die Spezifität von HGF, MET, p-MET(Tyr1234/1235), GSK-3ß, p-GSK-3ß(Ser9) und Axin wurde an humanen kryokonservierten HCC-Gewebe validiert, da diese Moleküle insbesondere in hepatozellulären Karzinomen erhöhte Proteinspiegel zeigen (Breuhahn et al., 2006). Entscheidendes Kriterium war die Detektion einer singulären, spezifischen Bande auf Höhe des korrekten molekularen Gewichts. Auch spezifische Mehrfachbanden, die durch Dimere, Spaltprodukte oder Isomere erklärbar waren und nach Rücksprache mit dem Hersteller bestätigt wurden, z.B. bei P-Erk (Thr202/Tyr204) (Abb. 8, C), konnten als spezifisch gewertet werden, sofern die Banden das korrekte molekulare Gewicht zeigten. Alle getesteten Antikörper, die diese Kriterien nicht erfüllt haben, wurden ausgeschlossen. Bei der Auswahl der Gewebeproben für die Antikörpervalidierung habe ich speziell darauf geachtet, dass sowohl negative als auch positive Patientenproben gezeigt wurden, um die Spezifität zu veranschaulichen. Als Ladekontrolle wurde das ubiquitär vorkommende Zytoskelettprotein ß-actin verwendet, um eine gleichmäßige Ladung der Proben in allen Taschen und eine korrekte Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran während des Western Blots zu zeigen. Alle in Tabelle 5 aufgelisteten 29 Antikörper wurden vor ihrer Anwendung im RPPA auf diese Art validiert.

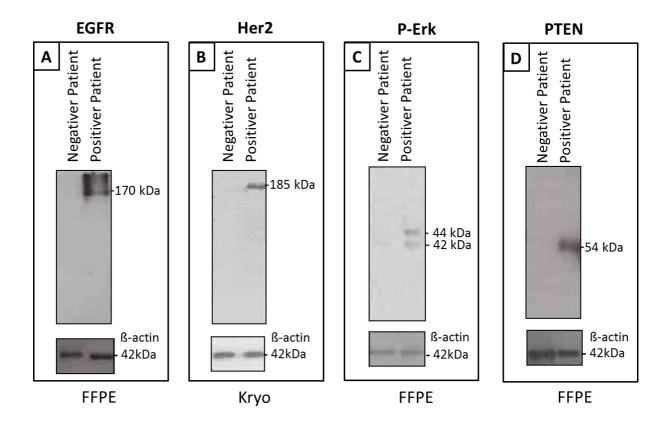


Abbildung 8: Auswahl von in dieser Arbeit verwendeten hochspezifischen Antikörpern.

Nachweis der Spezifität von Antikörpern im Western Blot. Es wurden Proteinlysate von formalinfixierten und schockgefrorenen Brustkrebsgewebeproben verwendet. EGFR (A) weist eine spezifische Bande bei 170 kDa auf. Aufgrund der Proteingröße (185 kDa) wurden bei Her2 (B) Extrakte aus kryokonservierten Gewebeproben eingesetzt. Auch hier zeigt sich ein spezifisches Signal. P-Erk (Thr202/Tyr204) (C) zeigt spezifische Doppelbanden bei 42 kDa und 44 kDa. PTEN (D) weist eine singuläre Bande bei 54 kDa auf. Für diese Moleküle negative Patienten zeigen kein Signal. Das in den meisten Zellarten vorkommende ß-actin wurde als Ladekontrolle verwendet und macht eine gleichmäßige Probenladung der Proteinlysate sowie eine korrekte Übertragung auf die Membran während des Western Blottens deutlich.

4.2. Reproduzierbarkeit des Reverse Phase Protein Array

Eine weitere Herausforderung bei der Verwendung von Reverse Phase Protein Arrays ist die Variabilität und Vergleichbarkeit der Signalstärken zwischen verschiedenen Arrays, die mit demselben Antikörper analysiert wurden. In Voruntersuchungen habe ich sowohl die Abweichungen im Inter-Array-Vergleich, also zwischen zwei Arrayansätzen, als auch im Inter-Extraktions-Vergleich, d.h. zwischen zwei unabhängigen Extraktionsansätzen, genauer analysiert. Hierfür wurden 10 FFPE-Brustkrebsgewebeproben je drei Mal extrahiert und auf zwei Arrays gespottet. Die Objektträger wurden mit einem Her2 Antikörper detektiert und die

Signale, nach Normalisierung am Gesamtprotein (Sypro Ruby), quantitativ erfasst. Die Normalisierung ist notwendig, da die *absoluten* Intensitätswerte nur innerhalb eines einzelnen Arrays verglichen werden können. Die statistische Auswertung ergab für den Inter-Array-Vergleich einen mittleren Varianzkoeffizient CV (Verhältnis von Standardabweichung und Mittelwert) von ca. 17% und für den Inter-Extraktions-Vergleich einen CV von ca. 15%. In einer weiteren Versuchsreihe habe ich Referenzstandards aus rekombinanten Her2 Protein in exakt definierten Mengen mit Patientenproben auf die Slides übertragen. Dadurch ließen sich die Gesamtproteinmengen zwischen verschiedenen Arrays vergleichen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle durchgeführten Ansätze gute Übereinstimmungen lieferten, und die Reproduzierbarkeit des RPPA bestätigt werden konnte (Berg et al., 2010-1).

4.3. Histopathologische Beurteilung

Für die histopathologische Qualitätskontrolle wurden fast hundert klinische Gewebeproben an Spezialmikrotomen geschnitten, Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopiert. Als Ausschlusskriterium für die Verwendung der Gewebeproben wurde ein nekrotischer Anteil von ≥10% festgelegt. Nach eingehender mikroskopischer Untersuchung wurde jedes Tumorpräparat auf das vollständige Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms jeder Referenzgewebsschnitt auf komplette Tumorfreiheit überprüft. Alle Tumoren waren laut WHO-Kriterien mäßig differenziert (G2). Die Ergebnisse wurden durch eine erfahrene Fachärztin für Pathologie (OÄ PD Dr. Slotta-Huspenina) überprüft und bestätigt. Der Tumoranteil der Gewebeproben betrug immer nahezu 100%, Präparate mit erhöhtem Nekrose-, Stroma- und Entzündungsanteil wurden ausgeschlossen, sodass eine Mikrodissektion nicht erforderlich war. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit das HCC als Modell ausgewählt, da es im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten eine morphologisch relativ homogene Tumorverteilung zeigt und sich somit besser für eine vergleichende Analyse mehrerer zerteilter Gewebeproben eignet, die zu Beginn der kalten Ischämie möglichst gleiche Eigenschaften aufweisen sollten. Im Gegensatz dazu wären andere Tumorentitäten, wie beispielsweise das Kolonkarzinom, weniger gut geeignet, da sich die zu untersuchenden Präparate aus verschiedenen Gewebeschichten zusammensetzen und eine aufwändige Mikrodissektion erforderlich gewesen wäre. Diese zusätzliche Variable konnte durch die Verwendung von Leberkarzinomen vermieden werden. Nach kritischer Beurteilung wurden 54 klinische Gewebeproben in das Kollektiv aufgenommen. Davon waren 27 Tumorgewebeproben und 27 korrespondierendes morphologisch unauffälliges Lebergewebe. Die folgende Abbildung soll die relative morphologische Homogenität der unterschiedlichen Gewebealiquote innerhalb eines Patienten und somit die Eignung dieser Entität für die Durchführung der in dieser Arbeit vergleichenden Analyse verdeutlichen. Selbstverständlich konnte die biologische Heterogenität, insbesondere auf molekularer Ebene, innerhalb eines Tumors in dieser Versuchsreihe nicht ausgeschlossen werden. Die Abbildungen A-D (Abb. 9) zeigen stellvertretend das mikroskopische Bild eines hepatozellulären Karzinoms ethyltoxischer Genese (Patient 22) über alle Zeitpunkte der experimentell verzögerten Ischämie. Die trabekulär angeordneten Tumorzellen mit breitem eosinophilen Plasma zeigen deutlich vergrößerte pleomorphe Zellkerne mit Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten der Kerne. Zusätzlich ist ein erhöhtes vergröbertes Chromatin erkennbar. In E-H sind die korrespondierenden tumorfreien Lebergewebe desselben Patienten abgebildet, die keine Atypien zeigen.

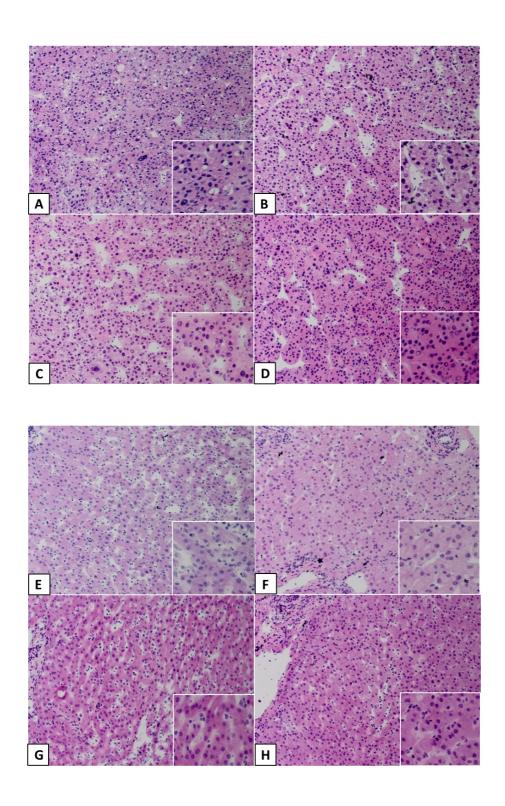


Abbildung 9: Ausgewählte HE-gefärbte Kryoschnitte eines Patienten zur Darstellung der morphologischen Homogenität der Gewebeproben.

A-D: HCC mit vergrößerten pleomorphen Zellkernen und erhöhtem vergröbertem Chromatin. E-H: Korrespondierendes tumorfreies Lebergewebe. Vergrößerte Ausschnitte zur Veranschaulichung der Morphologie. Experimentelle Verzögerung der kalten Ischämie bis zur Fixierung in flüssigem Stickstoff (N₂): A,E: 0 Minuten; B,F: 30 Minuten; C,G: 60 Minuten; D,H: 120 Minuten. (Hämatoxylin & Eosin, großer Ausschnitt: Vergr. 100x, kleiner Ausschnitt: Vergr. 200x)

4.4. Einfluss unterschiedlicher Ischämiezeiten auf die Proteinspiegel humaner Gewebeproben

Um den Einfluss unterschiedlicher Ischämiezeiten auf den Proteinlevel humaner Gewebeproben zu evaluieren, wurden geteilte Proben des hepatozellulären Karzinoms und peritumoröses korrespondierendes Lebergewebe zu unterschiedlich experimentellen Zeiten (0, 30, 60 und 120 Minuten) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, dass möglichst eine realitätsnahe Verzögerung im klinischen Routinealltag simuliert werden konnte. Nach Fixierung in flüssigem Stickstoff (N2), Aufarbeitung und Proteinextraktion der Gewebeproben, erfolgte die quantitative Analyse der unterschiedlichen Proteinlevel mittels RPPA-Technologie. Eine molekulare Proteinkartierung aus einer Auswahl von 29 Signalwegsund Rezeptormolekülen, die erhebliche regulatorische Einflüsse auf Wachstum, Differenzierung, Angiogenese und Überleben hat, wurde mittels hochspezifischer Antikörper für jeden Zeitpunkt und jede Gewebeprobe erstellt. Um den Aktivierungsstatus und posttranslationale Modifikationen der Moleküle genauer zu charakterisieren, wurden davon 11 Antikörper gewählt, die an phosphorylierte Epitope binden.

Für die Erfassung der relativen Abweichung der Proteinlevel während der präanalytischen Phase, wurden die einzelnen Werte auf die mittlere Signalintensität des Zeitpunktes 0 (erste Probe, die schockgefroren wurde) normalisiert. Dieser Wert entspricht der Signalstärke 1,0. Dann erfolgte die statistische Analyse mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die berechneten RPPA Ergebnisse der kryokonservierten Referenzgewebe (Tab. 10) und kryokonserviertem Tumorgewebe (Tab. 11) werden im Folgenden gezeigt:

Tabelle 10: RPPA Ergebnisse der kryokonservierten Referenzgewebe.

Mittlere, normalisierte Signalstärken relativ zur mittleren Signalintensität der ersten Probe bei Zeitpunkt 0 = 1,0. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Eine *p*-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant deklariert, fett hervorgehoben und mit einem * markiert. Die Zahl in Klammern entspricht der Standardabweichung.

Protein (n=29)	0 min (n=6)	30 min (n=6)	60 min (n=6)	120 min (n=2)	Bereich (min- max)
EGFR	1	1,18 (0,39)	1,20 (0,35)	1,31 (0,07)	0,88-1,86
p-EGFR(Tyr1086)	1	1,11 (0,16)	1,01 (0,16)	1,07 (0,36)	0,81-2,14
Her2	1	1,05 (0,38)	1,10 (0,43)	1,05 (0,09)	0,81-1,93

Her3	1	1,30 (0,56)	1,05 (0,46)	1,48 (0,53)	0,61-2,33
p-Her3(Tyr1289)	1	1,20 (0,33)	1,19 (0,50)	1,20 (0,41)	0,86-2,16
Her4	1	1,17 (0,33)	1,20 (0,43)	1,07 (0,34)	0,83-2,06
HGF	1	1,25 (0,59)	1,33 (0,63)	1,07 (0,42)	0,49-2,26
сМЕТ	1	1,07 (0,33)	1,09 (0,46)	1,03 (0,08)	0,70-1,97
p-MET ^(Tyr1234/1235)	1	1,08 (0,21)	1,02 (0,23)	0,97 (0,37)	0,71-1,46
Akt	1	1,17 (0,38)	1,02 (0,29)	1,06 (0,35)	0,74-1,91
p-Akt (Ser473)	1	1,16 (0,48)	1,07 (0,54)	0,90 (0,00)	0,73-2,04
PI3K	1	1,21 (0,50)	1,19 (0,44)	1,12 (0,01)	0,78-2,16
p-PI3K(Tyr458/Tyr199)	1	1,19 (0,49)	1,09 (0,40)	1,07 (0,33)	0,76-2,10
Erk	1	1,16 (0,33)	1,12 (0,43)	1,08 (0,12)	0,79-1,85
p-Erk(Thr202/Tyr204)	1	1,57 (0,66)	1,48 (0,89)	1,21 (0,03)	0,72-3,23
Pten	1	1,19 (0,49)	1,09 (0,40)	1,07 (0,33)	0,76-2,10
p-Pten ^(Ser380)	1	1,20 (0,48)	1,09 (0,52)	0,92 (0,00)	0,60-2,02
	1	1,37	2,10	1,69	0,59-4,54
ß-Catenin	1	(0,58)	(1,29)*	(0,46)	0,37-4,34
n Q Catanin (Tur142)					
p-ß-Catenin ^(Tyr142)	1	1,24 (0,44)	1,17 (0,39)	1,22 (0,12)	0,90-2,10
GSK-3ß	1 1	1,24 (0,44) 1,17 (0,36)	1,17 (0,39) 1,16 (0,44)	1,22 (0,12) 1,09 (0,22)	0,90-2,10
-					
GSK-3ß	1	1,17 (0,36)	1,16 (0,44)	1,09 (0,22)	0,80-2,00
GSK-3ß p-GSK-3ß(Ser9)	1	1,17 (0,36) 1,31 (0,42)	1,16 (0,44) 1,28 (0,56) 1,17 (0,39)	1,09 (0,22) 1,05 (0,17)	0,80-2,00 0,62-2,30
GSK-3ß p-GSK-3ß(Ser9) Axin	1 1 1	1,17 (0,36) 1,31 (0,42) 1,20 (0,34) 1,31 (0,41)	1,16 (0,44) 1,28 (0,56) 1,17 (0,39)	1,09 (0,22) 1,05 (0,17) 1,11 (0,44) 1,23 (0,54)	0,80-2,00 0,62-2,30 0,80-1,96
GSK-3ß p-GSK-3ß(Ser9) Axin HIF1α	1 1 1 1	1,17 (0,36) 1,31 (0,42) 1,20 (0,34) 1,31 (0,41)	1,16 (0,44) 1,28 (0,56) 1,17 (0,39) 1,18 (0,33) 1,24 (0,45)	1,09 (0,22) 1,05 (0,17) 1,11 (0,44) 1,23 (0,54)	0,80-2,00 0,62-2,30 0,80-1,96 0,80-2,07
GSK-3ß p-GSK-3ß(Ser9) Axin HIF1α VEGFR	1 1 1 1	1,17 (0,36) 1,31 (0,42) 1,20 (0,34) 1,31 (0,41) 1,26 (0,47)	1,16 (0,44) 1,28 (0,56) 1,17 (0,39) 1,18 (0,33) 1,24 (0,45) 1,13 (0,41)	1,09 (0,22) 1,05 (0,17) 1,11 (0,44) 1,23 (0,54) 1,24 (0,17)	0,80-2,00 0,62-2,30 0,80-1,96 0,80-2,07 0,88-2,09
GSK-3ß p-GSK-3ß(Ser9) Axin HIF1α VEGFR p-VEGFR(Tyr1175)	1 1 1 1 1	1,17 (0,36) 1,31 (0,42) 1,20 (0,34) 1,31 (0,41) 1,26 (0,47) 1,25 (0,42)	1,16 (0,44) 1,28 (0,56) 1,17 (0,39) 1,18 (0,33) 1,24 (0,45) 1,13 (0,41)	1,09 (0,22) 1,05 (0,17) 1,11 (0,44) 1,23 (0,54) 1,24 (0,17) 1,04 (0,07)	0,80-2,00 0,62-2,30 0,80-1,96 0,80-2,07 0,88-2,09 0,80-2,06
GSK-3ß p-GSK-3ß(Ser9) Axin HIF1α VEGFR p-VEGFR(Tyr1175) Cleaved Caspase-3	1 1 1 1 1 1	1,17 (0,36) 1,31 (0,42) 1,20 (0,34) 1,31 (0,41) 1,26 (0,47) 1,25 (0,42) 1,24 (0,49)	1,16 (0,44) 1,28 (0,56) 1,17 (0,39) 1,18 (0,33) 1,24 (0,45) 1,13 (0,41) 1,06 (0,32) 1,02 (0,58)	1,09 (0,22) 1,05 (0,17) 1,11 (0,44) 1,23 (0,54) 1,24 (0,17) 1,04 (0,07) 1,12 (0,09)	0,80-2,00 0,62-2,30 0,80-1,96 0,80-2,07 0,88-2,09 0,80-2,06 0,81-2,17

Tabelle 11: RPPA Ergebnisse des kryokonservierten HCC.

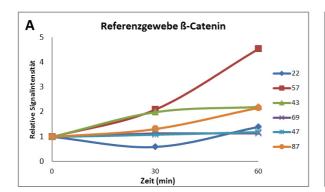
Mittlere, normalisierte Signalstärken relativ zur mittleren Signalintensität der ersten Probe bei Zeitpunkt 0 = 1,0. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Eine p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant deklariert, fett hervorgehoben und mit einem * markiert. Die Zahl in Klammern entspricht der Standardabweichung.

