

Aus der Universitätsklinik für  
Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die Rolle der Zinktransporter ZIP4, ZIP14 und ZnT9  
im Hepatozellulären Karzinom – eine immunhistochemische  
Studie**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von  
aus  
Magdeburg

Laura Gartmann  
Minden  
2018

## **Bibliografische Beschreibung**

**Gartmann, Laura:**

**Die Rolle der Zinktransporter ZIP4, ZIP14 und ZnT9 im Hepatozellulären Karzinom – eine immunhistochemische Studie – 2018 – 73 Blatt, 19 Abbildungen, 10 Tabellen, 5 Anlagen**

## **Kurzreferat**

Als essenzielles Spurenelement ist Zink für wichtige Funktionen der menschlichen Zelle nötig. Verschiedene Zinktransporterproteine gewährleisten die zelluläre Verteilung: Die ZIP (*Zinc-Irt-like protein*)-Familie besteht aus Influx-Transportern, Gegenspieler sind die ZnT (*Zinc-Transporter*)-Proteine als Efflux-Transporter. Ein entscheidendes Organ der systemischen Zinkhomöostase ist die Leber. Da ein lokaler Zinkmangel und ein Ungleichgewicht der Zinktransporter-Expression im Verdacht stehen mit Karzinomen assoziiert zu sein, ist die Zielsetzung unserer Studie die Expression von drei ausgewählten Zinktransportern (ZIP4, ZIP14 und ZnT9) im Hepatozellulären Karzinom (HCC) zu ergründen und die Eignung als prognostische Marker für das Überleben zu prüfen. Es wurden insgesamt 138 Biopsien von HCC-Patienten immunhistochemisch gefärbt und semiquantitativ ausgewertet. Bei den drei Zinktransporterproteinen konnte eine signifikante Expressionserhöhung im HCC verglichen mit angrenzendem extraläsionalem Gewebe nachgewiesen werden, welche unabhängig von der zugrunde liegenden Lebererkrankung war (AFLD, NAFLD, Virus-Hepatitis, sonstige Ätiologien). Zudem zeigten erhöhte Expressionen von ZIP4, ZIP14 und ZnT9 im Zellkern eine Assoziation mit kürzerer Überlebenszeit. Insgesamt ist zu vermuten, dass die Hepatokarzinogenese eng mit einem veränderten zellulären Zinkstoffwechsel verbunden ist und Zinktransporter als Ziele zukünftiger Therapeutika genutzt werden könnten.

## **Schlüsselwörter**

Hepatozelluläres Karzinom, Zinktransporter, Immunhistochemie, Zink

## Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	II
Bibliografische Beschreibung.....	II
Kurzreferat.....	II
Schlüsselwörter.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Zink allgemein.....	1
1.1.1. Zelluläre Zinkfunktionen.....	1
1.1.2. Die systemische und intrazelluläre Zinkhomöostase.....	4
1.2. Zinktransporterproteine.....	6
1.2.1. ZIP4.....	10
1.2.2. ZIP14.....	11
1.2.3. ZnT9.....	12
1.3. Zink und Zinktransporterproteine im HCC.....	14
1.3.1. HCC allgemein.....	14
1.3.2. Zink und HCC.....	15
1.3.3. Zinktransporter im HCC.....	15
1.4. Die Auswahl der Zinktransporterproteine.....	16
1.5. Aufgabenstellung.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1. Das Studiendesign.....	17
2.2. Die Gewebeproben und immunhistochemische Färbungen.....	20
2.3. Die semiquantitative mikroskopische Auswertung.....	22
2.4. Gruppierung nach Ätiologie.....	23
2.5. Die statistische Auswertung.....	23
3. Ergebnisse.....	24
3.1. Die immunhistochemische Auswertung.....	24
3.1.1. ZIP4.....	26
3.1.2. ZIP14.....	27
3.1.3. ZnT9.....	28

3.2.	Die statistische Analyse des gesamten Stichprobenumfangs.....	32
3.3.	Die statistische Analyse der paarweisen Stichproben.....	36
3.4.	Die Korrelation mit dem Überleben.....	39
4.	Diskussion.....	43
4.1.	Das Studiendesign.....	43
4.2.	Das Patientenkollektiv und Biopsiematerial.....	44
4.3.	Die subzellulären Nachweise der Zinktransporterproteine.....	45
4.4.	Die Unabhängigkeit der Zinktransporter-Expression von der zugrunde liegenden Lebererkrankung.....	46
4.5.	Die Eignung als prognostische Marker.....	46
4.6.	Die Zinkstoffwechselalteration in Verbindung mit der Hepatokarzinogenese.....	47
4.7.	Ausblick.....	50
5.	Zusammenfassung.....	52
6.	Literaturverzeichnis.....	55
7.	Anhang.....	61
7.1.	Tabellen der parametrischen und nicht-parametrischen Analyse.....	61
7.2.	Ehrenerklärung.....	63
7.3.	Danksagung.....	64
7.4.	Lebenslauf.....	65
7.5.	Veröffentlichung.....	66

**Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1:</i> Übersicht der zellulären Funktionen des Zinks.....	2
<i>Abbildung 2:</i> Die Zinkverteilung im menschlichen Körper.....	5
<i>Abbildung 3:</i> Subzelluläre Lokalisation der ZIP- und ZnT-Proteine.....	7
<i>Abbildung 4:</i> Die ZIP-Topografie in der Membran.....	8
<i>Abbildung 5:</i> Die ZnT-Topografie in der Membran.....	8
<i>Abbildung 6:</i> Die RNA-Expression der Zinktransporter in menschlichen Geweben.....	10
<i>Abbildung 7:</i> Die prozentuale Verteilung der klinischen Parameter.....	19
<i>Abbildung 8:</i> Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung.....	21
<i>Abbildung 9:</i> Exemplarische Färbungen am Beispiel eines gut differenzierten Hepatozellulären Karzinoms.....	25
<i>Abbildung 10:</i> Immunhistochemische Färbungen von ZIP4 in HCC-Gewebeproben.....	26
<i>Abbildung 11:</i> Immunhistochemische Färbungen von ZIP14 in HCC-Gewebeproben.....	27
<i>Abbildung 12:</i> Immunhistochemische Färbungen von ZnT9 in HCC-Gewebeproben.....	28
<i>Abbildung 13:</i> Immunhistochemischer Nachweis nukleärer ZnT9-Expression in HCC-Gewebeproben.....	29
<i>Abbildung 14:</i> Immunhistochemische Färbung der Zinktransporter in extraläsionalem und läsionalem Gewebe.....	31
<i>Abbildung 15:</i> Darstellung der extraläsionalen und läsionalen Expression der Zinktransporterproteine bezüglich der Gesamtstichprobenanalyse.....	35
<i>Abbildung 16:</i> Gegenüberstellung der Analyse des gesamten und paarweisen Stichprobenumfangs in Bezug auf die extraläsionale und läsionale Expression von zytoplasmatischem ZnT9 und ZIP14.....	38
<i>Abbildung 17:</i> Grafische Darstellung der Rangkorrelation nach Spearman mit dem Überleben.....	41
<i>Abbildung 18:</i> Darstellung der Überlebenszeitanalyse als Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen Zinktransporterproteine.....	42
<i>Abbildung 19:</i> Schematische Darstellung der Zinkstoffwechselalteration in Verbindung mit der Hepatokarzinogenese.....	48

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1:</i> Übersicht des aktuellen Forschungsstandes zu ZIP4, ZIP14 und ZnT9...	13
<i>Tabelle 2:</i> Die klinischen Parameter.....	18
<i>Tabelle 3:</i> Charakteristika der primären Antikörper.....	20
<i>Tabelle 4:</i> Einfluss der Probenlokalisierung und der Ätiologie der Lebererkrankung auf die Zinktransporterprotein-Expression bei Betrachtung des gesamten Stichprobenumfangs.....	33
<i>Tabelle 5:</i> Die Ergebnisse der statistischen Analyse des gesamten Stichprobenumfangs extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine.....	34
<i>Tabelle 6:</i> Die Ergebnisse der parametrischen und nicht-parametrischen Analyse des gesamten Stichprobenumfangs extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine.....	61
<i>Tabelle 7:</i> Einfluss der Probenlokalisierung und der Ätiologie der Lebererkrankung auf die Zinktransporterprotein-Expression bei Betrachtung der paarweisen Stichproben.....	36
<i>Tabelle 8:</i> Ergebnisse der statistischen Analyse über die paarweise angeordneten Stichproben extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine.....	37
<i>Tabelle 9:</i> Ergebnisse der parametrischen und nicht-parametrischen Analyse über die paarweise angeordneten Stichproben extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine.....	62
<i>Tabelle 10:</i> Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman der Zinktransporterprotein-Expression mit dem Überleben.....	39

**Abkürzungsverzeichnis**

AFLD	–	ethyltoxische Lebererkrankung
BCLC	–	Barcelona-Clinic-Liver-Cancer
BMI	–	Body-Mass-Index
CRP	–	C-reaktives Protein
CC1	–	Cell Conditioner 1
D	–	Asparaginsäure
DNA	–	Desoxyribonukleinsäure
DAB	–	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
GH	–	Growth-Hormon (Somatotropin)
H	–	Histidin
HCC	–	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	–	Meerrettichperoxidase
IGF-1	–	Insulin like-Growth-Factor-1
IL	–	Interleukin
Ig	–	Immunglobulin
Mg	–	Mangan
MT	–	Metallothionein
MTF-1	–	metal-response element-binding transcription factor-1
NADPH	–	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAFLD	–	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NKZ	–	natürliche Killer-Zellen
PDE	–	Phosphodiesterasen
PTP	–	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RNA	–	Ribonukleinsäure
RPKM	–	reads per kilobase per million reads placed
SLC	–	solute carrier
TMD	–	Transmembrandomäne
TNF- $\alpha$	–	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TSE	–	Tumor-suppressiver Effekt
VH	–	Virus-Hepatitis
Zn	–	Zink
ZIP	–	Zrt-Irt-like protein
ZnT	–	Zinc transporter

## **1. Einleitung**

### **1.1. Zink allgemein**

Spurenelemente spielen zweifellos eine besondere Rolle in unserer Ernährung und Gesundheit. Eines der wichtigsten essenziellen Spurenelemente des Menschen ist Zink. Die Erkenntnis der vielseitigen Funktionen des Zinks, die in den letzten Jahren gewonnen werden konnte, lenkt immer mehr Interesse auf dieses Mineral und eröffnet eine Vielzahl potenzieller therapeutischer Angriffsmöglichkeiten.

Ein menschlicher Körper beinhaltet circa 2 g Zink, überwiegend intrazellulär an Proteine gebunden [1]. Ein Anteil von 60 % dieses Bestandes befindet sich in der Muskulatur, 30 % im Knochen, je 5 % in der Haut und in der Leber [2]. Der Zinkbedarf eines Erwachsenen beträgt 7 bis 10 mg täglich [3] und erhöht sich durch pathologische Prozesse wie Stress, Traumata oder Infektionen [4].

Zink ist ein funktioneller Bestandteil von Enzymen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. So spielt es eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Funktionen wie Genexpression, Zelldifferenzierung, Proliferation, Bekämpfung von oxidativem Stress, Apoptose und der Signaltransduktion [5–7] (s. *Abbildung 1*). Zink beeinflusst die Funktion des Immunsystems [8, 9], die Heilung von Wunden, die Produktion von Prostaglandinen, die Knochenmineralisierung, die Funktion der Schilddrüse, die Blutgerinnung, kognitive Prozesse, fetales Wachstum und auch die Spermatogenese [4].

Aufgrund dieser Vielzahl von Funktionen ist es nicht erstaunlich, dass viele chronische Erkrankungen wie Hepatitis [10], Diabetes mellitus [11], Arteriosklerose [12], Alzheimer-Demenz [13], Autoimmunerkrankungen [8] oder auch Malignome [14, 15] in Verbindung mit einem veränderten Zinkmetabolismus stehen.

Länger andauernder Zinkmangel äußert sich klinisch in Störungen des Geschmacks und Geruchs, der Dunkeladaptation, zerebraler Dysfunktion, einer starken Infektanfälligkeit sowie trockener Haut, brüchigen Nägeln und Wundheilungsstörungen [16].

#### **1.1.1. Zelluläre Zinkfunktionen**

Als einziges essenzielles Übergangsmetall mit geringer Redoxaktivität und sehr guter Proteinbindung ist Zink als Kofaktor von mehr als 300 Enzymen äußerst gut geeignet [17]. Die Affinität von Zink-Ionen zu Metalloproteinen ist so stark, dass freies Zink in der Zelle streng reguliert werden muss [17].

Zu hohe intrazelluläre Konzentrationen führen zum Zelltod [18], vermutet werden Funktionsstörungen vieler Metalloproteine, die ungehemmt Zink-Ionen binden [17].

Durch die Studie von Andreini et al. wurde die evolutionär zunehmende Anzahl Zink-bindender Proteine von Prokaryoten zur eukaryoten Zelle gezeigt [19]. Tatsächlich kodieren circa 10 % des menschlichen Genoms zinkbindende Proteine, dies sind vermutlich mehr als 2000 verschiedene Genprodukte [20].

Als Kofaktor wirkt Zink zum Teil katalytisch, indem es am Substratumsatz oder an der Stabilisierung der Enzymstruktur beteiligt ist. Außerdem stabilisiert es die Struktur von Transkriptionsfaktoren wie Zinkfingerproteine und reguliert Hormone, Hormonrezeptoren und die Genexpression [4, 16].

Änderung der lokalen Zinkkonzentration vermitteln Signale, so kann Zink endokrin, parakrin und autokrin wirken [21] (s. *Abbildung 1*). Zink ist Inhalt präsynaptischer Vesikel und moduliert bei neuronaler Erregung die synaptische Übertragung im ZNS, indem es an Transporter und Rezeptoren bindet [21].

### Signaltransduktion

#### extrazellulär:

- Modulation der synaptischen Übertragung
- Reduktion der Insulinsekretion und Suppression des hepatischen Insulinabbaus
- Aktivierung des Zinkrezeptors

#### intrazellulär (als „Zink-Welle“, „Zink-Funke“ oder Expressionsänderungen der Zinktransporter):

- Inhibition von Enzymen (PTP, PDE, Calcineurin, Proteinkinase-C)

### Proliferation

- Kofaktor der DNA-Synthese
- Proliferationsanregung durch GH und IGF-1

### Apoptose-Inhibition

- Inhibition von Caspasen
- Stabilisation von p53 an der DNA

**Zink**

### Schutz vor oxidativem Stress

- Stabilisierung der Zellmembran
- Unterstützung der Superoxiddismutase
- Prävention vor Bildung radikaler Gruppen
- Aufrechterhaltung eines ausreichenden Spiegels an intrazellulären Radikalfängern (MT)
- Inhibition der NADPH-Oxidase

### Immunsystem

- T-Zellproliferation
- Aktivierung von NKZ
- Zytokinproduktion von Mastzellen

### Abbildung 1: Übersicht der zellulären Funktionen des Zinks

Gezeigt wird eine Auswahl bekannter zellulärer Funktionen von Zink.

Für genauere Erläuterung s. *Abschnitt 1.1.1*.

(PTP = Protein-Tyrosin-Phosphatase; PDE = Phosphodiesterasen; GH = Growth-Hormon (Somatotropin); IGF-1 = Insulin like-Growth-Factor-1; NADPH = Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat; NKZ = natürliche Killer-Zellen; MT = Metallothionein)

Der sogenannte Zink-Insulin-Komplex wird in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas gespeichert. Zusammen mit Insulin wird Zink bei Stimulation durch Glucose aus den Inselzellen sezerniert. Anschließend reduziert Zink autoregulatorisch die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen und supprimiert endokrin den hepatischen Insulinabbau [21]. Außerdem aktiviert Zink den Zinkrezeptor, ein Protein-G-gekoppelter Rezeptor, der die Proliferation, Differenzierung, das Überleben, den Transport von Ionen und die Homöostase von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  und  $\text{Cl}^-$  der Zielzelle regulieren kann [21, 22]. Die sogenannte „Zink-Welle“, der rasche Anstieg der intrazellulären Konzentration des Kations, beschreibt seine intrazelluläre Funktion als „second messenger“ [23]. Der schnelle Zinkanstieg kann durch Influx, aber auch durch Freisetzung aus Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum geschehen [21]. Des Weiteren kann Zink bei oxidativem Stress aus der Bindung von Metalloproteinen im Zytosol freigesetzt werden [21]. Diese zellulären Mechanismen werden als „frühe Zinksignale“ beschrieben [24]. „Späte Zinksignale“ werden durch Änderung in der Expression von Zinktransportern erzielt und bewirken erst nach gewisser Zeit eine Adaptation der Zelle [24].

Der zelluläre Zinkanstieg inhibiert viele verschiedene Proteine wie die Protein-Tyrosin-Phosphatase, Phosphodiesterasen, Calcineurin, Caspasen sowie unterschiedliche Kinasen wie die Proteinkinase-C [21]. Beschrieben wird auch der „Zink-Funke“, die Freisetzung von akkumuliertem Zink aus der Oozyte, welche die zelluläre Zinkkonzentration herabsetzt, intrazelluläre Kalziumschwankungen verursacht und so vermutlich für den Übergang zum Embryonalstadium wichtig ist [25].

Zinkmangel kann Einschränkungen des Immunsystems auslösen und ist möglicherweise die häufigste Ursache für sekundäre Störungen des Immunsystems beim Menschen [4]. Auch in Immunzellen wird Zink zur Transduktion von Signalen genutzt, so beeinflusst beispielsweise die Zinkkonzentration die Zytokinproduktion von Mastzellen [24, 26]. Außerdem reduziert der Mangel an Zink die Aktivität der natürlichen Killer-Zellen, beeinträchtigt ihre zytotoxischen Eigenschaften, und schränkt die T-Zellproliferation ein [4, 27, 28].

Wie schon am Beispiel der T-Zellen erwähnt, ist auch die Proliferation von verschiedensten Geweben und Zelltypen auf Zink angewiesen, so sind wichtige Enzyme der DNA-Synthese wie die Desoxythymidinkinase zinkabhängig [29]. Auch die hormonelle Regulation der Zellproliferation werde durch Zink beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die hypophysäre Achse des Somatotropins und des Insulin-like growth factors-1 zur adäquaten Proliferationsanregung Zink benötigen [29].

Zink wird auch als Apoptose-Inhibitor beschrieben [29]. Darüber hinaus kann Zinkmangel sogar den programmierten Zelltod einleiten [30]. Zink fungiert als Inhibitor von verschiedenen Caspasen, welche eine entscheidende Rolle in der Apoptose spielen [31]. Außerdem kann Zink die spezifische DNA-bindende Domäne von p53 stabilisieren [4]. Zinkmangel könnte also die intrazelluläre p53-Konzentration ansteigen lassen und so den Zellzyklus inhibieren und die Apoptose aktivieren [32].

Auch der Schutz vor freien Radikalen während oxidativem Stress gehört zur Wirkung des Zinks. Wahrscheinliche Mechanismen sind hierbei die Stabilisation der Zellmembran, die Unterstützung der Superoxiddismutase und die Prävention vor Bildung radikaler Gruppen durch die Interaktion chemischer Gruppen mit Eisen [4]. Außerdem sorgt Zink für eine ausreichende Konzentration an Metallothioneinen (MT), welche wichtige intrazelluläre Radikalfänger darstellen, und die NADPH-Oxidase inhibieren [4]. So wurde untersucht, dass Zinkmangel mit einer zunehmenden Schädigung von Lipiden, Proteinen und der DNA durch Oxidation assoziiert ist [4, 8, 33].

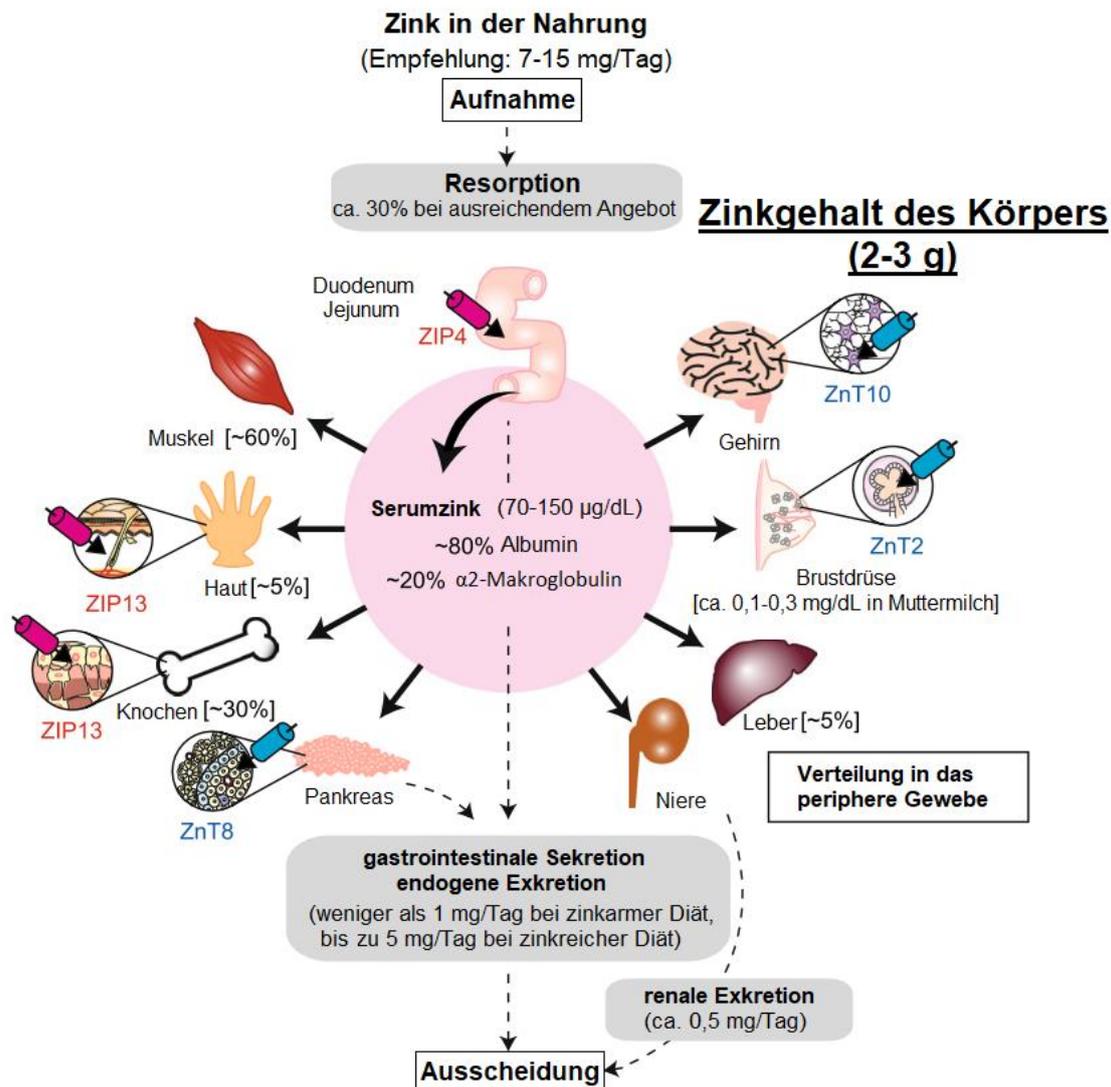
### **1.1.2. Die systemische und intrazelluläre Zinkhomöostase**

Der Zinkstoffwechsel ist bisher nur in groben Zügen erforscht. Aber bekannt ist, dass nach der Absorption aus dem Lumen durch die Enterozyten des Dünndarms der Zinktransport im Blut zu 80 % an Albumin und zu 20% an  $\alpha$ 2-Makroglobulin gebunden geschieht [34] (s. *Abbildung 2*).

Nach oraler Verabreichung von Zink an Ratten steigt die Zinkkonzentration in den Lebermitochondrien an [35]. Bei anhaltendem Mangel bleibt die Zinkkonzentration in Haar, Haut, Herz- und Skelettmuskel lange konstant, während sie in Plasma, Leber, Knochen und Hoden sinkt [36]. Besonders die Leber spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der systemischen Zink-Homöostase [16, 37]. Vermutlich sind neben lokalen Regulationsmechanismen wie die Änderung der Zinkkonzentration auch endokrine Einflüsse für diese Anpassungsvorgänge ursächlich [38, 39]. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Hormone wie Insulin, Glucagon, Glucocorticoide und Zytokine wie IL-6 diesen Prozess regulieren [40–42].

Die Zink-Plasmakonzentration bleibt sehr lange auch bei großen Variabilitäten der aufgenommenen Zinkmenge unverändert [43]. Dies lässt auf einen ausgeprägten Kontrollmechanismus der Zinkhomöostase schließen.

Die Zink-Plasmakonzentration wird überwiegend durch gastrointestinale Absorption und intestinale Zinkexkretion per Sekretion und Epithelabschilferung aus Duodenum, Jejunum und Pankreas reguliert, eine untergeordnete Rolle spielt die renale Exkretion [43–45] (s. *Abbildung 2*).



