

# **Bedeutung von PACS-2 für die Karzinogenese von Hepatozyten**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Kirstin Hanak, geb. Große, Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

2018

Referent: Prof. Dr. Arndt Vogel  
Koreferent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Tag der Promotion: 12.11.2018

## Abstract

Liver cancer, particularly hepatocellular carcinoma (HCC), is the fifth most common tumorous disease and causes every second death related to neoplasia. While in Africa and Asia infections of hepatitis B and C cause hepatocellular carcinoma, in Europe and Northern America excessive consumption of food and alcohol lead to fatty liver, fibrosis and cirrhosis and over time to tumours in the liver. Until now diagnosis of liver cancer mostly occurs very late when therapy becomes delicate or impossible.

To analyze the importance of PACS2 and its loss in hepatocarcinogenesis, a murine model was chosen to induce liver damage chemically via Diethylnitrosamine (DEN) that causes hepatocarcinogenesis in the process of time. Wildtype mice (PACS2<sup>+/+</sup>) and mice with genetic knockout of PACS2 (PACS2<sup>-/-</sup>) with and without (control) DEN-treatment were analyzed for liver damage, ability of regeneration, sensitivity to apoptosis, hepatitis and tumour development.

It was shown that the used low dose of DEN in PACS2<sup>+/+</sup>- and PACS2<sup>-/-</sup>-mice leads to a very mild liver damage and without detectable hepatitis to liver tumours. In PACS2<sup>-/-</sup>-mice hepatocarcinogenesis was delayed, 12 months after DEN-treatment this difference was no longer present. After Jo2-induced apoptosis loss of PACS2 showed a gain of survival as DEN-treated knockout-mice survived a lot longer than animals of all other groups. An influence of PACS2 on regenerative capability was not observed.

The delayed development of tumours is presumably attributed to a lesser extend of hepatocyte damage after DEN. The hyperplasia of PACS2<sup>-/-</sup>-hepatocytes in the preneoplastic phase is reasoned in the mTOR-signaling pathway but indicates no connection to the delayed hepatocarcinogenesis.

So PACS2 exhibits potential in understanding the multiple signaling pathways in the development of liver cancer but not in prevention or therapy of HCC.

## Zusammenfassung

Leberkrebs, genauer das Hepatozelluläre Karzinom (HCC), ist weltweit die fünfthäufigste Krebserkrankung und zweithäufigste Ursache Tumor-assoziiierter Todesfälle. Sind in afrikanischen und asiatischen Ländern Hepatitis B- und Hepatitis C-Virusinfektionen ursächlich, so sind in Europa und Nordamerika v.a. übermäßiger Alkohol- oder Nahrungsmittelkonsum Ursprung von Fettleber, Leberfibrose und Leberzirrhose, die im Laufe der Zeit zur Entstehung von Lebertumoren führen. Auch weiterhin erfolgt die Diagnose oft erst sehr spät, was eine Therapie schwierig oder gar unmöglich macht.

Um die Bedeutung des Proteins PACS2 bzw. dessen Verlust in der Hepatokarzinogenese zu untersuchen, wurde ein murines Modell gewählt, in dem chemisch eine Leberschädigung durch Diethylnitrosamin (DEN) induziert wurde, die über einen längeren Zeitraum zur Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms führte. Wildtyp-Mäuse (PACS2<sup>+/+</sup>) und Mäuse mit genetischem PACS2-Knockout (PACS2<sup>-/-</sup>) sowohl ohne (Kontrollen) als auch mit DEN-Behandlung wurden auf Leberschädigung, Regenerationsfähigkeit, Apoptosesensitivität, Hepatitis sowie Tumorentstehung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendete niedrige DEN-Dosis in PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer sehr milden Schädigung der Lebern und ohne eine nachweisbare Hepatitis zu Lebertumoren führt. Die Hepatokarzinogenese war in den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren verzögert, 12 Monate nach DEN-Behandlung war dieser Unterschied jedoch nicht mehr vorhanden. Bei Jo2-induzierter Apoptose zeigte der Verlust von PACS2 einen Überlebensvorteil, da DEN-behandelte Knockout-Tiere deutlich länger lebten als Tiere aller anderen Gruppen. Ein Einfluss von PACS2 auf die Regenerationsfähigkeit wurde nicht festgestellt.