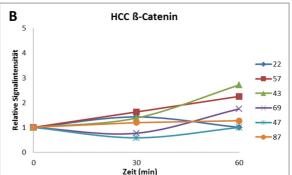
	0 min	30 min	60 min	120 min	Bereich
Protein (n=29)					(min-
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=2)	max)
EGFR	1	0,87 (0,12)	0,89 (0,29)	0,60 (0,10)	0,53-1,33
p-EGFR(Tyr1086)	1	0,91 (0,15)	0,89 (0,14)	0,59 (0,07)	0,49-1,12
Her2	1	0,92 (0,19)	0,86 (0,22)	0,57 (0,08)	0,51-1,12
Her3	1	0,75 (0,12)	0,85 (0,20)	0,51 (0,22)	0,35-1,04
p-Her3(Tyr1289)	1	0,94 (0,20)	0,90 (0,10)	0,69 (0,06)	0,65-1,20
Her4	1	0,95 (0,19)	0,90 (0,18)	0,69 (0,16)	0,57-1,25
HGF	1	0,66 (0,18)	0,75 (0,24)	0,54 (0,01)	0,45-1,19
сМЕТ	1	1,11 (0,17)	0,92 (0,19)	0,84 (0,31)	0,62-1,33
p-MET ^(Tyr1234/1235)	1	1,10 (0,33)	1,06 (0,31)	0,99 (0,05)	0,63-1,63
Akt	1	0,86 (0,22)	0,86 (0,21)	0,60 (0,12)	0,51-1,18
p-Akt ^(Ser473)	1	0,85 (0,27)	0,83 (0,18)	0,57 (0,01)	0,54-1,23
PI3K	1	0,88 (0,15)	0,85 (0,12)	0,70 (0,18)	0,58-1,05
p-PI3K(Tyr458/Tyr199)	1	0,90 (0,18)	0,88 (0,24)	0,56 (0,04)	0,52-1,14
Erk	1	0,92 (0,12)	0,90 (0,14)	0,71 (0,33)	0,48-1,10
		1,43	1,14	0,76	
p-Erk(Thr202/Tyr204)	1	(0,42)*	(0,19)	(0,11)	0,68-2,14
Pten	1	0,90 (0,18)	0,88 (0,24)	0,56 (0,04)	0,52-1,14
p-Pten(Ser380)	1	0,86 (0,30)	0,92 (0,08)	0,63 (0,18)	0,46-1,27
ß-Catenin	1	1,16 (0,41)	1,66 (0,71)	1,00 (0,45)	0,58-2,71
p-ß-Catenin(Tyr142)	1	0,96 (0,15)	0,94 (0,14)	0,69 (0,05)	0,65-1,20
GSK-3ß	1	1,03 (0,23)	1,02 (0,16)	0,83 (0,35)	0,58-1,31
p-GSK-3ß(Ser9)	1	0,99 (0,40)	1,10 (0,24)	0,80 (0,11)	0,34-1,53
Axin	1	1,02 (0,30)	0,98 (0,21)	0,72 (0,16)	0,60-1,51
HIF1α	1	0,90 (0,18)	0,91 (0,11)	0,78 (0,13)	0,67-1,11
VEGFR	1	0,84 (0,15)	0,73 (0,20)	0,44 (0,08)	0,38-1,03
p-VEGFR ^(Tyr1175)	1	0,90 (0,17)	0,84 (0,11)	0,65 (0,08)	0,59-1,11

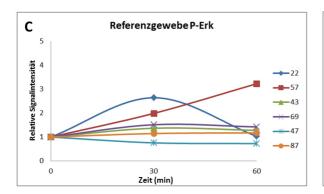
Cleaved Caspase-3	1	0,87 (0,19)	0,93 (0,16)	0,70 (0,16)	0,59-1,22
Cyotkeratin 18	1	0,79 (0,35)	0,85 (0,20)	0,50 (0,14)	0,38-1,32
p-Cytokeratin					
18(Ser33)	1	0,84 (0,30)	1,06 (0,24)	0,84 (0,10)	0,55-1,54
GAPDH	1	0,75 (0,29)	0,77 (0,17)	0,54 (0,02)	0,40-1,14

Nach statistischer Analyse aller Proben ergab im kryokonservierten Referenzgewebe das ß-Catenin eine signifikante Veränderung zwischen den Zeitpunkten 30 Minuten und 60 Minuten (*p*-Wert = 0,048). Nach 60 Minuten stiegen die Werte auf über das Doppelte des Ausgangswertes (2,10) (Tab. 10). Die Fluktuationen der individuellen ß-Catenin-Level der Patientenproben wurden graphisch dargestellt (Abb. 10, A und B). Bis auf Patient 22, bei dem das beta-Catenin nach 30 Minuten auf das 0,6-fache des Ausgangswertes sinkt um dann nach 60 Minuten wieder auf das 1,4-fache ansteigt, lässt sich ein genereller Aufwärtstrend für dieses Protein im Referenzlebergewebe ableiten. Insgesamt zeigen sich erhebliche Fluktuationen im Verlauf des ß-Catenins. Der Wert von Patient 57 scheint kontinuierlich zu steigen, bis er nach 60 Minuten den 4,54-fachen Wert erreicht. Die Proteinexpressionen von Patient 47 und 69 verlaufen relativ stabil (Abb. 10, A). Auch im HCC lässt sich zwischen 30 Minuten und 60 Minuten ein leichter Aufwärtstrend beobachten (Abb. 10, B).

Im kryokonservierten Tumorgewebe zeigte sich bereits innerhalb der ersten 30 Minuten (p-Wert = 0,048) ein statistisch signifikanter Anstieg von p-Erk (Thr202/Tyr204). Die Signalintensität erhöhte sich im Durchschnitt auf das 1,43-fache (Tab. 11). Graphisch lässt sich ein Anstieg der einzelnen Proben im Tumorgewebe und Referenzgewebe nach 30 Minuten beobachten (Abb. 10, C und D), wobei auch hier eine hohe interindividuelle Variabilität erkennbar ist. Beispielsweise fallen während des Verlaufs die Werte im Referenzgewebe von Patient 47 (0,75 nach 30 Minuten und 0,72 nach 60 Minuten), wobei sie im HCC leicht steigen. Im Gegensatz dazu wird p-Erk (Thr202/Tyr204) im HCC bei Patient 43 nach 30 Minuten herunterreguliert. Interessanterweise scheinen sich die Werte nach 60 Minuten wieder dem Ausgangswert anzunähern. Ausnahme hier ist der Expressionsverlauf von Patient 57 (Lebergewebe), der während der ersten Stunde kontinuierlich ansteigt.







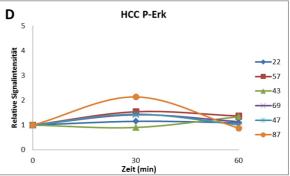
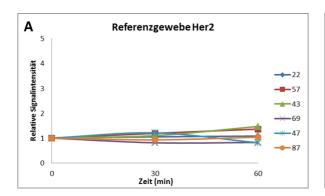
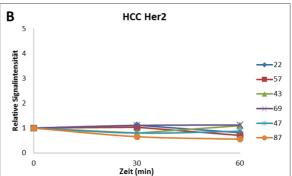


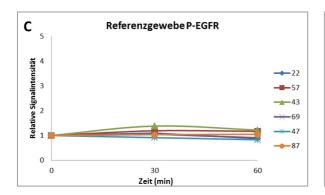
Abbildung 10: Starke Fluktuationen im Proteinlevel von kryokonserviertem humanem Gewebe (Referenzgewebe und HCC) mittels RPPA-Analyse.

Einfluss der Ischämie auf das Proteinlevel am Beispiel von ß-Catenin (A und B) und p-Erk (Thr202/Tyr204) (C und D). Die Werte der einzelnen Zeitpunkte werden als mittlere, normalisierte Signalintensitäten relativ zur mittleren Signalintensität zum Zeitpunkt 0 = 1,0 dargestellt. Aufgrund der begrenzten Probenanzahl konnten die Proteinlevel nach 120 Minuten Ischämiezeit nur von zwei Patienten (22, 87) ermittelt werden und wurden aus Übersichtsgründen nur in tabellarischer Form gezeigt (Tab. 10 und 11).

Alle anderen Werte wiesen keine statistisch signifikanten Veränderungen auf. Vielmehr konnten einige Proteine und Phosphoproteine identifiziert werden, die eine ausgesprochene Stabilität während der ersten Stunde kalter Ischämie aufwiesen. Als Beispiel für ein stabiles, unphosphoryliertes Protein wurde Her2 graphisch (Abb. 11, A und B) dargestellt. Als phosphoryliertes Protein, welches geringe Fluktuationen im Proteinlevel zeigt, wurde exemplarisch p-EGFR (Tyr1086) gewählt (Abb. 11, C und D).







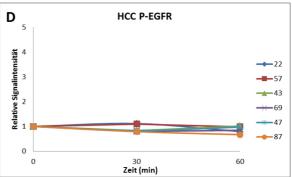


Abbildung 11: Stabiler Verlauf im Proteinlevel von kryokonserviertem humanem Gewebe (Referenzgewebe und HCC) mittels RPPA-Analyse.

Einfluss der Ischämie auf das Proteinlevel am Beispiel von Her 2 (A und B) und p-EGFR (Tyr1086) (C und D). Die Werte der einzelnen Zeitpunkte werden als mittlere, normalisierte Signalintensitäten relativ zur mittleren Signalintensität zum Zeitpunkt 0 = 1,0 dargestellt.

4.5. Interindividuelle Biomarkervariabilität im HCC

In den bisher gezeigten Ergebnissen konnte bereits auf eine unterschiedliche Variationsbreite der Proteinlevel zwischen den Individuen hingedeutet werden. Für eine genauere Untersuchung und Erfassung der Expressionsspanne der Leberzellkarzinome wurden die *absoluten* Signalintensitäten, ohne die Normalisierung auf einen Ausgangswert, mittels RPPA-Analyse generiert. Alle Werte wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normalisiert. Die Auswertung ergab sowohl eine Identifizierung von Proteinen, die interindividuell sehr variabel auftreten, als auch von stabilen Molekülen, die nicht nur während der kalten Ischämie, sondern auch zwischen den individuellen Tumoren ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen.

Insbesondere ß-Catenin zeigt eine erhebliche Variationsbreite, die sich sehr stark von Patient zu Patient unterscheidet. Zum Zeitpunkt 0 konnte eine Signalintensitätsspanne von 39 (Patient 87)

bis 223 (Patient 22) gemessen werden. Ähnliche Streuungen in der Signalintensität wurden für GSK-3ß (155 bis 279), p-GSK-3ß (80 bis 174), p-Erk (47 bis 115) und p-Cytokeratin 18 (83 bis 246) zum Zeitpunkt 0 ermittelt. Die Streuung der Werte scheint im Laufe der Ischämie breiter zu werden und erreicht ihren Höhepunkt nach 30 Minuten, wobei sich keine gleichförmige Entwicklung jedes individuellen Wertes ableiten lässt. Im korrespondierenden Referenzgewebe waren ähnliche Fluktuationen zu beobachten, die aber geringer ausgeprägt waren.

Im Gegensatz dazu konnten Moleküle identifiziert werden, die in ihrer Variationsbreite relativ stabile, aber schwache Expressionslevel zeigten. Dies wurde beispielsweise bei AKT mit Signalintensitätswerten von 44 (Patient 22) bis 69 (Patient 43) zum Zeitpunkt 0 beobachtet. Insbesondere für PTEN, dessen Streuungsbereich nur von 23 bis 48 zwischen allen Tumorproben und Zeitpunkten reicht, konnte eine niedrige interindividuelle Variabilität demonstriert werden. Auch im korrespondierenden Referenzgewebe wurde die Stabilität dieses Proteins nachgewiesen. Interessanterweise konnten jedoch keine Proteine beobachtet werden, die deutlich hohe Signalintensitäten zwischen allen Individuen zeigten und trotzdem stabil waren.

Zur Veranschaulichung der unterschiedlich ausgeprägten Diversität von Proteinspiegeln in Tumorgewebe wurden exemplarisch ß-Catenin (Abb. 12, A), stellvertretend für hohe interindividuelle Unterschiede und PTEN (Abb. 12, B) für eine geringe Variabilität in Box Plots dargestellt. Diese komplexe Situation in klinischen Gewebeproben zeigt uns, in Abhängigkeit der zu untersuchenden Proteine, die molekulare Heterogenität zwischen den einzelnen Patientenproben, deren Erfassung durch eine verlängerte präanalytische Phase zusätzlich erschwert wird. Daraus lassen sich wichtige Aussagen für die Patientenvariabilität ableiten, die im Abschnitt 5.2. genauer diskutiert werden sollen.

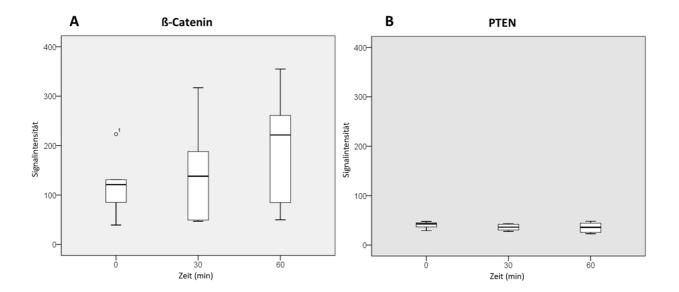


Abbildung 12: Box Plot Darstellung der interindividuellen Variationsbreite spezieller Proteinlevel im hepatozellulären Karzinom.

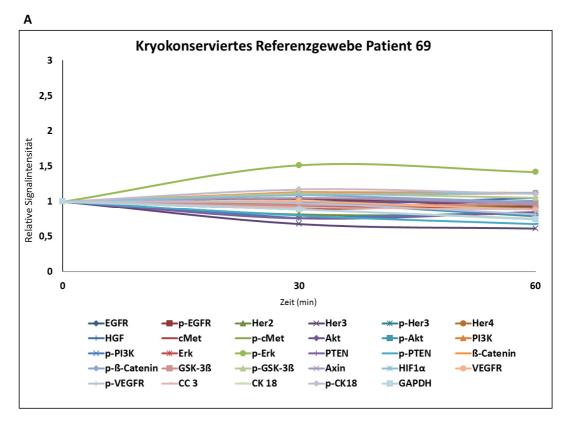
RPPA Ergebnisse von 6 Patienten als absolute Signalintensitäten, ohne Normalisierung auf einen Ausgangswert. (Jedoch Normalisierung auf die Gesamtproteinkonzentration.) A: ß-Catenin mit hohem Streuungsbereich zwischen den Individuen. ^{o1} Ausreißer (Patient 22 mit Signalintensität von 223). B: PTEN mit niedrigem Streuungsbereich und geringer interindividueller Variabilität. Aus Übersichtsgründen wurde das korrespondierende Referenzgewebe nicht dargestellt.

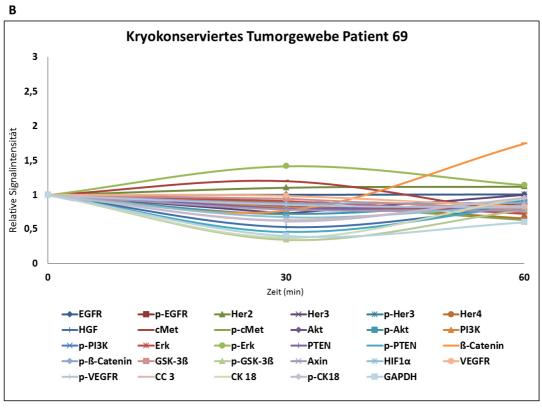
4.6. Intraindividuelle Unterschiede im Proteinlevel

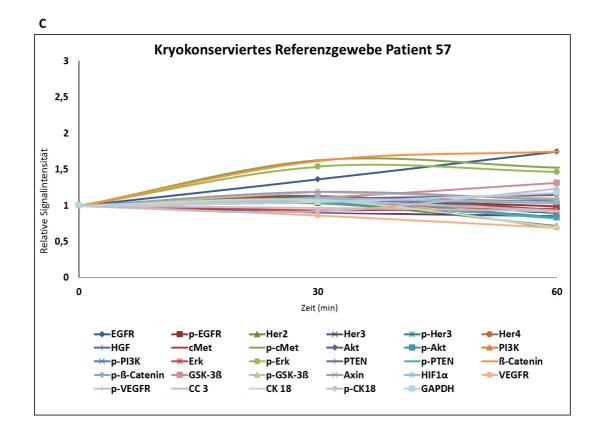
Die spezifische Analyse der Proteinlevel weist eine unterschiedliche molekulare Signatur jedes Patienten während der präanalytischen Phase auf. Für die exakte Bestimmung der intraindividuellen Variation aller untersuchten Proteine und Phosphoproteine, wurden die RPPA Ergebnisse auf die mittlere Signalstärke des Ausgangswertes (Zeitpunkt 0 = 1,0) normalisiert. Betrachtet man den Verlauf aller Analyte, so lassen sich Patientenproben identifizieren, die scheinbar weniger durch die Ischämie beeinflusst werden und kaum präanalytische Fluktuationen aufweisen. Stellvertretend für solch eine Gewebeprobe ist das kryokonservierte Lebergewebe von Patient 69 (Abb. 13, A). Bis auf p-Erk (Thr202/Tyr204), dessen maximale Abweichung nach 30 Minuten das 1,51-fache des Ausgangswertes erreicht, beträgt die Variationsspanne aller anderen Proteine zwischen dem 0,61-fachen (Her3) und dem 1,17-fachen (p-Cytokeratin 18 (Ser33)) der gemittelten ersten Probe. Das Tumorgewebe desselben Patienten zeigt einen ähnlich stabilen Verlauf (Abb. 13, B). Lediglich p-Erk

(Thr202/Tyr204) steigt nach 30 Minuten auf das 1,42-fache. Auch ß-Catenin erreicht nach 60 Minuten kalter Ischämie einen Wert der 1,74-fach höher war als zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme.

Im Gegensatz dazu scheinen die Proteinspiegel der Gewebeproben von Patient 57 sensitiver zu reagieren und weisen teilweise erhebliche Schwankungen während der experimentell verzögerten präanalytischen Phase auf. Insbesondere das kryokonservierte Tumorgewebe zeigt starke Fluktuationen (Abb. 13, D). Hier lässt sich eine Ausdehnung um den Faktor 0,68 (HGF) bis 2,25 (p-Erk (Thr202/Tyr204)) vom Referenzwert beobachten. Diese komplexen intraindividuellen Unterschiede erschweren zusätzlich die Vorhersagbarkeit von Biomarkern im Verlauf der präanalytischen Phase.







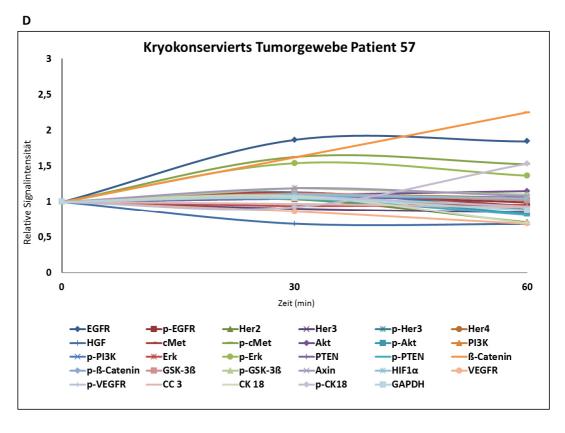


Abbildung 13: Einfluss der präanalytischen Phase auf die intraindividuelle Variabilität der Proteinlevel von vier repräsentativen humanen Gewebeproben.

RPPA Ergebnisse als mittlere, normalisierte Signalstärke relativ zur mittleren Signalintensität der Ausgangsprobe bei Zeitpunkt 0 = 1,0. A: Kryokonserviertes Referenzgewebe von Patient 69 mit relativ stabilem Verlauf im Proteinlevel. B: Im Vergleich dazu, das kryokonservierte Tumorgewebe desselben Patienten mit ähnlich stabilem Verlauf. C: Kryokonserviertes Referenzgewebe von Patient 57 mit leichten Fluktuationen. D: Stärkere Fluktuationen der Proteinlevel beim Tumorgewebe von Patient 57 während der experimentellen kalten Ischämie.

4.7. Expressionsvergleich deregulierter Signalwegsmoleküle zwischen dem HCC und korrespondierendem Referenzgewebe

Ziel des folgenden Teilprojekts war es, deregulierte Signalwegsmoleküle im HCC quantitativ zu charakterisieren und mit dem korrespondierenden peritumorösen Referenzgewebe zu vergleichen. Die kryokonservierten Gewebepaare (Tumor/Referenz) wurden auf ihre Gesamtproteinkonzentration mittels Sypro Ruby normalisiert, Phosphoproteine über alle Zeitpunkte bestimmt, in ihrer absoluten Signalstärke verglichen und statistisch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test analysiert. Auffällige Wertepaare wurden in Box-Plots dargestellt. Dabei wurden einige Moleküle identifiziert, die ein deutlich höheres Proteinlevel im malignen Gewebe aufweisen. Auffällig war die Hochregulation des Wnt-Schlüsselmoleküls ß-Catenin (Abb. 14, A), das in seiner unphosphorylierten Konformation in der Zelle akkumuliert und die Expression von protumorösen Wnt-Zielgenen, insbesondere Myc, Zyklin D1, MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) und VEGF induziert. Zusätzlich konnte eine Überexpression aller untersuchten Angiogenesemarker (HIF1α, VEGFR, p-VEGFR (Tyr1175)) evaluiert werden (Abb. 14, B-D). Interessanterweise wiesen nur die Gewebepaare zum Zeitpunkt der frühesten Fixierung (Zeitpunkt 0) eine statistische Signifikanz auf. Beim ß-Catenin und HIF1α wurden p-Werte von 0,028 berechnet, bei VEGFR und p-VEGFR (Tyr1175) p-Werte von 0,048. Diese Veränderung nimmt während der Ischämie ab, da die Level der Referenz- und Tumorgewebe sich kontinuierlich angleichen. Bei zwei Patientenproben (22, 87) konnte ausreichend Gewebematerial für einen Zeitpunkt nach 120 Minuten gesammelt werden. Die analysierten Werte von HIF1α, VEGFR und p-VEGFR (Tyr1175) bestätigen diesen Trend (nicht dargestellt). Wichtig bei der folgenden Abbildung ist, dass ein Interproteinvergleich nicht zulässig ist, da die Signalintensitäten zwischen den Arrays durch unterschiedliche

Entwicklungszeiten erheblichen Schwankungen unterworfen sind, d.h. jeder Biomarker muss für sich betrachtet werden. Daher erfolgte auch die Verwendung unterschiedlicher Skalierungen der Signalstärke zur besseren graphischen Darstellung.