**Abbildung 2: Die Zinkverteilung im menschlichen Körper**

Das Jejunum und Duodenum nehmen ca. 30 % des angebotenen Zinks aus dem Lumen auf. Hierbei ist ZIP4 als Influx-Transporter nötig. Nur 0,1 % des Zinks befindet sich im Blut und wird durch Albumin und α2-Makroglobulin in das periphere Gewebe verteilt. Etwa 60 % des Gesamtzinkgehaltes befindet sich in den Skelettmuskeln, 30 % in den Knochen und ca. 5 % in der Leber und der Haut [2]. Der übrige Anteil verteilt sich auf andere Gewebe wie das Gehirn, Pankreas, die Brustdrüsen und Nieren. Die Zinkausscheidung geschieht überwiegend durch gastrointestinale Sekretion und Exkretion, wodurch der Stoffwechsel reguliert wird. Eine untergeordnete Rolle spielt die Ausscheidung über den Urin. Die gewebespezifische Expression der Zinktransporter ZIP (rot) und ZnT (blau) spielen eine wichtige regulatorische Rolle in der Zinkverteilung. Verschiedene Untergruppen sind neben ihrer typischen Gewebelokalisation dargestellt. (angelehnt an [34])

Freies  $\text{Zn}^{2+}$  ist zytotoxisch und unterliegt daher im menschlichen Körper einer strengen Kontrolle. Die intrazelluläre Konzentration freier  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen wird daher im Pico- bis maximal einstelligen Nanomolbereich gehalten [46, 47]. Der weitaus größte Anteil des intrazellulären Zink ist an Proteine gebunden. Dies gewährleistet, dass es zeitlich und räumlich kontrolliert an gezielte Metalloproteine abgegeben werden kann. Metallothioneine (MT) sind intrazelluläre Proteine, die circa 20 % dieses zellulären Zinkanteils binden [48]. Zu 50 % befindet sich das intrazelluläre Zink im Zytoplasma, 30 bis 40 % im Zellkern und 10 % in der Membran [21, 49].

Die Zinkhomöostase in der Zelle wird durch schnelle (sog. „Buffering“) und verzögerte Mechanismen (sog. „Muffling“) gewährleistet [17]. Tritt freies  $\text{Zn}^{2+}$  in die Zelle ein, bindet es größtenteils an Proteine, sofort wird ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Zink erzeugt.

Hierbei spielen MT eine entscheidende Rolle. Es kann bis zu sieben  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen an sich binden, wobei die Affinität je zusätzlich frei gewordener Zinkbindungsstelle steigt [50]. MT dienen als Reservoir, können durch ihre variable Affinität zum Zink große Schwankungen der Zinkkonzentration abpuffern und die Verteilung in unterschiedliche Zellkompartimente steuern. Der Isotyp MT2a ist überwiegend in Hepatozyten lokalisiert [18], was den Stellenwert der Leber im Zinkstoffwechsel unterstreicht. In mehrzelligen Organismen wurde bislang ein Zink-Sensor beschrieben: MTF-1 (*metal-response element-binding transcription factor-1*) [51]. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der das MT [51] sowie den Zinktransporter ZnT1 [52] reguliert, zwei äußerst wichtige Proteine der Zinkhomöostase.

Neben diesem schnell eintretenden Gleichgewicht stehen langsamere Umverteilungsprozesse in Zellkompartimente oder nach extrazellulär zur Verfügung. Dies kann mithilfe von MT und Zinktransporterproteinen in den Intermembranraum von Mitochondrien [53], den Zellkern [54], auch in den Golgi-Apparat [55] oder Vesikel [56, 57, 58] geschehen.

## **1.2. Zinktransporterproteine**

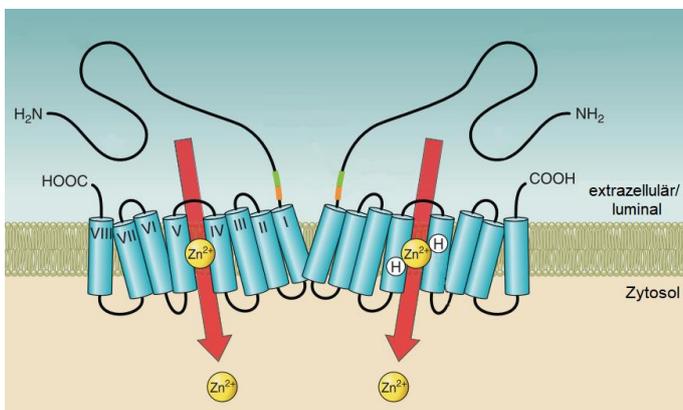
Die Zinktransporter sind membrangebundene Proteine, die dem Austausch von Zink zwischen intra- und extrazellulär beziehungsweise verschiedenen zellulären Kompartimenten dienen. Spezifische Zinkkanäle, die diesen Prozess unterstützen würden, sind nicht bekannt [17], daher sind Zinktransporterproteine unverzichtbar, um die zelluläre und subzelluläre Zinkhomöostase aufrechtzuerhalten.



Der genaue Transportmechanismus dieser Proteine ist im Detail noch nicht bekannt. Vermutet wird ein  $\text{Zn}^{2+}/[\text{HCO}_3^-]_2$ -Symport-Mechanismus [65].

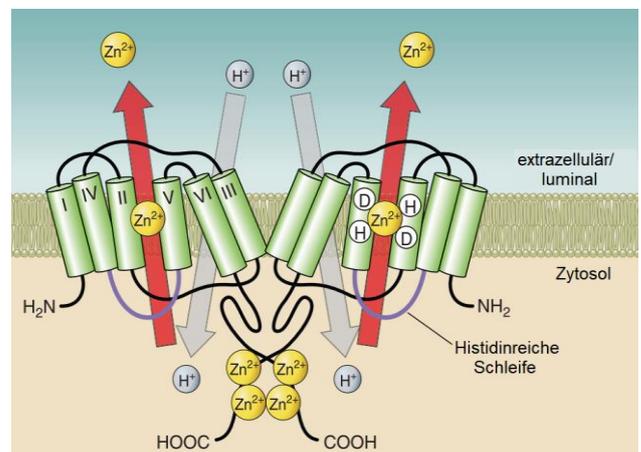
Die ZIP besitzen teilweise keine absolute Zinkspezifität, sie sind auch eingebunden im Transport von Eisen, Mangan, Kupfer und Kadmium [21]. Das Histidin der TMD5 könnte eine wichtige Funktion bei der spezifischen Zinkbindung haben, da bei ZIP14 und ZIP8 hier eine Glutaminsäure das Histidin ersetzt und diese Proteine bekannterweise auch andere Metalle transportieren können [21].

Kambe et al. haben mithilfe der bekannten strukturellen Information zu YiiP, einem ZnT-ähnlichen bakteriellen Transporter, ein topografisches Modell der ZnT-Familie erstellt [21] (s. *Abbildung 5*). Die ZnT bilden wie auch ZIP bis auf wenige Ausnahmen Homodimere, haben aber meist sechs Transmembrandomänen. Die N- und C-Termini sind im Zytoplasma lokalisiert. Dadurch dass die C-Termini je zwei  $\text{Zn}^{2+}$  binden können, dienen sie möglicherweise der Stabilisierung des Homodimers [21] (s. *Abbildung 5*). Zwei Histidine und zwei Asparaginsäuren in den TMD2 und TMD5 (HD-HD, s. *Abbildung 5*) könnten als Zinkbindungsstelle dienen und für die Zinkspezifität der meisten ZnT verantwortlich sein [21]. Sie nutzen vermutlich einen  $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauschmechanismus, wobei der  $\text{H}^+$ -Gradient als treibende Kraft für den Transport genutzt werden könnte [21].



**Abbildung 4: Die ZIP-Topografie in der Membran**

Dargestellt ist ein Schema der vermuteten topografischen Lage der ZIP in der Plasmamembran bzw. der Membran von Zellkompartimenten. Die meisten ZIP haben acht Transmembrandomänen und liegen als Homodimer vor. Die C- und N-Termini reichen nach extrazellulär bzw. luminal [64]. Transmembrandomänen (TMD) 4 und TMD5 besitzen Histidine (H), die als Zinkbindungsstelle dienen könnten. Der Transport geschieht vermutlich im  $\text{Zn}^{2+}/[\text{HCO}_3^-]_2$ -Symport (hier nicht dargestellt). (angelehnt an [21])



**Abbildung 5: Die ZnT-Topografie in der Membran**

Gezeigt wird ein Schema der vermutlichen topografischen Lage der ZnT-Transporter in der Plasmamembran bzw. der Membran von Zellkompartimenten. Die meisten von ihnen besitzen sechs Transmembrandomänen und lagern sich zu Homodimeren zusammen. Die Proteinenenden reichen nach intrazellulär und können je zwei  $\text{Zn}^{2+}$  binden. Der  $\text{Zn}^{2+}$ -Export geschieht vermutlich im Austausch mit  $\text{H}^+$ . TMD2 und TMD5 besitzen je eine Asparaginsäure (D) und ein Histidin (H), welche als  $\text{Zn}^{2+}$ -Bindungsstelle dienen könnten. Die histidinreiche Schleife könnte den zytosolischen Zinkgehalt erkennen, wodurch die Bindeaffinität zum Zink angepasst werden könnte. (angelehnt an [21])

Zwischen den TMD4 und TMD5 ist eine histidinreiche Schleife zu finden. Deletions- und Mutationsuntersuchungen lassen vermuten, dass dieser Proteinabschnitt die zytosolische Zinkkonzentration erkennt und damit die Bindeaffinität an den HD-HD-Abschnitt adaptieren könnte [21]. ZnT9 enthält vermutlich einen HD-DN (Asparaginsäure und Asparagin) -Abschnitt, wodurch eine geänderte Metallspezifität vorherrschen könnte [69]. Zusätzlich besitze ZnT9 Signalsequenzen für nukleäre Lokalisation oder den nukleären Export, eine DNA-Reparatur- und eine Zinkfinger-ähnliche Domäne sowie eine Sequenz, die als Koaktivator nukleärer Rezeptoren dienen kann [70, 71].

Viele Beeinträchtigungen konnten durch die phänotypische Ausprägung von ZIP-Knock-out-Mäusen beobachtet werden: Eine schlechtere embryonale Entwicklung bei limitiertem Zinkangebot (ZIP1 und ZIP2), beeinträchtigte T-Zell-Reifung im Thymus (ZIP3), Einschränkung in der pankreatischen und hepatischen Zinkexkretion (ZIP5), letale Hypoplasie multipler Organe und Störung der Hämatopoese (ZIP8), Störungen der B-Zell-Funktion (ZIP10), Wachstumsstörung und Entwicklungsstörung der Knochen und des Bindegewebes (ZIP13) [21].

Homozygoter ZIP4-Knock-out führt zur Letalität in der Embryonalphase, auch bei Zinksubstitution [21], was die außerordentliche Bedeutung dieses Proteins für das Leben zeigt. Heterozygote ZIP4-Knock-out-Mäuse weisen eine Wachstumsstörung und gestörte Neurogenese auf [72].

ZIP14-Knock-out-Mäuse zeigen Wachstumsstörungen, eine beeinträchtigte Gluconeogenese und Knochenbildung, erniedrigte Körperfettanteile, Insulinwerte und Glucosewerte in der Leber sowie eine gestörte Proliferation von Hepatozyten [21].

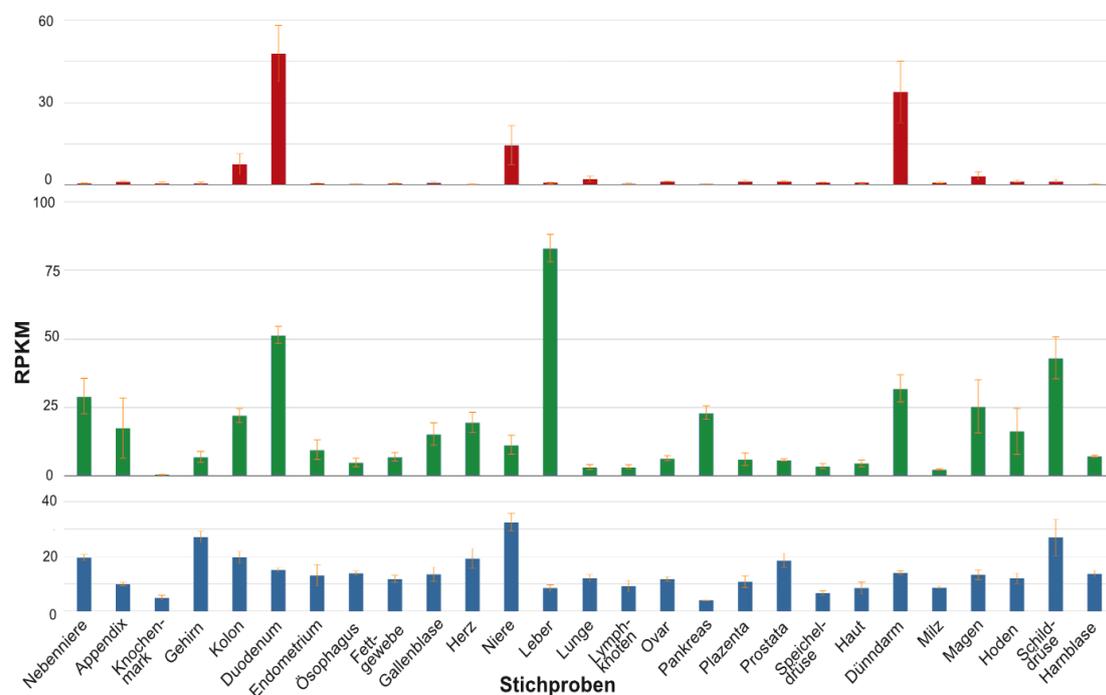
Knock-out von ZnT führt zu Letalität in der Embryonalphase (ZnT1), erniedrigter Resistenz gegenüber toxischen Effekten des Zinks (ZnT1, ZnT2 und ZnT4), verminderter Anreicherung von Zink in synaptischen Vesikeln glutamaterger Neurone (ZnT3), Produktion von zinkdefizitärer Milch, sogenannter „lethal milk“ (ZnT4), Knochendysplasie und Herzinsuffizienz (ZnT5) [52].

Auch verschiedene Erkrankungen des Menschen konnten durch Mutationen von Zinktransporter-Genen erklärt werden. So steht das ZIP4-Gen (*SLC39A4*) in Zusammenhang mit der Acrodermatitis enteropathica, ZIP5 ist mit einer asymptomatischen Myopie [73], ZIP13 mit der seltenen spondylocheirodysplastischen Form des Ehlers-Danlos-Syndroms [21] und ZnT2 mit der transienten Zinkmangeldermatitis des Neugeborenen [21] assoziiert.

Eine ZnT3-Mutation sei mit einem erhöhten Risiko für fieberhafte epileptische Anfälle [74] und der Ansammlung von Zink in Amyloid-Plaques beim Morbus Alzheimer [52] assoziiert, ZnT8 mit Diabetes mellitus Typ II [75] und ZnT10 mit dem sogenannten Zirrhose-Dystonie-Polyzythämie-Hypermanganämie-Syndrom [21].

### **1.2.1. ZIP4**

ZIP4 gehört zur LIV-1-Subfamilie und wird durch das *SLC39A4*-Gen des Chromosoms 8 kodiert. Die Lokalisation von ZIP4 wurde bisher im gastrointestinalen Trakt, den Nieren und dem Hippocampus beschrieben [59]. Quantitativ befindet sich ZIP4-RNA laut HPA-Dataset hauptsächlich in Dün-, Dickdarm und Nieren, während die Expression in der Leber eher gering ist (HPA-Dataset, zu finden auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (s. *Abbildung 6*). Unabhängig von der untersuchten Gewebeart wird ZIP4 zumeist als plasmamembrangebunden angesehen [59], aber auch eine Lage an der Membran von intrazellulären Vesikeln wird beschrieben [66, 76] (s. *Abbildung 3*). Wenige Studien haben bisher die subzelluläre Lage von ZIP4 in den Hepatozyten untersucht, aber diese fanden ZIP4 ebenso an der Plasmamembran [77, 78]. An der apikal gelegenen Zellmembran der Enterozyten dient es der Zinkaufnahme aus der Nahrung [59].



**Abbildung 6: Die RNA-Expression der Zinktransporter in menschlichen Geweben**

Die Expression der Zinktransporter ZIP4 (rot), ZIP14 (grün) und ZnT9 (blau) wurde anhand von RNA-Sequenzierung in 27 Geweben identifiziert und in der HPA-Datenbank erfasst (zu finden auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). ZIP4 wird überwiegend im Dünndarm und in den Nieren exprimiert. ZIP14 ist ubiquitär lokalisiert, mit stärkster Expression in der Leber. ZnT9 ist ebenso weitverbreitet, hohe Werte weisen Niere, Schilddrüse und das Gehirn auf. (RPKM = reads per kilobase per million reads placed)

In unseren Untersuchungen konnten wir ZIP4 im Zytoplasma der Hepatozyten lokalisiert nachweisen.

Durch posttranskriptionale Mechanismen bei Erniedrigung der  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen könnte die ZIP4-Expression hochreguliert werden [59]. Defekte in dem für ZIP4 kodierenden Genabschnitt sind bei der Acrodermatitis enteropathica identifiziert worden. Bei der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung kann durch den Mangel an ZIP4 die Zinkaufnahme dem Bedarf nicht gerecht werden, es kommt zum Zinkmangel. Dies äußert sich in pustulösen, nässenden Dermatitis, Entzündungen der Schleimhäute wie Glossitis, Stomatitis oder Proktitis und chronisch-rezidivierenden Diarrhöen [16]. Bei homozygotem Ausfall ist die Acrodermatitis enteropathica letal. Auch eine Assoziation von ZIP4 mit Karzinomen wurde festgestellt [77–80], was in *Abschnitt 1.3.* näher beleuchtet wird.

### **1.2.2. ZIP14**

Chromosom 8 enthält auch das *SLC39A14*-Gen für ZIP14. Die Sequenzierung von ZIP14-RNA in verschiedenen Geweben zeigte, dass es hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt mit höchster Expression in der Leber lokalisiert ist (HPA-Dataset, zu finden auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (s. *Abbildung 6*). Wie ZIP4 wurde ZIP14 an der Plasmamembran gebunden identifiziert [59] (s. *Abbildung 3*), aber auch eine Lage an Transferrin-haltigen endosomalen Kompartimenten wurde beschrieben [67].

Im Nachhinein konnte gezeigt werden, dass manche der ZIP auch andere zweiwertige Metalle transportieren. ZIP14 vermittelt neben Zink die Aufnahme von Eisen, Mangan und Kadmium [81]. Im Tierversuch zeigten ZIP14-knockout-Mäuse eine Änderung der Eisen-, Mangan- und Kupferkonzentration in Leber, Dünndarm und Pankreas [82].

Wie die ZIP4-Expression, wird durch einen Zinkmangel auch die ZIP14-Expression erhöht [83].

Zudem weisen mehrere Studien daraufhin, dass ZIP14 während der Akuten-Phase-Reaktion hochreguliert wird [84, 85]. Das Zytokin IL-6 hat im Maus-Modell die ZIP14-Proteinexpression stark erhöht und ist damit wahrscheinlich für die begleitende Hypozinkämie in der Akuten-Phase-Reaktion während einer Infektion verantwortlich [42]. Durch die experimentelle Operation von Ratten entstand ebenso eine Hypozinkämie, während sich der hepatische Zinkgehalt der Ratten erhöhte [85]. Auslöser vermag die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-6 und die dadurch resultierende Induktion von MT und ZIP14 in den Hepatozyten sein [85].

Es wurde auch beschrieben, dass die ZIP14-Proteinkonzentration durch den zellulären Eisengehalt moduliert werden kann [86]. Bei der Hämochromatose wurde eine geringere ZIP14-Expression und damit sinkende Eisenaufnahme von Hepatozyten beschrieben [87].

Inflammatorische Erkrankungen wie das Asthma [59] oder auch das kolorektale Karzinom [88] sind vermutlich ZIP14-assoziiert.

### **1.2.3. ZnT9**

Das *SLC30A9*-Gen für ZnT9 liegt auf Chromosom 4 und ist ebenso bekannt als HUEL, da es zuerst aus humanen embryonalen Lungenzellen (MRC-5) isoliert wurde [71]. Auch die ZnT9-Expression ist weitverbreitet. Hohe Konzentrationen weisen die Nieren, das Gehirn und die Schilddrüse auf, während die Leber dieses Protein eher mäßig exprimiert (HPA-Dataset, zu finden auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (s. *Abbildung 6*). Auch, wenn ZnT9 eine Kationen-Efflux-Domäne besitzt, ist die Funktion als Zinktransporter umstritten [70]. Zytosolische Zinkmessungen von embryonalen Nierenzellen mit überexprimiertem und mutiertem *SLC30A9*-Gen ergaben erste Hinweise darauf, dass ZnT9 in die zelluläre Zinkhomöostase eingreift [69]. Allerdings zeigten die überexprimierenden Zellen, anders als bei ZnT als Efflux-Transporter zu erwarten, höhere zytosolische Zinkkonzentrationen. Auch die regulatorischen Mechanismen sind noch unklar. Einerseits wird es als konsekutiv exprimiertes Gen oder auch Haushaltsgen tituiert [89], andererseits konnte im Zebrafisch-Model eine erniedrigte ZnT9-Expression bei Embryonen zinkdefizitärer Mutterfische erhoben werden [90]. Die Untersuchung von Overbeck et al. konnte diese ZnT9-Expressionsänderung bei erniedrigter Zinkkonzentration für periphere Lymphozyten des Blutes dagegen nicht bestätigen [91]. Die Lokalisation von ZnT9 wurde bisher im Zellkern und Zytoplasma von MRC-5-Zellen beschrieben [71]. Auch in Zellkernen von neuronalem Mäusegewebe [68] sowie vesikulär assoziiert mit der Lage des endoplasmatischen Retikulums im Zytoplasma von Neuroblastom-ähnlichen Zellen [69] wurde ZnT9 beschrieben (s. *Abbildung 3*).

Ebenso noch sehr unvollständig ist das Verständnis über die Funktion von ZnT9. Eine Mutation des ZnT9-kodierenden Gens kann zum zerebrorenalen Syndrom führen, hier sind psychomotorische Retardiertheit, renale Insuffizienz und Hypertension in der Kindheit vordergründig [69]. Der ZnT9-Gehalt von Leukozyten aus dem Blut koreanischer Frauen war umgekehrt proportional zu ihrem Body-Maß-Index [92].

Währenddessen waren inflammatorische Marker wie CRP und TNF- $\alpha$  bei Übergewicht, einem chronisch entzündlichen Zustand, erhöht [92]. Leukozytäres ZnT9 könnte also durch Akute-Phase-Proteine oder Zytokine herunterreguliert werden. ZnT9 spiele auch eine Rolle im Wnt-Signalweg und beeinflusse so die Embryonalentwicklung [69].

Ebenso bei der zellulären Aktivierung durch Hormone, wie Östrogen, sei ZnT9 wichtig. Es binde an den Ligand/Kernrezeptorkomplex oder an Koaktivatoren dieser nukleären Rezeptoren und transloziere in den Zellkern, um dort die Transkription der Zielgene anzuregen [63, 93].

Eine assoziierte ZnT9-Expressionsänderung mit der HCC-Karzinogenese ist bisher noch nicht untersucht worden. In *Tabelle 1* sind die bisherigen Erkenntnisse über die drei untersuchten Zinktransporter zusammengefasst.

**Tabelle 1: Übersicht des aktuellen Forschungsstandes zu ZIP4, ZIP14 und ZnT9**

Die bisherigen Erkenntnisse über die Lokalisation im Gewebe (HPA-Dataset, zu finden auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und subzellulär, die Auswirkungen auf Knock-out-Mäuse, die assoziierten Erkrankungen, die zellulären Funktionen und die Regulation der untersuchten Zinktransporterproteine werden übersichtlich dargestellt. Nähere Erläuterung und Quellenhinweise in *Abschnitt 1.2.1.* bis *1.2.3.*

	Gewebe-lokalisation	subzelluläre Lokalisation	KO-Maus	assoziierte Krankheiten	Funktion	Regulation
<b>ZIP4</b>	Dünn-, Dickdarm, Nieren	Plasma-membran, intrazelluläre Vesikel	<i>homozygot</i> : letal <i>heterozygot</i> : Wachstumsstörung und gestörte Neurogenese	Acrodermatitis enteropathica, HCC, Pankreas-Ca, Gliom	Zinkimport	↑ bei erniedrigter intrazell. Zn-Konzentration
<b>ZIP14</b>	weitverbreitet, vermehrt in: Gastro-intestinaltrakt, Leber	Plasma-membran, Transferrin-haltige endosomale Kompartimente	Störungen v. Wachstum, Gluconeogenese, Knochenbildung, Hepatozyten-proliferation, erniedrigte Körperfettanteile, Insulinwerte, Leberglucosewerte	HCC, Hämochromatose kolorektales Krzinom, Asthma bronchiale	Zn-, Fe-, Mg-, Cu-Import, systemische Hypozinkämie während Akute-Phase-Reaktion	↑ bei erniedrigter intrazell. Zn-, Fe-, Mg-, Cu-konzentration, IL-1 $\beta$ und IL-6
<b>ZnT9</b>	weitverbreitet, vermehrt in: Niere, Schilddrüse, Gehirn	Nukleus, Zytoplasma, Vesikel nahe ER (Neurone)	unbekannt	zerebrorenales Syndrom	Zink-homöostase, Kernrezeptor-Koaktivierung, Embryonalentwicklung	↓ bei Akute-Phase-Reaktion

### **1.3. Zink und Zinktransporterproteine im HCC**

#### **1.3.1. HCC allgemein**

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) entsteht durch maligne Entartung der Hepatozyten und wird auch als Leberzellkarzinom bezeichnet. Die Inzidenz liegt in Europa und den USA bei etwa 5 pro 100.000 Einwohner jährlich [94]. Sie steigt weltweit an und führt bei circa 75 % der betroffenen Patienten innerhalb eines Jahres zum Tode [95]. In China, Südostasien und Zentralafrika ist die Prävalenz am größten [96].