Die verzögerte Tumorentstehung ist wahrscheinlich auf eine verminderte Hepatozytenschädigung durch DEN zurückzuführen. Die Vergrößerung der PACS2<sup>-/-</sup>-Hepatozyten in der präneoplastischen Phase liegt im mTOR-Signalweg begründet, ist jedoch nicht mit der verzögerten Hepatokarzinogenese in Zusammenhang zu bringen.

So bietet PACS2 ein Potential im Verständnis der vielfältigen Signalwege der Leberkrebsentstehung, nicht aber in der Prävention oder Therapie des HCC.

carcinogenesis, liver, PACS2

Karzinogenese, Leber, PACS2

## Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	3
Zusammenfassung.....	4
Inhaltsverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Abbildungsverzeichnis.....	13
Tabellenverzeichnis.....	16
1 Einleitung .....	17
1.1 Die Leber.....	17
1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom .....	19
1.3 Die Bedeutung von PACS2.....	23
1.4 Das HCC-Mausmodell .....	26
1.5 Zielsetzung .....	27
2 Material und Methoden .....	28
2.1 Allgemeine Chemikalien.....	28
2.2 Mäuse .....	29
2.3 Tierexperimentelle Methoden .....	29
2.3.1 Behandlung mit Diethylnitrosamin (DEN) .....	30
2.3.2 Behandlung mit dem CD95-Antikörper Jo2 .....	30
2.3.3 Leberteileresektion.....	30
2.3.4 Isolierung von Hepatozyten und Zellzyklus-Messung mittels Propidiumiodid-Färbung .....	31
2.3.5 Isolierung von Immunzellen .....	32
2.3.6 Isolierung von leberspezifischen Stammzellen/ Ovalzellen .....	33
2.3.7 Probengewinnung und Blutplasmamessung .....	35
2.4 Genotypisierung .....	35
2.4.1 DNA-Isolierung aus Mausschwänzen.....	36
2.4.2 Genotypisierung von PACS2-Mäusen .....	36
2.5 Immunhistochemie.....	37
2.5.1 Allgemeine Chemikalien für die Immunhistochemie .....	37
2.5.2 Hämatoxylin-Eosin- (H&E) Färbung.....	38
2.5.3 Ki67-Färbung .....	38
2.5.4 BrdU-Färbung .....	39
2.5.5 $\beta$ -Catenin-Färbung .....	39
2.5.6 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-(TUNEL) Färbung.....	40
2.5.7 p21-Färbung .....	40
2.5.8 $\gamma$ H2Ax-Färbung.....	41
2.6 Proteinanalysen .....	41
2.6.1 Proteinisolierung aus Lebergewebe .....	41
2.6.2 Western Blot Analyse .....	42
2.6.3 Immunologischer Nachweis von Caspasen in Lebergewebe .....	45
2.7 Genexpressionsanalysen.....	47
2.7.1 RNA-Isolierung aus Lebergewebe.....	47
2.7.2 cDNA-Synthese.....	47
2.7.3 Semi-quantitative Polymerasekettenreaktion (sqPCR).....	47
2.8 <i>In vitro</i> -Versuche mit Hepa1c1c7-Gewebekulturzellen.....	50
2.8.1 Kultivierung der Zellen.....	51
2.8.2 Transfektion mit PACS2-siRNA.....	51