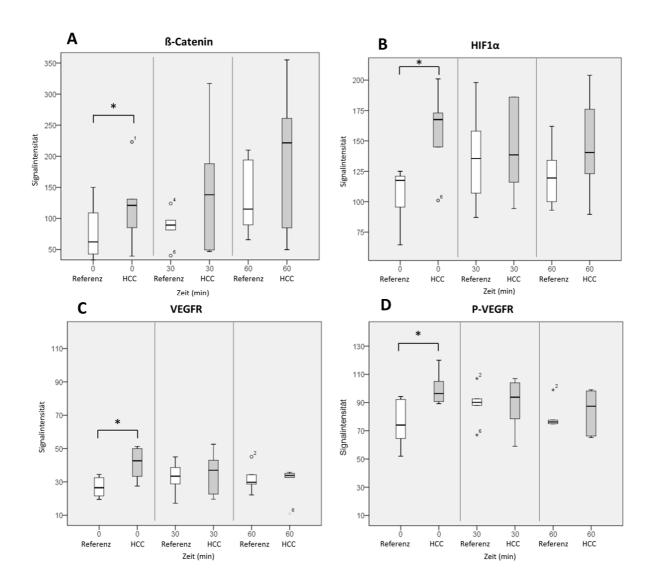


Abbildung 14: Box-Plot Darstellung an ausgewählten deregulierten Signalwegsproteinen über alle Zeitpunkte mit Median und Perzentilen, die im HCC höher exprimiert sind als im korrespondierenden Referenzgewebe.

Die Signalintensitäten wurden auf die Gesamtproteinkonzentration mittels Sypro Ruby normalisiert. Beachte die unterschiedlichen Skalierungen der Ordinaten zur besseren graphischen Darstellung der unterschiedlichen absoluten Signalstärke. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Ein *p*-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant deklariert und mit einem * markiert.

[∘] und * sind Ausreißer. A: ß-Catenin, B: HIF1α, C: VEGFR, D: P-VEGFR.

4.8. Einfluss der Fixierungsmethode auf die Proteinexpression

4.8.1. Analyse der Proteinlevel im FFPE-Gewebe

Eine Besonderheit dieser Arbeit stellt die Zusammensetzung der klinischen Gewebeproben dar. Zusätzlich zum Kryomaterial konnte FFPE-Material von den Patienten gewonnen und analysiert werden. Voraussetzung hierfür war die Proteinextraktion aus FFPE-Gewebe. Bis vor einigen Jahren konnte die Untersuchung von Proteinen und Phosphoproteinen, welche den Aktivierungsstatus eines Signalwegs widerspiegeln, mittels Reverse Phase Protein Array nur mit frischen oder kryokonservierten Gewebeproben durchgeführt werden. Die Proteinextraktion aus FPPE-Geweben schien nicht möglich zu sein. In unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch eine Methode entwickelt, mit der man vollständige, nichtdegradierte und immunreaktive Proteine aus formalinfixierten Geweben extrahieren und anschließend im RPPA quantitativ bestimmen kann (Becker et al., 2007; Becker et al., 2008). Dadurch konnte in diesem Kollektiv nicht nur schockgefrorenes humanes Tumorgewebe mit korrespondierendem Referenzgewebe im Laufe der präanalytischen Phase verglichen, sondern erstmalig auch der Einfluss der kalten Ischämie auf Signalwegsproteine in FFPE-Gewebe untersucht werden. Da die Anzahl der Gewebestücke durch die Größe des Gesamtresektats limitiert wurde, konnte nicht von allen Patienten FFPE-Blöcke erstellt werden. Die zwei folgenden Tabellen zeigen die RPPA Ergebnisse der Patienten 22 und 47 über drei Zeitpunkte (0, 30 und 60 Minuten), bei denen ausreichend Material für die Formalin-Fixierung gewonnen werden konnte.

Tabelle 12: RPPA Ergebnisse der FFPE Referenzgewebe.

Mittlere, normalisierte Signalstärken relativ zur mittleren Signalintensität der ersten Probe bei Zeitpunkt 0 = 1,0. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Zahl in Klammern entspricht der Standardabweichung.

Protein (n=29)	0 min (n=2)	30 min (n=2)	60 min (n=2)	Bereich (min- max)
EGFR	1	1,19 (0,18)	1,44 (0,43)	1,06-1,74
p-EGFR ^(Tyr1086)	1	1,03 (0,17)	0,85 (0,15)	0,74-1,15
Her2	1	1,03 (0,45)	0,87 (0,17)	0,72-1,35
Her3	1	1,02 (0,34)	1,28 (0,70)	0,79-1,78
p-Her3(Tyr1289)	1	1,05 (0,18)	0,96 (0,02)	0,92-1,18
Her4	1	1,24 (0,32)	1,24 (0,16)	1,01-1,46
HGF	1	0,97 (0,19)	0,81 (0,05)	0,77-1,10
сМЕТ	1	1,10 (0,21)	1,10 (0,27)	0,91-1,29
p-MET(Tyr1234/1235)	1	1,35 (0,26)	1,14 (0,03)	1,12-1,54
Akt	1	1,06 (0,15)	0,92 (0,17)	0,80-1,17
p-Akt ^(Ser473)	1	1,03 (0,24)	0,81 (0,07)	0,75-1,19
PI3K	1	1,19 (0,18)	0,90 (0,16)	0,79-1,31
p-PI3K(Tyr458/Tyr199)	1	1,01 (0,32)	0,78 (0,18)	0,65-1,24
Erk	1	1,13 (0,17)	1,10 (0,05)	1,01-1,25
p-Erk(Thr202/Tyr204)	1	1,35 (0,26)	1,14 (0,03)	1,12-1,54
Pten	1	1,01 (0,32)	0,78 (0,18)	0,65-1,24
p-Pten(Ser380)	1	1,05 (0,24)	1,01 (0,06)	0,88-1,22
ß-Catenin	1	1,14 (0,45)	1,97 (1,62)	0,83-3,12
p-ß-Catenin ^(Tyr142)	1	0,96 (0,30)	0,78 (0,05)	0,74-1,17
GSK-3ß	1	1,07 (0,32)	1,15 (0,36)	0,85-1,41
p-GSK-3ß(Ser9)	1	1,38 (0,29)	1,21 (0,03)	1,17-1,59
Axin	1	1,18 (0,28)	1,40 (0,45)	0,98-1,72
HIF1α	1	1,57 (0,52)	0,98 (0,12)	0,90-1,94
VEGFR	1	1,02 (0,25)	1,47 (0,69)	0,85-1,95
p-VEGFR(Tyr1175)	1	1,00 (0,37)	0,93 (0,24)	0,73-1,26
Cleaved Caspase-3	1	1,22 (0,53)	0,92 (0,16)	0,81-1,60
Cyotkeratin 18	1	1,19 (0,12)	0,68 (0,04)	0,65-1,27

p-Cytokeratin				
18(Ser33)	1	1,19 (0,35)	0,78 (0,18)	0,65-1,44
GAPDH	1	1,27 (0,45)	1,97 (1,20)	0,94-2,82

Tabelle 13: RPPA Ergebnisse der FFPE HCC.

Mittlere, normalisierte Signalstärken relativ zur mittleren Signalintensität der ersten Probe bei Zeitpunkt 0 = 1,0. Die statistische Analyse erfolgte mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Zahl in Klammern entspricht der Standardabweichung.

Protein (n=29)	0 min (n=2)	30 min (n=2)	60 min (n=2)	Bereich (min- max)
EGFR	1	0,99 (0,07)	0,80 (0,18)	0,67-1,04
p-EGFR ^(Tyr1086)	1	1,24 (0,51)	1,02 (0,05)	0,88-1,60
Her2	1	1,34 (0,26)	1,11 (0,04)	1,08-1,52
Her3	1	1,15 (0,50)	1,02 (0,10)	0,80-1,51
p-Her3(Tyr1289)	1	1,01 (0,15)	1,06 (0,02)	0,91-1,12
Her4	1	1,44 (0,99)	1,09 (0,39)	0,74-2,15
HGF	1	1,27 (0,30)	0,98 (0,28)	0,78-1,48
сМЕТ	1	0,71 (0,04)	1,04 (0,33)	0,68-1,28
p-MET ^(Tyr1234/1235)	1	0,93 (0,02)	0,93 (0,08)	0,87-0,99
Akt	1	1,49 (0,33)	1,14 (0,22)	0,98-1,72
p-Akt(Ser473)	1	1,23 (0,01)	1,32 (0,57)	0,91-1,72
PI3K	1	0,75 (0,25)	0,92 (0,12)	0,57-1,00
p-PI3K(Tyr458/Tyr199)	1	1,17 (0,43)	1,14 (0,42)	0,84-1,48
Erk	1	0,90 (0,18)	0,90 (0,11)	0,78-1,03
p-Erk(Thr202/Tyr204)	1	0,93 (0,02)	0,93 (0,08)	0,87-0,99
Pten	1	1,17 (0,43)	1,14 (0,42)	0,84-1,48
p-Pten(Ser380)	1	1,01 (0,57)	0,91 (0,42)	0,60-1,41
ß-Catenin	1	0,98 (0,68)	1,88 (1,75)	0,50-3,12
p-ß-Catenin ^(Tyr142)	1	1,25 (0,26)	0,97 (0,11)	0,90-1,44
GSK-3ß	1	1,11 (0,21)	0,89 (0,10)	0,82-1,26
p-GSK-3ß(Ser9)	1	1,12 (0,28)	0,86 (0,05)	0,83-1,33
Axin	1	0,93 (0,02)	0,70 (0,20)	0,56-0,95
HIF1α	1	1,14 (0,58)	0,97 (0,23)	0,73-1,56

VEGFR	1	1,41 (0,19)	1,36 (0,07)	1,28-1,55
p-VEGFR(Tyr1175)	1	1,04 (0,01)	1,03 (0,35)	0,78-1,28
Cleaved Caspase-3	1	1,33 (0,34)	0,92 (0,08)	0,87-1,57
Cyotkeratin 18	1	1,33 (0,95)	0,87 (0,73)	0,35-2,00
p-Cytokeratin				
18(Ser33)	1	0,98 (0,35)	0,87 (0,30)	0,66-1,23
GAPDH	1	1,34 (0,53)	0,95 (0,45)	0,63-1,72

4.8.2. Vergleich zwischen Kryogewebe und FFPE-Gewebe

Im Folgenden wurde an den beiden Patienten (22 und 47) untersucht, ob die unterschiedlichen Fixierungsmethoden, d.h. Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (N₂) oder Fixierung in Formalin mit anschließender Einbettung in Paraffin, einen Einfluss auf die Proteinexpression hat. Zur graphischen Darstellung der *relativen* Proteinspiegel wurde eine hierarchische Clusteranalyse erstellt. Dieser Algorithmus berechnet den Abstand zweier Gruppen als Mittelwert der Abstände zwischen allen Paaren der Gruppen und fasst sie in einem Cluster zusammen. In einer sog. *heat map* (Abb. 15) erscheinen alle Proteine rot, die im Vergleich aller analysierten Proteine eine hohe Expression aufweisen. Eine grüne Einfärbung stellt eine niedrige Proteinexpression dar. Die Analyse ordnet die detektierten Proteine nach ihrer Ähnlichkeit und bildet Subgruppen. Hier zeigt sich der Einfluss der Fixierungsmethode. Die Kryoproben bilden die Subgruppe 1, die FFPE-Proben die Subgruppe 2. Interessanterweise werden im schockgefrorenen Gewebe (Subgruppe 1) mehrheitlich phosphorylierte Proteine (10 Phosphoproteine von insgesamt 17 Proteinen in Proteingruppe B) hochreguliert, wogegen unphosphorylierte Proteine (nur ein Phosphoprotein von 11 Proteinen) in Proteingruppe A eher schwache Level aufweisen. Das FFPE-Gewebe (Subgruppe 2) verhält sich hingegen genau invers.

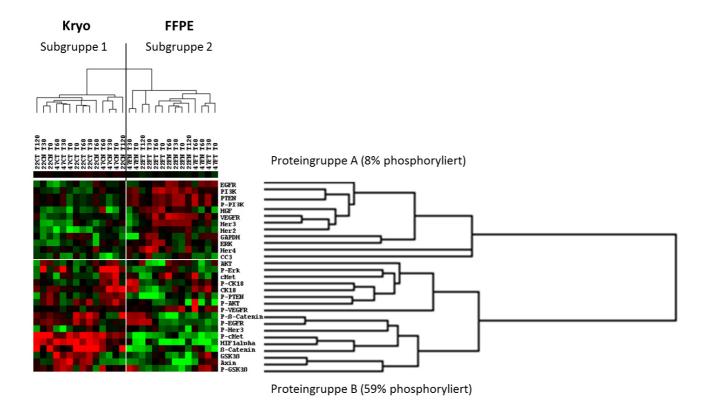


Abbildung 15: Hierarchische Clusteranalyse als *heat map* von benignem und malignem Lebergewebe unterschiedlicher Ischämiezeiten und Fixierungsmethoden im Bezug zu HCC assoziierten Signalwegsmolekülen und dessen phosphorylierte Formen.

Es bilden sich zwei Proteingruppen, die sich in ihrem Expressionsmuster (Proteingruppe A: kaum phosphoryliert 8%, Proteingruppe B: mehr als die Hälfte phosphoryliert 59%) invers unterscheiden. Subgruppe 1: kryokonserviertes Gewebe, Subgruppe 2: FFPE-Gewebe. Farbschlüssel: Rot – im Vergleich aller untersuchten Proteine hochreguliert; grün – im Vergleich herunterreguliert; schwarz – unverändert. Die Farbgraduierung spiegelt die *relativen* Signalintensitäten wider.

Leider lässt sich kein stringentes Verhalten der einzelnen Moleküle, im Sinne einer Korrelation der Fixierungsart und der Proteinregulation, beobachten. In Abb. 16 wird deutlich, dass eine höhere Signalstärke durch FFPE im Gegensatz zur Kryofixierung eines Proteins (Her 3; Abb. 16, B) in einer Patientenprobe sich nicht beliebig auf ein anderes Protein übertragen lässt, sondern sogar invers verlaufen kann (ß-Catenin; Abb. 16, C). P-VEGFR (Tyr1175) (Abb. 16, A) scheint noch gleichsinnig zu verlaufen, wohingegen sich bei PI3K (Abb. 16, D) kein geradliniges Muster erkennen lässt. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass in Abhängigkeit der Fixierung das molekulare Expressionsmuster maßgeblich beeinflusst wird und allein durch die Art und Weise der Gewebeprozessierung völlig unterschiedliche Signaturen generiert werden. Jedoch sei an dieser Stelle auf die schwache Aussagekraft bei geringer Fallzahl (zwei

Patientenpaare) und die Möglichkeit von systematisch nicht-biologischen Unterschieden hingewiesen, die im Kapitel 5.6. genauer erläutert werden.

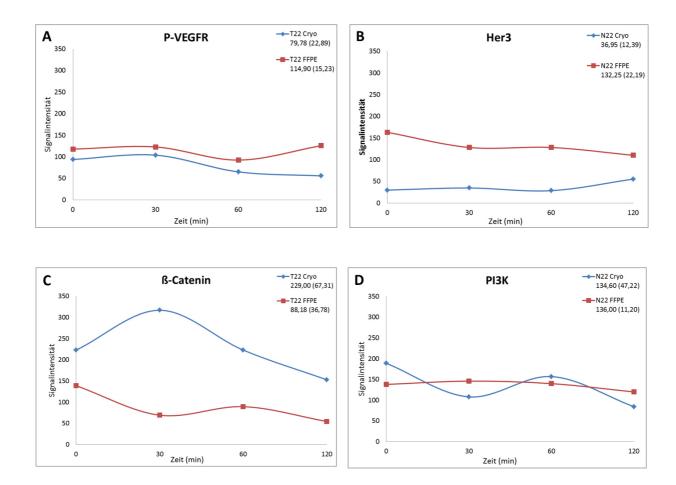


Abbildung 16: Proteinlevel in Abhängigkeit der Fixierungsmethode und der Ischämiezeit.

RPPA Ergebnisse von vier Proteinen von Patient 22 als *absolute* Signalintensitäten. (Jedoch Normalisierung auf die Gesamtproteinkonzentration.) Aus Übersichtsgründen wurde eine Abbildung mit Normalisierung auf einen Ausgangswert nicht dargestellt. A: P-VEGFR mit ähnlichem Muster, B: Her3 mit höheren FFPE-Werten, C: ß-Catenin mit höheren Kryo-Werten, D: PI3K ungeordnet. Die Zahl vor der Klammer beschreibt den Mittelwert der Signalintensität im Verlauf. Die Zahl in der Klammer die Standardabweichung. T=Tumor; N=Normales Lebergewebe.

5. Diskussion

5.1. Präanalytische Einflüsse während der Gewebeprozessierung als Herausforderung in der personalisierten Medizin

Die exakte Erfassung molekularer Signaturen in Tumorgeweben ist die fundamentale Voraussetzung für die korrekte Einschätzung von Risikoprofil und Prognose von Krebspatienten. Darüber hinaus spielen sie als pharmakologische Angriffspunkte für die Entwicklung neuer zielgerichteter Behandlungsstrategien eine herausragende Rolle in der personalisierten Medizin. Leider ist bisher wenig über die Variabilität von Biomarkern während der präanalytischen Phase bekannt. Fest steht jedoch, dass eine schlechte Probenqualität zu falschen Ergebnissen und einer Fehlinterpretation der Daten führen kann (Vaught & Lockhart, 2012). Dies kann schwerwiegende Folgen für den korrekten Einsatz von zielgerichteten Medikamenten in der Behandlung onkologischer Patienten haben. In Anbetracht dessen, können die vielversprechenden Ansätze neuer Tumormarker niemals realisiert werden, sofern diese Problematik nicht gelöst wird (Espina et al., 2009).

Aufgrund ihrer komplexen Interaktionen sind individuelle Patientenmerkmale, die biologische Heterogenität von Tumoren und unterschiedliche Medikationsprofile stellvertretend für eine Vielzahl von Variablen, nur schwer erfassbar. Anders verhält es sich mit peri- und postoperativen Einflussfaktoren, insbesondere der kalten Ischämie, die mit der Fixierung und Stabilisierung der Biomarker endet. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der präanalytischen Phase auf die Robustheit quantitativer und qualitativer Level von Proteinen und Phosphoproteinen untersucht. Der Reverse Phase Protein Array, der eine präzise und simultane Untersuchung vieler hundert Gewebelysate ermöglicht, wurde für die Durchführung dieser Studie verwendet (Pierobon et al., 2011). Die Auswahl der untersuchten Proteine setzte sich aus 29 Molekülen zusammen, die maßgeblich regulatorische Einflüsse auf Signaltransduktion (z.B. EGFR), Proliferation (z.B. ERK), Überleben (z.B. AKT), Hypoxie (HIF1α), Angiogenese (z.B. VEGFR), Apoptose (Cleaved Caspase-3) und Zellstruktur (z.B. Cyotkeratin 18) haben. Davon wurde bei 11 Proteinen die phosphorylierte Form analysiert, um genaue Einblicke in posttranslationale Modifikationen zu gewinnen. Bei nahezu allen Proteinen wurden im Verlauf Fluktuationen beobachtet, wobei insbesondere Änderungen von ß-Catenin im Referenzgewebe (Zeitintervall 30 bis 60 Minuten) und p-Erk im Tumorgewebe (Zeitintervall 0 bis 30 Minuten) hervorzuheben sind. Die Charakterisierung von p-Erk als Ischämie-sensitiver Biomarker erfolgte

bereits in vorangegangen Publikationen und konnte durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt werden. Gündisch et al. konnten in einer ähnlichen Versuchsreihe einen Anstieg dieses Moleküls zwischen 30 und 60 Minuten kalter Ischämie an humanem nicht-malignen Kolongewebe beobachten (Gundisch et al., 2012). In einer weiteren Arbeit von Espina et al. wurde eine über 20%ige Steigerung der p-Erk Signalintensität innerhalb von 90 Minuten Postresektionszeit in verschiedenen Gewebeproben beschrieben (Espina et al., 2008). Das ist insofern interessant, da ein erhöhtes p-Erk als prädiktiver Marker für ein schlechtes Gesamtüberleben im fortgeschrittenen HCC identifiziert wurde (Negri et al., 2015). In einer weiteren quantitativen Analyse von kolorektalen Karzinomen konnte demonstriert werden, dass insbesondere EGFR und die downstream Schlüsselmoleküle des AKT und MAPK Signalwegs bereits durch die chirurgische Entnahme und die nachfolgende postoperative Aufarbeitung stark in ihrer Gen- und Proteinexpression beeinflusst werden (David et al., 2014). Die Autoren konnten hierbei in malignem Gewebe stärkere Effekte auf das Phosphoproteom feststellen als im Referenzgewebe, was vermutlich auf die heterogene Beschaffenheit der Tumoren zurückzuführen war. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass in Gewebeproben auch nach chirurgischer Exzision lebendige dynamische Prozesse weiterhin ablaufen und insbesondere der Status intrazellulärer Phosphorylierungsaktivitäten nach einer verzögerten Gewebefixierung nicht mehr den ursprünglichen biologischen Zustand widerspiegeln.