Zumeist geht eine langjährige Leberzirrhose dem Karzinom voraus. Somit sind die wichtigsten Risikofaktoren für ein HCC der Alkoholabusus, die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und entzündliche Lebererkrankungen wie chronische Virushepatitiden (B, C und D), parasitäre Leberinfektionen, Autoimmunhepatitiden, die primär sklerosierende Cholangitis und primär billiäre Zirrhose [94]. Auch verschiedene Speichererkrankungen wie die Hämochromatose, Morbus Wilson oder der  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel und die Cirrhose cardiaque, die Exposition mit Aflatoxinen oder hepatotoxischen Medikamenten sowie die kryptogene Leberzirrhose können zur malignen Entartung der Leberepithelzellen führen [94]. Jährlich entwickeln circa 4 % aller Zirrhosepatienten ein HCC, wobei Patienten mit einer chronischen Hepatitis B (circa 50 % aller HCC-Patienten) und C (circa 25 % aller HCC-Patienten) das größte Entartungsrisiko aufweisen [94].

Histologisch lassen sich mehrere Karzinomformen unterscheiden. Am häufigsten ist der trabekulär-sinusoidale, der pseudoglanduläre und der kompakte Typ, günstige klinische Verläufe zeigt das fibrolamelläre HCC [96].

Die Therapie richtet sich nach dem Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC) -System. Kurative Maßnahmen umfassen die operative Resektion, die Lebertransplantation und lokale Ablationsverfahren [97]. Eine medikamentöse Therapie wird bisher nur bei palliativem Ansatz empfohlen, hierbei kommt der Proteinkinase-Inhibitor Sorafenib zum Einsatz. Aus diesem Grunde sind Früherkennungsmaßnahmen bei Zirrhositikern wie regelmäßige Leberultraschalluntersuchungen und Bestimmungen des Tumormarkers ( $\alpha$ -Fetoprotein) verlaufsentscheidend.

### **1.3.2. Zink und HCC**

Die Pathomechanismen des Leberzellkarzinoms sind trotz der steigenden Relevanz und insuffizienter medikamentöser Therapiemöglichkeiten weitestgehend unverstanden. Seit den 1970er Jahren wurde mehrfach gezeigt, dass das HCC-Gewebe verglichen mit gesundem und auch zirrhotischem Lebergewebe einen um circa 55 bis 75 % reduzierten Zinkgehalt hat [98–102]. Der Zinkmangel bestünde schon in hochdifferenzierten HCC-Zellen und resultiert so wahrscheinlich aus frühen Mechanismen in der Karzinogenese [103]. Auch andere Karzinome, wie das des Pankreas, der Prostata [104] oder auch orale Plattenepithelkarzinome [76] werden als „zinkdefizient“ erachtet. Gar eine Zinksubstitution wird als unterstützende oder präventive Therapie in Erwägung gezogen [104].

### **1.3.3. Zinktransporter im HCC**

In mehreren Studien wurde die Zinktransporter-Expression in unterschiedlichen Lebererkrankungen und Immunzellen analysiert. ZIP14 spielt eine Rolle in der Regulierung der Gluconeogenese [105, 106], dem metabolischen Syndrom [107], der Leberzirrhose [108] und der Leberregeneration [109]. In HCC-Geweben [102, 110] und auch im Prostatakarzinom [67] wurde bisher eine erniedrigte ZIP14-Expression gefunden.

Dagegen wurde die ZIP4-Expression im HCC als erhöht identifiziert [78, 102, 111]. Weaver et al. verglichen aktiv-ZIP4-mRNA-exprimierende mit ZIP4-mRNA-herunterregulierten Mäuse-Hepatozyten und konnten mittels Durchflusszytometrie zeigen, dass bei ZIP4-Aktivität die Zellproliferation erhöht und die Apoptoserate erniedrigt ist [78]. Mithilfe einer Fibronectin-beschichteten Membran ließen sich Aussagen zum Migrationsverhalten treffen, auch diese sei bei aktivierter ZIP4-Expression erhöht [78]. Eine weiterführende Studie von Xu et al. konnte durch in vitro Beobachtungen mittels Zellmigrations-Filter, Auswertung im Lichtmikroskop und der Durchflusszytometrie dieses Verhalten auch bei menschlichen HCC-Zellen wiederfinden [79].

Neben dem HCC wurden auch das Pankreas-Karzinom [66, 79], das Ovarial-Karzinom [112], das nicht-kleinzellige Lungen-Karzinom [113] und das Gliom [80] als ZIP4-assoziierte Tumore beschrieben.

#### **1.4. Die Auswahl der Zinktransporterproteine**

Im Hinblick auf die Expressionsstudie der Zinktransporter in Lebergewebe und HCC wurden innerhalb der Arbeitsgruppe um Frau Privatdozentin Dr. med. Schütte verschiedene Studien zwischen 2011 und 2014 durchgeführt, deren Ergebnisse bei der Auswahl der zu analysierenden Moleküle berücksichtigt wurden.

Hierzu gehörte eine Expressionsstudie zum Nachweis der 24 Zinktransporter auf RNA-Ebene in ruhenden und stimulierten mononukleären Zellen, da Leber-infiltrierende Immunzellen im Rahmen der Pathogenese des HCCs eine Rolle spielen [114]. Des Weiteren wurde die Genexpression der 24 Moleküle jeweils in läSIONalem und extraläsIONalem Gewebe von zwölf HCC-Patienten in einer Pilotstudie untersucht. Hierbei zeigten sich teilweise tendenziell erhöhte Expressionsniveaus für verschiedene Zinktransporter in läSIONalen Proben (Wex et al., unveröffentlichte Daten). Im Kontext mit (I) den Expressionsdaten der Vorläuferstudien, (II) Studiendaten anderer Gruppen zur Expression von Zinktransportern in Lebergewebe und Lebererkrankungen und (III) der Verfügbarkeit etablierter Antikörper zum Nachweis der Zinktransporter, entschieden wir uns für die Analyse der drei Proteine ZIP4, ZIP14 und ZnT9.

#### **1.5. Aufgabenstellung**

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse über Zinktransporter und ihrer Rolle in der HCC-Karzinogenese sind noch sehr lückenhaft. Es werden noch immer prognostische Marker und Angriffspunkte für eine spezifische Therapie zur besseren Behandlung des HCCs benötigt.

Um diesem Ziel näher zu kommen, haben wir die Expression von ZIP4, ZIP14 und ZnT9 immunhistochemisch in HCC-Biopsien und angrenzendem Lebergewebe analysiert und klinische Daten der Patienten zusammengetragen.

Folgende Teilaspekte sollen in unserer Studie untersucht werden:

1. Gibt es eine unterschiedliche Expression der Zinktransporterproteine in HCC-Gewebe verglichen mit extraläsIONalem Lebergewebe?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen Zinktransporter-Expression und der zugrunde liegenden Lebererkrankung?
3. Ist die Expression der Zinktransporterproteine mit verlängertem oder verkürztem Überleben assoziiert?

In den nachfolgenden Abschnitten möchte ich der Beantwortung dieser Fragen näher kommen, unsere Ergebnisse präsentieren und anschließend kritisch diskutieren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Das Studiendesign**

Die Auswahl der Patienten wurde anhand des digitalen Datenarchivs des Universitätsklinikums Magdeburg getroffen. Involviert sind 138 Patienten, die durch das Institut für Pathologie in den Jahren 2005 bis 2014 histologisch diagnostiziert und in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie und der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg behandelt wurden. Somit handelt es sich um einen retrospektiven Studienansatz. Patienten, deren Biopsien nicht mehr zur Verfügung standen, wurden, wie auch Patienten mit Zweitkarzinomen, ausgeschlossen. Für die durchgeführten Untersuchungen liegt ein Votum der örtlichen Ethikkommission vor (Votum 91/12).

Zu jedem Patienten wurde aus dem digitalen und dem schriftlichen Aktenarchiv ein klinischer Datensatz zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erstellt. Dieser umfasst epidemiologische Daten, Serumparameter, Tumorstadium und die Therapie.

Die epidemiologischen Daten umfassen Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, ermittelter Body-Mass-Index (BMI), Zeitpunkt der Erstdiagnose, Todeszeitpunkt beziehungsweise Datum des letzten Kontaktes.

Zur Charakterisierung der Leberfunktion und der Aktivität der Hepatitis wurden Albumin, Bilirubin, Quick-Wert, Prothrombin-Zeit, alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Creatinin, Hämoglobin, Thrombozytenzahl, Harnstoff, Gesamtprotein und wenn vorhanden die Immunglobuline G und A erfasst.

Um die Ätiologie der chronischen Lebererkrankung zu belegen, wurden neben dem BMI und dem Alkoholkonsum Ferritin, Transferrinsättigung, Ceruloplasmin, antinukleäre Antikörper (ANA), antimitochondriale Antikörper (AMA), Antikörper gegen das lösliche Leberantigen (anti-SLA), Antikörper gegen Leber-Niere-Mikrosomen (anti-LKM) und  $\alpha$ 1-Antitrypsin bei Bestimmung miterfasst. Als HCC-Tumormarker wurde auch das  $\alpha$ -Fetoprotein verzeichnet.

Um die Erkrankung der Patienten zu beschreiben, wurden folgende Parameter erfasst: Ätiologie der zugrunde liegenden Lebererkrankung, die Anzahl der Tumorherde, die maximale Herdgröße, die Lage innerhalb der Lebersegmente, das Stadium der Leberzirrhose (Child-Pugh-Score) und des HCCs (BCLC).

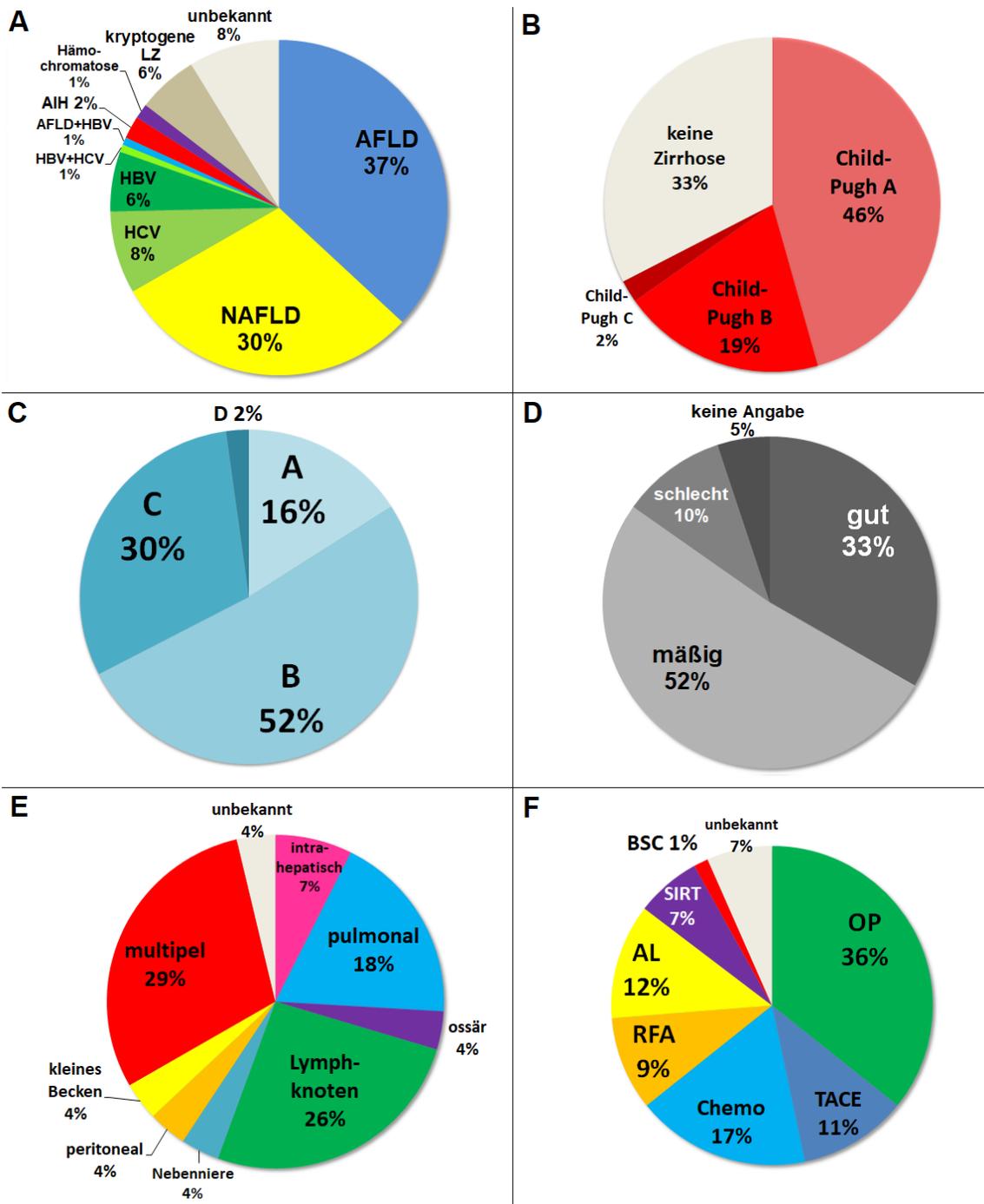
Ein Alkoholkonsum von mehr als 60 g Alkohol pro Tag oder ein zurückliegender Alkoholabusus wurde als Risikofaktor in die Daten einbezogen. Wenn vorhanden, wurde der ECOG als Performance-Status dokumentiert. Auch ob der Tumor mehr als die Hälfte der Leber einnimmt oder Komplikationen wie Aszites, eine hepatische Enzephalopathie, Metastasierung, Pfortaderhochdruck, -thrombose oder -invasion bestanden, wurden im Datensatz aufgeführt. Abschließend wurde der primäre Therapieansatz und der weitere Therapieverlauf verzeichnet. Die einzelnen klinischen Parameter mit der Verteilung sind nachfolgend in *Tabelle 2* und *Abbildung 7* dargestellt.

**Tabelle 2: Die klinischen Parameter**

Die klinischen Parameter der Studienpatienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose werden mit der absoluten Stichprobenanzahl (n) und dem prozentualen Anteil (%) angegeben. Ein mit (\*) markierter Patient wurde in der statistischen Analyse über alle Ätiologien erfasst, bei der Gruppierung allerdings ausgeschlossen. Bei sieben Patienten fehlte eine Festlegung des Gradings. Bei zwei Patienten fehlte die Angabe der Metastasenlokalisation.

(AFLD = alkoholische Fettlebererkrankung; NAFLD = nicht-alkoholische Fettlebererkrankung; HBV = chron. Hepatitis B; HCV = chron. Hepatitis C)

	n	%		n	%	
	männlich	116	84,1	HCC	138	100
	weiblich	22	15,9	extraläsionales Gewebe	72	52,2
	lebendig	39	28,3	unifokal	66	47,8
	verstorben	72	52,2	bifokal	18	13
	unbekannt	27	19,5	multifokal	54	39,2
Ätiologie	AFLD	51	37	gut differenziert (G1)	46	33,3
	NAFLD	41	29,7	mäßig differenziert (G2)	71	51,4
	Virus-Hepatitis:	20	14,5	schlecht differenziert (G3)	14	10,1
	HCV	11	8	nicht-metastasiert	111	80,4
	HBV	8	5,8	metastasiert	27	19,6
	HCV + HBV	1	0,7	intrahepatisch	2	1,4
	AFLD + HCV*	1	0,7	lymphogen	7	5,0
	sonstige Ätiologien:	25	18,1	pulmonal	5	3,6
	Autoimmunhepatitis	3	2,2	ossär	1	0,7
	Hämochromatose	2	1,4	Nebenniere	1	0,7
	kryptogene Zirrhose	8	5,8	peritoneal	1	0,7
	unbekannt	12	8,7	kleines Becken	1	0,7
		keine Zirrhose	45	32,6	unbekannt	1
Child-Pugh A		63	45,7	multipel	8	5,8
Child-Pugh B		27	19,5	Leberteilresektion	49	35,5
Child-Pugh C		3	2,2	Lebertransplantation	1	0,7
BCLC	A	22	15,9	interstitielle Brachytherapie	16	11,6
	B	71	51,4	Radiofrequenzablation	13	9,4
	C	42	30,5	transarterielle Chemotherapie	15	10,9
	D	3	2,2	selektive interne Radiotherapie	9	6,5
				systemische Chemotherapie	24	17,4
Alter	Spannweite	32 - 85 Jahre		Best-supportive-care	2	1,4
	Mittelwert ± Standardabweichung	67 ± 10,0		unbekannt	9	6,5



**Abbildung 7: Die prozentuale Verteilung der klinischen Parameter**

Dargestellt werden (A) die zugrunde liegende Lebererkrankung, (B) das Zirrhosestadium, (C) der BCLC-Score, (D) der Differenzierungsgrad, (E) die Lokalisation der Metastasen und (F) die primäre Therapie in Form von Kreisdiagrammen. Die Prozentsätze und Stichprobenanzahlen sind der *Tabelle 2* zu entnehmen. Aus Übersichtlichkeitsgründen Prozentangaben in ganzen Zahlen und daher leichte Abweichungen.

(AIH = Autoimmunhepatitis; AFLD = alkoholische Fettlebererkrankung; NAFLD = nicht-alkoholische Fettlebererkrankung; HBV = chron. Hepatitis B; HCV = chron. Hepatitis C; TACE = transarterielle Chemoembolisation; Chemo = systemische Chemotherapie; RFA = Radiofrequenzablation; AL = Afterloading/Brachytherapie; SIRT = Selektive Interne Radiotherapie; BSC = Best Supportive Care)

## 2.2. Die Gewebeproben und immunhistochemische Färbungen

Die Biopsien wurden unabhängig von unserer Studie durch Feinnadelpunktionen oder operativer Resektion an dem Universitätsklinikum Magdeburg gewonnen. Dann wurden die Proben in Formalin eingelegt und im Institut für Pathologie in Paraffin eingebettet. Die Gewebeproben sind archiviert worden und anschließend für unsere Studienzwecke aufgearbeitet.

Im Labor für Immunhistochemie wurden die Biopsien nach Schneiden mittels Mikrotom auf Objektträger fixiert und immunhistochemisch gefärbt.

Hierfür wurde die zu den indirekten Färbemethoden zählende Biotin-freie-Komplex-Methode des Färbeautomaten *BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Model* von *Ventana* (Ventana Medical System, Strasbourg, Frankreich) genutzt.

Sie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität in Biotin-haltigem Gewebe, wie Leber, Niere oder Milz aus, da das endogene Biotin zu Fehlinterpretationen führen kann. Die verwendeten primären Antikörper sind in *Tabelle 3* charakterisiert.

Die Entparaffinierung der circa 2 µm dicken histologischen Schnitte sowie die Hitzevorbehandlung mit Kochpuffer *Cell Conditioner 1* erfolgte im Automaten, der jeweilige primäre Antikörper mit der entsprechenden Verdünnung (s. *Tabelle 3*) wurde als Titration aufgetragen.

### Tabelle 3: Charakteristika der primären Antikörper

(*CC1* = *Cell Conditioner 1*; *HRP* = *Meerrettichperoxidase*; *DAB* = *3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid*)

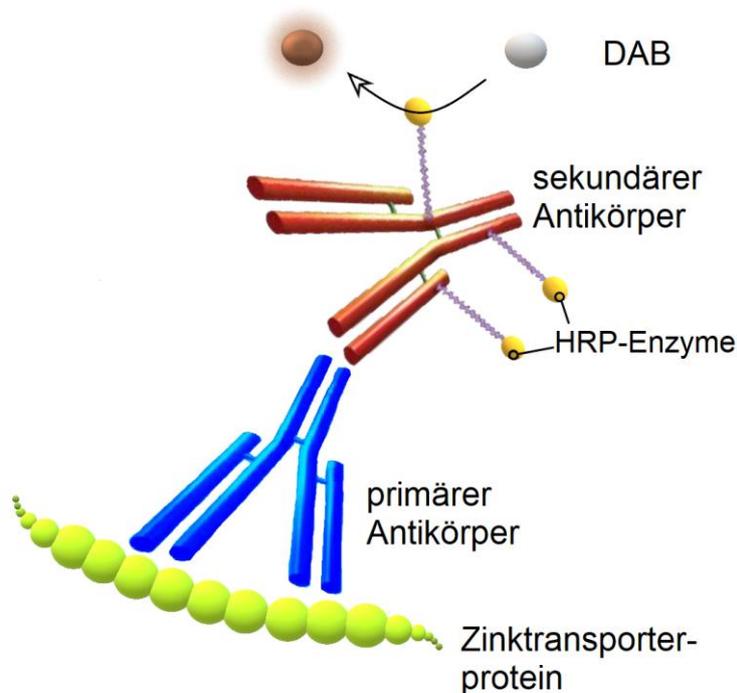
Antigen		ZIP4	ZIP14	ZnT9
Antikörper	Produktname	SLC39A4 (Internal) antibody	SLC39A14 (Internal) antibody	SLC30A9 / ZNT9 Rabbit anti-Human Polyclonal (aa103-151) Antibody
	Produkttyp	primärer AK	primärer AK	primärer AK
	Katalog-Nr.	pab79249	pab73247	LS-B9652
	Art	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen
	Klonalität	polyklonal	polyklonal	polyklonal
	Firma	Covalab R&D in Bio- technology, Villeurbanne, Frankreich	Covalab R&D in Bio- technology, Villeurbanne, Frankreich	LSBio, LifeSpan BioScience, Inc., Seattle, USA
Verdünnung		1:200	1:200	1:500
Kochpuffer		CC1mild	CC1mild	CC1mild
Sekundärer AK		HRP-Multimer- komplex	HRP-Multimer- komplex	HRP-Multimer- komplex
Chromogen		DAB	DAB	DAB
Positiv-Kontrolle		Niere	Niere	Hoden

Um die positive Reaktion der primären Antikörper sichtbar zu machen, wurde das *ultraVIEW™ DAB Detection Kit* (Ventana Medical Systems, Tuscon, Arizona, USA) eingesetzt. Hierbei ist der sekundäre Antikörper direkt mit den Meerrettichperoxidase (HRP)-Enzymen konjugiert (s. *Abbildung 8*). Das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) reagiert mit diesem zu einem braunen Reaktionsprodukt.

Für die Negativ-Kontrollen wurde entweder auf den primären Antikörper verzichtet oder er wurde durch unwirksames IgG1 ersetzt, beides ergab kein Signal der Epitope.

Um die Differenzierung des Gewebes sichtbar zu machen, wurde die *Hämalaun-Färbung nach Mayer* als Gegenfärbung eingesetzt.

Während der Studie wurden die ZIP14-Antikörper einmalig nachbestellt, es waren Proteine der Firma *Covalab* aus der gleichen Charge erhältlich, sodass die Färbeeigenschaften identisch blieben. Geeignete ZIP4-Antikörper waren leider auch von anderen Firmen zum gewünschten Zeitpunkt nicht erhältlich, sodass die Stichprobenanzahl der gefärbten Biopsien auf 72 beschränkt werden musste. Der ZnT9-Antikörper war für alle Biopsien ausreichend. Für die fotografische Dokumentation der histologischen Schnitte wurde das *Zeiss Axioskop 50* und eine *Nikon DP26* verwendet.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung**

Nach Bindung des primären Antikörpers an dem Epitop des Zinktransporters, bindet der sekundäre Antikörper am Fc-Fragment des primären Antikörpers. Die HRP-Enzyme sind direkt mit dem sekundären Antikörper konjugiert und sorgen für den bräunlichen Farbumschlag des DAB. (angelehnt an die Broschüre des Ultra View DAB Detection Kid von Vantana)

### **2.3. Die semiquantitative mikroskopische Auswertung**

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte der HCC-Biopsien wurden in Zusammenarbeit mit Professor Dr. med. Kalinski (Institut für Pathologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) lichtmikroskopisch ausgewertet. Verwendet wurde ein *Zeiss Axioskop 50*.

Dabei wurde das HCC-Gewebe in seiner Gesamtheit auf prozentuale Positivität (Farbausbreitung) bewertet und die Zelle mit der stärksten Färbung (Farbintensität) beurteilt.

Miterfasstes extraläsionales Gewebe betrachteten wir separat und legten auch hier die Farbintensität und die -ausbreitung fest. ZnT9 war im Zytoplasma und zum Teil auch in den Zellkernen lokalisiert, diese beiden Lokalisationen wurden ebenso separat beurteilt.

Zur Semiquantifizierung wurde die Intensität in vier Grade abgestuft:

- 0: keine Färbung
- 1: schwach
- 2: mittel
- 3: stark

Zudem wurde die Ausbreitung je nach prozentualen Anteil am insgesamt im Schnitt erfasstem Tumor- beziehungsweise extraläsionalem Gewebe eingeteilt.

Es wurden fünf Grade festgelegt:

- 0: keine Färbung
- 1: 1 - 9 %
- 2: 10 - 49 %
- 3: 50 - 79 %
- 4: 80 - 100 %

Zur Ermittlung des Expressionsgrades (Summenscore) der Zinktransporterproteine wurde die Intensität und die Ausbreitung der immunhistochemischen Färbung herangezogen. Der Intensitätsgrad und der Grad der Ausbreitung wurden addiert, sodass die ermittelten Summenscores minimal 0 und maximal 7 Punkte betragen.

Auf das Scoring wird in *Abschnitt 3.1. des Ergebnisteils* mithilfe von Bildbeispielen näher eingegangen.

Um die Expressionsänderung zu berücksichtigen, wurde bei der Überlebensanalyse die läsionale Expression auf die extraläsionale normiert. Hierfür wurde der extraläsionale Summenscore von dem läsionalen subtrahiert. So können Werte ( $\Delta$  läsional – extraläsional) von -7 bis 7 entstehen.

#### **2.4. Gruppierung nach Ätiologie**

Um der Frage nachzugehen, ob die zugrunde liegende Lebererkrankung mit der Zinktransporter-Expression zusammenhängt, wurden die Patienten nach der Ätiologie ihres HCCs gruppiert. Festgelegt wurden vier Gruppen: Alkoholbedingte Fettlebererkrankung (AFLD), nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), Virushepatitis (VH) und sonstige Ätiologien.