2.8.3	Ernten der Zellen, Isolierung von RNA und cDNA-Synthese .....	52
2.8.4	Ernten der Zellen und Isolierung von Protein .....	52
2.8.5	Behandlung der Zellen mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Cisplatin .....	53
2.9	Statistische Auswertung .....	53
3	Ergebnisse .....	54
3.1	Hepatozelluläres Karzinom .....	54
3.1.1	Der Verlust von PACS2 <sup>-/-</sup> verzögert die Tumorentstehung nach initialer Injektion von DEN .....	54
3.1.2	Der leichte Anstieg des Lebergewichtes korreliert mit der Tumorentwicklung .....	55
3.1.3	Im Plasma sind die Leber-sensiblen Transaminasen bei vorliegenden Tumoren deutlich erhöht .....	56
3.1.4	Das Fehlen von PACS2 <sup>-/-</sup> führt zu einer Vergrößerung der Hepatozyten .....	57
3.2	Akute Leberschädigung .....	58
3.2.1	Die Blutparameter zeigen eine geringere Leberschädigung bei den PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren im Vergleich zu PACS2 <sup>+/+</sup> -Tieren .....	58
3.2.2	Leichte Veränderungen von Körpergewicht und Lebergewicht sind unabhängig vom Genotyp .....	59
3.2.3	Anstieg von Proliferation und Apoptose ist ähnlich bei PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	60
3.2.4	Frühe Hepatozytenvergrößerung ist unabhängig vom Genotyp .....	60
3.2.5	Proteine mit Beteiligung an Zellzyklus, Zellproliferation sowie Apoptose zeigen keine erhöhte Aktivität .....	61
3.2.6	Induktion einer akuten Hepatitis mit Hilfe einer Hochdosis DEN von 100 µg DEN · g <sup>-1</sup> Körpergewicht bei 8 Wochen alten männlichen Mäusen .....	63
3.2.7	Akute Leberschädigung durch DEN hat keinen Einfluss auf die Immunzellen von PACS2 <sup>+/+</sup> -Mäusen .....	67
3.3	Präneoplastische Phase .....	69
3.3.1	Die Entwicklung von Körpergewicht und Lebergewicht ist Genotyp-unabhängig und unauffällig .....	69
3.3.2	PACS2 <sup>+/+</sup> -Tiere zeigen stärker erhöhte Transaminase-Level als PACS2 <sup>-/-</sup> -Tiere .....	70
3.3.3	Das Lebergewebe zeigt sich intakt und unauffällig im Verlauf der präneoplastischen Phase bei PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	70
3.3.4	Im Verlauf der Zeit zeigen die PACS2 <sup>+/+</sup> -Tiere eine leicht erhöhte Proliferation der Hepatozyten während PACS2 <sup>-/-</sup> -Tiere eine Vergrößerung der Hepatozyten aufweisen. ....	71
3.3.5	Proteinanalysen von Lebern der präneoplastischen Phase zeigen geringfügige Aktivitäten des AKT/mTOR-Signalweges .....	72
3.3.6	Der Verlust von PACS2 zeigt keine Regulierung Tumor-assoziiertes Gene in der präneoplastischen Phase .....	73
3.4	Leberregeneration .....	74
3.4.1	Induzierte Leberregeneration durch Partielle Hepatektomie zeigt eine identische Entwicklung in Körpergewicht und Lebergewicht bei PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	75
3.4.2	Parameter im Blutplasma zeigen Genotyp-unabhängige Veränderungen nach Leberteilektomie .....	75
3.4.3	Makroskopische und mikroskopische Darstellung der Lebern von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren nach partieller Hepatektomie sind äquivalent .....	76
3.4.4	Zellzyklusanalyse von Hepatozyten in der präneoplastischen Phase .....	78
3.4.5	Ovalzell-Analyse .....	80
3.5	Apoptose .....	81