Daher ist es von großer Bedeutung, das zu untersuchende Gewebe einer möglichst standardisierten präanalytische Phase auszusetzen und schnelle Techniken in der Gewebeaufarbeitung anzuwenden, um den wahren Status für die Diagnostik zu konservieren. Fakt ist, dass eine Umsetzung in die Realität durch bereits ausgelastete Bedingungen im Rahmen der klinischen Routinearbeit erschwert wird. Ein geeigneter und praktikabler Ansatz, um unerwünschte Effekte auf Biomarker zu minimieren, scheint während der präanalytischen Phase die Kühlung zu sein. In vergleichenden Analysen von Leberproben konnten bei Raumtemperatur stärkere Degradierungsprozesse identifiziert werden als bei Lagerung auf Eis. Dies betraf sowohl Proteine als auch RNA (Gundisch et al., 2013; Lee et al., 2013). Daher sollten gerade bei der Analyse sensibler Biomarker, Gewebeproben bis zur Fixierung auf Eis oder im Kühlschrank gelagert werden.

Andere, in dieser Arbeit analysierte Proteinlevel, wiesen zwar geringe Fluktuationen auf, waren insgesamt relativ robust und schienen kaum auf exogene Umwelteinflüsse zu reagieren. Ein stabiles Verhalten im HCC und Lebergewebe zeigte stellvertretend Her2, konnte aber auch bei Phosphoproteinen, z.B. p-EGFR (Tyr1086) beobachtet werden (Abb. 11, C und D). Diese Daten bestätigen die Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten. Im Mammakarzinom konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Proteine in Tumorgewebe innerhalb der ersten Stunde stabil sind und sich erst nach 6 bis 24 Stunden signifikant verändern (Hennessy et al., 2010). In einer weiteren Versuchsreihe konnten anhand von Mäuse- und Rattenlebern eine Vielzahl von

Proteinen identifiziert werden, die insbesondere während der Lagerung auf Eis, ein konstantes Proteinlevel über den Zeitraum von 360 min zeigten (Gundisch et al., 2013).

Festzuhalten ist, dass die Charakterisierung unterschiedlich stabiler Biomarker eine große Chance darstellt, prädiagnostische Effekte auf die Gewebequalität besser zu verstehen. Instabile Marker können als Surrogatmarker frühzeitig alarmierende Hinweise auf eine unzureichende Güte der Gewebeprobe geben und sie für eine weitere molekulare Diagnostik disqualifizieren (Bianchi, 2007). Zusätzlich können robuste Moleküle wertvolle Erkenntnisse in der Entwicklung neuer Kinase- und Proteaseinhibitoren liefern (Gundisch et al., 2013). Diese Ergebnisse zeigen uns jedoch auch die Notwendigkeit, dass jeder Biomarker für jede Entität etabliert werden muss und ein Transfer auf andere Gewebearten nicht möglich ist. Zusätzlich ist eine ausführliche und lückenlose Dokumentation von klinischen Daten und präanalytischen Einflüssen (Umgebungstemperatur der Probe, kalte und warme Ischämie, Komposition der Fixierungslösung, etc.) erforderlich, um etwaige Abweichungen richtig zu interpretieren.

5.2. Individuelle Tumorvariabilität

Eine der größten Hürden von exakten, reproduzierbaren Analysen in systematischen Studien ist die biologische Diversität zwischen individuellen Patienten. Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass verschiedene Tumoren trotz gleicher histologischer Subklassifikation eine extreme Variabilität von molekularen und genetischen Alterationen aufweisen können (Sato et al., 2013; Hoadley et al., 2014; Kumar et al., 2016). Das spiegelt sich auch in dem unterschiedlichen Ansprechen auf Chemotherapeutika und den verschiedenen Überlebenszeiten der Patienten wider.

Wie schon im Abschnitt 4.5. gezeigt werden konnte, verhalten sich einige Signalwegsmoleküle vollkommen unterschiedlich in verschiedenen Individuen einer Tumorentität (intertumorale Heterogenität) und weisen eine große Variationsbreite auf. Beispielsweise konnte bei GSK-3ß, p-GSK-3ß, p-Erk und p-CK18 von Patient zu Patient eine starke Divergenz in ihren Proteinspiegeln beobachtet werden. Eine besonders hohe intertumorale Fluktuation wies ß-Catenin auf (Abb. 12, A).

Insgesamt waren die Unterschiede in der Proteinexpression im Tumorgewebe stärker ausgeprägt als im korrespondierenden Lebergewebe, was durch dynamische Wachstumsprozesse in Krebszellen erklärt werden kann. Da man davon ausgeht, dass sich Onkogene und Tumorsuppressorgene in transformierten Zellen im Laufe der Krebsentstehung verändern und neue Mutationen akquiriert werden (Aktipis et al., 2013), ist es nicht verwunderlich, dass verschiedene Patienten abhängig von Biologie und Fortschritt der

Krebserkrankung unterschiedliche zellbiologische Protein- und Phosphoproteinmuster aufzeigen.

Diese Tatsache macht deutlich, dass jeder Tumor einzigartig ist und für sich als individuell betrachtet werden muss. Für die Krebstherapie bedeutet das, dass Patienten, die an dem gleichen Tumor erkrankt sind, weiter in biologische Subentitäten klassifiziert werden müssen, über den Krankheitsverlauf damit genauere Vorhersagen und angepasste Therapieentscheidungen getroffen werden können. Übertragen auf die Analyse von Gewebeproben für Wissenschaft und Klinik heißt das, dass die Prozesse der translationalen Medizin weiter fortgesetzt werden müssen und die exakte Erfassung dieser interindividuellen Unterschiede entscheidend zu einer Verbesserung der Versorgung jedes einzelnen Krebspatienten beitragen kann.

Für das hepatozelluläre Karzinom wurden leider bislang kaum arzneimittelbezogene molekulare Zielstrukturen identifiziert. Vielversprechende Ergebnisse konnten Masuda *et al.* kürzlich mittels RPPA-basierenden Analysen an Zelllinien zur Identifizierung von potentiellen Biomarkern in Sorafenib-refraktären HCC zeigen (Masuda et al., 2014). Die Autoren schlagen vor, bei p-RPS6 S235/236 positiven Patienten alternative pharmakologische Strategien, wie beispielsweise mTOR-Inhibitoren, in Erwägung zu ziehen. Vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenz dieser Tumorentität und den limitierten pharmakologischen Therapieoptionen in der palliativen Situation (Sorafenib, als einzig zugelassene zielgerichtete Therapie verlängert das Gesamtüberleben nur um einige Monate (Llovet et al., 2008)), ist es daher dringend erforderlich, prädiktive Biomarker als therapeutische Angriffspunkte für die Behandlung von Leberkrebspatienten zu identifizieren (Brito et al., 2016).

5.3. Intratumorale Heterogenität

Neben diesen interindividuellen Phänomenen stellen auch intraindividuelle Fluktuationen ein großes Problem für die korrekte Diagnose von Malignomen dar. Innerhalb eines einzelnen Tumors können sich einzelne Tumorzellen genotypisch und phänotypisch deutlich voneinander unterscheiden (Marusyk et al., 2012). Durch die Entwicklung neuester Methoden konnte mit Hilfe genomweiter Analysetechniken diese intratumoröse Heterogenität in zahlreichen Publikationen bestätigt werden (Cancer Genome Atlas Research, 2011; Navin et al., 2011; Gerlinger et al., 2012). Diese Tumorheterogenität stellt eine der größten Herausforderungen in der personalisierten Medizin und in der Entwicklung von Biomarkern dar (Junttila & de Sauvage, 2013).

Allein die Tatsache, dass besser perfundierte Areale weniger hypoxischen, metabolischen und oxidativen Stresszuständen ausgesetzt sind als schlechter durchblutete Gewebeabschnitte lässt vermuten, dass durch den permanenten Selektionsdruck der wachsenden Tumorzellen im Wettbewerb um Sauerstoff und Nährstoffe ein unterschiedlicher Status von aktivierten und deregulierten Signalwegsprozessen zu beobachten ist. Zudem ist es einleuchtend, dass eine pharmakologische Intervention stärkere Einflüsse auf gut zugängliche Bereiche zeigt und demzufolge ein höherer Selektionsdruck auf betroffene Tumorzellen ausgeübt wird als auf schlecht erreichbare Regionen. Als ein Beispiel für die Auswirkung des Selektionsdrucks auf Tumorzellen konnte bei Mammakarzinomen der Einfluss der Chemotherapie mit Cisplatin auf die Akquirierung spezieller molekulare Alterationen gezeigt werden (Sakai et al., 2008).

Der abschließende Befund sollte daher sofern möglich stets auf einer Vielzahl von repräsentativen Tumorarealen und nicht nur auf einer einzelnen Biopsie basieren, wie es oft in der klinischen Routine der Fall ist. In vielen extraktionsbasierenden Proteinanalysen konnte bereits die Heterogenität innerhalb eines Tumors oder zwischen Primärtumor und Metastase beschrieben werden. Entitäten mit einer besonders ausgeprägten Diversität auf Proteinebene sind das kolorektale Karzinom (Silvestri et al., 2013) und das Mammakarzinom (Amir et al., 2012; Niikura et al., 2012). Malinowsky *et al.* konnten anhand von RPPA Analysen eindrücklich die Tumorheterogenität von Brustkrebsgewebeproben in Protein- und Phosphoproteinspiegeln veranschaulichen (Malinowsky et al., 2012).

Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde für die Durchführung meiner Arbeit das hepatozelluläre Karzinom als Modell gewählt. Ausschlaggebend war die gering ausgeprägte phänotypische Diversität innerhalb dieses Tumors und der nahezu 100%ige Tumorgehalt. Daher war eine Mikrodissketion verschiedener Tumoranteile nicht notwendig. Dies wäre beispielsweise bei gastrointestinalem Gewebe, das aus unterschiedlichen Gewebeschichten zusammengesetzt ist, wie auch bei Präparaten mit heterogen verteilten Tumoranteilen erforderlich gewesen (Becker et al., 2008). Zudem waren 40 der 54 analysierten Gewebeproben schockgefroren und nur 14 Proben waren formalin-fixiert (vgl. 3.2.1.). Eine Mikrodissektion an kryokonserviertem Gewebe wäre technisch wesentlich aufwändiger und unpraktikabler gewesen als eine an FFPE-Gewebe und hätte dabei die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit des Vorhabens erheblich reduziert. Durch mikroskopische Begutachtung von HE-gefärbten Referenzschnitten (vgl. 4.3.) konnte sichergestellt werden, dass alle Proben des Tumors den gleichen Differenzierungsgrad aufwiesen und im histologischen Erscheinungsbild kaum Unterschiede der Tumorzellen erkennbar waren. Präparate mit erhöhtem (≥ 10%) Nekrose-, Stroma- und Entzündungsanteil wurden ausgeschlossen. Die akkurate Auswahl der Proben und die homogene Morphologie innerhalb des Tumors ermöglichten mir erst die Durchführung eines experimentellen Zeitreihenversuches dieser Art.

Aufgrund der individuellen Variabilität und Tumorheterogenität auf molekularer Ebene, muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass sich mögliche statistisch signifikante Ergebnisse aus der biologischen Variabilität ergeben, dass sie schlecht reproduzierbar sind und sich allein

durch eine technisch-methodische Optimierung nicht komplett verhindern lassen (Hansen et al., 2011). Diese Variablen müssen bei molekularen Analysen immer bedacht werden, sind aber in ihrer Gesamtheit nahezu unmöglich zu erfassen.

5.4. Molekulare Unterschiede zwischen dem hepatozellulären Karzinom und korrespondierendem Referenzgewebe

In einem weiteren Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden quantitative Expressionsunterschiede deregulierter Signalwegsmoleküle im HCC genauer beleuchtet. Eine Besonderheit der Versuchsreihe war die Möglichkeit, relevante Proteine nicht nur in Tumorgewebe zu untersuchen, sondern jeweils mit korrespondierendem, peritumorösen Referenzgewebe während der kalten Ischämie zu vergleichen. Statistisch signifikante Wertepaare sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

5.4.1. β-Catenin und HIF-1α zeigen eine erhöhte Expression im hepatozellulären Karzinom

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ß-Catenin eine erhöhte Expression im hepatozellulären Karzinom aufweist (Abb. 14, A). Das ß-Catenin, ein Schlüsselmolekül des Wnt Signalwegs, spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese des hepatozellulären Karzinoms. Eine nukleäre Akkumulation dieses Moleküls induziert eine Expression von Zielgenen, die proliferative, antiapoptotische und angiogenetische Effekte auf die Tumorzelle haben (Breuhahn et al., 2006). Eine Hochregulation dieses Moleküls im malignen Lebergewebe stimmt mit Beobachtungen von Prange *et al.* überein, die in ihren Untersuchungen einen erhöhten Level von ß-Catenin im hepatozellulären Karzinom gefunden haben (Prange et al., 2003).

Auch meine Daten zu HIF- 1α und VEGFR/p-VEGFR(Tyr1175) zeigen stark erhöhte Werte im Proteinlevel im Vergleich zum Referenzgewebe (Abb. 14, B-D). Ein vermindertes Sauerstoffangebot in Tumorzellen triggert die Expression des Transkriptionsfaktors Hif- 1α , die wiederum über eine erhöhte Freisetzung von VEGF, zu einer Hochregulation von VEGFR und dessen phosphorylierter Form führt. Dies könnte einen Zusammenhang zwischen dem

Wnt-Signalweg und der Hypoxie in den Zellen vermuten lassen. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass hypoxische Zustände im HCC einen funktionellen Wechsel im β-Catenin-Signalweg verursachen, so wie es in der Arbeit von Liu *et al.* beschrieben wurde (Liu et al., 2010). Scheinbar verlässt β-Catenin seine ursprüngliche Funktion als Proliferationsmolekül und verstärkt HIF-1α-assoziierte Überlebensstrategien der Tumorzellen. Über diesen zellulären Umschaltmechanismus wird demnach das metastatische Potential des HCC erhöht. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte eine Subgruppe von hepatozellulären Karzinomen identifiziert werden, die gleichzeitig eine erhöhte Expression von Hypoxiemarkern und Wnt-Signalwegsmolekülen aufwiesen. Diese Gruppe zeigte ein ausgesprochen schlechtes Gesamtüberleben (Srivastava et al., 2015). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit keine weitere signifikante Erhöhung von Wnt-Signalwegsmolekülen (p-β-Catenin (Tyr142), GSK-3β, p-GSK-3β (Ser9) und Axin) gefunden werden.

5.4.2. Proteinlevel von angiogenetischen Faktoren im HCC und Referenzgewebe gleichen sich im Lauf der kalten Ischämie an

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken die Erkenntnis, dass die Angiogenese eine wichtige Rolle in der Hepatokarzinogenese spielt. Daher könnte diesen Molekülen zukünftig eine wichtige Rolle als potentielle pharmakologische Angriffspunkte in der individualisierten Krebstherapie zukommen (Wu et al., 2007). Wie bereits beschrieben, lässt sich über alle Zeitpunkte ein erhöhtes Proteinlevel der Angiogenesefaktoren (HIF1α, VEGFR, p-VEGFR (Tyr1175)) vergleichend zum Referenzgewebe beobachten. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass nur das erste Wertepaar zum Zeitpunkt 0 min statistisch signifikante Unterschiede aufweist. Die folgenden Wertepaare zu den Zeitpunkten 30 min und 60 min zeigen keine statistische Signifikanz mehr auf. Interessanterweise verhalten sich die Proteinlevel dieser Moleküle im Tumorgewebe exakt gegenläufig zu denselben Molekülen im Referenzgewebe. Während die Angiogenesefaktoren im HCC während der kalten Ischämie stetig abnehmen, steigen sie im korrespondierenden Referenzgewebe und gleichen sich im Verlauf an. Eine Erklärung für eine derartige Veränderung der Angiogenesemarker während der präanalytischen Phase könnte eine Degradation der Tumormarker bei bereits hoher Ausgangsexpression im HCC sein, während im Referenzgewebe mit niedriger Ausgangsexpression, die Marker durch die experimentell induzierte Hypoxie ansteigen. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von David et al., die nach zehnminütiger postoperativer Zeit eine kontinuierliche Degradation von Hif- 1α in Kolonkarzinomen feststellen konnten (David et al., 2014). Daraus lässt sich ableiten, dass insbesondere bei Hypoxie-assoziierten Tumormarkern eine schnellstmögliche Fixierung der klinischen Gewebeproben unabdingbar ist, da sich sonst die Werte durch verlängerte Ischämie angleichen und den Zustand *in vivo* nicht mehr widergeben. Viele Studien zeigen uns, dass die Fixierung schnellstmöglich, also idealerweise bereits im Operationssaal unmittelbar nach Resektion, erfolgen sollte, um unnötige Einflüsse während des Transportes zur zuständigen Pathologie zu vermeiden (Berg et al., 2011; Bai et al., 2013). Zusätzlich erscheint es sinnvoll, besonders in der Analyse von Hypoxie und Angiogenese ein diagnostisches Zeitintervall zu definieren, in der die Proteinlevel weitestgehend den nativen Zustand entsprechen. Daher wäre eine Einführung klar definierter zeitlicher Standards in Richtlinien zur Untersuchung von molekularen Zuständen der Hypoxie und Angiogenese empfehlenswert. Als Vorreiter wurde für die Analyse von Tumormarkern im Mammakarzinom bereits von der *American Society of Clinical Oncology* ein oberes Zeitlimit der kalten Ischämie empfohlen (Harris et al., 2007). In der nachfolgenden Graphik wurde das Zeitfenster der zuverlässlichen Diagnostik grün eingefärbt, wogegen der rot eingefärbte Bereich nicht mehr geeignet ist. Die Grenze des Zeitintervalls wurde nur schematisch angedeutet (ca. 60 min).

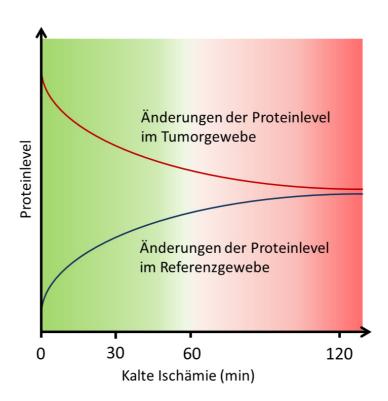


Abbildung 17: Änderungen der Proteinlevel von Hypoxie- und Angiogenesemarkern zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe im Laufe der kalten Ischämie.

Der grüne Bereich stellt das Zeitfenster einer verlässlichen Diagnostik dar. Der rote Bereich eignet sich nicht mehr für eine Diagnostik. Rote Kurve: Hypoxie- und Angiogenesemarker im Tumorgewebe; blaue Kurve: Hypoxie- und Angiogenesemarker im Referenzgewebe.

5.5. Normalisierung der Biomarker auf das korrespondierende Referenzgewebe

Die in dieser Arbeit parallel durchgeführte Analyse von peritumorösem Referenzgewebe könnte sich als Chance erweisen, präanalytische Variablen zu umgehen, da sie denselben Umwelteinflüssen ausgesetzt sind wie das Tumorgewebe. Diese Möglichkeit soll im Folgenden genauer betrachtet werden. Eine Normalisierung der Biomarker auf das jeweilig korrespondierende Referenzgewebe würde störende Variablen wie Fixierungsmethode, Transport, Temperaturbedingungen und Ischämiezeit nivellieren und die Analyse auf die reine Erhöhung oder Erniedrigung des Proteins im Tumor reduzieren. Dazu müsste man vom Gesamtproteinlevel des Tumors das Proteinlevel des Referenzgewebes sozusagen als Basislevel subtrahieren, um einen rein quantitativen Wert über den tatsächlichen Proteinstatus im Tumor zu erhalten. Voraussetzung hierfür wäre jedoch ein exakt gleiches Verhalten der Analyte im Laufe der kalten Ischämie, d.h. eine Erhöhung oder Degradation der Proteinlevel als Reaktion auf die Umgebung müsste molekülspezifisch, sowohl im Tumorgewebe als auch im Referenzgewebe, erfolgen. Vereinfacht gesagt, Tumormaterial und Referenzmaterial müsste in seinen Fluktuationen exakt korrelieren. Die Analyse von Angiogenesemarkern im vorherigen Abschnitt, widerspricht jedoch genau diesem Ansatz. Auch die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen keine Korrelation der Proteinlevel in Tumoren zu Normalgewebe im Verlauf der kalten Ischämie (vgl. Tab. 10 und 11). Vor dem Hintergrund der Heterogenität, die ja bereits innerhalb eines Tumors gravierende Unterschiede aufweisen kann und dem unterschiedlichen, nicht vorherzusagenden biologischen Verhalten der Proteine, muss dieser Ansatz verlassen werden. Ein vielversprechenderer Ansatz, diese Problematik zu lösen, kann die Einführung hochgradiger Standards für die präanalytische Phase darstellen, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden soll.