Die Patienten mit einer chronischen Hepatitis B und C wurden als Virushepatitis-Gruppe zusammengefasst. Sonstige Ätiologien umfasst Patienten mit Hämochromatose, Autoimmunhepatitis, kryptogener Leberzirrhose und einer unbekanntem Ursache ohne Leberzirrhose.

Ein Patient hatte eine ethyltoxische Genese und eine Hepatitis B, er wurde folglich in der statistischen Analyse über alle Ätiologien erfasst, bei der Gruppierung allerdings ausgeschlossen (s. *Tabelle 2*). Die Aufteilung ist in *Abbildung 7 A* dargestellt.

#### **2.5. Die statistische Auswertung**

Mithilfe des klinischen Datensatzes und der immunhistochemischen Summenscores wurde eine Tabelle in *Microsoft Excel 10* (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt. Diese Tabelle war die Grundlage der statistischen Analyse, die mithilfe von *IBM SPSS Statistics 22.0.0* (IBM Corporation, New York, USA) durchgeführt wurde. Genauere Angaben der durchgeführten Tests sind im *Abschnitt 3.2.* bis *3.4.* zu finden.

### **3. Ergebnisse**

In dem ersten Abschnitt des Ergebnisteils werden mikroskopische Bildbeispiele vorgestellt, um die immunhistochemische Auswertung zu verdeutlichen. In den darauf folgenden Abschnitten werden die statistischen Ergebnisse sowohl für den gesamten Stichprobenumfang (s. *Abschnitt 3.2.*) als auch für die Subgruppe der Patienten, von welchen neben läSIONalen auch extraläsIONale Gewebeprouen vorlagen (s. *Abschnitt 3.3.*), präsentiert. Abschließend wird in *Abschnitt 3.4.* die Korrelation mit dem Überleben gezeigt.

#### **3.1. Die immunhistochemische Auswertung**

Insgesamt wurden 138 histologisch diagnostizierte HCC-Gewebeprouen immunhistochemisch für die drei Zinktransporter gefärbt und ausgewertet. Bei 72 dieser Proben war extraläsIONales Lebergewebe miterfasst.

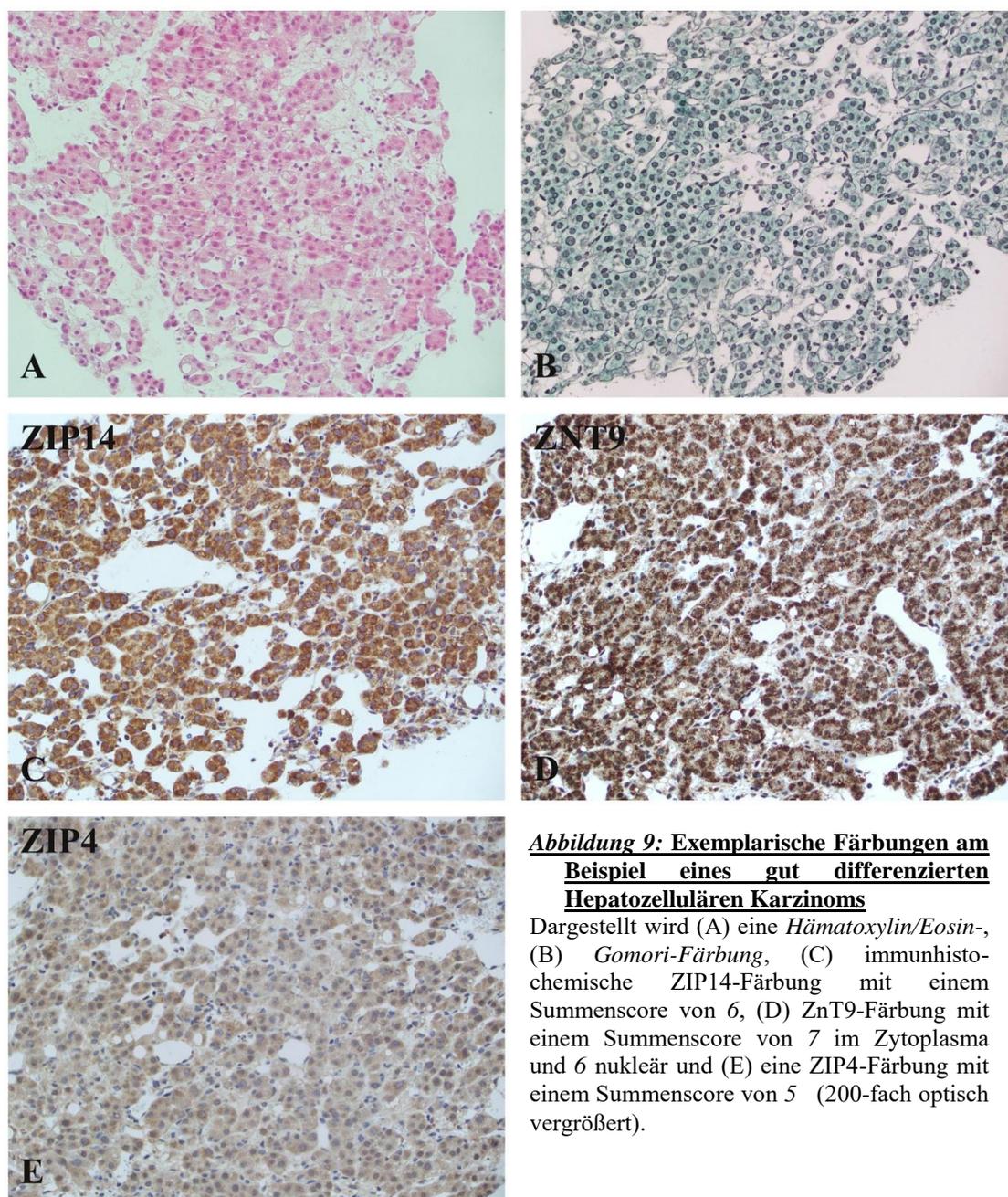
In *Abbildung 9* ist ein gut differenziertes HCC eines Patienten mit einer kryptogenen Leberzirrhose dargestellt. Man erkennt die typische Verbreiterung des Trabekelwerks sowie verminderte Bindegewebsanteile in der *Hämatoxylin/Eosin-* und *Gomori-Färbung*. Die Zellen zeigen eine veränderte Kern-Plasma-Relation mit Kernhäufung. Die Leberläppchenarchitektur ist aufgehoben.

*Bildabschnitt C* der *Abbildung 9* zeigt die ZIP14-Färbung mit mittlerer Intensität (Score 2) und maximaler prozentualer Ausbreitung (Score 4), was einen Summenscore (2+4) von 6 ergibt (s. auch *Material und Methoden*).

Die immunhistochemische ZnT9-Färbung in *Abbildung 9 D* ist sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär nachweisbar. Beide subzellulären Kompartimente wurden bei der Auswertung separat betrachtet. Das Zytoplasma zeigt eine starke Intensität (Score 3) mit maximaler Ausbreitung (Score 4), woraus ein Summenscore von 7 folgt. Die Zellkerne sind ebenfalls stark gefärbt (Score 3), die Ausbreitung beträgt allerdings 70 Prozent (Score 3), sodass sich ein Summenscore von 6 ergibt.

In *Abbildung 9 E* ist die ZIP4-Färbung abgebildet. Die schwache zytoplasmatische bzw. perinukleäre Färbung (Score 1) ist in ihrer Ausbreitung überall nachweisbar (Score 4), so dass der Summenscore mit 5 klassifiziert wurde.

Weitere exemplarische Färbungen zur Illustration der immunhistochemischen Primärergebnisse sowie nähere Erläuterungen zur mikroskopischen Auswertung hinsichtlich der einzelnen Zinktransporterproteine sind in den nachfolgenden *Abschnitten 3.1.1.* bis *3.1.3.* dokumentiert.

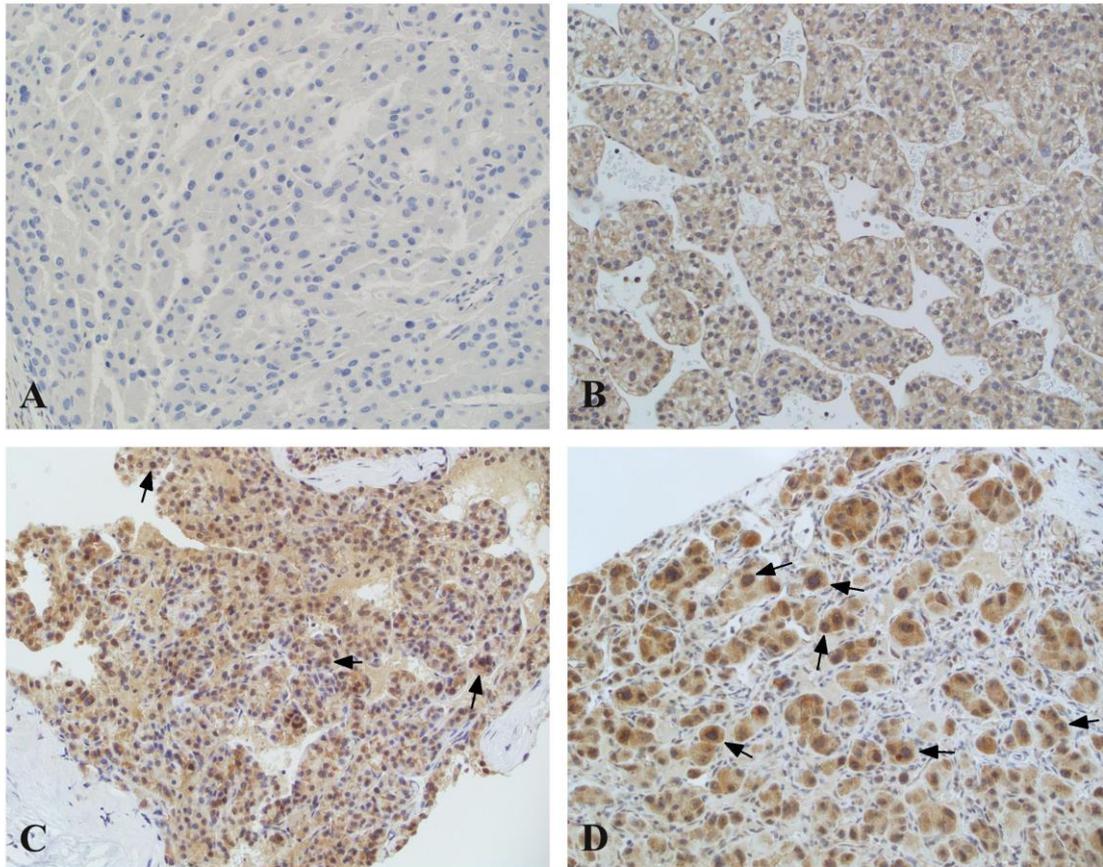


**Abbildung 9: Exemplarische Färbungen am Beispiel eines gut differenzierten Hepatozellulären Karzinoms**

Dargestellt wird (A) eine *Hämatoxylin/Eosin*-, (B) *Gomori-Färbung*, (C) immunhistochemische ZIP14-Färbung mit einem Summenscore von 6, (D) ZnT9-Färbung mit einem Summenscore von 7 im Zytoplasma und 6 nukleär und (E) eine ZIP4-Färbung mit einem Summenscore von 5 (200-fach optisch vergrößert).

### 3.1.1. ZIP4

Bei der Auswertung der ZIP4-Färbungen wurde das Zytoplasma der HCC-Zellen beurteilt. In *Abbildung 10* sind verschiedene Farbintensitäten (fehlend – stark) exemplarisch gezeigt. Die Pfeile in *Abbildung 10 C* und *10 D* markieren die intensivere Färbung in der Nähe des Zellkerns.

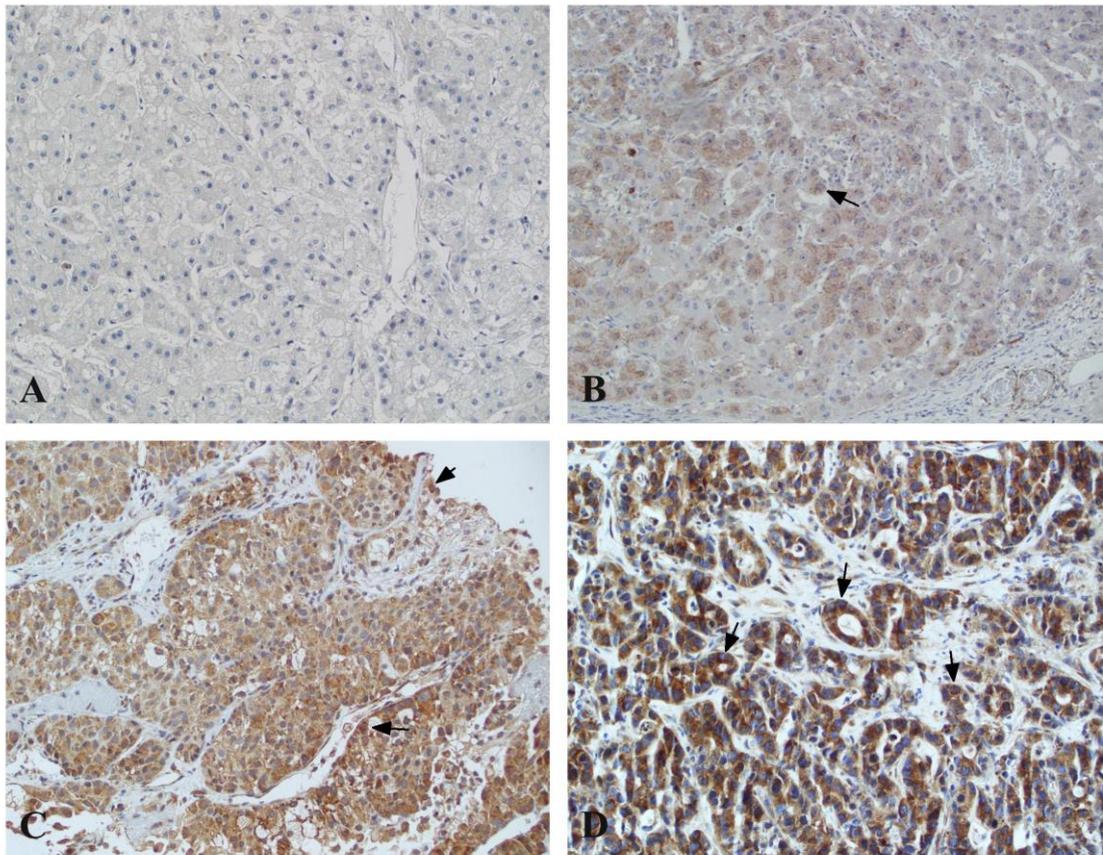


**Abbildung 10: Immunhistochemische Färbungen von ZIP4 in HCC-Gewebeproben**

Vergleichend gezeigt wird (A) ein mäßig differenziertes HCC mit negativer Zytoplasma-Färbung, (B) mit schwacher Färbung, (C) mit mittlerer Färbung und (D) ein schlecht differenziertes HCC mit starker zytoplasmatischer Färbung. Die Pfeile weisen exemplarisch auf eine perinukleäre Farbintensivierung (200-fach optisch vergrößert).

### 3.1.2. ZIP14

Bei der histologischen Auswertung von ZIP14 wurde wie bei ZIP4 die zytoplasmatische Expression der HCC-Zellen (läsional) und der Hepatozyten im umliegenden Gewebe (extraläsional) untersucht. In *Abbildung 11* sind die einzelnen Abstufungen der Farbintensität dargestellt. Die Färbung erscheint leicht granuliert, wie auch perinukleär intensiver, besonders bei insgesamt stärkerem Kolorit (Pfeile in *Abbildung 11 B, C und D*).



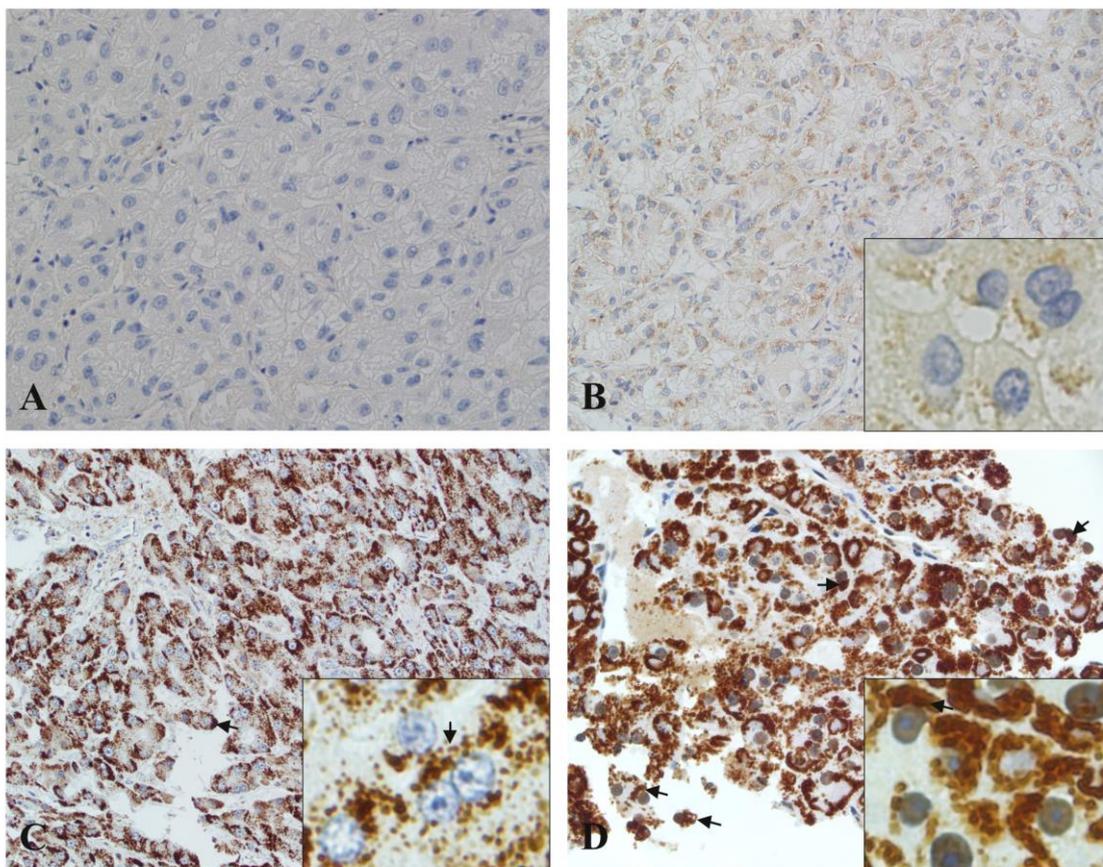
**Abbildung 11: Immunhistochemische Färbungen von ZIP14 in HCC-Gewebeproben**

Vergleichend gezeigt wird (A) ein gut differenziertes HCC mit negativer Zytoplasma-Färbung, (B) mit schwacher Färbung, (C) ein mäßig differenziertes HCC mit mittlerer Färbung und (D) ein schlecht differenziertes HCC mit starker zytoplasmatischer Färbung. Die Pfeile weisen exemplarisch auf eine perinukleäre Farbintensivierung (200-fach optisch vergrößert).

### 3.1.3. ZnT9

Bei der mikroskopischen Auswertung der ZnT9-Expression sind neben der zytoplasmatischen, auch Färbungen der Zellkerne aufgefallen. Die beiden Kompartimente wurden daraufhin stets separat ausgewertet.

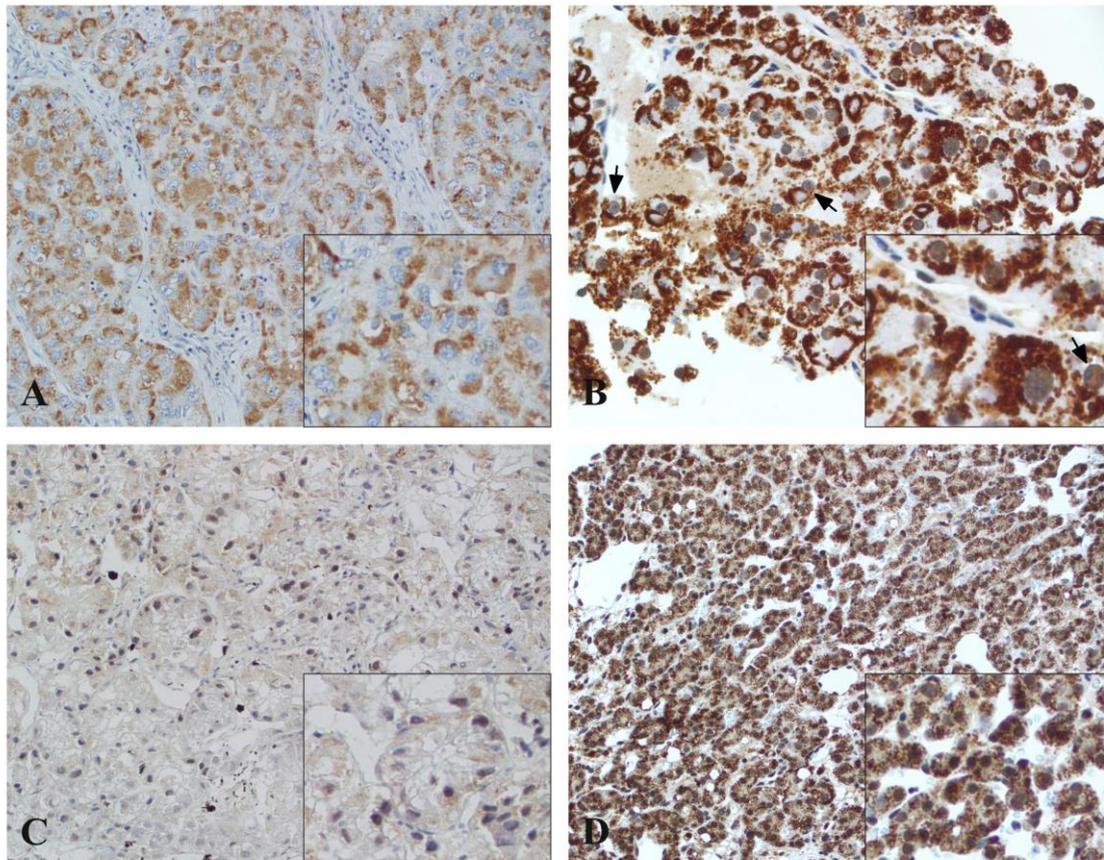
In *Abbildung 12* sind unterschiedliche Expressionsstärken für ZnT9 im Zytoplasma der HCC-Zellen dargestellt. Insgesamt erwies sich die ZnT9-Färbung als deutlich stärker als die der beiden anderen Transporter. Alle Proben wiesen eine positive zytoplasmatische Färbung für ZnT9 auf. Auffällig ist eine granuläre Anordnung von ZnT9 im Zytoplasma. Des Weiteren erkennt man eine den Zellkern umgebende, kappenartige Expression. Dies erinnert an die Zellen eines neuroendokrinen Tumors (Pfeile in *Abbildung 12 B* und *C*).



***Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen von ZnT9 in HCC-Gewebe***

Gezeigt werden (A) die Negativkontrolle eines mäßig differenzierten HCCs sowie gut differenzierte HCC-Zellen mit (B) schwacher, (C) mittlerer und (D) starker Zytoplasma-Färbung. Die Pfeile weisen exemplarisch auf eine kappenartige ZnT9-Expression hin (200-fach optisch vergrößert. Bildausschnitte rechts unten 400-fach vergrößert).

Die immunhistochemische ZnT9-Färbung im Kern der HCC-Zellen unterschiedlicher Intensität ist in *Abbildung 13* zu erkennen. Die Zellkerne einer Biopsie zeigen eine homogene Färbung. Auch die einzelnen Nuklei sind gleichmäßig schattiert. Bei einigen Kernen lässt sich erkennen, dass das Kernkörperchen nicht angefärbt ist (s. Pfeile in *Abbildung 13 B*).



**Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis nukleärer ZnT9-Expression in HCC-Gewebeproben**

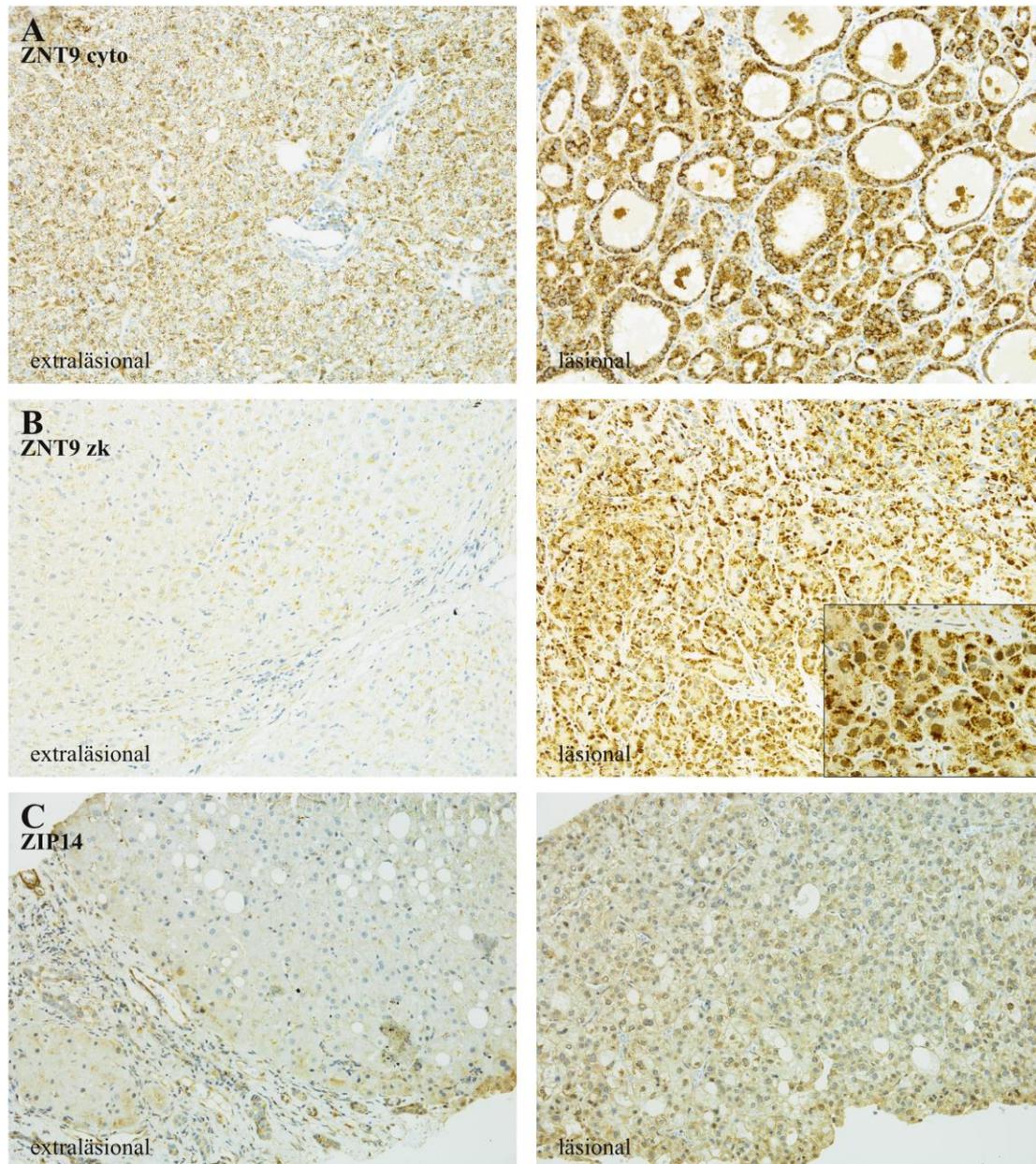
Gezeigt wird (A) ein mäßig differenziertes HCC mit negativer Zellkern-Färbung, (B) ein gut differenziertes HCC mit schwacher Färbung, (C) ein gut differenziertes HCC mit mittlerer Färbung und (D) ein schlecht differenziertes HCC mit starker nukleärer Färbung. Die Pfeile weisen exemplarisch auf die fehlende Färbung des Kernkörperchens hin (200-fach optisch vergrößert. Bildausschnitte rechts unten zusätzlich zweifach digital vergrößert).

In *Abbildung 14* wird eine Gegenüberstellung extraläsionalen und läsionalen Gewebes einer Gewebeprobe beispielhaft an ZnT9- und ZIP14-Färbungen dargestellt, wobei verschiedene Ätiologien ausgewählt wurden.

*Abbildung 14 A* zeigt die ZnT9-Färbung im Zytoplasma anhand einer Biopsie eines Patienten mit nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung. Das extraläsionale Gewebe ist mäßig, das läsionale hingegen stark gefärbt.

Die ZnT9-Färbung der HCC-Zellkerne wird in *Abbildung 14 B* anhand der Biopsie einer Leberzirrhose kryptischer Genese dargestellt. Die Nuklei im extraläsionalen Gewebe zeigen keine Färbung, während jene im HCC mäßig gefärbt sind.

Auch ZIP14 ist läsional tendenziell stärker exprimiert (s. *Abbildung 14 C*). Die Gewebeprobe eines Patienten mit ethyltoxischer Leberzirrhose weist extraläsional eine negative, läsional eine schwach positive Zytoplasma-Färbung auf.



**Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung der Zinktransporter in extraläsionalem und läsionalem Gewebe**

- (A) Immunhistochemischer Nachweis von ZnT9 in einer HCC-Gewebeprobe eines Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung. Das extraläsionale Gewebe weist eine mittlere, das läsionale eine starke zyttoplasmatisch lokalisierte ZnT9-Färbung auf, wohingegen die Zellkerne nicht angefärbt sind.
- (B) Immunhistochemischer Nachweis von ZnT9 in Lebergewebe eines Patienten mit kryptischer Lebererkrankung. Das Augenmerk soll hier auf die Zellkernfärbung gelegt werden. Das extraläsionale Gewebe weist eine negative, das läsionale eine mittlere positive nukleäre Färbung auf. Die zyttoplasmatisch lokalisierte Anfärbung ist extraläsional schwach, läsional mäßig positiv gefärbt.
- (C) Immunhistochemischer Nachweis von ZIP14 in Lebergewebe eines Patienten mit ethyltoxischer Leberzirrhose. Das extraläsionale Gewebe weist keine ZIP14-Expression auf, wohingegen im läsionalen Gewebe eine schwache zyttoplasmatische ZIP14-Expression nachweisbar ist. (200-fach optisch vergrößert, in Panel B läsional rechts unten 400-fach optisch vergrößert)

### **3.2. Die statistische Analyse des gesamten Stichprobenumfangs**

Die immunhistochemisch basierten Daten sind grundsätzlich „nicht-parametrisch“. Die Darstellung als Median und dem dazugehörigen Konfidenzintervall führt aber in der Regel zu einem Verlust an Information, da kleine statistisch signifikante Differenzen nicht immer gut visuell dokumentiert werden können. Daher wird in der wissenschaftlichen Praxis bei der Präsentation von histopathologischen und immunhistochemischen „Scoring“-basierten Ergebnissen oft auf die Darstellung der Mittelwert und Standardabweichungen zurückgegriffen, da diese kleine Differenzen und tendenzielle Veränderungen besser illustrieren. Aus diesem Grunde haben wir den gesamten Stichprobenumfang sowohl nicht-parametrisch (*Mann-Whitney-U-Test*) als auch parametrisch (*zweifaktorielle ANOVA* und *T-Test*) in verschiedenen Subgruppen analysiert. Da beide Testformen in den untersuchten Analysen nahezu identische Ergebnisse erbrachten (s. *Anhang*), wurde aus Übersichtsgründen die Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen als adäquat angesehen und für die nachfolgenden Ergebnisabschnitte verwandt. Als signifikant anerkannt werden  $p\text{-Werte} < 0,05$ .

Um den Einfluss der Biopsielokalisation einzuschätzen und mögliche Subgruppen bilden zu können, haben wir zu Beginn die *zweifaktorielle ANOVA* berechnet. Auf diese Weise konnten wir die beiden Faktoren Biopsielokalisation (extraläsional oder läsional) und Ätiologie der zugrunde liegenden Lebererkrankung hinsichtlich der Beeinflussung des Summenscores und einer möglichen Interaktion der Faktoren untersuchen.

*Tabelle 4* zeigt die Ergebnisse der *ANOVA* für den gesamten Stichprobenumfang. Man erkennt, dass die Biopsielokalisation bezüglich aller Zinktransporterproteine einen signifikanten Einfluss auf die Summenscores hat. Mittels *Standard-t-Test* als Post-hoc-Test wird nachfolgend in diesem Abschnitt die Beeinflussung der Biopsielokalisation auf den Summenscore näher untersucht.

Die Patienten wurden im Hinblick auf ihre zugrunde liegende Lebererkrankung gruppiert. Es ergaben sich vier Gruppen: ethyltoxische Lebererkrankung (AFLD), nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), Virus-Hepatitis (VH) und sonstige Ätiologien. Auf die Gruppierung wird in *Material und Methoden* (s. *Abschnitt 2.4.*) genauer eingegangen. Die Vermutung, dass die Gruppenzugehörigkeit mit Unterschieden im Summenscore einhergeht, konnten wir für die Zinktransporterproteine ZIP14 und ZnT9 nicht bestätigen (s. *Tabelle 4*). Allein ZIP4 zeigt mit  $p=0,081$  eine allerdings nicht-signifikante Neigung, dass Ätiologie und Expression interagieren.

**Tabelle 4: Einfluss der Probenlokalisierung und der Ätiologie der Lebererkrankung auf die Zinktransporterprotein-Expression bei Betrachtung des gesamten Stichprobenumfangs**

Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde die *zweifaktorielle ANOVA* verwandt. Es wurden der Einfluss der beiden Faktoren Lokalisation der Biopsie und Ätiologie der Lebererkrankung, wie auch ihre Interaktion untereinander untersucht. Als signifikant anerkannt werden *p-Werte*  $<0,05$ . Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben. *P-Werte*  $>0,2$  sind als nicht signifikant (n.s.) illustriert. Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.2*.

ZIP14	Ätiologien	Stichprobenanzahl [extraläs;läs]	Biopsielokalisation			p-Wert zweifaktorielle ANOVA
			extraläsional	läsional		
ZIP14	AFLD	n=24;51	2,0 $\pm$ 1,65	3,1 $\pm$ 2,09	<b>Biopsie-</b> <b>lokalisierung</b>	<b>0,0053</b>
	NAFLD	n=23;41	2,9 $\pm$ 1,58	3,4 $\pm$ 1,95	<b>Ätiologie</b>	n.s.
	VH	n=11;20	2,7 $\pm$ 2,20	3,6 $\pm$ 2,37	<b>Interaktion</b>	n.s.
	sonstige	n=13;25	2,5 $\pm$ 1,56	3,2 $\pm$ 1,82		
ZNT9 cyto	AFLD	n=24;50	5,5 $\pm$ 0,93	6,3 $\pm$ 0,89	<b>Biopsie-</b> <b>lokalisierung</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	NAFLD	n=23;41	5,2 $\pm$ 1,30	6,2 $\pm$ 1,04	<b>Ätiologie</b>	n.s.
	VH	n=11;20	5,9 $\pm$ 0,83	6,4 $\pm$ 1,39	<b>Interaktion</b>	n.s.
	sonstige	n=13;25	5,5 $\pm$ 1,39	6 $\pm$ 1,00		
ZNT9 zk	AFLD	n=24;50	2,2 $\pm$ 2,43	3,8 $\pm$ 2,47	<b>Biopsie-</b> <b>lokalisierung</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	NAFLD	n=23;41	2,1 $\pm$ 2,71	3,5 $\pm$ 2,61	<b>Ätiologie</b>	n.s.
	VH	n=11;20	2,2 $\pm$ 2,68	3,6 $\pm$ 2,74	<b>Interaktion</b>	n.s.
	sonstige	n=13;25	1,8 $\pm$ 2,83	3,3 $\pm$ 2,61		
ZIP4	AFLD	n=15;36	1,6 $\pm$ 1,50	2,8 $\pm$ 2,01	<b>Biopsie-</b> <b>lokalisierung</b>	<b>&lt;0,001</b>
	NAFLD	n=10;24	2,7 $\pm$ 2,16	3,9 $\pm$ 1,42	<b>Ätiologie</b>	0,081
	VH	n=7;14	2 $\pm$ 2,00	3,2 $\pm$ 1,89	<b>Interaktion</b>	n.s.
	sonstige	n=9;17	2,4 $\pm$ 1,33	3,2 $\pm$ 1,75		

Eine unerwünschte Interaktion der beiden Faktoren, die für eine interfaktorische Abhängigkeit sprechen würde, zeigte sich bei keinem der drei Transporter (s. Tabelle 4).

Im Folgenden wird die Frage, ob HCC-Gewebe eine höhere Zinktransporter-Expression aufweist, näher betrachtet. Beim Umgang mit zwei unabhängigen Stichproben ist der *Standard-t-Test* Mittel der Wahl. Aus diesem Grunde haben wir hiermit den Einfluss der Probenlokalisierung auf den Summenscore in geeigneter Weise geprüft.

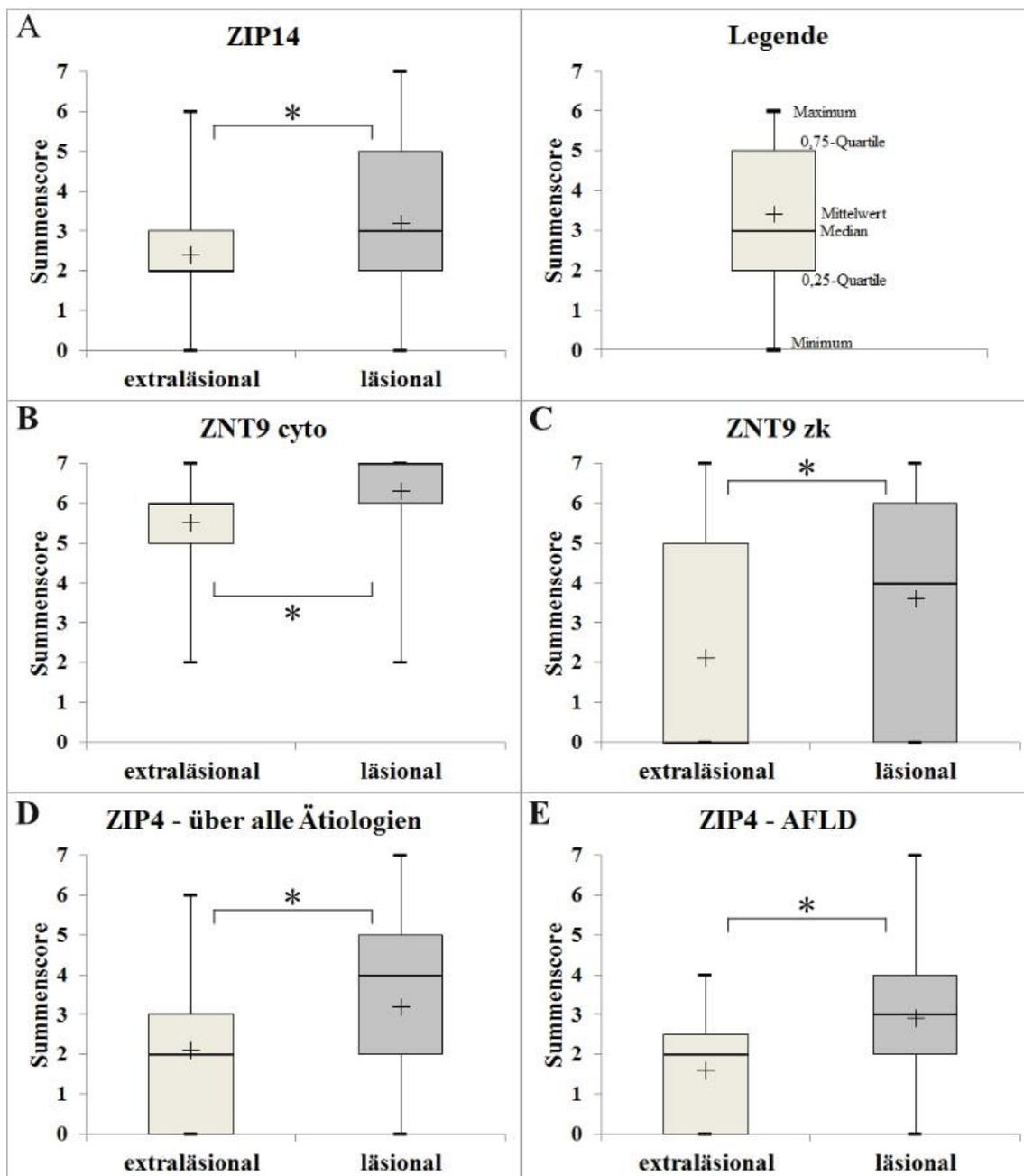
Tabelle 5 zeigt, dass alle untersuchten Zinktransporter mit  $p < 0,0001$  einen signifikanten Unterschied bezüglich extraläsional vs. läsional aufweisen. Aufgrund der Tendenz, dass Ätiologie und Expression interagieren (s. Tabelle 4), wurde ZIP4 aus Interesse in Subgruppen eingeteilt. Man erkennt, dass die signifikanten *p-Werte* des gesamten Stichprobenumfangs, wie zuvor beschrieben, hinsichtlich ZIP4 vorwiegend auf Patienten mit ethyltoxischer Genese beruhen ( $p=0,029$ , s. Tabelle 5). Die übrigen Gruppen zeigen lediglich die Tendenz, dass in läsionalem Gewebe die ZIP4-Expression erhöht sein könnte.

**Tabelle 5: Die Ergebnisse der statistischen Analyse des gesamten Stichprobenumfangs extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine**

Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Standard-t-Test* verwendet. Die Stichprobenanzahlen sind äquivalent zu jenen aus *Tabelle 6* im Anhang. Es werden die Ergebnisse bezüglich aller Ätiologien und, für ZIP4 zusätzlich, die der Subgruppen aufgeführt. Als signifikant anerkannt werden *p-Werte*  $<0,05$ . Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben. *P-Werte*  $>0,2$  sind als nicht signifikant (n.s.) illustriert. Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.2*.

	extraläsional	läsional	p-Wert T-Test
<b>ZIP14</b>	2,4 $\pm$ 1,73	3,2 $\pm$ 2,04	<b>&lt;0,0001</b>
<b>ZNT9 cyto</b>	5,5 $\pm$ 1,15	6,3 $\pm$ 1,04	<b>&lt;0,0001</b>
<b>ZNT9 zk</b>	2,1 $\pm$ 2,57	3,6 $\pm$ 2,57	<b>&lt;0,0001</b>
<b>ZIP4</b>			
<b>alle Ätiologien</b>	2,1 $\pm$ 1,71	3,2 $\pm$ 1,85	<b>&lt;0,0001</b>
<b>AFLD</b>	1,6 $\pm$ 1,50	2,8 $\pm$ 2,01	<b>0,029</b>
<b>NAFLD</b>	2,7 $\pm$ 2,16	3,9 $\pm$ 1,42	0,12
<b>Virus-Hepatitis</b>	2 $\pm$ 2,00	3,2 $\pm$ 1,89	0,2
<b>sonstige Ätiologien</b>	2,4 $\pm$ 1,33	3,2 $\pm$ 1,75	n.s.

Um die im *T-Test* signifikant höhere läsionale Zinktransporterprotein-Expression zu veranschaulichen, werden in *Abbildung 15* die Ergebnisse der Analyse in Form von Boxplotdiagrammen dargestellt. Gezeigt werden, entsprechend der untersuchten Zinktransporterproteine, die extraläsionale und läsionale Expression im Vergleich. Die Stichproben beziehen sich jeweils auf alle Patienten, sowie ergänzend für ZIP4 auf die Gruppe AFLD.



**Abbildung 15: Darstellung der extraläsionalen und läsionalen Expression der Zinktransporterproteine bezüglich der Gesamtstichprobenanalyse**

Als Boxplotdiagramm wie in der Legende oben rechts dargestellt. Der *Standard-t-Test* ist für alle dargestellten Untersuchungen signifikant. Gezeigt werden Diagramme für die drei Zinktransporter über alle Ätiologien ( $p < 0,0001$ ) und für ZIP4 zusätzlich AFLD ( $p = 0,029$ ). Signifikanzen sind markiert (\*). Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.2.* und *Tabelle 5.*

### 3.3. Die statistische Analyse der paarweisen Stichproben

Da wir aufgrund der Probenauswahl eine größere Anzahl von läSIONalem Gewebe ausgewertet haben (s. *Abschnitt 2.3.*), wird hier näher auf die paarweise Analyse von extraläsionalen und läSIONalen Stichproben eingegangen. Diejenigen Patienten, bei denen kein extraläsionales Gewebe ausgewertet wurde, werden nicht berücksichtigt, um mögliche Auswahlfehler aufzudecken. Die Stichprobenanzahlen von läSIONal und extraläsional sind somit für diese Analyse identisch (s. *Tabelle 7*). Auch in dieser Untersuchung beschreiben wir, im Sinne der Anschaulichkeit, ausschließlich die parametrische Analyse mit Mittelwert, ANOVA und *Standard-t-Test*. Die nicht-parametrische Analyse ist in *Tabelle 9* im Anhang nachzuempfinden. Die paarweise Analyse beruht auf der gleichen Zielsetzung wie die des gesamten Stichprobenumfangs in *Abschnitt 3.2*.

Die *Tabelle 7* zeigt hierfür die Ergebnisse der *zweifaktoriellen ANOVA*. Man erkennt, dass bei gepaarten Stichproben die Biopsielokalisation die zytoplasmatische ZnT9-Expression signifikant beeinflusst ( $p=0,008$ , s. *Tabelle 7*).

**Tabelle 7: Einfluss der Probenlokalisierung und der Ätiologie der Lebererkrankung auf die Zinktransporterprotein-Expression bei Betrachtung der paarweisen Stichproben**

Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde die *zweifaktorielle ANOVA* verwandt. Es wurden der Einfluss der beiden Faktoren Lokalisation der Biopsie und Ätiologie der Lebererkrankung, wie auch ihre Interaktion untersucht. Als signifikant anerkannt werden  $p$ -Werte  $<0,05$ . Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben.  $P$ -Werte  $>0,2$  sind als nicht signifikant (n.s.) illustriert. Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.3*.

ZIP14	Ätiologien	Stichprobenanzahl	Biopsielokalisation			p-Wert zweifaktorielle ANOVA
			extraläsional	läSIONal		
ZIP14	AFLD	n=24	2,0 $\pm$ 1,65	2,4 $\pm$ 1,82	<b>Biopsielokalisation</b>	0,187
	NAFLD	n=23	2,9 $\pm$ 1,58	3,6 $\pm$ 2,00		
	VH	n=11	2,7 $\pm$ 2,20	3 $\pm$ 2,65	<b>Ätiologie</b>	<b>0,048</b>
	sonstige	n=13	2,5 $\pm$ 1,56	2,4 $\pm$ 1,39	<b>Interaktion</b>	n.s.
ZNT9 cyto	AFLD	n=24	5,5 $\pm$ 0,93	6,2 $\pm$ 0,87	<b>Biopsielokalisation</b>	<b>0,008</b>
	NAFLD	n=23	5,2 $\pm$ 1,30	6,0 $\pm$ 1,15		
	VH	n=11	5,9 $\pm$ 0,83	6,1 $\pm$ 1,81	<b>Ätiologie</b>	n.s.
	sonstige	n=13	5,5 $\pm$ 1,39	5,5 $\pm$ 1,05	<b>Interaktion</b>	n.s.
ZNT9 zk	AFLD	n=24	2,2 $\pm$ 2,43	2,9 $\pm$ 2,57	<b>Biopsielokalisation</b>	0,111
	NAFLD	n=23	2,1 $\pm$ 2,71	3,1 $\pm$ 2,63		
	VH	n=11	2,2 $\pm$ 2,68	2,2 $\pm$ 2,71	<b>Ätiologie</b>	n.s.
	sonstige	n=13	1,8 $\pm$ 2,83	2,5 $\pm$ 2,44	<b>Interaktion</b>	n.s.
ZIP4	AFLD	n=15	1,6 $\pm$ 1,50	1,9 $\pm$ 1,88	<b>Biopsielokalisation</b>	n.s.
	NAFLD	n=10	2,7 $\pm$ 2,16	3,7 $\pm$ 1,57		
	VH	n=7	2 $\pm$ 2,00	2,1 $\pm$ 1,77	<b>Ätiologie</b>	<b>0,039</b>
	sonstige	n=9	2,4 $\pm$ 1,33	2,3 $\pm$ 1,66	<b>Interaktion</b>	n.s.

Die ZIP14- ( $p=0,187$ ) und nukleäre ZnT9-Färbung ( $p=0,111$ ) zeigen hingegen lediglich einen tendenziellen Zusammenhang zwischen Lokalisation und Summenscore. ZIP4 weist diesbezüglich keine Signifikanz auf. Nachfolgend in diesem Abschnitt wird mittels *T-Test* der Einfluss der Biopsielokalisation auf den Summenscore genauer untersucht.

Die *zweifaktorielle ANOVA* der paarweisen Stichproben erbrachte außerdem signifikante Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen Ätiologie und ZIP14- ( $p=0,048$ ) sowie ZIP4-Expression ( $p=0,039$ , s. *Tabelle 7*), während die ZnT9-Expression im Zytoplasma und im Zellkern nicht von der zugrunde liegenden Lebererkrankung beeinflusst wird. Wie zu erwarten, zeigt auch die paarweise Untersuchung keinen Hinweis auf Interaktionen zwischen Biopsielokalisation und Ätiologie (s. *Tabelle 7*). Für die folgende Analyse von ZIP14 und ZIP4 ist es also sinnvoll, Subgruppen bezüglich der Genese der Lebererkrankung zu bilden. Fortan werden nur diejenigen Gruppen betrachtet, deren *ANOVA*-Ergebnis signifikant ist.

Wie in *Abschnitt 3.2.* haben wir auch bei der paarweisen Analyse mithilfe des *Standard-t-Testes* untersucht, ob HCC-Gewebe im Vergleich zu extraläsionalem Gewebe eine höhere Zinktransporterprotein-Expression aufweist.

In *Tabelle 8* sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und *p-Werte* des *Standard-t-Testes* der Zinktransporterproteine bezüglich aller Ätiologien aufgeführt. Die Stichproben von ZIP14 und ZIP4 haben wir angesichts der *ANOVA*-Ergebnisse zusätzlich in Subgruppen aufgeteilt.