5.6. Einfluss der Gewebefixierung auf die molekulare Signatur

Während Gefriergewebe in flüssigem Stickstoff (N2) oft in der Grundlagenforschung und in der Entwicklung von Biomarkern verwendet wird, spielt es in der histopathologischen Diagnostik eine eher untergeordnete Rolle. Methode der Wahl in der klinischen Routine ist die Formaldehydfixierung. Diese induziert durch ein crosslinking der Proteine eine Konservierung des Gewebes und zeigt ausgezeichnete Färbeergebnisse für die Mikroskopie. Die Formaldehydfixierung ist nahezu für alle Gewebearten geeignet, für sämtliche klinische Einrichtungen praktikabel und die Proben können über lange Zeiträume bei Raumtemperatur gelagert werden (Fox et al., 1985). Durch die grundsätzlich unterschiedlichen Methoden der Gewebeprozessierung ergeben sich auch unterschiedliche präanalytische Störfaktoren. Abb. 18 zeigt schematisch den unterschiedlichen Weg einer Gewebeprobe während der präanalytischen Phase. Links, blau eingefärbt, die Kryokonservierung bei kalten Temperaturen und rechts, in rot, die FFPE-Aufbereitung bei warmen Temperaturen bis 100°C. Während die Fixierung des Gefriergewebes bei -196° C rasch erfolgt, benötigt das Formaldehyd bei Raumtemperatur eine gewisse Zeit bis das Gewebe penetriert und durchfixiert ist. Man geht hier von wenigen Millimetern pro Stunde aus (Fox et al., 1985). Daher kann man annehmen, dass der Kern einer Gewebeprobe bei der Formaldehyd-Fixierung einer längeren kalten Ischämie exponiert ist als die Randbereiche und demzufolge stärkere Fluktuationen nachzuweisen sind (Nassiri et al., 2008). Auch die Entwässerung, die Einbettung in flüssigem Paraffin (60° C), die Rehydrierung nach dem Schneiden am Mikrotom und die Thermoschritte (20 Min. 100°C und 2 Std. 80°C), im Falle der Proteinextraktion, können ihren artifiziellen Fingerabdruck auf die spätere molekulare Analyse hinterlassen. Die sensiblen Phasen bei der Probenaufarbeitung von Gefriergewebe, sind das Antauen und Wiedereinfrieren am Kryostat, das Überführen in Reaktionsgefäße, sowie der Transport und die Lagerung bis zur Analyse.

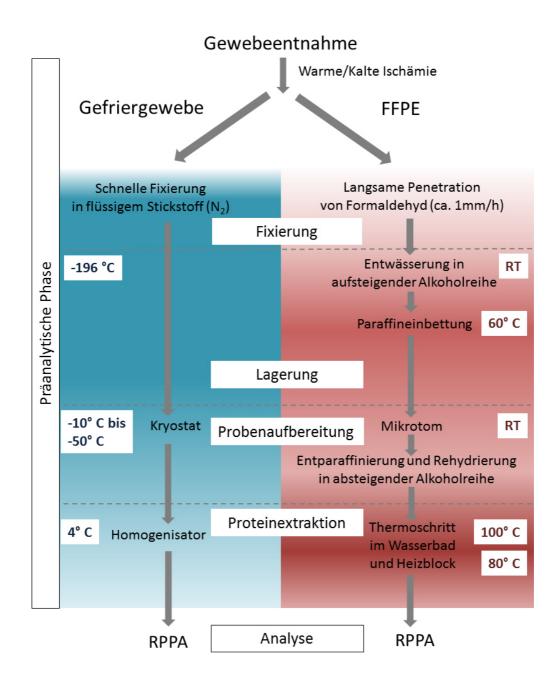


Abbildung 18: Vergleich der Gewebeprozessierung zwischen Gefriergewebe und FFPE-Gewebe.

Unterschiedliche präanalytische Einflussfaktoren in der Prozessierung und der Temperaturexposition von klinischen Gewebeproben von der Gewebeentnahme bis zur molekularen Analyse. Links in blau die Fixierung von Gefriergewebe, rechts in rot die Herstellung von FFPE-Gewebe. (Schematische Farbgraduierung der Temperaturexposition.)

Die Vergleichbarkeit zwischen Kryogewebe und FFPE-Gewebe wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Viele Arbeiten zeigen generell übereinstimmende Daten bei proteinextraktionsbasierten Analysen zwischen beiden Fixierungsarten (Sprung et al., 2009;

Tanca et al., 2012). Guo et al. konnten anhand von Brustkrebsgewebe und Nierentumorgewebe weitgehend ähnliche Daten zwischen Kryogewebe und FFPE-Gewebe im RPPA zeigen (Guo et al., 2012). Jedoch wurden einige Marker identifiziert, die keine Korrelation zwischen frisch-gefrorenem und FFPE-Material aufwiesen. Möglicherweise können diese Unterschiede auf einer unterschiedlichen Proteinausbeute zwischen den beiden Gewebeprozessierungen beruhen, wie Analysen in der Massenspektrometrie vermuten lassen (Addis et al., 2009). Broeckx et al. konnten in einer vergleichenden MS-Analyse zeigen, dass nur ca. 60% der identifizierten Proteine in schockgefrorenem Gewebe und FFPE-Gewebe nachzuweisen waren (Broeckx et al., 2016). Ca. 30% der Proteine wurden nur im kryokonservierten Gewebe, ca. 11% alleinig im FFPE-Gewebe bestimmt. Das weist darauf hin, dass abhängig von der Fixierungsart einige Proteinbiomarker niedrigere Proteinspiegel aufweisen oder teilweise komplett unentdeckt bleiben und in der Folge methodenspezifische Signaturen generiert werden. Noch gravierendere Unterschiede in der Proteinanalyse zwischen frisch-gefrorenem und FFPE-Gewebe zeigten sich in der 2D-Gelelektrophorese (Davalieva et al., 2014). Hier konnte insgesamt nur eine Übereinstimmung von 7-10% festgestellt werden. Daraus geht eindeutig hervor, dass beide Techniken ihre eigenen exogenen Einflüsse auf die Gewebeproben haben und die zu untersuchenden Analyte dementsprechend unterschiedlich darauf reagieren.

Auch die Art der Gewebeentnahme scheint erheblichen Einfluss auf das Proteinmuster zu haben. Es konnte bereits am Mammakarzinom demonstriert werden, dass die erfasste Proteinaktivität des PI3K-Signalwegs in Biopsien höher ist als in Resektaten aus offenen Operationen (Meric-Bernstam et al., 2014). Auch in einer kürzlich erschienen Arbeit von Böllner & Becker konnten bei einer RPPA-basierenden Analyse von FFPE-Brustkrebsgewebeproben signifikant erhöhte Proteinspiegel von Her3, p-Her2, p-EGFR, p-ERK, p-4E-BP1, PDGFR-ß und p-mTOR in Biopsien im Vergleich zum Primärresektat gezeigt werden (Boellner & Becker, 2015). Ähnliche Ergebnisse lieferte auch Gündisch et al., die in Mammakarzinomen eine erhöhte Stabilität von Phosphoproteinen in Biopsien nachweisen konnten (Gundisch et al., 2015). Ein möglicher Grund scheint hierfür das Fehlen der warmen Ischämie und die extrem kurze kalte Ischämie bei den Probenbiopsien zu sein. Das lässt uns vermuten, dass eine verlängerte Ischämie, bedingt durch langsamere Formaldehyd-Penetration größerer Gewebestücke, Einflüsse auf die Stabilität der Biomarker hat. So konnte beispielsweise in einer Arbeit von Chung et al. demonstriert werden, dass allein die zu kurze Fixierung in Formaldehyd erheblichen Einfluss auf die RNA-Qualität hat (Chung et al., 2008). Diese Tatsache ist bemerkenswert, da bereits kleinste Schwankungen innerhalb einer Fixierungsmethode Auswirkungen auf die Qualität von Biomarkern haben können.

In dieser Arbeit ging aus einer hierarchischen Clusteranalyse der Patienten hervor, dass in Abhängigkeit der Gewebefixierung eigene Subgruppen gebildet werden. Aufgrund der begrenzten Fallzahl lässt sich daraus keine generelle Aussage treffen, jedoch lässt sich daraus ableiten, dass die unterschiedliche Probenaufarbeitung starke Einflüsse auf das Proteinprofil zu haben scheint. Obwohl sich die molekulare Signatur durch die Gewebefixierung eindeutig verändert, müssen die Ergebnisse aus der Clusteranalyse kritisch hinterfragt werden. Eine Erklärung wäre eine Verzerrung durch *batch effects. Batch effects* sind systematische nicht-biologische Unterschiede zwischen *batches* (Gruppen) in Mikroarray Experimenten, die eine Vielzahl unterschiedlichster Ursachen haben können (Luo et al., 2010). Eine systematische Beeinflussung der Proteinlevel in Abhängigkeit der Gewebeverarbeitung kann in diesem Fall demnach nicht eindeutig ausgeschlossen werden und sollte im Falle einer Wiederholung des Experiments unbedingt vermieden werden.

Trotzdem oder gerade deswegen, zeigen uns diese Daten, dass ein Transfer zwischen schockgefrorenem und Formalin-fixiertem Gewebematerial nicht immer ohne weiteres möglich ist. Ein zuverlässiger Vergleich von Molekülen sollte daher nur innerhalb einer Methode erfolgen, da jede Gewebeprozessierung seine eigenen artifiziellen Muster mit sich bringt. Die große Bedeutung einheitlicher Standards in der Gewebeaufarbeitung soll im folgenden Kapitel genauer betrachtet werden.

5.7. Optimierung der Gewebequalität durch Standardisierung der präanalytischen Phase

Da über die Effekte der Gewebeprozessierung bisher nur wenig bekannt ist, bedarf es einer Standardisierung der präanalytischen Phase, um die Gewebequalität für Diagnostik und Therapie zu optimieren. Fest steht, dass nur eine exzellente Probenqualität zu exzellenten Daten und somit zu verlässlichen Entscheidungen in der stratifizierten Medizin führen kann (Poste, 2011; Becker, 2015). Gewebegewinnung und Protokollabwicklung müssen daher standardisiert werden, um die Anforderungen an die maximale Ischämiezeit, die optimale Temperatur während Lagerung und Transport sowie die Mindestmenge in geeigneten Probenbehältern festzulegen. Erst durch eine lückenlose Kontrolle und eine strenge Einhaltung der Protokolle kann eine harmonisierte Behandlung der Gewebeproben und somit eine Minimierung der Variabilität erzielt werden. Diese Anforderungen müssen von validierten Prozessen gesteuert und sichergestellt werden.

In vielen Einrichtungen hat dies zur Implementierung von sogenannten *standard operating procedures (SOPs)* geführt, um in der Entnahme, Prozessierung und Lagerung von Biomaterial einheitliche Richtlinien zu etablieren. Jedoch lassen sich teilweise erhebliche instituts-spezifische Unterschiede dieser *SOPs* beobachten. Diese Tatsache führt zwangsweise zu

falschen Daten bei vergleichenden Analysen von verschiedenen Kliniken und Biobanken. Um dieses Problem zu lösen, bedarf es internationaler Richtlinien, die als allgemeingültige Standards, Zugang in alle Institutionen finden müssen, um die Probenqualität und diagnostische Güte zu verbessern (Becker, 2015). Kürzlich wurde ein neuer Ansatz zur Standardisierung der präanalytischen Phase in Form von NCI Biospecimen Evidence-Based Practices (BEBPs) (Engel et al., 2014) als Optimierung bereits bestehender Richtlinien veröffentlicht, um die Qualität von präanalytischen Arbeitsabläufen zu erhöhen. Der Bedarf an standardisierten Normierungen im voranalytischen Bereich der molekularen Diagnostik zeigt sich auch an der europäischen Forschungsinitiative SPIDIA (Standardization and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in-vitro diagnostics). Trotz zunehmender Bedeutung der molekularen Diagnostik in ganz Europa, gab es lange Zeit keine normierten Abläufe in der Probenvorbereitung. Ziel von SPIDIA war es daher, verbindliche Qualitätskontrollen und einheitliche Leitlinien für die Durchführung von In-vitro-Diagnoseprozessen zu entwickeln. Die erhobenen Standards für die präanalytische Gewinnung, Handhabung und Verarbeitung von Patientenproben wurden in Form von neun Arbeitspapieren vom europäischen Normungskomitee CEN/TC 140 im Jahre 2015 publiziert. Sie beinhalten auch optimierte Arbeitsabläufe von proteinbasierenden Untersuchungen an klinischen Gewebeproben. Der Erfolg von SPIDIA und der wachsende Bedarf an Standardisierung der präanalytischen Phase zeigt sich auch in der Fortsetzung SPIDIA4P (SPIDIA for personalized medicine), die Anfang des Jahres 2017 ihre Arbeit aufgenommen hat.

Das komplexe Management von wertvollen Patientenproben stellt uns vor große Herausforderungen und erfordert intelligente Biobanken, in denen Gewebeproben sicher aufbewahrt werden und deren klinisch-pathologische Informationen jederzeit elektronisch zugänglich sind (Zatloukal & Hainaut, 2010). Die *Biobank Alliance* des m⁴-Spitzenclusters München, die die Durchführung der vorliegenden Arbeit erst ermöglicht hat, hat sich als Ziel gesetzt, auf Gewebe und Blut basierte Biobanken am Standort München in einer gemeinsamen Datenbank nach gemeinsamen Standards zu erfassen und einheitliche Maßstäbe für Gewinnung und Verarbeitung von klinischen Patientenproben zu entwickeln (Thasler et al., 2017). In Biobanken aufbewahrte humane krankheitsspezifische Gewebeproben sind daher von größter Bedeutung für die Weiterentwicklung der personalisierten Medizin. Dies zeigt uns, dass die Bedeutung der Präanalytik zukünftig noch mehr in den Fokus von Forschern, Pathologen und Klinikern gerückt werden muss, um ein besseres Bewusstsein für diese wichtige Thematik zu schaffen.

Da nicht jeder Aspekt der präanalytischen Phase, beispielsweise die warme Ischämie während der Operation, standardisiert werden kann, ist es unabdingbar, möglichst viele Variablen zu dokumentieren (Becker, 2015). Jede Probe bedarf einer detaillierten, lückenlosen Dokumentation von der Entnahme, der kalten Ischämie, dem Transport, bis zur Fixierung,

Lagerung und Aufbereitung der Proben, um mögliche Störeinflüsse zu identifizieren. Klar ist, dass verlässliche Messungen und die korrekte Interpretation von Biomarkern engmaschig kontrollierte Richtlinien erfordert und die richtige Einschätzung präanalytischer Einflussfaktoren auf molekulare Analyte besser verstanden werden muss.

5.8. RPPA als geeignete Methode zur objektivierten, quantitativen Analyse von Proteinen in Gewebeproben

Der RPPA gehört zu den besten Methoden, parallel eine große Anzahl von Proteinen und dessen posttranslationale Modifikationen in einer Vielzahl von Gewebeproben bei einem geringen Probenvolumen zu analysieren (Voshol et al., 2009). In der molekularen Pathologie ist nach wie vor die immunhistochemische Untersuchung der Goldstandard. In der quantitativen und simultanen Untersuchung von zahlreichen Proben stößt diese Methode jedoch an ihre Grenzen, zumal sie stark vom Betrachter abhängig ist und nur semiquantitative Ergebnisse liefert. Weiterhin kann in der IHC der Aktivierungsstatus der Zelle, z.B. in Form von Phosphorylierungen (z.B. p-Her2), nur unzureichend erfasst werden und bleibt oft verborgen (Frogne et al., 2009). Hier eignet sich besonders der Einsatz von Hochdurchsatztechniken auf Proteinebene, die die technischen Möglichkeiten von RNA- und DNA-Analysen optimal ergänzen. Diese Proteomanalysen haben den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu Genexpressionsanalysen, Informationen über die durch Proteinphosphorylierung gesteuerte Signaltransduktion, posttranslationale Modifikationen oder Bindungspartner liefern können (Ge et al., 2003). Eine weitere Herausforderung ist der Umgang mit wertvollem, teils begrenzt verfügbarem, diagnostischem Material. Aufgrund der verbesserten und früheren Krebserkennung sehen sich Pathologen immer mehr mit kleineren Tumorproben konfrontiert. Daher bedarf es effizienter Methoden, die umfassende Analysen bereits mit kleinsten Mengen ermöglichen. Vorteil der extraktbasierten Reverse Phase Protein Array Methode ist, dass bereits geringste Volumina des Nanoliterbereich ausreichend Lysats im sind. um funktionelle, quantitative Biomarker-Kartierungen durchzuführen (Malinowsky et al., 2010). Da das minimale Detektionslevel dieser Methode im Attogrammbereich (10⁻¹⁸g) liegt, erlaubt sie noch sensitivere Messungen als ein Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Rapkiewicz et al., 2007; Grote et al., 2008). Zur genauen Quantifizierung der absoluten Proteinmenge können gereinigte, rekombinante Proteine als Standard eingesetzt werden und erlauben dabei, im Gegensatz zur IHC, eine exakte und v.a. objektive Bewertung der Ergebnisse (Wulfkuhle et al., 2012). Jedoch sei an dieser Stelle erwähnt, dass durch die Extraktion der Gewebeprobe jegliche

histomorphologische Information verloren geht. Ein Lösungsansatz dieses Problems wurde in einer Arbeit von Becker und Taylor treffenderweise als "Liquid Morphology" beschrieben und vereint sowohl den Erkenntnisgewinn aus der histopathologischen Gewebeuntersuchung als auch aus der Proteinextraktion der nachfolgenden quantitativen Signalwegsanalyse (Becker & Taylor, 2011). Ein weiterer Vorteil der RPPA Methode ist die Unabhängigkeit vom Probenmaterial, d.h. Proteine aus nativen, kryokonservierten oder FFPE Geweben können untersucht werden. Die Reverse Phase Protein Array Analysen wurden ausschließlich an frisch präpariertem oder schockgefrorenem Material durchgeführt (Gulmann et al., 2005; Petricoin et al., 2005). Lange Zeit wurde es für unmöglich gehalten, Proteine aus FFPE Gewebeproben zu extrahieren. In den letzten Jahren wurden jedoch wirksame Methoden entwickelt, um dieses Problem zu lösen (Shi et al., 2006; Becker et al., 2007). Daraus ergeben sich herausragende Möglichkeiten auch auf ältere, archivierte Gewebekollektive zurückzugreifen und retrospektive Studien durchzuführen (Wolff et al., 2011). Der größte limitierende Faktor von RPPA Analysen ist die Etablierung spezifischer Antikörper. Nishizuka et al. konnten an unfixierten Zelllinien zeigen, dass nur ca. 70% von über 200 getesteten Antikörpern für den Array geeignet waren (Nishizuka et al., 2003). Bei der Verwendung von fixiertem Gewebematerial dürfte eine noch höhere Ausfallquote zu erwarten sein. In anderen immunologischen Verfahren kann eine fehlende Spezifität teilweise durch Abgleich des Molekulargewichts (Western Blot) oder durch die Verwendung zwei spezifischer Antikörper (ELISA) kompensiert werden. Dies ist beim RPPA nicht möglich. Daher müssen im Vorfeld alle verwendeten Antikörper im Western Blot validiert werden (Berg et al., 2010-1; Schuster et al., 2012). Von den 29 in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern zeigten 22 spezifische, singuläre Banden auf der erwarteten Höhe. Erk und P-Erk (Thr202/Tyr204) zeigten jeweils zwei Banden auf Höhe von 42 kDa und 44 kDa, die erwartungsgemäß die Isoform des Moleküls darstellen. Die Spezifität von den großen Molekülen Her2, Her3, p-Her3(Tyr1289), VEGFR, p-VEGFR(Tyr1175) konnte nur an schockgefrorenem Gewebe gezeigt werden, da es bei der Proteinextraktion aus FFPE-Gewebe zu einer unzureichenden Spaltung von quervernetzten Proteinagglumeraten kam und folglich nur undefinierbare Banden am Übergang von Sammel- und Trenngel detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu konnte Berg et al. die Spezifität von Her2 in formalinfixierten Brustkrebsgewebeproben nachweisen (Berg et al., 2010-2). Weitere getestete unspezifische Antikörper fielen somit aus dem Raster und konnten nicht für diese Technologie verwendet werden.

Für die Einschätzung der Reproduzierbarkeit wurden sowohl Inter-Array-Vergleiche als auch Inter-Extraktions-Vergleiche durchgeführt. Hierfür wurden die bedruckten Arrays mit einem hochspezifischen Antikörper (Her2) detektiert und die Gesamtproteinmenge mittels Sypro Ruby erfasst. Die statistische Auswertung ergab einen CV von ca. 17% im Inter-Array-Vergleich und einen CV von ca. 15% im Inter-Extraktions-Vergleich (Berg et al., 2010-1). Verglichen mit der

Immunhistochemie, die eine hohe *Interobserver*-Variabilität und CV-Werte von bis zu 50% zeigt, ist diese Methode eindeutig zuverlässiger (Hsu et al., 2003).

Neben den vielen Vorteilen dieser Technologie, gibt es auch einige Limitationen. Wie bereits erwähnt, schränkt die Verwendung ausschließlich hochspezifischer Antikörper die Auswahl an zu untersuchenden Proteinbiomarker ein und kann nicht mit anderen Plattformen wie der Massenspektrometrie verglichen werden, die mehrere Tausend Proteine gleichzeitig detektieren kann (Mertins et al., 2016; Tyanova et al., 2016). Zusätzlich kann eine verminderte Probenqualität das Ergebnis der Array Analyse erheblich einschränken (Malinowsky et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass der Reverse Phase Protein Array eine ideale Methode ist, um objektivierte, quantitative Analysen von Gewebeproben und Zelllinien für die Forschung durchzuführen und stellt eine herausragende Chance für die Verbesserung von Proteomanalysen in der translationalen Medizin dar. Dies wird durch die steigende Verbreitung und Anwendung von RPPA in den letzten Jahren zunehmend deutlich (Hong et al., 2010; Ince et al., 2015; von der Heyde et al., 2016; Li et al., 2017). Darüber hinaus scheint diese Technologie das Potential zu haben, in Zukunft in die klinische Routinediagnostik implementiert zu werden (Akbani et al., 2014).