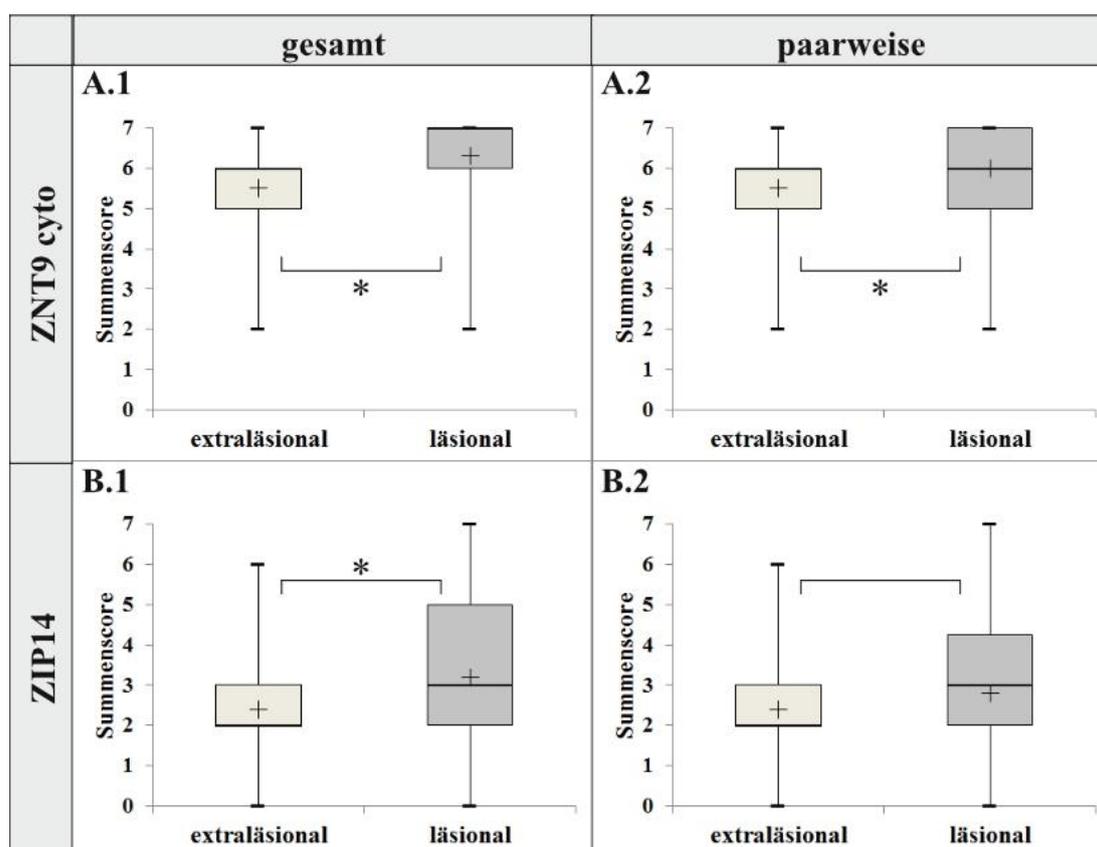
**Tabelle 8: Ergebnisse der statistischen Analyse über die paarweise angeordneten Stichproben extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine**

Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Standard-t-Test* verwandt. Die Stichprobenanzahlen sind äquivalent zu jenen aus *Tabelle 9* im Anhang. Es werden die Ergebnisse bezüglich aller Ätiologien und, für ZIP14 und 4 zusätzlich, die der Subgruppen aufgeführt. Als signifikant anerkannt werden *p-Werte*  $<0,05$ . Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben. *P-Werte*  $>0,2$  sind als nicht signifikant (n.s.) illustriert. Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.3.*

	extraläsional	läsional	p-Wert T-Test		extraläsional	läsional	p-Wert T-Test
<b>ZIP14</b>				<b>ZNT9 zk</b>	2,1 $\pm$ 2,57	2,8 $\pm$ 2,56	0,12
alle Ätiologien	2,4 $\pm$ 1,73	2,8 $\pm$ 2	0,2	<b>ZIP4</b>			
AFLD	2,0 $\pm$ 1,65	2,4 $\pm$ 1,82	n.s.	alle Ätiologien	2,1 $\pm$ 1,71	2,4 $\pm$ 1,85	n.s.
NAFLD	2,9 $\pm$ 1,58	3,6 $\pm$ 2,00	0,2	AFLD	1,6 $\pm$ 1,50	1,9 $\pm$ 1,88	n.s.
Virus-Hepatitis	2,7 $\pm$ 2,20	3 $\pm$ 2,65	n.s.	NAFLD	2,7 $\pm$ 2,16	3,7 $\pm$ 1,57	n.s.
sonstige Ätiologien	2,5 $\pm$ 1,56	2,4 $\pm$ 1,39	n.s.	Virus-Hepatitis	2 $\pm$ 2,00	2,1 $\pm$ 1,77	n.s.
<b>ZNT9 cyto</b>	5,5 $\pm$ 1,15	6,0 $\pm$ 1,16	<b>0,009</b>	sonstige Ätiologien	2,4 $\pm$ 1,33	2,3 $\pm$ 1,66	n.s.

Bei Betrachtung der  $p$ -Werte wird deutlich, dass sich die zuvor in *Abschnitt 3.2.* beschriebenen signifikanten Unterschiede bei der paarweisen Analyse nur für ZnT9 im Zytoplasma bestätigen lassen ( $p=0,009$ , s. *Tabelle 8*). ZIP14 ( $p=0,2$ ) und ZnT9 im Zellkern ( $p=0,12$ ) lassen lediglich eine nicht-signifikante Tendenz, in HCC-Gewebe erhöht zu sein, erkennen. Betrachtet man die ZIP4-Färbung über alle Gruppen hinweg, findet sich keine höhere Expression im HCC-Gewebe (s. *Tabelle 8*).

Die Boxplotdarstellungen in *Abbildung 16* zeigen die Analyse des gesamten Stichprobenumfangs vergleichend mit der paarweisen für ZnT9 im Zytoplasma und ZIP14. Der signifikante Unterschied bei extraläsional vs. läsional, der für ZnT9 im Zytoplasma im gesamten Stichprobenumfang ermittelt wurde, findet sich auch in der paarweisen Analyse wieder (s. *Abbildung 16 A.1* und *A.2*). Dem Gegenüber ist bei der ZIP14-Färbung im gesamten Stichprobenumfang eine Signifikanz erkennbar, die bei der paarweisen Untersuchung hingegen nicht zu bestätigen ist.



**Abbildung 16: Gegenüberstellung der Analyse des gesamten und paarweisen Stichprobenumfangs in Bezug auf die extraläsionale und läsionale Expression von zytoplasmatischem ZnT9 und ZIP14**

Als Boxplotdiagramm wie in der Legende von *Abbildung 15* dargestellt. Der *Standard-t-Test* ist für ZnT9 im Zytoplasma und ZIP14 (jeweils  $p < 0,0001$ ) hinsichtlich des gesamten Stichprobenumfangs signifikant (s. *Tabelle 5*). Die paarweise Analyse ergab einzig für ZnT9 cyto ein signifikantes Ergebnis ( $p=0,009$ , s. *Tabelle 8*). Signifikanzen sind markiert (\*). Nähere Erläuterung in dem *Abschnitt 3.3.*

### 3.4. Die Korrelation mit dem Überleben

Die Korrelation der Zinktransporterproteine mit dem Überleben wurde mithilfe der *Rangkorrelation nach Spearman* ermittelt. In dieser Analyse wurden wie in *Abschnitt 3.2.* und *3.3.* Subgruppen bezüglich der zugrunde liegenden Lebererkrankung gebildet, hier allerdings für sämtliche Zinktransporterproteine. Um die Expression im HCC auf die extraläsionale zu normieren, haben wir den extraläsionalen Summenscore von dem läSIONalen subtrahiert. Nähere Erläuterungen zu der Gruppierung und der Normierung sind in *Material und Methoden* (s. *Abschnitt 2.3. und 2.4.*) beschrieben.

Diese Differenz sowie die läSIONalen und extraläsionalen Summenscores isoliert wurden mit den Überlebenstagen korreliert (s. *Tabelle 10*). Bei der läSIONalen Analyse wurde der gesamte Stichprobenumfang betrachtet.

In der *Tabelle 10* ist ein uneinheitliches Bild erkennbar. Die Rangkorrelation mit der Summenscoredifferenz zeigt größtenteils keine Signifikanzen (s. *Tabelle 10*). Bei Patienten mit einer Virushepatitis ( $r=-0,8$ ;  $p<0,01$ ) ist ein starker signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter ZIP14-Expression und kürzerem Überleben erkennbar. Dies ist auch bei der separaten Betrachtung des HCC-Gewebes zu sehen.

**Tabelle 10: Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman der Zinktransporterprotein-Expression mit dem Überleben**

Die Rangkorrelation mit dem Überleben wurde anhand des läSIONalen und extraläsionalen Summenscores einzeln sowie deren Differenz ermittelt. Für die Analyse der läSIONalen Proben wurde der gesamte Stichprobenumfang verwendet. Angegeben ist der Rangkorrelationskoeffizient  $r$  und der dazugehörige  $p$ -Wert. Als signifikant anerkannt werden  $p$ -Werte  $<0,05$ . Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben.  $P$ -Werte  $>0,2$  sind als nicht signifikant (n.s.) deklariert. Mit (\*) markierte Werte sind in *Abbildung 18* als *Kaplan-Meier-Kurven* dargestellt. Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.4.*

		ZIP14	ZNT9 cyto	ZNT9 zk	ZIP4
		r; p	r; p	r; p	r; p
<b>Δ läSIONal - extraläsional</b>	<b>alle Ätiologien</b>	-0,19; 0,11	-0,06; n.s.	-0,20; 0,10	-0,02; n.s.
	<b>AFLD</b>	-0,12; n.s.	0,11; n.s.	-0,20; n.s.	-0,49; 0,07
	<b>NAFLD</b>	-0,15; n.s.	0,07; n.s.	-0,08; n.s.	0,32; n.s.
	<b>Virus-Hepatitis</b>	<b>-0,80; &lt;0,01</b>	-0,32; n.s.	-0,13; n.s.	-0,11; n.s.
	<b>sonstige Ätiologien</b>	0,12; n.s.	-0,17; n.s.	<b>-0,61; 0,03</b>	0,50; 0,17
<b>läSIONal</b>	<b>alle Ätiologien</b>	<b>-0,25; &lt;0,01*</b>	-0,16; 0,06*	<b>-0,19; 0,02*</b>	<b>-0,28; &lt;0,01*</b>
	<b>AFLD</b>	-0,25; 0,08	-0,20; 0,16	-0,13; n.s.	<b>-0,42; &lt;0,01</b>
	<b>NAFLD</b>	-0,29; 0,06	-0,17; n.s.	-0,14; n.s.	<b>-0,41; 0,05</b>
	<b>Virus-Hepatitis</b>	<b>-0,46; 0,04</b>	-0,30; n.s.	-0,31; 0,19	-0,20; n.s.
	<b>sonstige Ätiologien</b>	-0,05; n.s.	0,17; n.s.	-0,22; n.s.	0,12; n.s.
<b>extra- läSIONal</b>	<b>alle Ätiologien</b>	-0,10; n.s.*	-0,01; n.s.*	-0,14; n.s.*	<b>-0,42; 0,01*</b>
	<b>AFLD</b>	-0,24; n.s.	-0,16; n.s.	-0,31; 0,12	-0,50; 0,06
	<b>NAFLD</b>	0,18; n.s.	-0,10; n.s.	-0,03; n.s.	-0,57; 0,09
	<b>Virus-Hepatitis</b>	-0,25; n.s.	-0,09; n.s.	-0,23; n.s.	-0,20; n.s.
	<b>sonstige Ätiologien</b>	-0,17; n.s.	0,40; 0,18	0,25; n.s.	-0,37; n.s.

Patienten mit erhöhter läsionaler ZIP14-Expression der Gruppe Virus-Hepatitis ( $r=-0,46$ ;  $p=0,04$ ) und auch über alle Ätiologien ( $r=-0,25$ ;  $p<0,01$ ) zeigen ein signifikant kürzeres Überleben (s. *Tabelle 10*).

In der Rangkorrelation des läsionalen Gewebes ist insgesamt eine Tendenz zur Beziehung der Zinktransporterproteine mit kürzerem Überleben erkennbar. Besonders eine erhöhte ZIP4-Expression im HCC von Patienten mit ethyltoxischer Genese ( $r=-0,41$ ;  $p=0,01$ ) und einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung ( $r=-0,41$ ;  $p=0,05$ ) korreliert signifikant mit einer geringeren Überlebenszeit (s. *Tabelle 10*). Diese beiden Gruppen sind die Hauptursache für die Signifikanz, die über alle Ätiologien bestimmt werden konnte ( $r=-0,28$ ;  $p<0,01$ ).

Der Zusammenhang zwischen extraläsionaler Expression und Überleben ist weniger ausgeprägt. Allein die erhöhte ZIP4-Expression über alle Ätiologien ( $r=-0,42$ ;  $p<0,01$ ) korreliert signifikant mit dem Überleben, was sich auf die Gruppen AFLD und NAFLD mit einer gleichartigen Tendenz zum kürzeren Überleben zurückführen lässt (s. *Tabelle 10*).

In *Abbildung 17* sind ausgewählte Rangkorrelationsanalysen mit dem Überleben als Regressionsgerade der Ränge veranschaulicht. Die läsionale Analyse sowie die der Summenscoredifferenz werden vergleichend dargestellt. Die *Abbildung 17 A* zeigt die Korrelation zwischen der ZIP14-Expression von Patienten mit Virus-Hepatitis und den Überlebenstagen. Die Differenz ( $r=-0,8$ ;  $p<0,01$ ) und auch die läsionalen Summenscores ( $r=-0,46$ ;  $p=0,04$ ) weisen eine signifikant negative Korrelation mit dem Überleben auf.

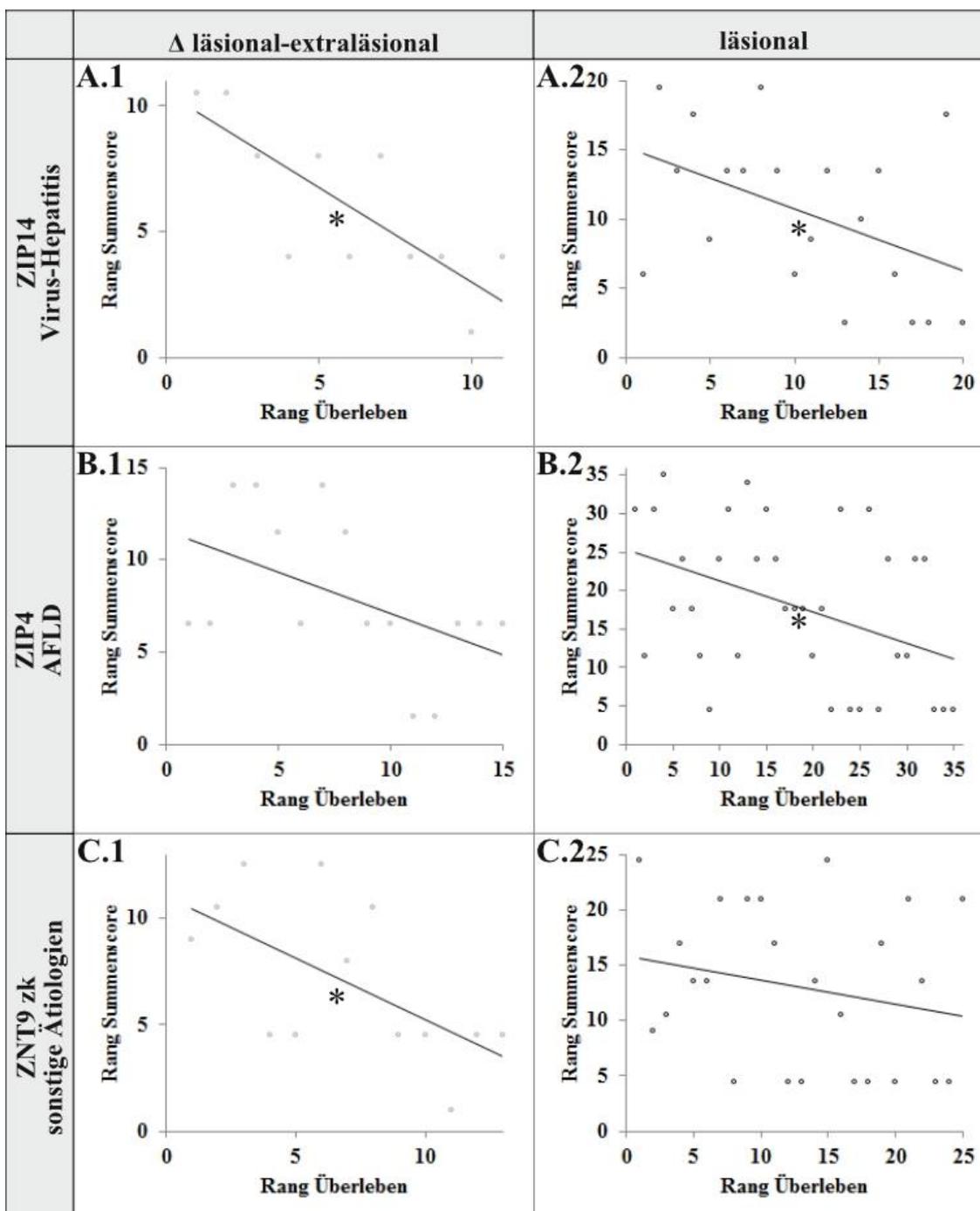
Die erhöhte ZIP4-Expression bei ethyltoxischer Genese ( $r=-0,42$ ;  $p=0,01$ ) korreliert bei Betrachtung des läsionalen Gewebes (s. *Abbildung 17 B.2*) signifikant mit kürzerem Überleben. Bei Normierung auf extraläsionales Gewebe ist hingegen keine Signifikanz zu ermitteln ( $r=-0,49$ ;  $p=0,07$ , s. *Tabelle 10*). Man erkennt jedoch einen klaren Trend hin zur Korrelation von hoher Expression mit geringerer Überlebenszeit (s. *Abbildung 17 B.1*).

Gegensätzlich ist in *Abbildung 17 C* die Rangkorrelation von ZnT9-Expression im Zellkern bei der Gruppe sonstige Ätiologien nur in der Analyse der Summenscoredifferenz ( $r=-0,61$ ;  $p=0,03$ ) eindeutig.

Zusammenfassend ist eine in ihrer Ausprägung variierende Tendenz, dass eine erhöhte Expression mit kürzerem Überleben korreliert, erkennbar. Hervorzuheben sind die Signifikanzen bei läsionaler Ausprägung von ZIP4, ZIP14 und ZnT9 im Zellkern.

Allerdings zeigt sich das Bild der *Spearman*-Analyse sehr heterogen.

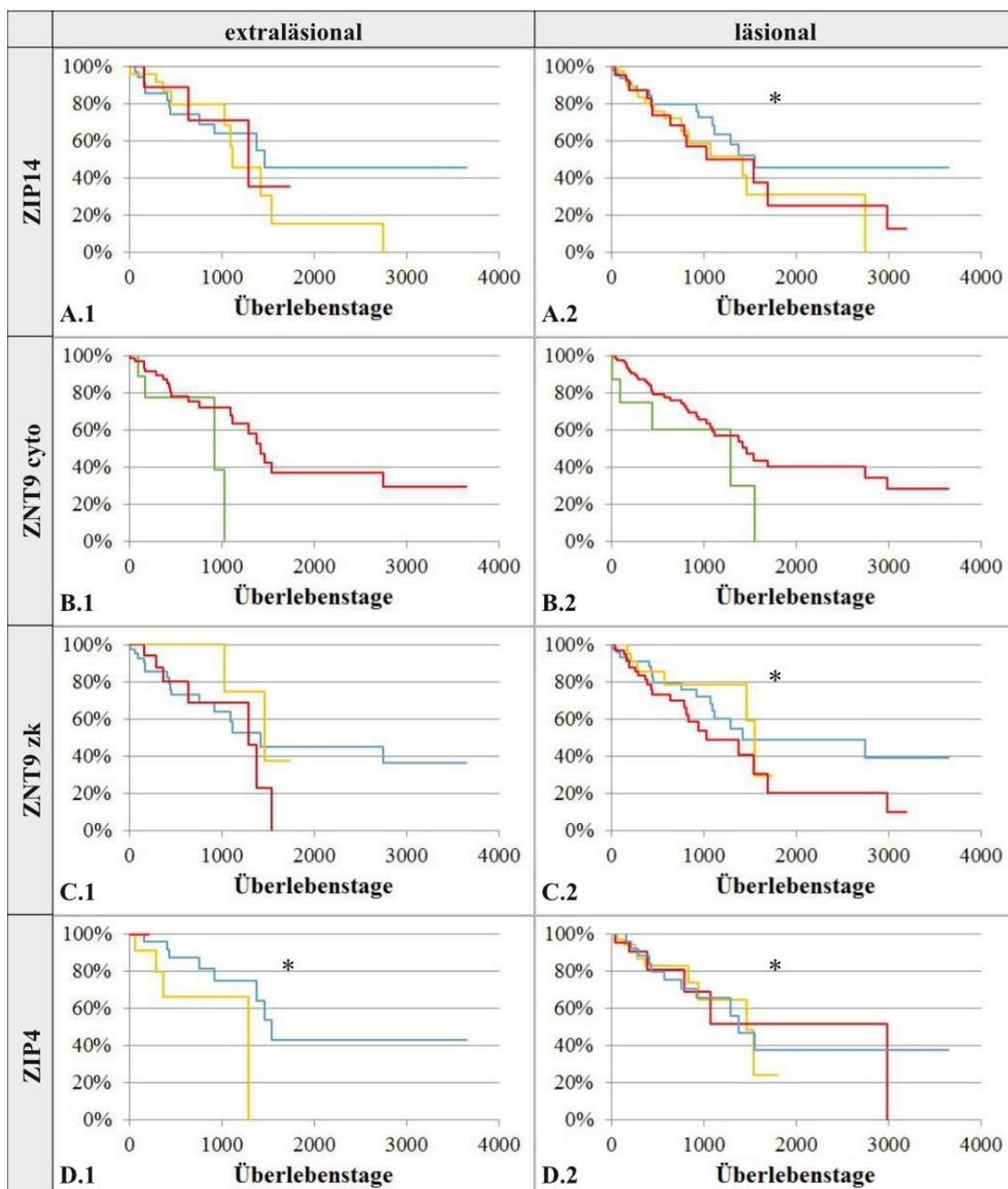
Die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse haben wir ergänzend in der Form von *Kaplan-Meier-Kurven* zusammengefasst (s. *Abbildung 18*). Es werden nebeneinander die Untersuchungen der extraläsionalen und der läSIONalen Stichproben dargestellt.



**Abbildung 17: Grafische Darstellung der Rangkorrelation nach Spearman mit dem Überleben**

Gezeigt werden Regressionsgeraden basierend auf den Rängen der Summenscoredifferenz ( $\Delta$ läSIONal-extraläsIONal) links, beziehungsweise der läSIONalen Summenscores rechts, und der Überlebenstage. Es wird beispielhaft der Zusammenhang zwischen Überleben von Patienten der Gruppe Virus-Hepatitis und deren ZIP14-Score, ethyltoxischer Lebererkrankung und dem ZIP4-Score sowie Patienten der Gruppe sonstige Ätiologien und ihren ZnT9-Scores des Zellkerns dargestellt. Signifikante Werte sind mit (\*) markiert (s. *Tabelle 10*). Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.4*.

Die Zinktransporter ZIP14, ZIP4 und ZnT9 im Zellkern zeigen die Tendenz, dass höhere Expressionen mit geringerer Überlebenszeit assoziiert sind. Eine Ausnahme ist ZnT9 im Zytoplasma (s. *Abbildung 18 B*). *Tabelle 10* zeigt, dass bei diesem Protein der Regressionskoeffizient  $r$  sehr viel näher an null liegt als bei den anderen Transportern. Insgesamt erkennt man, dass sich die extraläsionale und die läSIONALE Analyse jeweils sehr ähnlich verhalten.



**Abbildung 18: Darstellung der Überlebenszeitanalyse als Kaplan-Meier-Kurven der einzelnen Zinktransporterproteine**

Links sind die Analysen der extraläsionalen und rechts der läSIONALE Summscores dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Überlebenden. Es wurden drei Gruppen hinsichtlich des Summscores gebildet: Blau 0-2; Gelb 3-4; Rot 5-7; die grüne Kurve in (B) vereint die Gruppen Blau und Gelb. Die mit (\*) markierten Kurven zeigen in der *Spearman-Korrelation* ein signifikantes Ergebnis (s. *Tabelle 10*). Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.4*.

## **4. Diskussion**

Unsere hier vorgestellte Studie gibt Hinweise auf das Expressionsverhalten der drei ausgewählten Zinktransporterproteine im HCC. Wichtige Erkenntnisse sind: (I) die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Transporter, (II) dass alle untersuchten Proteine eine signifikant höhere Expression in HCC-Gewebe zeigen, dies für ZnT9 im Zytoplasma auch für den paarweisen Vergleich gilt und unabhängig von der zugrunde liegenden Lebererkrankung ist und (III) die prognostisch ungünstige Aussagekraft von läSIONAL erhöhtem ZIP14, ZIP4 und ZnT9 im Zellkern.

In der Literatur gibt es bisher kaum vergleichbare Daten, nur bezüglich ZIP4 hat die Forschungsgruppe um Xu et al. mit einem kleineren Patientenkollektiv ähnliche Ergebnisse präsentiert [77].

### **4.1. Das Studiendesign**

In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe um Frau Privatdozentin Dr. med. Schütte wurde die Expression der 24 Zinktransporterproteine in ruhenden und stimulierten mononukleären Zellen sowie in HCC-Geweben untersucht [114] (Wex et al., unveröffentlichte Daten). Um die Ergebnisse dieser Studien weiter zu prüfen, entschieden wir uns, die Expression von ZIP4, ZIP14 und ZnT9 in HCC-Geweben zu studieren. Um die Lokalisation der Zinktransporterproteine den Hepatozyten zuzuordnen und auch eine subzelluläre Lokalisationsaussage treffen zu können, entschieden wir uns für die Immunhistochemie als geeignete Untersuchungsmethode. Eine quantitative Genexpressionsanalyse wäre zwar dem semiquantitativen Ansatz der Immunhistochemie bezüglich Aussagen über die Expressionsunterschiede überlegen, bietet aber keine Möglichkeit die Expression den Hepatozyten zuzuordnen. Präanalytische Mikrodissektionsverfahren zur alleinigen Untersuchung des Hepatozyten-Genmaterials standen uns nicht zur Verfügung. Sinnvoll wäre es, in nachfolgenden Studien die Immunhistochemie mit Transkriptionsanalysen zu kombinieren, um durch zwei methodische Ansätze die Ergebnisse zu bekräftigen und bestmögliche Aussagen über die Expressionsniveaus sowie die subzelluläre Lokalisation zu erhalten.

Aufgrund des retrospektiven Designs unserer Studie war es nicht möglich, Zink-Plasmakonzentrationen im Verlauf zu erfassen. Es ist denkbar, dass die Zinktransporter-Expression der Leber von der Zink-Plasmakonzentration abhängt, was somit nicht berücksichtigt werden konnte.

Eine prospektive Studie wäre besser geeignet um den Verlauf der Expression der untersuchten Zinktransporter zu verfolgen und zu klären, ob sie während der Tumorentwicklung ansteigt. Allerdings ist eine derartige Studie schwer zu verwirklichen, da es nur wenige Patienten gibt, denen zu mehreren Zeitpunkten Biopsien entnommen werden.

#### **4.2. Das Patientenkollektiv und Biopsiematerial**

Es wurden Patienten, denen eine Biopsie zur Sicherung der Diagnose entnommen wurde, in die Studie eingeschlossen, somit umfasst das untersuchte Biopsiematerial Feinnadelpunktionen und Operationspräparate zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Es wurde das extraläsionale Gewebe betrachtet, das mit auf dem Objektträger des diagnostizierten HCCs erfasst wurde.

Möglicherweise zeigt weiter entferntes extraläsionales Gewebe eine andere Zinktransporter-Expression. Dieses Gewebe sowie auch gesundes Lebergewebe steht allerdings aufgrund ethischer Aspekte oft nicht zur Verfügung, somit bleibt unklar, ob die Expression der Zinktransporter unserer Studienpatienten bereits im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist oder ob ein größerer Unterschied zu weiter entferntem Gewebe übersehen wurde.

Außerdem sind Färbeartefakte besonders bei kleinen Proben oder Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Zinktransporterproteinen, trotz geprüfter Spezifität, nicht vollkommen auszuschließen. In zukünftigen Studien sollten zwei unterschiedliche Antikörper genutzt werden, um die Validität der Ergebnisse zu stärken.

In *Abschnitt 3.3.* wird deutlich, dass das Ergebnis über den gesamten Stichprobenumfang nach der Analyse des paarweisen Stichprobenumfangs relativiert wird. Eine Ursache könnte hierbei eine Stichprobenverzerrung sein, da große Tumore möglicherweise bei der paarweisen Analyse herausfielen. Aufgrund der Größe eines Objektträgers sind eher kleinere Tumore zusammen mit extraläsionalem Gewebe auf einem histologischen Schnitt zu finden. Das bedeutet, dass wir mit unserem paarweisen Ansatz der Analyse einen früheren Zeitpunkt der Hepatokarzinogenese in kleineren Tumoren betrachtet haben könnten. Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass ZnT9 im Zytoplasma schon zu einem frühen Zeitpunkt in der HCC-Karzinogenese involviert ist, während nukleäres ZnT9, ZIP4 und ZIP14 erst später höher exprimiert werden. Die Diskrepanz zwischen Analyse des gesamten und des paarweisen Stichprobenumfangs sollte Gegenstand weiterführender Forschung sein, wobei auch das extraläsionale Gewebe größerer Tumore mit einbezogen werden sollte.

Außerdem könnte man die Größe des Tumors beziehungsweise das Grading mit einbeziehen, um dem Hinweis nachzugehen, ob es einen frühzeitigen Expressionsanstieg von zytosolischem ZnT9 gibt und ob der oben beschriebene Verlauf der Expression der drei Proteine wiederzuerkennen ist.

Ebenso könnte der von uns analysierte klinische Datensatz als Grundlage für weitere statistische Analysen bezüglich einer Assoziation der Zinktransporterproteine zur Metastasierung, Child-Pugh-Score und BCLC dienen.

### **4.3. Die subzelluläre Nachweise der Zinktransporterproteine**

Die subzelluläre Lage der Zinktransporterproteine wurde in unserer Studie anhand der immunhistochemischen Färbung bestimmt. Aufgrund der unzureichenden Studienlage bezüglich der subzellulären Lokalisation von Zinktransportern in Lebergewebe und besonders im HCC, können unsere Erkenntnisse hierüber nur eingeschränkt mit anderen Studien verglichen werden. Die Zinktransporter ZIP4 und ZIP14 sind intrazellulär im Zytoplasma lokalisiert und zum Teil auch perinukleär nachgewiesen worden. Dieser Nachweis könnte für eine Lokalisation in der Membran von Organellen oder Vesikeln sprechen.

Andere Arbeitsgruppen fanden ZIP4 und ZIP14 vorwiegend in der Zellmembran, aber auch an intrazellulären Vesikeln (ZIP4) beziehungsweise an endosomalen Kompartimenten (ZIP14) wurden sie beschrieben [59, 66, 67]. Ob die Proteine an intrazellulären Kompartimenten Ionen transportieren oder hierher zur Inaktivierung transloziert wurden, ist unklar. Möglicherweise sind Zinktransporter in der Leber als wichtiges Organ der systemischen Zinkhomöostase, anders als in anderen Geweben, eher intrazellulär lokalisiert. Denkbar ist auch, dass ZIP4 und ZIP14 im HCC und in umliegendem erkranktem Lebergewebe aufgrund eines veränderten Zinkmetabolismus zytoplasmatisch lokalisiert sind. Während eines lokalen Zinkmangelzustandes könnte eine ausgeprägte Biosynthese dieser Proteine vorliegen [59, 83].

Unsere Erkenntnis über die subzelluläre Lage von ZnT9 stimmt mit anderen Studien überein [68, 69, 71]. Die in *Abbildung 12* dargestellte granuläre kappenartige Färbung des Zytoplasmas ist gut vereinbar mit der Lage des endoplasmatischen Retikulums in der Zelle. Auch die Lokalisation im Zellkern stimmt mit der Beschreibung von ZnT9 als Koaktivator nukleärer Rezeptoren anderer Autoren überein [63, 93].

Möglicherweise transportiert ZnT9 Zink nur subzellulär, zum Beispiel aus dem Zytoplasma in den Zellkern oder das endoplasmatische Retikulum.

Man sollte die subzelluläre Zinkkonzentration erforschen, auch im Hinblick auf Expressionsänderungen der Zinktransporter.

Da nur eine begrenzte Anzahl an Studien die immunhistochemische Färbung von ZIP4, ZIP14 und ZnT9 in Lebergewebe untersucht hat, sollte unsere Analyse als eine der ersten Datensätze angesehen und durch Folgestudien validiert werden.

#### **4.4. Die Unabhängigkeit der Zinktransporter-Expression von der zugrunde liegenden Lebererkrankung**

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Zinktransporter-Expression und der zugrunde liegenden Lebererkrankung zu untersuchen, haben wir das Patientenkollektiv nach Ätiologie des HCCs gruppiert. Hierbei haben wir die häufigsten Ätiologien berücksichtigt (AFLD, NAFLD, Virus-Hepatitis) und seltene Erkrankungen als „sonstige Ätiologien“ zusammengefasst. Eine realistische Abbildung der Gesamtheit der Erkrankten ist somit gegeben.

In der statistischen Analyse hat sich gezeigt, dass die Expression der Zinktransporter unabhängig von der zugrunde liegenden Lebererkrankung ist (s. *Abschnitt 3.2* und *3.3*). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass unabhängig von der Ätiologie gemeinsame pathogenetische Prozesse in der Hepatitis, Zirrhose und Karzinogenese wirksam werden und somit auch die Regulation der Zinktransporter ähnlich verläuft.

#### **4.5. Die Eignung als prognostische Marker**

Unsere Analyse über die Korrelation der Zinktransporterexpression mit den Überlebenstagen zeigt kein einheitliches Bild. Aber folgende Aspekte sind dennoch interessant: (I) Eine erhöhte läSIONALE Expression von ZIP14, nukleärem ZnT9 und ZIP4 zeigt einen prognostisch ungünstigen Verlauf an, (II) bei HCC-Patienten mit einer Virushepatitis als zugrunde liegende Lebererkrankung scheint ein erhöhtes ZIP14 ein kürzeres Überleben vorherzusagen, (III) AFLD- und auch NAFLD-Patienten mit erhöhten läSIONALEN ZIP4-Scores zeigen einen prognostisch ungünstigen Verlauf und (IV) auch schon extraläsIONALE ZIP4-ErhöHUNG korreliert mit einer kürzeren Überlebenszeit (s. *Tabelle 8*). ZnT9 im Zytoplasma scheint im HCC verglichen mit extraläsIONALEM Gewebe erhöht (s. *Abschnitt 3.2* und *3.3*) zu sein, aber keinen prognostischen Aussagewert zu haben.

Die umgekehrten Proportionalitäten der erhöhten läSIONALEN ZIP14, ZnT9 im Zellkern und ZIP4 weisen keinen großen Rangkorrelationskoeffizienten auf, wodurch die Umsetzung als prognostischer Marker in die histologische Diagnostik erschwert wird und aktuell nicht sinnvoll erscheint.

Der Aussagewert von ZIP14 bei Patienten mit einer Virushepatitis zeigt einen steileren Verlauf der Regressionsgeraden (s. *Abbildung 17*), sollte aber aufgrund der geringen Stichprobenanzahl (läsional:  $n=14$ ;  $\Delta$ läsional–extraläsional:  $n=7$ ) in zukünftigen Studien überprüft werden.

Eine erhöhte ZIP4-Expression wurde bereits in Zusammenhang mit verstärkter Proliferation, erniedrigter Apoptoserate und gesteigertem Migrationsverhalten beschrieben [78, 79] (s. *Abschnitt 1.3.3.*). Xu et al. erachten ZIP4 im HCC-Gewebe als geeigneten prognostischen Marker für kürzeres Überleben [79]. Dieses Erkenntnis ist in Einklang mit unseren Ergebnissen der Überlebensanalyse. Besonders AFLD- und NAFLD-Patienten mit einem HCC scheinen eine schlechte Prognose aufzuweisen, wenn ZIP4 läsional erhöht ist. Die extraläsional erhöhte Expression von ZIP4 ist nur in der Analyse über alle Ätiologien signifikant und könnte für einen bereits veränderten Zinkmetabolismus in tumorumgebendem Gewebe sprechen.

Insgesamt betrachtet gibt die Korrelation der Zinktransporterproteine mit dem Überleben in unserer Studie Hinweise darauf, dass ein veränderter Zinkmetabolismus mit erhöhten Zinktransporterproteinen ein prognostisch ungünstiges Zeichen darstellt. Diesbezüglich sollten weitere Untersuchungen von ZIP4 bei AFLD- und NAFLD-Patienten erfolgen sowie von ZIP14 bei Patienten mit Virushepatitiden.

#### **4.6. Die Zinkstoffwechselalteration in Verbindung mit der Hepatokarzinogenese**

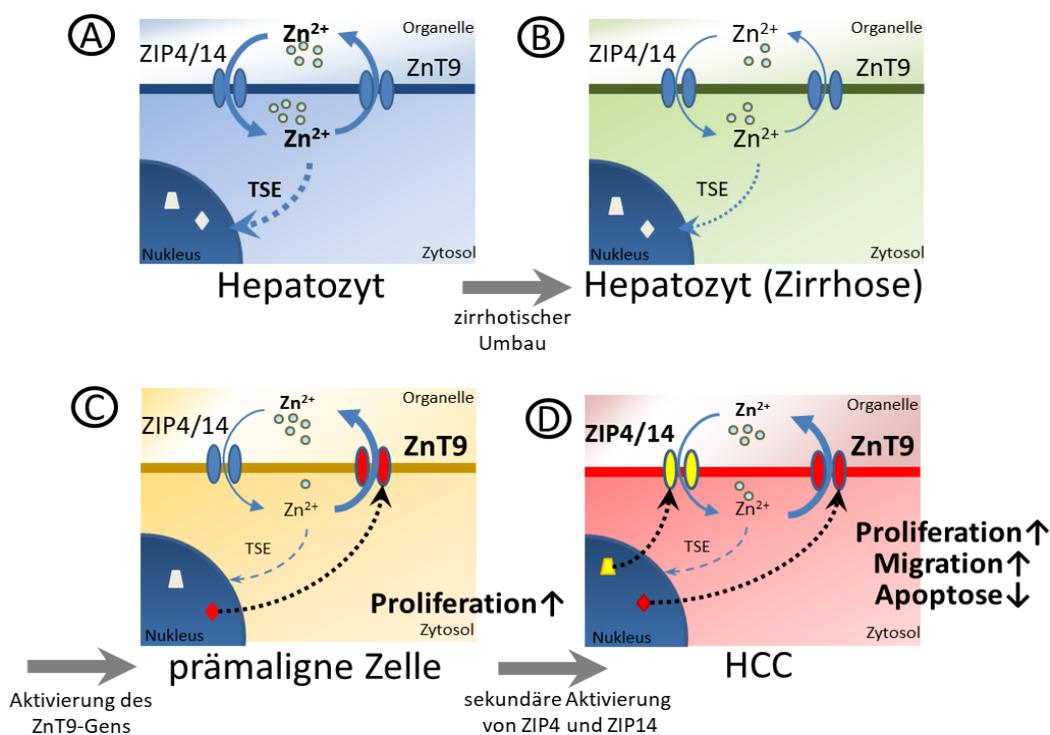
Der Zinkstoffwechsel beeinflusst wie in der *Einleitung* beschrieben vermutlich viele essenzielle Funktionen der Zelle und könnte somit bei einem Ungleichgewicht entscheidende Auswirkungen auf die Zelleigenschaften haben. In diesem Abschnitt möchte ich eine schematische Verbindung zwischen Zinkhomöostase und Malignität skizzieren und gleichzeitig unsere Ergebnisse in die bisherigen Erkenntnisse über Zink und die Zinktransporterproteine eingliedern.

Bekanntlich ist die Leberzirrhose der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Leberzellkarzinoms. Sie wird in einer Vielzahl an Studien als ein lokaler Zinkmangelzustand beschrieben [98–102]. Dieser Mangel könnte auf dem bindegewebigen Umbau basieren. Hierbei entstehe eine fibröse Ionenbarriere mit gestörten sinusoidalen Strukturen. Hinzu komme eine geringere Hepatozytendichte und somit erniedrigte Albumin-Plasmakonzentrationen mit gestörtem hämatogenen Zinktransport. Diese Konfiguration könnte zu einem gehemmten mikrovaskulären Austausch in der Leber und einem lokalen Zinkmangel führen [102].

Besonders während inflammatorischen Zuständen sei Zink in erhöhtem Maße nötig [4]. Bei Zinkmangel kann es dazu kommen, dass Immunzellen wie natürliche Killer-Zellen nicht ausreichend aktiviert werden, die T-Zellproliferation abnimmt und so die Bekämpfung von virusinfizierten oder malignen Zellen schwindet [4, 27, 28].

Liaw et al. fanden neben erniedrigtem Zink auch erniedrigte Aktivität der Superoxiddismutase im HCC verglichen mit angrenzendem zirrhotischem Lebergewebe [100]. Während eines Zinkmangelzustandes könnte also die Immunantwort schwächer ausfallen, der Schutz vor freien Radikalen und die Proliferation der Zelle sinken sowie die Apoptoserate ansteigen (s. *Abschnitt 1.1.1.*).

Generell wird Zink zwar als Apoptose-Inhibitor bezeichnet [115], allerdings hat sich auch gezeigt, dass maligne Zellen, die einer physiologischen Zinkkonzentration ausgesetzt werden, apoptotisch werden [116]. Außerdem inhibiert Zink die Invasivität und die Migration von HCC-Zellen [103]. Franklin et al. zeigten, dass HCC-Zellen der Zellreihe HepG2 bei erhöhter zellulärer Zinkkonzentration weniger proliferieren. Dies beschrieben sie als „Tumor-suppressiven Effekt“ (TSE) des Zinks. In Zinkmangelzuständen nehme dieser schützende Effekt ab [102] (s. A und B in *Abbildung 19*).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der Alteration des Zinkstoffwechsels in Verbindung mit der Hepatokarzinogenese**

(A) Hepatozyt geschützt vor maligner Entartung durch den „Tumor-suppressiven Effekt“ (TSE) von Zink. (B) Durch zirrhotischen Umbau sinkt die zelluläre Zinkkonzentration. (C) Die Aktivierung des ZnT9-Gens erniedrigt weiter das zytosolische Zink und erhöht die Proliferation. (D) Zinkmangel aktiviert ZIP4 und ZIP14. ZIP4 erhöht die Proliferation, Migration und erniedrigt die Apoptoserate. Nähere Erläuterung s. *Abschnitt 4.4.*

In der Leber entsteht möglicherweise ein Milieu, in dem gesunde Zellen in ihrem Wachstum gehemmt oder sogar apoptotisch werden, das Immunsystem entartete Zellen weniger effektiv unterdrückt, freie Radikale schlechter abgefangen werden können und entartete Leberepithelzellen besonders zur Proliferation neigen.

Ein Expressionsanstieg des vermeintlichen Efflux-Transporters ZnT9 im Lebergewebe könnte die zytoplasmatische Zinkkonzentration weiter senken (s. C in *Abbildung 19*). Bei Übertragung des Zebrafisch-Modells von Beaver et al. auf den Menschen [90] (s. *Abschnitt 1.2.3.*), läge in den HCC-Biopsien unserer Studie eine ZnT9-Expression vor, die für einen Zinkmangelzustand ungewöhnlich erscheint. In der HCC-Karzinogenese könnte die Aktivierung des *SLC30A9*-Gens ein entscheidender Schritt sein.

Die Proteinstruktur legt eine Wirkung von ZnT9 im Zellkern, dem Ort der Transkription, nahe und schon in vorherigen Studien wurde darauf hingewiesen, dass ZnT9 die Proliferation der Zelle anregen könnte [63, 93] (s. *Abschnitt 1.2.3.*).

Speziell in HCC-Zellen der Zellreihe PLC/PRF/5 konnten Sim et al. zeigen, dass während der S-Phase des Zellzyklus eine Translokation von ZnT9 aus dem Zytoplasma in den Zellkern stattfindet und es dann mit mitotisch-aktiven Proteinen interagiert [89]. Dies lässt vermuten, dass ZnT9 eng verbunden ist mit der zellulären Proliferation, der DNA-Synthese und womöglich auch regulatorisch in die Transkription eingreift, merklich auch im HCC.

Eine erhöhte Expression von ZnT9 könnte somit die Proliferation steigern und eine prä-maligne Leberzelle entstehen lassen (s. C in *Abbildung 19*).

Die ZIP4- und ZIP14-Expression wird vermutlich durch erniedrigte Zinkkonzentrationen erhöht [59, 83]. Die erniedrigte zytoplasmatische Zinkkonzentration der prä-malignen Zelle könnte sekundär zu einer Aktivierung von ZIP4 und ZIP14 führen (s. D in *Abbildung 19*). Allerdings könnte auch die zelluläre Konzentration von Eisen oder Kupfer einen Einfluss auf den Zinkmetabolismus und die Zinktransporter haben [86].

In Untersuchungen mit Zellreihen des oralen Plattenepithelkarzinoms [76] und des Pankreaskarzinoms [117] wiesen ZIP4-herunterregulierte Zellen einen Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase auf. Auch eine geringere Apoptoserate und Resistenz gegenüber Zinkmangelzuständen von Pankreaskarzinomzellen durch erhöhtes ZIP4 konnte gezeigt werden [117].

Ebenso beschrieben Xu et al. eine Assoziation zwischen erhöhter ZIP4-Expression in HCC-Zellen und gesteigerter Proliferation, Migration sowie erniedrigter Apoptoserate in vitro (s. *D* in *Abbildung 19*). Durch Auswertung klinischer Daten wiesen sie auch eine signifikante Assoziation mit einer gesteigerten Rezidivrate, Metastasierung, Child-Pugh-Score, Tumorgroße, erniedrigtem insgesamtem und tumorfreiem Überleben nach [79]. Diese vermittelten zellulären Eigenschaften könnten auch das kürzere Überleben in unserer Studie bei erhöhter ZIP4 und ZIP14-Expression bedingen.

Diese genetischen und metabolischen Veränderungen könnten somit die malignen Eigenschaften des HCCs vermitteln.

In der Entwicklung des Prostatakarzinoms wurde entsprechend ein Zinkstoffwechsel mit erniedrigter ZIP1-Expression und geringer Zink-Plasmakonzentration im PIN (prostatistische intraepitheliale Neoplasie) beschrieben [118]. Auch das prä-maligne Stadium des Pankreaskarzinoms PanIN (pankreatische intraepitheliale Neoplasie) wird in Verbindung mit einer Zinkkonzentrationserniedrigung und herunterregulierter ZIP3-Expression gesehen [119]. Bisher wurde eine erniedrigte ZIP14-Expression im HCC gefunden [102, 110]. Entgegen dem hier dargestellten Schema, beschrieben Franklin et al. – analog zur Entstehungstheorie des Prostata- und Pankreaskarzinoms – die erniedrigte ZIP14-Expression als ursächlich für das Absinken der zellulären Zinkkonzentration [102]. Eine prä-maligne Zelle in der Hepatokarzinogenese ist noch unbekannt, aber es liegt nahe, dass eine schrittweise Entstehung der Malignität auch im HCC vorliegt und diese mit einem veränderten Zinkmetabolismus einhergeht.

Möglicherweise werden diese malignen Eigenschaften durch eine subzelluläre Verschiebung von Zink in zelluläre Kompartimente und damit entstehender Bindung zu unterschiedlichen Metalloproteinen vermittelt. Dies könnte die zytoplasmatische Lokalisation in der immunhistochemischen Färbung erklären. Aber auch eine direkte Beeinflussung der zellulären Eigenschaften durch die Zinktransporter, wie sie schon bei ZnT9 beschrieben wurde, wäre denkbar.

#### **4.7. Ausblick**

Insgesamt betrachtet konnten wir eine Erhöhung der ZnT9-, ZIP14- und ZIP4-Expression in HCC-Zellen nachweisen. Diese Veränderungen haben vermutlich funktionelle Effekte auf die zelluläre Zinkhomöostase und auch auf die Entwicklung maligner Zelleigenschaften.

Die molekularen Vorgänge der Zinkhomöostase in der Zelle und auch die Lage der Zinktransporter in subzellulären Kompartimenten sind bisher noch weitestgehend unbekannt. Erkenntnisse hierüber könnten die molekularen Abläufe während der Karzinogenese nicht nur der Leberepithelzellen aufdecken.

Der vermeintliche „Tumor-suppressive Effekt“ könnte anhand von prospektiven Studien durch Kontrollen des Serumzinkgehaltes von HCC-Patienten untersucht werden, wobei der lokale hepatische Zinkgehalt allerdings unbekannt bliebe. Eine Zinksubstitution bei systemischen Zinkmangelzuständen besonders bei Leberzirrhotikern ist als sinnvoll zu erachten, da Zink, auch wenn der „Tumor-suppressive Effekt“ noch nicht bewiesen ist, unumstritten eine wichtige Funktion als essenzielles Spurenelement im menschlichen Körper erfüllt.

Zweifellos sind weitere Untersuchungen notwendig um das prognostische und therapeutische Potenzial der Zinktransporterproteine bei HCC-Patienten weiter zu belegen. Auch wäre es von Interesse, ob eine Zinksubstitution bei Zirrhotikern eine Auswirkung auf die hepatische Zinktransporter-Expression oder gar einen schützenden Effekt vor der HCC-Entstehung haben könnte.

Möglicherweise kann der Zinkmetabolismus in Verbindung mit den Tumor-suppressiven Eigenschaften des Zinks Ziel für spezifische Tumortherapien sein. Vielleicht werden in Zukunft Zinktransporterprotein-Modulatoren die Zinkhomöostase der Zelle beeinflussen und so das Tumorwachstum und eine Metastasierung hemmen können.

## **5. Zusammenfassung**

Das essenzielle Spurenelement Zink ist ein wichtiger Bestandteil zellulärer Funktionen wie Proliferation, Apoptose-Inhibition, Schutz vor freien Radikalen, Signaltransduktion und Aktivierung des Immunsystems. Die 24 verschiedenen membrangebundenen Zinktransporterproteine teilen sich in zelluläre Influx-Transporter, die ZIP (*Zinc-Irt-like protein*)-Familie, und Efflux-Transporter, die Familie der ZnT (*Zinc-Transporter*), auf. Lokaler Zinkmangel sowie eine Expressionsänderung unterschiedlicher Zinktransporter stehen in Verdacht, mit Karzinomen assoziiert zu sein.