6. Ausblick

Mit der Identifizierung und Validierung von prädiktiven Biomarkern und der folgenden Stratifizierung von Patienten wurde eine neue Ära in der Medizin eingeleitet. Eine Erfassung molekularer Zielstrukturen für eine individualisierte Therapie von Krebspatienten ist heutzutage fest in der klinischen Routine verankert. Für die optimale Versorgung von Tumorpatienten ist die Medizin jedoch auf ein Maximum an Präzision in der Analyse von Biomarkern angewiesen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bestätigen die Erkenntnis, dass klinische Gewebeproben sensibel auf Umwelteinflüsse in der präanalytischen Phase reagieren und die exakte Bestimmung von Proteinen und Phosphoproteinen dadurch erheblich reduziert wird (Mertins et al., 2014; Gajadhar et al., 2015). In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Broeckx et al. wurde die präanalytische Variabilität von Proteomanalysen aus Gewebeproben statistisch ausgewertet (Broeckx et al., 2016). Insgesamt wurde ein mittlerer Varianzkoeffizient von 48% bei MS-basierender Analyse von tierischen FFPE-Gewebeproben ermittelt, wovon 12% auf die MS-Methodik und 36% auf präanalytische Fluktuationen zurückzuführen waren. Die Autoren konnten darüber hinaus eine Probenvariabilität (Probenaufbereitung und biologische Heterogenität) von über 68% bei humanen Kolonproben feststellen. Das sind alarmierende Erkenntnisse für die Fachwelt, die dringend ein Umdenken erfordern.

Wie in Kapitel 5.7. beschrieben, gibt es bereits weltweite Bemühungen für standardisierte Arbeitsabläufe in der Aufbereitung klinischer Gewebeproben in der Pathologie. Die Realität sieht jedoch so aus, dass Arbeitsabläufe in der präanalytischen Phase immer noch viel zu häufig aus eigenständigen, schlecht verzahnten und fluktuierenden Prozessen bestehen (Abb. 19 A). In Zukunft bedarf es daher Proteomanalysen, die in gut vernetzte, harmonisierte und standardisierte *workflows* implementiert werden (Abb. 19 B), um das meiste aus einer Gewebeprobe für die exakte Diagnose und die optimale Behandlung eines Patienten herauszuholen (Boellner & Becker, 2015).

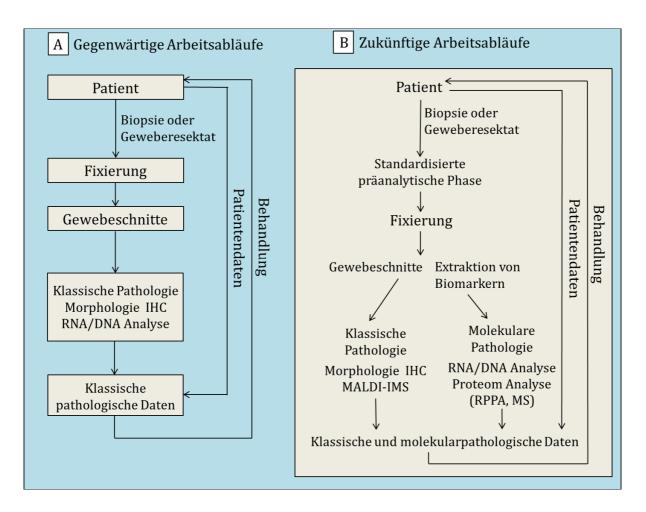


Abbildung 19: Vergleich von gegenwärtigen und zukünftigen Arbeitsabläufen in der molekularen Analyse von klinischen Gewebeproben.

Gegenwärtige, isolierte Arbeitsabläufe (A) und vorgeschlagene, zukünftige, harmonisierte Arbeitsabläufe mit Standardisierung der präanalytischen Phase und integrierten Proteomanalysen (B) für die optimale Prozessierung von klinischen Gewebeproben (modifiziert nach Boellner & Becker, 2015).

7. Summary/Zusammenfassung

7.1. Summary

Profiling disease-associated protein signaling networks in tumor tissues is an important component of the strategy for personalized cancer therapy. Unfortunately, variability of protein biomarkers in human tissue specimens can cause significant bias in molecular analysis. The aim of this thesis was to assess the potential effects of delayed tissue preservation (cold ischemia) on protein and phosphoprotein levels in human hepatocellular carcinoma. To characterize the impact of the preanalytical phase on protein and phosphoprotein levels, 6 human hepatocellular carcinoma specimens and corresponding reference tissues were collected, divided and either snap-frozen or fixed in formalin after defined ischemic intervals, ranging from 0 to 120 minutes. Proteins were extracted and 29 signaling pathway proteins and phosphoprotein levels were measured for all time points by reverse phase protein arrays (RPPA). Comparison across tissue specimens revealed an increase of p-Erk (Tyr202/204) and beta-Catenin within the first 60 minutes after excision. In contrast, other protein levels, like p-EGFR (Tyr1086) and Her2 were unchanged after 120 minutes and seem to be stable during the preanalytical phase. Moreover, we found a decrease of angiogenetic signaling factors (HIF1alpha, VEGFR, p-VEGFR (Tyr1175)) in HCC during ischemic duration, whereas these molecules increase in corresponding reference tissue. Thus, during cold ischemia protein levels of angiogenetic factors in HCC and reference tissue become similar. Depending on the experimental delay time, some protein biomarker levels were up-regulated or suppressed in a manner which did not represent the protein level at the time of surgical resection. To obtain reliable proteomics data, human tissue specimens should be stabilized as soon as possible after resection. Moreover, I suggest that the total duration of cold ischemia should be documented and the preanalytical phase needs to be standardized. Valid measurement and exact interpretation of protein biomarkers require tightly controlled guidelines, taking into account preanalytical variables.

7.2. Zusammenfassung

Die Analyse krankheitsassoziierter Signalwegsproteine im Tumorgewebe ist ein wichtiger Bestandteil in der Strategie der personalisierten Krebstherapie. Leider können Instabilitäten von Proteinbiomarkern im humanen Gewebe Ergebnisse von molekularen Analysen verfälschen. Ziel dieser Arbeit ist es, potentielle Effekte einer verzögerten Gewebefixierung (kalte Ischämie) auf das Protein- und Phosphoproteinlevel im hepatozellulären Karzinom zu evaluieren. Um den Einfluss der präanalytischen Phase auf die Protein- und Phosphoproteinspiegel zu charakterisieren, wurden 6 Gewebeproben von humanen hepatozellulären Karzinomen mit dazu korrespondierendem Referenzgewebe gesammelt, geteilt und nach definierten ischämischen Intervallen, von 0 bis 120 Minuten, sowohl schockgefroren als auch Formalin-fixiert. Die Proteine wurden extrahiert und 29 Signalwegsprotein- und Phosphoproteinlevel über alle Zeitpunkte mittels Reverse Phase Protein Arrays (RPPA) gemessen. Ein Vergleich zwischen den Geweberesektaten ergab eine Erhöhung von p-Erk (Tyr202/204) und beta-Catenin innerhalb der ersten 60 Minuten nach Resektion. Im Gegensatz dazu waren andere Proteinlevel, wie p-EGFR (Tyr1086) und Her2, nach 120 Minuten unverändert und scheinen während der präanalytischen Phase stabil zu sein. Weiter wurde im hepatozellulären Karzinom im Verlauf der kalten Ischämie eine Erniedrigung von angiogenetischen Signalwegsfaktoren (HIF1alpha, VEGFR, p-VEGFR (Tyr1175)) beobachtet, während der Gehalt dieser Moleküle im korrespondierenden Referenzgewebe anstieg. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Proteinlevel von angiogenetischen Faktoren im HCC und Referenzgewebe während der kalten Ischämie angleichen. Abhängig von der experimentellen zeitlichen Verzögerung wurden einige Proteinbiomarker in einer Art und Weise hochreguliert oder unterdrückt, die nicht mehr dem Proteinlevel zum Zeitpunkt der Resektion entsprachen. Um verlässliche proteomische Daten zu erhalten, sollten menschliche Gewebeproben so schnell wie möglich nach Resektion stabilisiert werden. Zusätzlich schlage ich vor, die Gesamtdauer der kalten Ischämie zu dokumentieren und die präanalytische Phase zu standardisieren. Die verlässliche Messung und genaue Interpretation von Proteinbiomarkern erfordert engmaschig kontrollierte Richtlinien und die Berücksichtigung präanalytischer Einflussfaktoren auf Ergebnisse molekularer Analysen.

${\bf 8.\,Abbildungs verzeichnis}$

Abbildung 1: Einfluss präanalytischer Variationen während der Gewebeprozessierung	11
Abbildung 2: BCLC Klassifikation des hepatozellulären Karzinoms	17
Abbildung 3: Vereinfachtes Schema relevanter deregulierter Signalwegskaskaden in der	
Entstehung und Progression des hepatozellulären Karzinoms	19
Abbildung 4: Überblick über die verwendeten Gewebeproben	35
Abbildung 5: Präanalytische Phase von der Gewebegewinnung bis zur molekularen Analyse	38
Abbildung 6: Studiendesign der klinischen Gewebeproben.	39
Abbildung 7: Prinzip des Reverse Phase Protein Array (RPPA)	44
Abbildung 8: Auswahl von in dieser Arbeit verwendeten hochspezifischen Antikörpern	49
Abbildung 9: Ausgewählte HE-gefärbte Kryoschnitte eines Patienten zur Darstellung der	
morphologischen Homogenität der Gewebeproben.	52
Abbildung 10: Starke Fluktuationen im Proteinlevel von kryokonserviertem humanem Gew	ebe
(Referenzgewebe und HCC) mittels RPPA-Analyse	57
Abbildung 11: Stabiler Verlauf im Proteinlevel von kryokonserviertem humanem Gewebe	
(Referenzgewebe und HCC) mittels RPPA-Analyse	58
Abbildung 12: Box Plot Darstellung der interindividuellen Variationsbreite spezieller	
Proteinlevel im hepatozellulären Karzinom	60
Abbildung 13: Einfluss der präanalytischen Phase auf die intraindividuelle Variabilität der	
Proteinlevel von vier repräsentativen humanen Gewebeproben	64
Abbildung 14: Box-Plot Darstellung an ausgewählten deregulierten Signalwegsproteinen üb	er
alle Zeitpunkte mit Median und Perzentilen, die im HCC höher exprimiert sind als im	
korrespondierenden Referenzgewebe	65
Abbildung 15: Hierarchische Clusteranalyse als <i>heat map</i> von benignem und malignem	
Lebergewebe unterschiedlicher Ischämiezeiten und Fixierungsmethoden im Bezug zu HCC	
assoziierten Signalwegsmolekülen und dessen phosphorylierte Formen	70
Abbildung 16: Proteinlevel in Abhängigkeit der Fixierungsmethode und der Ischämiezeit	71
Abbildung 17: Änderungen der Proteinlevel von Hypoxie- und Angiogenesemarkern zwisch	en
Tumorgewebe und Referenzgewebe im Laufe der kalten Ischämie	79
Abbildung 18: Vergleich der Gewebeprozessierung zwischen Gefriergewebe und FFPE-Gewe	
	82
Abbildung 19: Vergleich von gegenwärtigen und zukünftigen Arbeitsabläufen in der	
molekularen Analyse von klinischen Gewebeproben	90

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des hepatozellulären Karzinoms	16
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Chemikalien	28
Tabelle 3: Verwendete Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen	29
Tabelle 4: Verwendetes Verbrauchsmaterial.	30
Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte Primärantikörper und deren Verdünnungen im Weste	ern
Blot und Reverse Phase Protein Array	31
Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper	33
Tabelle 7: Überblick über die verwendeten HCC-Gewebeproben	34
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Geräte.	36
Tabelle 9: Für die Datenauswertung und Abbildungserstellung verwendete Software.	37
Tabelle 10: RPPA Ergebnisse der kryokonservierten Referenzgewebe	53
Tabelle 11: RPPA Ergebnisse des kryokonservierten HCC	55
Tabelle 12: RPPA Ergebnisse der FFPE Referenzgewebe.	67
Tabelle 13: RPPA Ergebnisse der FFPE HCC	68

10. Literaturverzeichnis

- **Addis**, M. F., A. Tanca, D. Pagnozzi, S. Crobu, G. Fanciulli, P. Cossu-Rocca and S. Uzzau. "Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." <u>Proteomics</u> (2009); **9**(15): 3815-3823.
- **Akbani**, R., K. F. Becker, N. Carragher, T. Goldstein, L. de Koning, U. Korf, L. Liotta, G. B. Mills, S. S. Nishizuka, M. Pawlak, E. F. Petricoin, 3rd, H. B. Pollard, B. Serrels and J. Zhu. "Realizing the promise of reverse phase protein arrays for clinical, translational, and basic research: a workshop report: the RPPA (Reverse Phase Protein Array) society." <u>Mol Cell Proteomics</u> (2014); **13**(7): 1625-1643.
- **Aktipis**, C. A., A. M. Boddy, R. A. Gatenby, J. S. Brown and C. C. Maley. "Life history trade-offs in cancer evolution." Nat Rev Cancer (2013); **13**(12): 883-892.
- **Alves**, R. C., D. Alves, B. Guz, C. Matos, M. Viana, M. Harriz, D. Terrabuio, M. Kondo, O. Gampel and P. Polletti. "Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs." <u>Ann Hepatol</u> (2011); **10**(1): 21-27.
- **Amir**, E., N. Miller, W. Geddie, O. Freedman, F. Kassam, C. Simmons, M. Oldfield, G. Dranitsaris, G. Tomlinson, A. Laupacis, I. F. Tannock and M. Clemons. "Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer." <u>J Clin Oncol</u> (2012); **30**(6): 587-592.
- **Baffy**, G., E. M. Brunt and S. H. Caldwell. "Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace." <u>J Hepatol</u> (2012); **56**(6): 1384-1391.
- **Bai**, Y., H. Cheng, J. Bordeaux, V. Neumeister, S. Kumar, D. L. Rimm and D. F. Stern. "Comparison of HER2 and phospho-HER2 expression between biopsy and resected breast cancer specimens using a quantitative assessment method." <u>PLoS One</u> (2013); **8**(11): e79901.
- **Baker**, A. F., T. Dragovich, N. T. Ihle, R. Williams, C. Fenoglio-Preiser and G. Powis. "Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling." <u>Clin Cancer Res</u> (2005); **11**(12): 4338-4340.
- **Baluk**, P., H. Hashizume and D. M. McDonald. "Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer." <u>Curr Opin Genet Dev</u> (2005); **15**(1): 102-111.
- **Becker**, K. F. "Using tissue samples for proteomic studies critical considerations." <u>Proteomics Clin Appl.</u> (2015); **9**(3-4): 257-267
- **Becker**, K. F., C. Schott, I. Becker and H. Hofler. "Guided protein extraction from formalin-fixed tissues for quantitative multiplex analysis avoids detrimental effects of histological stains." Proteomics Clin Appl (2008); **2**(5): 737-743.
- **Becker**, K. F., C. Schott, S. Hipp, V. Metzger, P. Porschewski, R. Beck, J. Nahrig, I. Becker and H. Hofler. "Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis." <u>J Pathol</u> (2007); **211**(3): 370-378.
- **Becker**, K. F. and C. R. Taylor. ""Liquid morphology": Immunochemical analysis of proteins extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Combining proteomics with immunohistochemistry." <u>Appl Immunohistochem Mol Morphol</u> (2011); **19**(1): 1-9.

- **Berg**, D. (1), S. Hipp, K. Malinowsky, C. Bollner and K. F. Becker. "Molecular profiling of signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded cancer tissues." <u>European Journal of Cancer</u> (2010); **46**(1): 47-55.
- **Berg**, D. (2), H. Bronger, A. Walch, H. Hofler, K.F. Becker. "Analyse von Signalwegen in formalinfixierten Brustkrebsgeweben." <u>Pathologe</u> (2010); **31**(2):296-299
- **Berg**, D., R. Langer, K. Tran, A. Walch, T. Schuster, H. Bronger and K. F. Becker. "Protein microarray-based comparison of HER2, estrogen receptor, and progesterone receptor status in core biopsies and surgical specimens from FFPE breast cancer tissues." <u>Appl Immunohistochem Mol Morphol</u> (2011); **19**(4): 300-305.
- **Berg**, D., C. Wolff, K. Malinowsky, K. Tran, A. Walch, H. Bronger, T. Schuster, H. Hofler and K. F. Becker. "Profiling signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues reveals cross-talk between EGFR, HER2, HER3 and uPAR." <u>J Cell Physiol</u> (2012); **227**(1): 204-212.
- **Bialecki**, E. S., A. M. Ezenekwe, E. M. Brunt, B. T. Collins, T. B. Ponder, B. K. Bieneman and A. M. Di Bisceglie. "Comparison of liver biopsy and noninvasive methods for diagnosis of hepatocellular carcinoma." <u>Clin Gastroenterol Hepatol</u> (2006); **4**(3): 361-368.
- **Bianchi**, M. E. "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." <u>J Leukoc Biol</u> (2007); **81**(1): 1-5.
- **Biomarkers Definitions Working**, G. "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." <u>Clin Pharmacol Ther</u> (2001); **69**(3): 89-95.
- **Boellner**, S. and K. F. Becker. "Recent progress in protein profiling of clinical tissues for next-generation molecular diagnostics." <u>Expert Rev Mol Diagn</u> (2015); **15**(10): 1277-1292.
- **Boissan**, M., E. Beurel, D. Wendum, C. Rey, Y. Lecluse, C. Housset, M. L. Lacombe and C. Desbois-Mouthon. "Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma." <u>Am J Pathol</u> (2005); **167**(3): 869-877.
- **Breuhahn**, K., T. Longerich and P. Schirmacher. "Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma." <u>Oncogene</u> (2006); **25**(27): 3787-3800.
- **Breuhahn**, K., S. Vreden, R. Haddad, S. Beckebaum, D. Stippel, P. Flemming, T. Nussbaum, W. H. Caselmann, B. B. Haab and P. Schirmacher. "Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression." <u>Cancer Res</u> (2004); **64**(17): 6058-6064.
- **Brito**, A. F., A. M. Abrantes, J. G. Tralhao and M. F. Botelho. "Targeting Hepatocellular Carcinoma: What did we Discover so Far?" Oncol Rev (2016); **10**(2): 302.
- **Broeckx**, V., K. Boonen, L. Pringels, X. Sagaert, H. Prenen, B. Landuyt, L. Schoofs and E. Maes. "Comparison of multiple protein extraction buffers for GeLC-MS/MS proteomic analysis of liver and colon formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." <u>Mol Biosyst</u> (2016); **12**(2): 553-565.
- **Bugianesi**, E. "Non-alcoholic steatohepatitis and cancer." <u>Clin Liver Dis</u> (2007); **11**(1): 191-207, x-xi.
- **Bussolati**, G., L. Annaratone, E. Medico, G. D'Armento and A. Sapino. "Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity." <u>PLoS One</u> (2011); **6**(6): e21043.

- **Cameron**, D., M. J. Piccart-Gebhart, R. D. Gelber, M. Procter, A. Goldhirsch, E. de Azambuja, G. Castro, Jr., M. Untch, I. Smith, L. Gianni, J. Baselga, N. Al-Sakaff, S. Lauer, E. McFadden, B. Leyland-Jones, R. Bell, M. Dowsett, C. Jackisch and T. Herceptin Adjuvant Trial Study. "11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial." <u>Lancet</u>. (2017); **389**(10075): 1195-1205.
- **Cancer Genome Atlas Research**, N. "Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma." Nature (2011); **474**(7353): 609-615.
- **Carnero**, A., C. Blanco-Aparicio, O. Renner, W. Link and J. F. Leal. "The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications." <u>Curr Cancer Drug Targets</u> (2008); **8**(3): 187-198.
- **Chafin**, D., A. Theiss, E. Roberts, G. Borlee, M. Otter and G. S. Baird. "Rapid two-temperature formalin fixation." <u>PLoS One</u> (2013), **8**(1): e54138.
- **Chen**, C. J., L. Y. Wang, S. N. Lu, M. H. Wu, S. L. You, Y. J. Zhang, L. W. Wang and R. M. Santella. "Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma." <u>Hepatology</u> (1996); **24**(1): 38-42.
- **Chung**, J. Y., T. Braunschweig, R. Williams, N. Guerrero, K. M. Hoffmann, M. Kwon, Y. K. Song, S. K. Libutti and S. M. Hewitt. "Factors in tissue handling and processing that impact RNA obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue." <u>J Histochem Cytochem</u> (2008); **56**(11): 1033-1042.
- **Colburn**, W. A. "Biomarkers in drug discovery and development: from target identification through drug marketing." <u>I Clin Pharmacol</u> (2003); **43**(4): 329-341.
- **Colli**, A., M. Fraquelli, G. Casazza, S. Massironi, A. Colucci, D. Conte and P. Duca. "Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review." <u>Am J Gastroenterol</u> (2006); **101**(3): 513-523.
- **Dancey**, J. E., P. L. Bedard, N. Onetto and T. J. Hudson. "The genetic basis for cancer treatment decisions." Cell (2012); **148**(3): 409-420.
- **Davalieva**, K., S. Kiprijanovska and M. Polenakovic. "Assessment of the 2-d gel-based proteomics application of clinically archived formalin-fixed paraffin embedded tissues." <u>Protein J</u> (2014); **33**(2): 135-142.
- **David**, K. A., F. T. Unger, P. Uhlig, H. Juhl, H. M. Moore, C. Compton, B. Nashan, A. Dorner, A. de Weerth and C. Zornig. "Surgical procedures and postsurgical tissue processing significantly affect expression of genes and EGFR-pathway proteins in colorectal cancer tissue." <u>Oncotarget</u> (2014); **5**(22): 11017-11028.
- **De Roock**, W., H. Piessevaux, J. De Schutter, M. Janssens, G. De Hertogh, N. Personeni, B. Biesmans, J. L. Van Laethem, M. Peeters, Y. Humblet, E. Van Cutsem and S. Tejpar. "KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab." <u>Ann Oncol</u> (2008); **19**(3): 508-515.
- **Delire**, B. and P. Starkel. "The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications." <u>Eur J Clin Invest</u> (2015); **45**(6): 609-623.
- **Deng**, G. L., S. Zeng and H. Shen. "Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges." World I Hepatol (2015); **7**(5): 787-798.