Die Leber ist ein wichtiges Organ der systemischen Zinkhomöostase. Durch eine Entartung von Leberepithelzellen, zumeist verursacht durch eine langjährige Zirrhose-Erkrankung, entsteht ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC). Zielsetzung unserer Studie ist es, die Expression von drei ausgewählten Zinktransportern (ZIP4, ZIP14 und ZnT9) in HCC-Gewebe zu analysieren und eine Eignung als prognostischen Marker für das Überleben zu prüfen. Hierzu analysierten wir klinische Daten von 138 Patienten, die in der Universitätsklinik Magdeburg in den Jahren 2005 bis 2014 eine histologische Sicherung eines Hepatozellulären Karzinoms erhielten. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen die Zinktransporter immunhistochemisch gefärbt und die Expression der Proteine semiquantitativ ausgewertet. Wenn extraläsionales Gewebe auf dem Objektträger miterfasst war, wurde dies ebenso mikroskopisch bewertet. ZIP4 und ZIP14 waren im Zytoplasma der Hepatozyten lokalisiert. ZnT9 befand sich im Zytoplasma und im Zellkern, diese beiden subzellulären Lokalisationen wurden während der Analyse immer separat betrachtet. Die statistische Analyse des gesamten Stichprobenumfangs ergab eine signifikante Expressionserhöhung im HCC-Gewebe verglichen mit extraläsionalem Gewebe für alle drei untersuchten Zinktransporterproteine unabhängig von der zugrunde liegenden Lebererkrankung (AFLD, NAFLD, Virus-Hepatitis, sonstige Ätiologien). Bei Betrachtung des paarweisen Stichprobenumfangs – nach Ausschluss der Patienten, deren extraläsionales Gewebematerial nicht zur Verfügung stand – konnte dieses signifikante Ergebnis nur für ZnT9 im Zytoplasma bestätigt werden. Die Korrelation mit dem Überleben ergab Hinweise darauf, dass bei erhöhter läsionaler Ausprägung von ZIP4, ZIP14 und ZnT9 im Zellkern ein kürzeres Überleben zu erwarten sein könnte. Zusammenfassend weist unsere Studie darauf hin, dass ZnT9, ZIP4 und ZIP14 in der Hepatokarzinogenese eine entscheidende Rolle spielen und auch Auswirkung auf den klinischen Verlauf haben könnten. Weiterführende Studien sind dringend empfehlenswert.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Löffler/Petrides (2014) Biochemie und Pathobiochemie, 9. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg
2. Jackson MJ (1989) Physiology of Zinc. General Aspects. In: Mills CF (Hrsg) Zinc in human biology. Springer, Berlin, 1–14
3. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung (2015) D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 2. Aufl. Neuer Umschau Buchverl., Neustadt an der Weinstraße
4. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA et al (2012) Zinc and human health. An update. Arch Toxicol 86:521–534
5. Maret W (2009) Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. Biometals 22:149–157
6. Haase H, Rink L (2009) Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. Annu Rev Nutr 29:133–152
7. Duarte S, Baber J, Fujii T et al (2015) Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. Matrix Biol 44-46:147–156
8. Prasad AS (2009) Zinc. Role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 12:646–652
9. Maares M, Haase H (2016) Zinc and immunity: An essential interrelation. Arch Biochem Biophys 611:58–65
10. Grungreiff K, Reinhold D (2010) Zinc: A complementary factor in the treatment of chronic hepatitis C? (Review). Mol Med Rep 3:371–375
11. Jansen J, Rosenkranz E, Overbeck S et al (2012) Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. J Nutr Biochem 23:1458–1466
12. Little PJ, Bhattacharya R, Moreyra AE et al (2010) Zinc and cardiovascular disease. Nutrition 26:1050–1057
13. Wang C-Y, Wang T, Zheng W et al (2010) Zinc overload enhances APP cleavage and A $\beta$  deposition in the Alzheimer mouse brain. PLoS One 5:e15349
14. Dhawan DK, Chadha VD (2010) Zinc. A promising agent in dietary chemoprevention of cancer. Indian J Med Res 132:676–682
15. Stepien M, Hughes DJ, Hybsier S et al (2017) Circulating copper and zinc levels and risk of hepatobiliary cancers in Europeans. Br J Cancer 116:688–696
16. Grungreiff K (2006) Zink und Leber, Dr. Falk Pharma GmbH (Hrsg), 4. Aufl

17. Colvin RA, Holmes WR, Fontaine CP et al (2010) Cytosolic zinc buffering and muffling. Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics* 2:306–317
18. Jayawardena DP, Heinemann IU, Stillman MJ (2017) Zinc binds non-cooperatively to human liver metallothionein 2a at physiological pH. *Biochem Biophys Res Commun* 493:650–653
19. Andreini C, Banci L, Bertini I et al (2006) Zinc through the three domains of life. *J Proteome Res* 5:3173–3178
20. Andreini C, Banci L, Bertini I et al (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5:196–201
21. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A et al (2015) The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev* 95:749–784
22. Sunuwar L, Gilad D, Hershinkel M (2017) The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, in health and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 22:1469–1492
23. Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A et al (2007) Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol* 177:637–645
24. Hirano T, Murakami M, Fukada T et al (2008) Roles of Zinc and Zinc Signaling in Immunity. Zinc as an Intracellular Signaling Molecule. In: Alt FW (Hrsg) *Advances in Immunology*, 1. Aufl, Bd 97. Elsevier textbooks, 149–176
25. Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY et al (2011) Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chem Biol* 6:716–723
26. Haase H, Ober-Blöbaum JL, Engelhardt G et al (2008) Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J Immunol* 181:6491–6502
27. Muzzioli M, Stecconi R, Moresi R et al (2009) Zinc improves the development of human CD34+ cell progenitors towards NK cells and increases the expression of GATA-3 transcription factor in young and old ages. *Biogerontology* 10:593–604
28. Kaltenberg J, Plum LM, Ober-Blöbaum JL et al (2010) Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 40:1496–1503
29. MacDonald RS (2000) The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 130:1500–1508
30. Clegg MS, Hanna LA, Niles BJ et al (2005) Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life* 57:661–669
31. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE et al (2001) The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals* 14:315–330
32. Clegg MS, Hanna LA, Niles BJ et al (2005) Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life* 57:661–669

33. Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283:65–87
34. Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S (2014) Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell Mol Life Sci* 71:3281–3295
35. Yamaguchi M, Kura M, Okada S (1981) Zinc accumulation and succinate dehydrogenase activation in hepatic mitochondria of rats orally administered zinc sulfate. *Chem Pharm Bull* 29:2370–2374
36. Jackson MJ, Jones DA, Edwards RH (1982) Tissue zinc levels as an index of body zinc status. *Clin Physiol* 2:333–343
37. Murakami M, Hirano T (2008) Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci* 99:1515–1522
38. Costello LC, Liu Y, Zou J et al (1999) Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone. *J Biol Chem* 274:17499–17504
39. King JC, Shames DM, Lowe NM et al (2001) Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. *Am J Clin Nutr* 74:116–124
40. Maret W (2011) Human zinc biochemistry. In: Rink L (Hrsg) *Zinc in Human Health*. IOS Press, Amsterdam, 45–62
41. Etzel KR, Shapiro SG, Cousins RJ (1979) Regulation of liver metallothionein and plasma zinc by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem Biophys Res Commun* 89:1120–1126
42. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S et al (2005) Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6843–6848
43. King JC, Shames DM, Woodhouse LR (2000) Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 130:1360–1366
44. Krebs NF (2000) Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* 130:1374–1377
45. Hambidge M, Krebs NF (2001) Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis. Relevance to dietary zinc requirements. *Annu Rev Nutr* 21:429–452
46. Krezel A, Maret W (2006) Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem* 11:1049–1062
47. Colvin RA, Bush AI, Volitakis I et al (2008) Insights into Zn<sup>2+</sup> homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. *Am J Physiol , Cell Physiol* 294:726-742
48. Stefanidou M, Maravelias C, Dona A et al (2006) Zinc. A multipurpose trace element. *Arch Toxicol* 80:1–9

49. Thiers RE, Vallee BL (1957) Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem* 226:911–920
50. Krezel M (2007) Dual Nanomolar and Picomolar Zn(II) Binding Properties of Metallothionein 129:10911–10921
51. Andrews GK (2001) Cellular zinc sensors. MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals* 14:223–237
52. Palmiter RD, Huang L (2004) Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* 447:744–751
53. Ye B, Maret W, Vallee BL (2001) Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2317–2322
54. Weser U, Bischoff E (1970) Incorporation of  $^{65}\text{Zn}$  in Rat Liver Nuclei. *Eur J Biochem* 12:571–575
55. Kirschke CP, Huang L (2003) ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 278:4096–4102
56. Huang L, Kirschke CP, Gitschier J (2002) Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem* 277:26389–26395
57. Ohana E, Hoch E, Keasar C et al (2009) Identification of the  $\text{Zn}^{2+}$  binding site and mode of operation of a mammalian  $\text{Zn}^{2+}$  transporter. *J Biol Chem* 284:17677–17686
58. Chi Z-H, Wang X, Wang Z-Y et al (2006) Zinc transporter 7 is located in the cis-Golgi apparatus of mouse choroid epithelial cells. *Neuroreport* 17:1807–1811
59. Jeong J, Eide DJ (2013) The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med* 34:612–619
60. Hara T, Takeda T-A, Takagishi T et al (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* 67:283–301
61. Hojyo S, Fukada T (2016) Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis. *Arch Biochem Biophys* 611:43–50
62. Eide DJ (2004) The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch* 447:796–800
63. Huang L, Tapaamorndech S (2013) The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects Med* 34:548–560
64. Bin B-H, Fukada T, Hosaka T et al (2011) Biochemical characterization of human ZIP13 protein. A homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J Biol Chem* 286:40255–40265

65. Gaither LA, Eide DJ (2000) Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem* 275:5560–5564
66. Li M, Zhang Y, Liu Z et al (2007) Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18636–18641
67. Xu X-M, Wang C-G, Zhu Y-D et al (2016) Decreased expression of SLC 39A14 is associated with tumor aggressiveness and biochemical recurrence of human prostate cancer. *Onco Targets Ther* 9:4197–4205
68. Hardt S, Heidler J, Albuquerque B et al (2017) Loss of synaptic zinc transport in progranulin deficient mice may contribute to progranulin-associated psychopathology and chronic pain. *Biochim Biophys Acta* 1863:2727–2745
69. Perez Y, Shorer Z, Liani-Leibson K et al (2017) SLC30A9 mutation affecting intracellular zinc homeostasis causes a novel cerebro-renal syndrome. *Brain* 140:928–939
70. Liuzzi JP, Cousins RJ (2004) Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr* 24:151–172
71. Sim DL, Chow VT (1999) The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics* 59:224–233
72. Dufner-Beattie J, Weaver BP, Geiser J et al (2007) The mouse acrodermatitis enteropathica gene *Slc39a4* (*Zip4*) is essential for early development and heterozygosity causes hypersensitivity to zinc deficiency. *Hum Mol Genet* 16:1391–1399
73. Kambe T (2012) Molecular architecture and function of ZnT transporters. *Curr Top Membr* 69:199–220
74. Kimura T, Kambe T (2016) The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters. An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci* 17:336
75. Tamaki M, Fujitani Y, Hara A et al (2013) The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest* 123:4513–4524
76. Ishida S, Kasamatsu A, Endo-Sakamoto Y et al (2017) Novel mechanism of aberrant ZIP4 expression with zinc supplementation in oral tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 483:339–345
77. Xu X, Guo H-J, Xie H-Y et al (2014) ZIP4, a novel determinant of tumor invasion in hepatocellular carcinoma, contributes to tumor recurrence after liver transplantation. *Int J Biol Sci* 10:245–256
78. Weaver BP, Zhang Y, Hiscox S et al (2010) Zip4 (*Slc39a4*) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration. *PLoS One* 5:e13158

79. Xu C, Wallace MB, Yang J et al (2014) ZIP4 is a novel diagnostic and prognostic marker in human pancreatic cancer. A systemic comparison between EUS-FNA and surgical specimens. *Curr Mol Med* 14:309–315
80. Kang X, Chen R, Zhang J et al (2015) Expression Profile Analysis of Zinc Transporters (ZIP4, ZIP9, ZIP11, ZnT9) in Gliomas and their Correlation with IDH1 Mutation Status. *Asian Pac J Cancer Prev* 16:3355–3360
81. Jenkitkasemwong S, Wang C-Y, Mackenzie B et al (2012) Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals* 25:643–655
82. Geiser J, Venken KJT, Lisle RC de et al (2012) A mouse model of acrodermatitis enteropathica. Loss of intestine zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) disrupts the stem cell niche and intestine integrity. *PLoS Genet* 8:e1002766
83. Homma K, Fujisawa T, Tsuburaya N et al (2013) SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol Cell* 52:75–86
84. Sayadi A, Nguyen A-T, Bard FA et al (2013) Zip14 expression induced by lipopolysaccharides in macrophages attenuates inflammatory response. *Inflamm Res* 62:133–143
85. Aburto-Luna V, Treviño S, Santos-López G et al (2017) Hepatic mobilization of zinc after an experimental surgery, and its relationship with inflammatory cytokines release, and expression of metallothionein and Zip14 transporter. *Inflamm Res* 66:167–175
86. Nam H, Wang C-Y, Zhang L et al (2013) ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and overload. Implications for tissue iron uptake in iron-related disorders. *Haematologica* 98:1049–1057
87. Gao J, Zhao N, Knutson MD et al (2008) The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down-regulation of Zip14 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 283:21462–21468
88. Thorsen K, Mansilla F, Schepeler T et al (2011) Alternative splicing of SLC39A14 in colorectal cancer is regulated by the Wnt pathway. *Mol Cell Proteomics* 10:M110.002998
89. Sim DLC, Yeo WM, Chow VTK (2002) The novel human HUEL (C4orf1) protein shares homology with the DNA-binding domain of the XPA DNA repair protein and displays nuclear translocation in a cell cycle-dependent manner. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34:487–504
90. Beaver LM, Nkrumah-Elie YM, Truong L et al (2017) Adverse effects of parental zinc deficiency on metal homeostasis and embryonic development in a zebrafish model. *J Nutr Biochem* 43:78–87
91. Overbeck S, Uciechowski P, Ackland ML et al (2008) Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. *J Leukoc Biol* 83:368–380

92. Noh H, Paik HY, Kim J et al (2014) The alteration of zinc transporter gene expression is associated with inflammatory markers in obese women. *Biol Trace Elem Res* 158:1–8
93. Chen Y-H, Kim JH, Stallcup MR (2005) GAC63, a GRIP1-dependent nuclear receptor coactivator. *Mol Cell Biol* 25:5965–5972
94. Herold G (2015) *Innere Medizin 2015. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Selbstverl., Köln*
95. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62:10–29
96. Riede U-N, Werner M, Freudenberg N (2009) *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie. Springer, Berlin, Heidelberg*
97. Trojan J, Zangos S, Schnitzbauer AA (2013) Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Onkologie* 19:893–904
98. Tashiro H, Kawamoto T, Okubo T et al (2003) Variation in the Distribution of Trace Elements in Hepatoma. *BTER* 95:49–64
99. Kew MC, Mallett RC (1974) Hepatic zinc concentrations in primary cancer of the liver. *Br J Cancer* 29:80–83
100. Liaw KY, Lee PH, Wu FC et al (1997) Zinc, copper, and superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 92:2260–2263
101. Al-Ebraheem A, Farquharson MJ, Ryan E (2009) The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue. *Appl Radiat Isot* 67:470–474
102. Franklin RB, Levy BA, Zou J et al (2012) ZIP14 zinc transporter downregulation and zinc depletion in the development and progression of hepatocellular cancer. *J Gastrointest Cancer* 43:249–257
103. Costello LC, Franklin RB (2014) The status of zinc in the development of hepatocellular cancer: an important, but neglected, clinically established relationship. *Cancer Biol Ther* 15:353–360
104. Costello LC, Franklin RB (2016) Decreased zinc in the development and progression of malignancy: an important common relationship and potential for prevention and treatment of carcinomas. *Expert Opin Ther Targets* 21:51–66
105. Aydemir TB, Troche C, Kim M-H et al (2016) Hepatic ZIP14-mediated Zinc Transport Contributes to Endosomal Insulin Receptor Trafficking and Glucose Metabolism. *J Biol Chem* 291:23939–23951
106. Aydemir TB, Chang S-M, Guthrie GJ et al (2012) Zinc transporter ZIP14 functions in hepatic zinc, iron and glucose homeostasis during the innate immune response (endotoxemia). *PLoS One* 7:e48679

107. Maxel T, Smidt K, Larsen A et al (2015) Gene expression of the zinc transporter ZIP14 (SLC39a14) is affected by weight loss and metabolic status and associates with PPAR $\gamma$  in human adipose tissue and 3T3-L1 pre-adipocytes. *BMC Obes* 2:46
108. Sun Q, Li Q, Zhong W et al (2014) Dysregulation of hepatic zinc transporters in a mouse model of alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:313-322
109. Aydemir TB, Sitren HS, Cousins RJ (2012) The zinc transporter Zip14 influences c-Met phosphorylation and hepatocyte proliferation during liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 142:1536-1546.e5
110. Liu Y, Zhu X, Zhu J et al (2007) Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray. *Oncol Rep* 18:943–951
111. Zhao N, Gao J, Enns CA et al (2010) ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin. *J Biol Chem* 285:32141–32150
112. Fan Q, Cai Q, Li P et al (2017) The novel ZIP4 regulation and its role in ovarian cancer. *Oncotarget* 8:90090–90107
113. Huang C, Cui X, Sun X et al (2016) Zinc transporters are differentially expressed in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7:66935–66943
114. Wex T, Grungreiff K, Schutte K et al (2014) Expression analysis of zinc transporters in resting and stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Rep* 2:217–222
115. Seve M, Chimienti F, Favier A (2002) Rôle du zinc intracellulaire dans la mort cellulaire programmée. *Pathol Biol* 50:212–221
116. Feng P, Li T, Guan Z et al (2008) The involvement of Bax in zinc-induced mitochondrial apoptosis in malignant prostate cells. *Mol Cancer* 7:25
117. Cui X, Zhang Y, Yang J et al (2014) ZIP4 confers resistance to zinc deficiency-induced apoptosis in pancreatic cancer. *Cell Cycle* 13:1180–1186
118. Franklin RB, Feng P, Milon B et al (2005) hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer. *Mol Cancer* 4:32
119. Costello LC, Levy BA, Desouki MM et al (2014) Decreased zinc and downregulation of ZIP3 zinc uptake transporter in the development of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 12:297–303

## 7. Anhang

### 7.1. Tabellen der parametrischen und nicht-parametrischen Analyse

**Tabelle 6: Die Ergebnisse der parametrischen und nicht-parametrischen Analyse des gesamten Stichprobenumfangs extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine**

Gezeigt wird in der jeweils oberen Zeile der Median mit der Spannweite (Minimum – Maximum) sowie unten der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Mann-Whitney-U-Test* und *Standard-t-Test* verwandt. Es werden die Ergebnisse bezüglich aller Ätiologien und, für ZIP4 zusätzlich, die der Subgruppen aufgeführt. Als signifikant anerkannt werden *p-Werte*  $<0,05$ . Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben. Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.2*.

	Stichprobenanzahl [extr;läs]	extraläsional	läsional	p-Wert *Mann-Whitney-U-Test, **T-Test
<b>ZIP14</b>	n=72;138	2 (0 - 6)	3 (0 - 7)	<b>0,006*</b>
		2,4 $\pm$ 1,73	3,2 $\pm$ 2,04	<b>&lt;0,0001**</b>
<b>ZNT9 cyto</b>	n=72;137	6 (0 - 7)	7 (2 - 7)	<b>&lt;0,001*</b>
		5,5 $\pm$ 1,15	6,3 $\pm$ 1,04	<b>&lt;0,0001**</b>
<b>ZNT9 zk</b>	n=72;137	0 (0 - 7)	4 (0-7)	<b>&lt;0,001*</b>
		2,1 $\pm$ 2,57	3,6 $\pm$ 2,57	<b>&lt;0,0001**</b>
<b>ZIP4</b>				
<b>alle Ätiologien</b>	n=42;91	2 (0 - 6)	3,5 (0 - 7)	<b>0,001*</b>
		2,1 $\pm$ 1,71	3,2 $\pm$ 1,85	<b>&lt;0,0001**</b>
<b>AFLD</b>	n=15;36	2 (0 - 4)	3 (0 - 7)	<b>0,043*</b>
		1,6 $\pm$ 1,50	2,8 $\pm$ 2,01	<b>0,029**</b>
<b>NAFLD</b>	n=10;24	3 (0 - 6)	4 (0 - 7)	0,135*
		2,7 $\pm$ 2,16	3,9 $\pm$ 1,42	0,12**
<b>Virus-Hepatitis</b>	n=7;14	2 (0 - 6)	3 (0 - 6)	0,156*
		2 $\pm$ 2,00	3,2 $\pm$ 1,89	0,2**
<b>sonstige Ätiologien</b>	n=9;17	2 (0 - 4)	3 (0 - 6)	0,196*
		2,4 $\pm$ 1,33	3,2 $\pm$ 1,75	0,21**

**Tabelle 9: Ergebnisse der parametrischen und nicht-parametrischen Analyse über die paarweise angeordneten Stichproben extraläsional vs. läsional der einzelnen Zinktransporterproteine**

Gezeigt wird in der jeweils oberen Zeile der Median mit der Spannweite (Minimum – Maximum) sowie unten der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Mann-Whitney-U-Test* und *Standard-t-Test* verwandt. Die Stichprobenanzahl ist extraläsional und läsional gleich. Es werden die Ergebnisse bezüglich aller Ätiologien und, für ZIP14 und 4 zusätzlich, die der Subgruppen aufgeführt. Als signifikant anerkannt werden *p-Werte*  $< 0,05$ . Signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben. Nähere Erläuterung in *Abschnitt 3.3*.

	Stichprobenanzahl	extraläsional	läsional	p-Wert *Mann-Whitney-U-Test, **T-Test
<b>ZIP14</b>				
<b>alle Ätiologien</b>	n=72	2 (0 - 6) 2,4 $\pm$ 1,73	3 (0-7) 2,8 $\pm$ 2	0,267* 0,198**
<b>AFLD</b>	n=24	2 (0 - 5) 2,0 $\pm$ 1,65	2,5 (0 - 6) 2,4 $\pm$ 1,82	0,412* 0,37**
<b>NAFLD</b>	n=23	3 (0-6) 2,9 $\pm$ 1,58	3 (0 - 6) 3,6 $\pm$ 2,00	0,230* 0,2**
<b>Virus-Hepatitis</b>	n=11	2 (0 - 6) 2,7 $\pm$ 2,20	2 (0 - 7) 3 $\pm$ 2,65	0,842* 0,8**
<b>sonstige Ätiologien</b>	n=13	2 (0 - 5) 2,5 $\pm$ 1,56	2 (0 - 5) 2,4 $\pm$ 1,39	0,976* 0,9**
<b>ZNT9 cyto</b>	n=72	6 (0 - 7) 5,5 $\pm$ 1,15	6 (2 - 7) 6,0 $\pm$ 1,16	<b>0,002*</b> <b>0,009**</b>
<b>ZNT9 zk</b>	n=72	0 (0 - 7) 2,1 $\pm$ 2,57	3 (0 - 7) 2,8 $\pm$ 2,56	0,112* 0,12**
<b>ZIP4</b>				
<b>alle Ätiologien</b>	n=42	2 (0 - 6) 2,1 $\pm$ 1,71	2 (0 - 7) 2,4 $\pm$ 1,85	0,437* 0,465**
<b>AFLD</b>	n=15	2 (0 - 4) 1,6 $\pm$ 1,50	2 (0 - 6) 1,9 $\pm$ 1,88	0,803* 0,67**
<b>NAFLD</b>	n=10	3 (0 - 6) 2,7 $\pm$ 2,16	4 (2 - 7) 3,7 $\pm$ 1,57	0,384* 0,25**
<b>Virus-Hepatitis</b>	n=7	2 (0 - 6) 2 $\pm$ 2,00	2 (0 - 5) 2,1 $\pm$ 1,77	0,704* 0,89**
<b>sonstige Ätiologien</b>	n=9	2 (0 - 4) 2,4 $\pm$ 1,33	2 (0 - 5) 2,3 $\pm$ 1,66	1* 0,88**

## **7.2. Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Rolle der Zinktransporter ZIP4, ZIP14 und ZnT9  
im Hepatozellulären Karzinom – eine immunhistochemische Studie

in der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Frau Privatdozentin Dr. med. Kerstin Schütte

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen  
als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur  
Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere  
Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 01.08.2018

Laura Gartmann

### **7.3. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich jenen danken, die an der Entstehung dieser Dissertation beteiligt waren.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Peter Malfertheiner und auch seinem nachfolgenden Klinikdirektor Herrn Professor Dr. med. Ali Canbay dafür, dass ich dieses Promotionsthema bearbeiten durfte, dass sie mir die Möglichkeit gaben, diese Dissertation an der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchzuführen und ich danke für stets ausgesprochen gute Arbeitsbedingungen.

Außerdem möchte ich mich bei Univ.-Professor Dr. med. univ. Dr. sc. nat. Johannes Haybäck dafür bedanken, dass ich die benötigten Ausstattungen und Räumlichkeiten des pathologischen Instituts nutzen durfte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Privatdozentin Dr. med. Kerstin Schütte und Professor Dr. rer. nat. Thomas Wex bedanken. Sie waren stets zu Anregungen und Diskussionen bereit und unterstützten mich mit großem Engagement. Die Betreuung hätte nicht besser sein können.

Herrn Professor Dr. med. Thomas Kalinski danke ich für die Unterstützung im Institut für Pathologie. Er half mir bei der Auswahl der geeigneten Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen und bei der mikroskopischen Auswertung.

Danken möchte ich auch Carola Kügler, Claudia Miethke und Nadine West aus dem Institut für Pathologie für die fachlich hervorragende Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Zu guter Letzt gilt ein Dank von Herzen meiner Familie und meinen Freunden. Insbesondere meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen bestmöglich unterstützen, wie auch hier mit eifrigem Korrekturlesen.

#### **7.4. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

### **7.5. Veröffentlichung**

Gartmann L, Wex T, Grüngreif K, Reinhold D, Kalinski T, Malfertheiner P, Schütte K (2018) Expression of zinc transporters ZIP4, ZIP14 and ZnT9 in hepatic carcinogenesis- An immunohistochemical study. J Trace Elem Med Biol 49:35–42