- **Donato**, F., A. Tagger, R. Chiesa, M. L. Ribero, V. Tomasoni, M. Fasola, U. Gelatti, G. Portera, P. Boffetta and G. Nardi. "Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. Brescia HCC Study." <u>Hepatology</u> (1997); **26**(3): 579-584.
- **Efimova**, E. A., M. Glanemann, L. Liu, G. Schumacher, U. Settmacher, S. Jonas, J. M. Langrehr, P. Neuhaus and A. K. Nussler. "Effects of human hepatocyte growth factor on the proliferation of human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines." <u>Eur Surg Res</u> (2004); **36**(5): 300-307.
- **Eisen**, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein. "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1998); **95**(25): 14863-14868.
- **El-Serag**, H. B. "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma." <u>Gastroenterology</u> (2012); **142**(6): 1264-1273 e1261.
- **El-Serag**, H. B. and A. C. Mason. "Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States." N Engl J Med (1999); **340**(10): 745-750.
- **Engel**, K. B., J. Vaught and H. M. Moore. "National Cancer Institute Biospecimen Evidence-Based Practices: a novel approach to pre-analytical standardization." <u>Biopreserv Biobank</u> (2014); **12**(2): 148-150.
- **Espina**, V., K. H. Edmiston, M. Heiby, M. Pierobon, M. Sciro, B. Merritt, S. Banks, J. Deng, A. J. VanMeter, D. H. Geho, L. Pastore, J. Sennesh, E. F. Petricoin, 3rd and L. A. Liotta. "A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process." <u>Mol Cell Proteomics</u> (2008); **7**(10): 1998-2018.
- **Espina**, V., C. Mueller, K. Edmiston, M. Sciro, E. F. Petricoin and L. A. Liotta. "Tissue is alive: New technologies are needed to address the problems of protein biomarker pre-analytical variability." <u>Proteomics Clin Appl</u> (2009); **3**(8): 874-882.
- **European Association For The Study Of The**, L., R. European Organisation For and C. Treatment Of. "EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma." <u>I Hepatol</u> (2012); **56**(4): 908-943.
- **Foulstone**, E., S. Prince, O. Zaccheo, J. L. Burns, J. Harper, C. Jacobs, D. Church and A. B. Hassan. "Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer." <u>J Pathol</u> (2005); **205**(2): 145-153.
- **Fox**, C. H., F. B. Johnson, J. Whiting and P. P. Roller. "Formaldehyde fixation." <u>J Histochem Cytochem</u> (1985); **33**(8): 845-853.
- **Freeman**, R. B., Jr. "Transplantation for hepatocellular carcinoma: The Milan criteria and beyond." <u>Liver Transpl</u> (2006); **12**(11 Suppl 2): S8-13.
- **Frogne**, T., A. V. Laenkholm, M. B. Lyng, K. L. Henriksen and A. E. Lykkesfeldt. "Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors." <u>Breast Cancer Res</u> (2009); **11**(1): R11.
- **Gajadhar**, A. S., H. Johnson, R. J. Slebos, K. Shaddox, K. Wiles, M. K. Washington, A. J. Herline, D. A. Levine, D. C. Liebler, F. M. White and C. Clinical Proteomic Tumor Analysis. "Phosphotyrosine signaling analysis in human tumors is confounded by systemic ischemia-driven artifacts and intra-specimen heterogeneity." <u>Cancer Res</u> (2015); **75**(7): 1495-1503.

- **Ge**, H., A. J. Walhout and M. Vidal. "Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology." <u>Trends Genet</u> (2003); **19**(10): 551-560.
- **Gerlinger**, M., A. J. Rowan, S. Horswell, J. Larkin, D. Endesfelder, E. Gronroos, P. Martinez, N. Matthews, A. Stewart, P. Tarpey, I. Varela, B. Phillimore, S. Begum, N. Q. McDonald, A. Butler, D. Jones, K. Raine, C. Latimer, C. R. Santos, M. Nohadani, A. C. Eklund, B. Spencer-Dene, G. Clark, L. Pickering, G. Stamp, M. Gore, Z. Szallasi, J. Downward, P. A. Futreal and C. Swanton. "Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing." <u>N Engl J Med</u> (2012); **366**(10): 883-892.
- **Giglia**, J. L., S. J. Antonia, L. B. Berk, S. Bruno, S. Dessureault and S. E. Finkelstein. "Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: past, present, and future." <u>Cancer Control</u> (2010); **17**(2): 120-129.
- **Grote**, T., D. R. Siwak, H. A. Fritsche, C. Joy, G. B. Mills, D. Simeone, D. C. Whitcomb and C. D. Logsdon. "Validation of reverse phase protein array for practical screening of potential biomarkers in serum and plasma: accurate detection of CA19-9 levels in pancreatic cancer." Proteomics (2008); **8**(15): 3051-3060.
- **Gulmann**, C., V. Espina, E. Petricoin, 3rd, D. L. Longo, M. Santi, T. Knutsen, M. Raffeld, E. S. Jaffe, L. A. Liotta and A. L. Feldman. "Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma." <u>Clin Cancer Res</u> (2005); **11**(16): 5847-5855.
- **Gundisch**, S., L. Annaratone, C. Beese, E. Drecol, C. Marchio, E. Quaglino, A. Sapino, K. F. Becker and G. Bussolati. "Critical roles of specimen type and temperature before and during fixation in the detection of phosphoproteins in breast cancer tissues." <u>Lab Invest</u> (2015); **95**(5): 561-571.
- **Gundisch**, S., K. Grundner-Culemann, C. Wolff, C. Schott, B. Reischauer, M. Machatti, D. Groelz, C. Schaab, A. Tebbe and K. F. Becker. "Delayed times to tissue fixation result in unpredictable global phosphoproteome changes." <u>I Proteome Res</u> (2013); **12**(10): 4424-4434.
- **Gundisch**, S., S. Hauck, H. Sarioglu, C. Schott, C. Viertler, M. Kap, T. Schuster, B. Reischauer, R. Rosenberg, C. Verhoef, H. J. Mischinger, P. Riegman, K. Zatloukal and K. F. Becker. "Variability of protein and phosphoprotein levels in clinical tissue specimens during the preanalytical phase." J. Proteome Res (2012); **11**(12): 5748-5762.
- **Guo**, H., W. Liu, Z. Ju, P. Tamboli, E. Jonasch, G. B. Mills, Y. Lu, B. T. Hennessy and D. Tsavachidou. "An efficient procedure for protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for reverse phase protein arrays." <u>Proteome Sci</u> (2012); **10**(1): 56.
- **Hanahan**, D. and J. Folkman. "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." <u>Cell</u> (1996); **86**(3): 353-364.
- **Hansen**, K. D., Z. Wu, R. A. Irizarry and J. T. Leek. "Sequencing technology does not eliminate biological variability." <u>Nat Biotechnol</u> (2011); **29**(7): 572-573.
- **Harris**, L., H. Fritsche, R. Mennel, L. Norton, P. Ravdin, S. Taube, M. R. Somerfield, D. F. Hayes, R. C. Bast, Jr. and O. American Society of Clinical. "American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer." <u>J Clin Oncol</u> (2007); **25**(33): 5287-5312.
- **Hennessy**, B. T., Y. Lu, A. M. Gonzalez-Angulo, M. S. Carey, S. Myhre, Z. Ju, M. A. Davies, W. Liu, K. Coombes, F. Meric-Bernstam, I. Bedrosian, M. McGahren, R. Agarwal, F. Zhang, J. Overgaard, J. Alsner, R. M. Neve, W. L. Kuo, J. W. Gray, A. L. Borresen-Dale and G. B. Mills. "A Technical Assessment of the Utility of Reverse Phase Protein Arrays for the Study of the Functional

Proteome in Non-microdissected Human Breast Cancers." <u>Clin Proteomics</u> (2010); **6**(4): 129-151.

Hewitt, S. M., S. S. Badve and L. D. True. "Impact of preanalytic factors on the design and application of integral biomarkers for directing patient therapy." <u>Clin Cancer Res</u> (2012); **18**(6): 1524-1530.

Hewitt, S. M., M. Takikita, T. Braunschweig and J. Y. Chung. "Promises and challenges of predictive tissue biomarkers." <u>Biomark Med</u> (2007); **1**(2): 313-318.

Hoadley, K. A., C. Yau, D. M. Wolf, A. D. Cherniack, D. Tamborero, S. Ng, M. D. Leiserson, B. Niu, M. D. McLellan, V. Uzunangelov, J. Zhang, C. Kandoth, R. Akbani, H. Shen, L. Omberg, A. Chu, A. A. Margolin, L. J. Van't Veer, N. Lopez-Bigas, P. W. Laird, B. J. Raphael, L. Ding, A. G. Robertson, L. A. Byers, G. B. Mills, J. N. Weinstein, C. Van Waes, Z. Chen, E. A. Collisson, N. Cancer Genome Atlas Research, C. C. Benz, C. M. Perou and J. M. Stuart. "Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin." <u>Cell</u> (2014); **158**(4): 929-944.

Hong, B., V. W. Lui, E. P. Hui, Y. Lu, H. S. Leung, E. Y. Wong, S. H. Cheng, M. H. Ng, G. B. Mills and A. T. Chan. "Reverse phase protein array identifies novel anti-invasion mechanisms of YC-1." <u>Biochem Pharmacol</u> (2010); **79**(6): 842-852.

Hsu, C. Y., D. M. Ho, C. F. Yang and H. Chiang. "Interobserver reproducibility of MIB-1 labeling index in astrocytic tumors using different counting methods." <u>Mod Pathol</u> (2003); **16**(9): 951-957.

Hynes, N. E. and H. A. Lane. "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer (2005); **5**(5): 341-354.

Ibrahim, N., Y. Yu, W. R. Walsh and J. L. Yang. "Molecular targeted therapies for cancer: sorafenib mono-therapy and its combination with other therapies (review)." <u>Oncol Rep</u> (2012); **27**(5): 1303-1311.

Ince, T. A., A. D. Sousa, M. A. Jones, J. C. Harrell, E. S. Agoston, M. Krohn, L. M. Selfors, W. Liu, K. Chen, M. Yong, P. Buchwald, B. Wang, K. S. Hale, E. Cohick, P. Sergent, A. Witt, Z. Kozhekbaeva, S. Gao, A. T. Agoston, M. A. Merritt, R. Foster, B. R. Rueda, C. P. Crum, J. S. Brugge and G. B. Mills. "Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours." Nat Commun (2015); **6**: 7419.

Ishak, K. G., Z. D. Goodman and J. T. Stocker. <u>Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts</u>. (2001); Washington, D.C., Armed Forces Inst. of Pathology.

Ito, Y., T. Takeda, M. Sakon, M. Tsujimoto, S. Higashiyama, K. Noda, E. Miyoshi, M. Monden and N. Matsuura. "Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma." Br J Cancer (2001); **84**(10): 1377-1383.

Johnson, P. J. and R. Williams. "Cirrhosis and the aetiology of hepatocellular carcinoma." J. Hepatol (1987); **4**(1): 140-147.

Juhl, H. "Preanalytical aspects: a neglected issue." <u>Scand J Clin Lab Invest Suppl</u> (2010); **242**: 63-65.

Junttila, M. R. and F. J. de Sauvage. "Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response." Nature (2013); **501**(7467): 346-354.

- **Kalogeridi**, M. A., A. Zygogianni, G. Kyrgias, J. Kouvaris, S. Chatziioannou, N. Kelekis and V. Kouloulias. "Role of radiotherapy in the management of hepatocellular carcinoma: A systematic review." World J Hepatol (2015); **7**(1): 101-112.
- **Kikuchi**, A. "Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway." <u>Cancer Sci</u> (2003); **94**(3): 225-229.
- **Kumar**, A., I. Coleman, C. Morrissey, X. Zhang, L. D. True, R. Gulati, R. Etzioni, H. Bolouri, B. Montgomery, T. White, J. M. Lucas, L. G. Brown, R. F. Dumpit, N. DeSarkar, C. Higano, E. Y. Yu, R. Coleman, N. Schultz, M. Fang, P. H. Lange, J. Shendure, R. L. Vessella and P. S. Nelson. "Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer." <u>Nat Med</u> (2016); **22**(4): 369-378.
- **Layer**, G., S. Delorme and G. Kaick. <u>Radiologische Diagnostik in der Onkologie: Band 2:</u> <u>Gastrointestinum, Urogenitaltrakt, Retroperitoneum</u>. (2008); Berlin, Heidelberg, Springer.
- **Lee**, S. M., C. Schelcher, S. Gashi, S. Schreiber, R. M. Thasler, K. W. Jauch and W. E. Thasler. "RNA stability in human liver: comparison of different processing times, temperatures and methods." <u>Mol Biotechnol</u> (2013); **53**(1): 1-8.
- **Li**, J., W. Zhao, R. Akbani, W. Liu, Z. Ju, S. Ling, C. P. Vellano, P. Roebuck, Q. Yu, A. K. Eterovic, L. A. Byers, M. A. Davies, W. Deng, Y. N. Gopal, G. Chen, E. M. von Euw, D. Slamon, D. Conklin, J. V. Heymach, A. F. Gazdar, J. D. Minna, J. N. Myers, Y. Lu, G. B. Mills and H. Liang. "Characterization of Human Cancer Cell Lines by Reverse-phase Protein Arrays." <u>Cancer Cell</u> (2017); **31**(2): 225-239.
- **Liang**, T. J. and T. Heller. "Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma." <u>Gastroenterology</u> (2004); **127**(5 Suppl 1): S62-71.
- **Lievre**, A., J. B. Bachet, D. Le Corre, V. Boige, B. Landi, J. F. Emile, J. F. Cote, G. Tomasic, C. Penna, M. Ducreux, P. Rougier, F. Penault-Llorca and P. Laurent-Puig. "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." <u>Cancer Res</u> (2006); **66**(8): 3992-3995.
- **Liu**, L., X. D. Zhu, W. Q. Wang, Y. Shen, Y. Qin, Z. G. Ren, H. C. Sun and Z. Y. Tang. "Activation of beta-catenin by hypoxia in hepatocellular carcinoma contributes to enhanced metastatic potential and poor prognosis." <u>Clin Cancer Res</u> (2010); **16**(10): 2740-2750.
- **Llovet**, J. M., C. Bru and J. Bruix. "Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification." Semin Liver Dis (1999); **19**(3): 329-338.
- **Llovet**, J. M. and J. Bruix. "Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival." <u>Hepatology</u> (2003); **37**(2): 429-442.
- **Llovet**, J. M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J. F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J. L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J. F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix and S. I. S. Group. "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." N Engl J Med (2008); **359**(4): 378-390.
- **Luo**, J., M. Schumacher, A. Scherer, D. Sanoudou, D. Megherbi, T. Davison, T. Shi, W. Tong, L. Shi, H. Hong, C. Zhao, F. Elloumi, W. Shi, R. Thomas, S. Lin, G. Tillinghast, G. Liu, Y. Zhou, D. Herman, Y. Li, Y. Deng, H. Fang, P. Bushel, M. Woods and J. Zhang. "A comparison of batch effect removal methods for enhancement of prediction performance using MAQC-II microarray gene expression data." Pharmacogenomics J</u> (2010); **10**(4): 278-291.

Malinowsky, K., M. Raychaudhuri, T. Buchner, S. Thulke, C. Wolff, H. Hofler, K. F. Becker and S. Avril. "Common protein biomarkers assessed by reverse phase protein arrays show considerable intratumoral heterogeneity in breast cancer tissues." <u>PLoS One</u> (2012); **7**(7): e40285.

Malinowsky, K., C. Wolff, B. Ergin, D. Berg and K. F. Becker. "Deciphering signaling pathways in clinical tissues for personalized medicine using protein microarrays." <u>I Cell Physiol</u> (2010); **225**(2): 364-370.

Malinowsky, K., C. Wolff, C. Schott and K. F. Becker. "Characterization of signalling pathways by reverse phase protein arrays." <u>Methods Mol Biol</u> (2013); **1049**: 285-299.

Marelli, L., R. Stigliano, C. Triantos, M. Senzolo, E. Cholongitas, N. Davies, J. Tibballs, T. Meyer, D. W. Patch and A. K. Burroughs. "Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies." <u>Cardiovasc Intervent Radiol</u> (2007); **30**(1): 6-25.

Marrero, J. A., R. J. Fontana, A. Barrat, F. Askari, H. S. Conjeevaram, G. L. Su and A. S. Lok. "Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort." <u>Hepatology</u> (2005); **41**(4): 707-716.

Marusyk, A., V. Almendro and K. Polyak. "Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?" Nat Rev Cancer (2012); **12**(5): 323-334.

Masuda, M., W. Y. Chen, A. Miyanaga, Y. Nakamura, K. Kawasaki, T. Sakuma, M. Ono, C. L. Chen, K. Honda and T. Yamada. "Alternative mammalian target of rapamycin (mTOR) signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling." Mol Cell Proteomics (2014); **13**(6): 1429-1438.

Maxwell, P. H., G. U. Dachs, J. M. Gleadle, L. G. Nicholls, A. L. Harris, I. J. Stratford, O. Hankinson, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe. "Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> (1997); **94**(15): 8104-8109.

Mazzaferro, V., 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 (1996); **334**(11): 693-699.

McCormack, L., H. Petrowsky and P. A. Clavien. "Surgical therapy of hepatocellular carcinoma." <u>Eur J Gastroenterol Hepatol</u> (2005); **17**(5): 497-503.

McCubrey, J. A., L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli and R. A. Franklin. "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." <u>Biochim Biophys Acta</u> (2007); **1773**(8): 1263-1284.

Meric-Bernstam, F., A. Akcakanat, H. Chen, A. Sahin, E. Tarco, S. Carkaci, B. E. Adrada, G. Singh, K. A. Do, Z. M. Garces, E. Mittendorf, G. Babiera, I. Bedrosian, R. Hwang, S. Krishnamurthy, W. F. Symmans, A. M. Gonzalez-Angulo and G. B. Mills. "Influence of biospecimen variables on proteomic biomarkers in breast cancer." <u>Clin Cancer Res</u> (2014); **20**(14): 3870-3883.

Mertins, P., D. R. Mani, K. V. Ruggles, M. A. Gillette, K. R. Clauser, P. Wang, X. Wang, J. W. Qiao, S. Cao, F. Petralia, E. Kawaler, F. Mundt, K. Krug, Z. Tu, J. T. Lei, M. L. Gatza, M. Wilkerson, C. M. Perou, V. Yellapantula, K. L. Huang, C. Lin, M. D. McLellan, P. Yan, S. R. Davies, R. R. Townsend, S. J. Skates, J. Wang, B. Zhang, C. R. Kinsinger, M. Mesri, H. Rodriguez, L. Ding, A. G. Paulovich, D.

- Fenyo, M. J. Ellis, S. A. Carr and C. Nci. "Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer." <u>Nature</u> (2016); **534**(7605): 55-62.
- Mertins, P., F. Yang, T. Liu, D. R. Mani, V. A. Petyuk, M. A. Gillette, K. R. Clauser, J. W. Qiao, M. A. Gritsenko, R. J. Moore, D. A. Levine, R. Townsend, P. Erdmann-Gilmore, J. E. Snider, S. R. Davies, K. V. Ruggles, D. Fenyo, R. T. Kitchens, S. Li, N. Olvera, F. Dao, H. Rodriguez, D. W. Chan, D. Liebler, F. White, K. D. Rodland, G. B. Mills, R. D. Smith, A. G. Paulovich, M. Ellis and S. A. Carr. "Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels." Mol Cell Proteomics (2014); 13(7): 1690-1704.
- **Monga**, S. P., W. M. Mars, P. Pediaditakis, A. Bell, K. Mule, W. C. Bowen, X. Wang, R. Zarnegar and G. K. Michalopoulos. "Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes." <u>Cancer Res</u> (2002); **62**(7): 2064-2071.
- **Nassiri**, M., S. Ramos, H. Zohourian, V. Vincek, A. R. Morales and M. Nadji. "Preservation of biomolecules in breast cancer tissue by a formalin-free histology system." <u>BMC Clin Pathol</u> (2008); **8**: 1.
- **Navin**, N., J. Kendall, J. Troge, P. Andrews, L. Rodgers, J. McIndoo, K. Cook, A. Stepansky, D. Levy, D. Esposito, L. Muthuswamy, A. Krasnitz, W. R. McCombie, J. Hicks and M. Wigler. "Tumour evolution inferred by single-cell sequencing." <u>Nature</u> (2011); **472**(7341): 90-94.
- **Negri**, F. V., B. Dal Bello, C. Porta, N. Campanini, S. Rossi, C. Tinelli, G. Poggi, G. Missale, S. Fanello, S. Salvagni, A. Ardizzoni and S. Enrico Maria. "Expression of pERK and VEGFR-2 in advanced hepatocellular carcinoma and resistance to sorafenib treatment." <u>Liver Int</u>. (2015); **35**(8): 2001-2008
- **Ni**, Y., S. Mulier, Y. Miao, L. Michel and G. Marchal. "A review of the general aspects of radiofrequency ablation." Abdom Imaging (2005); **30**(4): 381-400.
- **Niederau**, C., R. Fischer, A. Sonnenberg, W. Stremmel, H. J. Trampisch and G. Strohmeyer. "Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis." N Engl J Med (1985); **313**(20): 1256-1262.
- **Niikura**, N., J. Liu, N. Hayashi, E. A. Mittendorf, Y. Gong, S. L. Palla, Y. Tokuda, A. M. Gonzalez-Angulo, G. N. Hortobagyi and N. T. Ueno. "Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors." <u>J Clin Oncol</u> (2012); **30**(6): 593-599.
- **Nishiyama**, M. and J. R. Wands. "Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> (1992); **183**(1): 280-285.
- **Nishizuka**, S., L. Charboneau, L. Young, S. Major, W. C. Reinhold, M. Waltham, H. Kouros-Mehr, K. J. Bussey, J. K. Lee, V. Espina, P. J. Munson, E. Petricoin, 3rd, L. A. Liotta and J. N. Weinstein. "Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays." Proc Natl Acad Sci U S A (2003); **100**(24): 14229-14234.
- **Nomura**, F., K. Ohnishi and Y. Tanabe. "Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients." <u>Cancer</u> (1989); **64**(8): 1700-1707.
- **Nowak**, A. K., P. K. Chow and M. Findlay. "Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review." <u>Eur I Cancer</u> (2004); **40**(10): 1474-1484.

Okuda, K., 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 (1985); **56**(4): 918-928.

Pascual, S., I. Herrera and J. Irurzun. "New advances in hepatocellular carcinoma." <u>World J Hepatol</u> (2016); **8**(9): 421-438.

Paweletz, C. P., L. Charboneau, V. E. Bichsel, N. L. Simone, T. Chen, J. W. Gillespie, M. R. Emmert-Buck, M. J. Roth, I. E. Petricoin and L. A. Liotta. "Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front." Oncogene (2001); **20**(16): 1981-1989.

Petricoin, E. F., 3rd, V. E. Bichsel, V. S. Calvert, V. Espina, M. Winters, L. Young, C. Belluco, B. J. Trock, M. Lippman, D. A. Fishman, D. C. Sgroi, P. J. Munson, L. J. Esserman and L. A. Liotta. "Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy." <u>J Clin Oncol</u> (2005); **23**(15): 3614-3621.

Piccart-Gebhart, M. J., M. Procter, B. Leyland-Jones, A. Goldhirsch, M. Untch, I. Smith, L. Gianni, J. Baselga, R. Bell, C. Jackisch, D. Cameron, M. Dowsett, C. H. Barrios, G. Steger, C. S. Huang, M. Andersson, M. Inbar, M. Lichinitser, I. Lang, U. Nitz, H. Iwata, C. Thomssen, C. Lohrisch, T. M. Suter, J. Ruschoff, T. Suto, V. Greatorex, C. Ward, C. Straehle, E. McFadden, M. S. Dolci, R. D. Gelber and T. Herceptin Adjuvant Trial Study. "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer." N Engl J Med (2005); 353(16): 1659-1672.

Pierobon, M., C. Belluco, L. A. Liotta and E. F. Petricoin, 3rd. "Reverse phase protein microarrays for clinical applications." <u>Methods Mol Biol</u> (2011); **785**: 3-12.

Pinhel, I. F., F. A. Macneill, M. J. Hills, J. Salter, S. Detre, R. A'Hern, A. Nerurkar, P. Osin, I. E. Smith and M. Dowsett. "Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer." <u>Breast Cancer Res</u> (2010); **12**(5): R76.

Poon, R. T. and S. T. Fan. "Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: patient selection and postoperative outcome." <u>Liver Transpl</u> (2004); **10**(2 Suppl 1): S39-45.

Poste, G. "Bring on the biomarkers." <u>Nature</u> (2011); **469**(7329): 156-157.

Prange, W., K. Breuhahn, F. Fischer, C. Zilkens, T. Pietsch, K. Petmecky, R. Eilers, H. P. Dienes and P. Schirmacher. "Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes." <u>I Pathol</u> (2003); **201**(2): 250-259.

Propst, T., A. Propst, O. Dietze, G. Judmaier, H. Braunsteiner and W. Vogel. "Prevalence of hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency." <u>J Hepatol</u> (1994); **21**(6): 1006-1011.

Rapkiewicz, A., V. Espina, J. A. Zujewski, P. F. Lebowitz, A. Filie, J. Wulfkuhle, K. Camphausen, E. F. Petricoin, 3rd, L. A. Liotta and A. Abati. "The needle in the haystack: application of breast fine-needle aspirate samples to quantitative protein microarray technology." <u>Cancer</u> (2007); **111**(3): 173-184.

Sakai, W., E. M. Swisher, B. Y. Karlan, M. K. Agarwal, J. Higgins, C. Friedman, E. Villegas, C. Jacquemont, D. J. Farrugia, F. J. Couch, N. Urban and T. Taniguchi. "Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers." <u>Nature</u> (2008); **451**(7182): 1116-1120.

- **Salata**, H., J. M. Cortes, R. Enriquez de Salamanca, H. Oliva, A. Castro, E. Kusak, V. Carreno and C. Hernandez Guio. "Porphyria cutanea tarda and hepatocellular carcinoma. Frequency of occurrence and related factors." <u>I Hepatol</u> (1985); **1**(5): 477-487.
- **Salem**, R. and R. J. Lewandowski. "Chemoembolization and radioembolization for hepatocellular carcinoma." <u>Clin Gastroenterol Hepatol</u> (2013); **11**(6): 604-611; quiz e643-604.
- **Sato**, Y., T. Yoshizato, Y. Shiraishi, S. Maekawa, Y. Okuno, T. Kamura, T. Shimamura, A. Sato-Otsubo, G. Nagae, H. Suzuki, Y. Nagata, K. Yoshida, A. Kon, Y. Suzuki, K. Chiba, H. Tanaka, A. Niida, A. Fujimoto, T. Tsunoda, T. Morikawa, D. Maeda, H. Kume, S. Sugano, M. Fukayama, H. Aburatani, M. Sanada, S. Miyano, Y. Homma and S. Ogawa.
- "Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma." <u>Nat Genet</u> (2013); **45**(8): 860-867.
- **Schuster**, C., K. Malinowsky, S. Liebmann, D. Berg, C. Wolff, K. Tran, C. Schott, S. Reu, J. Neumann, C. Faber, H. Hofler, T. Kirchner, K. F. Becker and F. Hlubek. "Antibody validation by combining immunohistochemistry and protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues." <u>Histopathology</u> (2012); **60**(6B): E37-50.
- **Sessa**, C., A. Guibal, G. Del Conte and C. Ruegg. "Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations?" <u>Nat Clin Pract Oncol</u> (2008); **5**(7): 378-391.
- **Shi**, S. R., C. Liu, B. M. Balgley, C. Lee and C. R. Taylor. "Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry." <u>J Histochem Cytochem</u> (2006); **54**(6): 739-743.
- **Shiina**, S., K. Tagawa, T. Unuma, R. Takanashi, K. Yoshiura, Y. Komatsu, Y. Hata, Y. Niwa, Y. Shiratori, A. Terano and et al. "Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma. A histopathologic study." <u>Cancer</u> (1991); **68**(7): 1524-1530.
- Siewert, J. R. Onkologische Chirurgie: mit 253 Tabellen. (2006); Heidelberg, Springer.
- **Silvestri**, A., V. Calvert, C. Belluco, M. Lipsky, R. De Maria, J. Deng, A. Colombatti, F. De Marchi, D. Nitti, E. Mammano, L. Liotta, E. Petricoin and M. Pierobon. "Protein pathway activation mapping of colorectal metastatic progression reveals metastasis-specific network alterations." <u>Clin Exp Metastasis</u> (2013); **30**(3): 309-316.
- **Sobin**, L. H., M. K. Gospodarowicz, C. Wittekind and International Union against Cancer. <u>TNM classification of malignant tumours</u>. (2010); Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell.
- **Song**, T. J., E. W. Ip and Y. Fong. "Hepatocellular carcinoma: current surgical management." <u>Gastroenterology</u> (2004); **127**(5 Suppl 1): S248-260.
- **Spruessel**, A., G. Steimann, M. Jung, S. A. Lee, T. Carr, A. K. Fentz, J. Spangenberg, C. Zornig, H. H. Juhl and K. A. David. "Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision." <u>Biotechniques</u> (2004); **36**(6): 1030-1037.
- **Sprung**, R. W., Jr., J. W. Brock, J. P. Tanksley, M. Li, M. K. Washington, R. J. Slebos and D. C. Liebler. "Equivalence of protein inventories obtained from formalin-fixed paraffin-embedded and frozen tissue in multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry shotgun proteomic analysis." Mol Cell Proteomics (2009); **8**(8): 1988-1998.

- **Srivastava**, S., B. Thakkar, K. G. Yeoh, K. Y. Ho, M. Teh, R. Soong and M. Salto-Tellez. "Expression of proteins associated with hypoxia and Wnt pathway activation is of prognostic significance in hepatocellular carcinoma." <u>Virchows Arch</u> (2015); **466**(5): 541-548.
- **Stuart**, K. "Chemoembolization in the management of liver tumors." <u>Oncologist</u> (2003); **8**(5): 425-437.
- **Stuart**, K. A., S. M. Riordan, S. Lidder, L. Crostella, R. Williams and G. G. Skouteris. "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling." <u>Int J Exp Pathol</u> (2000); **81**(1): 17-30.
- **Sukowati**, C. H., K. E. El-Khobar, S. I. Ie, B. Anfuso, D. H. Muljono and C. Tiribelli. "Significance of hepatitis virus infection in the oncogenic initiation of hepatocellular carcinoma." <u>World J Gastroenterol</u> (2016); **22**(4): 1497-1512.
- **Suzuki**, K., N. Hayashi, Y. Yamada, H. Yoshihara, Y. Miyamoto, Y. Ito, T. Ito, K. Katayama, Y. Sasaki, A. Ito and et al. "Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma." <u>Hepatology</u> (1994); **20**(5): 1231-1236.
- **Tanca**, A., D. Pagnozzi, G. P. Burrai, M. Polinas, S. Uzzau, E. Antuofermo and M. F. Addis. "Comparability of differential proteomics data generated from paired archival fresh-frozen and formalin-fixed samples by GeLC-MS/MS and spectral counting." <u>J Proteomics</u> (2012); **77**: 561-576.
- **Thasler**, R. M., A. J. Berghammer, T. Kirchner, J. Slotta-Huspenina, K. F. Becker, T. Schiergens, W. E. Thasler and H. E. Wichmann. "Federated Biobanking with Corporate Service Unit: The Munich Biobank Alliance Blueprint." <u>Biopreserv Biobank</u> (2017); **15**(1): 75-79.
- **Theodorsson-Norheim**, E. "Friedman and Quade tests: BASIC computer program to perform nonparametric two-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several related samples." <u>Comput Biol Med</u> (1987); **17**(2): 85-99.
- **Tseng**, P. L., M. H. Tai, C. C. Huang, C. C. Wang, J. W. Lin, C. H. Hung, C. H. Chen, J. H. Wang, S. N. Lu, C. M. Lee, C. S. Changchien and T. H. Hu. "Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients." J. Surg Oncol (2008); **98**(5): 349-357.
- **Turner**, P. C., A. Sylla, M. S. Diallo, J. J. Castegnaro, A. J. Hall and C. P. Wild. "The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: A basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa." <u>J Gastroenterol Hepatol</u> (2002); **17 Suppl**: S441-448.
- **Tyanova**, S., R. Albrechtsen, P. Kronqvist, J. Cox, M. Mann and T. Geiger. "Proteomic maps of breast cancer subtypes." <u>Nat Commun</u> (2016); **7**: 10259.
- **Tzahar**, E., H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunagaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin and Y. Yarden. "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." <u>Mol Cell Biol</u> (1996); **16**(10): 5276-5287.
- **Ueki**, T., J. Fujimoto, T. Suzuki, H. Yamamoto and E. Okamoto. "Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma." <u>Hepatology</u> (1997); **25**(4): 862-866.

- **Vaught**, J. and N. C. Lockhart. "The evolution of biobanking best practices." <u>Clin Chim Acta</u> (2012); **413**(19-20): 1569-1575.
- **Vauthey**, J. N., G. Y. Lauwers, N. F. Esnaola, K. A. Do, J. Belghiti, N. Mirza, S. A. Curley, L. M. Ellis, J. M. Regimbeau, A. Rashid, K. R. Cleary and D. M. Nagorney. "Simplified staging for hepatocellular carcinoma." <u>J Clin Oncol</u> (2002); **20**(6): 1527-1536.
- **Vejchapipat**, P., P. Tangkijvanich, A. Theamboonlers, V. Chongsrisawat, S. Chittmittrapap and Y. Poovorawan. "Association between serum hepatocyte growth factor and survival in untreated hepatocellular carcinoma." <u>I Gastroenterol</u> (2004); **39**(12): 1182-1188.
- **Vogel**, C. L., M. A. Cobleigh, D. Tripathy, J. C. Gutheil, L. N. Harris, L. Fehrenbacher, D. J. Slamon, M. Murphy, W. F. Novotny, M. Burchmore, S. Shak, S. J. Stewart and M. Press. "Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer." J Clin Oncol (2002); **20**(3): 719-726.
- **von der Heyde**, S., J. Sonntag, F. Kramer, C. Bender, U. Korf and T. Beissbarth. "Reconstruction of Protein Networks Using Reverse-Phase Protein Array Data." <u>Methods Mol Biol</u> (2016); **1362**: 227-246.
- **Voshol**, H., M. Ehrat, J. Traenkle, E. Bertrand and J. van Oostrum. "Antibody-based proteomics: analysis of signaling networks using reverse protein arrays." <u>FEBS J</u> (2009); **276**(23): 6871-6879.
- **Wang**, W., G. L. Xu, W. D. Jia, Z. H. Wang, J. S. Li, J. L. Ma, Y. S. Ge, S. X. Xie and J. H. Yu. "Expression and correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor and microvessel density in experimental rat hepatocarcinogenesis." <u>J Int Med Res</u> (2009); **37**(2): 417-425.
- **Wilcoxon**, F. "Individual comparisons of grouped data by ranking methods." <u>J Econ Entomol</u> (1946); **39**: 269.
- **Wilhelm**, S. M., L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J. M. Llovet and M. Lynch. "Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling." <u>Mol Cancer Ther</u> (2008); **7**(10): 3129-3140.
- **Wilhelm**, S. M., C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag and P. A. Trail. "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis." <u>Cancer Res</u> (2004); **64**(19): 7099-7109.
- **Wolff**, C., C. Schott, P. Porschewski, B. Reischauer and K. F. Becker. "Successful protein extraction from over-fixed and long-term stored formalin-fixed tissues." <u>PLoS One</u> (2011); **6**(1): e16353.
- **Woodgett**, J. R. "Recent advances in the protein kinase B signaling pathway." <u>Curr Opin Cell Biol</u> (2005); **17**(2): 150-157.
- **Wu**, X. Z., G. R. Xie and D. Chen. "Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma." <u>J Gastroenterol Hepatol</u> (2007); **22**(8): 1178-1182.
- **Wulfkuhle**, J. D., D. Berg, C. Wolff, R. Langer, K. Tran, J. Illi, V. Espina, M. Pierobon, J. Deng, A. DeMichele, A. Walch, H. Bronger, I. Becker, C. Waldhor, H. Hofler, L. Esserman, I. S. T. Investigators, L. A. Liotta, K. F. Becker and E. F. Petricoin, 3rd. "Molecular analysis of HER2

signaling in human breast cancer by functional protein pathway activation mapping." <u>Clin Cancer Res</u> (2012); **18**(23): 6426-6435.

Yamagamim, H., M. Moriyama, H. Matsumura, H. Aoki, T. Shimizu, T. Saito, M. Kaneko, A. Shioda, N. Tanaka and Y. Arakawa. "Serum concentrations of human hepatocyte growth factor is a useful indicator for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas in C-viral chronic liver diseases." <u>Cancer</u> (2002); **95**(4): 824-834.

Yang, H. I., S. N. Lu, Y. F. Liaw, S. L. You, C. A. Sun, L. Y. Wang, C. K. Hsiao, P. J. Chen, D. S. Chen, C. J. Chen and G. Taiwan Community-Based Cancer Screening Project. "Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma." N Engl J Med (2002); **347**(3): 168-174.

Yeo, W., T. S. Mok, B. Zee, T. W. Leung, P. B. Lai, W. Y. Lau, J. Koh, F. K. Mo, S. C. Yu, A. T. Chan, P. Hui, B. Ma, K. C. Lam, W. M. Ho, H. T. Wong, A. Tang and P. J. Johnson. "A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma." <u>J Natl Cancer Inst</u> (2005); **97**(20): 1532-1538.

Zatloukal, K. and P. Hainaut. "Human tissue biobanks as instruments for drug discovery and development: impact on personalized medicine." <u>Biomark Med</u> (2010); **4**(6): 895-903.

Zhu, R. X., W. K. Seto, C. L. Lai and M. F. Yuen. "Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the Asia-Pacific Region." <u>Gut Liver</u> (2016); **10**(3): 332-339.

11. Publikationen

Wulfkuhle, J. D., D. Berg, C. Wolff, R. Langer, **K. Tran**, J. Illi, V. Espina, M. Pierobon, J. Deng, A. DeMichele, A. Walch, H. Bronger, I. Becker, C. Waldhor, H. Hofler, L. Esserman, I. S. T. Investigators, L. A. Liotta, K. F. Becker and E. F. Petricoin, 3rd. "Molecular analysis of HER2 signaling in human breast cancer by functional protein pathway activation mapping." <u>Clin Cancer Res</u> (2012); **18**(23): 6426-6435.

Schuster, C., K. Malinowsky, S. Liebmann, D. Berg, C. Wolff, **K. Tran**, C. Schott, S. Reu, J. Neumann, C. Faber, H. Hofler, T. Kirchner, K. F. Becker and F. Hlubek. "Antibody validation by combining immunohistochemistry and protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues." <u>Histopathology</u> (2012); **60**(6B): E37-50.

Berg, D., C. Wolff, K. Malinowsky, **K. Tran**, A. Walch, H. Bronger, T. Schuster, H. Hofler and K. F. Becker. "Profiling signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues reveals cross-talk between EGFR, HER2, HER3 and uPAR." <u>J Cell Physiol</u> (2012); **227**(1): 204-212.

Berg, D., R. Langer, **K. Tran**, A. Walch, T. Schuster, H. Bronger and K. F. Becker. "Protein microarray-based comparison of HER2, estrogen receptor, and progesterone receptor status in core biopsies and surgical specimens from FFPE breast cancer tissues." <u>Appl Immunohistochem Mol Morphol</u> (2011); **19**(4): 300-305.

12. Danksagung

Ich möchte mich zunächst ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker bedanken, der mir das Vertrauen entgegengebracht und mir die Möglichkeit eröffnet hat, in seinem Team meine Dissertation anzufertigen. Er führte mich nicht nur in die faszinierende Thematik der Tumorbiologie ein und stellte ausgezeichnete Arbeitsbedingungen zur Verfügung, sondern war auch stets ein hilfsbereiter Doktorvater. Vielen Dank für die engagierte und herzliche Betreuung, die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Gespräche und die unnachgiebige Unterstützung während der gesamten Zeit in der Pathologie.

Herrn Prof. Dr. Wilko Weichert und Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie anfertigen zu dürfen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank auch Dr. Katharina Malinowsky, Dr. Sibylle Gündisch, Christa Schott, Christian Beese, Dr. Daniela Berg, Dr. Claudia Wolff, PD Dr. Julia Slotta-Huspenina und Dr. Lukas Bauer, die mich allesamt tatkräftig und jeder in unersetzlicher Weise unterstützt haben und ohne deren Hilfe die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden, die mir alle in den letzten Jahren ein wichtiger Rückhalt waren und mir immer zur Seite gestanden haben.