3.5.1	Nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 ist das Überleben der PACS2 <sup>-/-</sup> -Tiere länger als das der PACS2 <sup>+/+</sup> -Tiere nach DEN-Injektion .....	81
3.5.2	Nach Behandlung mit CD95-Antikörper Jo2 steigen die Lebertransaminasen unabhängig vom Genotyp an .....	82
3.5.3	Nach Behandlung mit dem CD95-Antikörper Jo2 zeigen sowohl PACS2 <sup>+/+</sup> - wie auch PACS2 <sup>-/-</sup> -Tiere einen leichten Anstieg des Lebergewichtes bei Überleben der ersten 24 Stunden .....	83
3.5.4	Die Aktivität der Caspasen 3 und 8 korreliert mit der Sterberate der PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tiere nach Injektion mit dem CD95-Antikörper Jo2 .....	84
3.6	<i>In-vitro</i> -Analysen .....	85
3.6.1	PACS2-siRNA-transfizierte Hepa1c1c7-Zellen reagieren auf DNA-Schäden vergleichbar mit Kontrollen.....	86
4	Diskussion.....	87
4.1	Die Bedeutung von PACS2 für die Hepatokarzinogenese.....	88
4.2	Die Bedeutung von PACS2 für die DEN-induzierte Leberschädigung .....	89
4.3	Die Bedeutung von PACS2 für die Leberregeneration .....	93
4.4	Die Bedeutung von PACS2 für die Apoptose.....	94
4.5	Fazit.....	95
	Literaturverzeichnis.....	97
	Danksagung.....	103

## Abkürzungsverzeichnis

ADAM17	<i>Metallopeptidase domain 17 (tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme, TACE)</i>
AFB1	Aflatoxin B1
AK	Antikörper
Akt	Synonym für Proteinkinase B
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	Allylphycocyanin
Apo2L	<i>Apoptosis antigen 2 ligand (TRAIL)</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated proteine, Serin/Threonin-Kinase</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein kinase</i>
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-x <sub>L</sub>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
Bim	<i>B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death</i>
Brca1	<i>Breast cancer 1</i>
BrdU	(+)-5-Bromo-2'-deoxy-uridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin/ Kälberserumalbumin</i>
Cdc25A	<i>cell division cycle phosphatase 25A</i>
cDNA	<i>complementary DNA, Komplementär-DNA</i>
cFlip	<i>cellular FLICE (Caspase 8)-like inhibitory protein</i>
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate</i>
ciAP 1/2	<i>cellular Inhibitor of apoptosis 1/2</i>
cJun	<i>cellular Jun</i>
CK2	Casein Kinase 2
clCasp3	<i>cleaved caspase 3</i>
clCasp9	<i>cleaved caspase 9</i>
cmyc	<i>cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
Cxcl1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
Cyt C	Cytochrom C
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEN	Diethylnitrosamin
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nucleosidtriphosphat
DR4/5	Todesrezeptor 4/5
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	<i>Early endosome, frühe Endosomen</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor, Epidermalwachstumsfaktor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>FAS-associated death domain</i>
FBR	Furin-bindende Region
FBS	<i>Fetal Bovine Serum, Fetales Kälberserum</i>
FITC	Fluorescein
FLIP L/S	<i>FLICE-inhibitory protein long/short</i>
Foxm1	<i>Forkhead box protein M1</i>
FSC	<i>forward scatter, Vorwärtsstreulicht</i>
Gadd45 $\alpha/\beta/\gamma$	<i>Growth Arrest and DNA Damage genes 45 alpha/ beta/ gamma</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGT	$\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HIV-1	Humanes Immunodefizientes Virus Typ 1
HNF4	<i>Hepatocyte nuclear factor 4</i>
HO1	Hämoxygenase 1
IFA	Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
i.p.	intraperitoneal
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer, Internationale Agentur für Krebsforschung</i>
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B $\alpha/\beta$	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha/beta</i>
IL6	Interleukin 6
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JNK	<i>cJun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
Ki67	Kiel 67
Klf6	<i>Krueppel-like factor 6</i>
KSHV	Kaposi sarcoma-Herpesvirus

LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1, Serin/Threonin-Kinase</i>
MAM	Mitochondrien-assoziierte Membran
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
Mcp1/Ccl2	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEK	MAPK-Kinase
MHC-1	<i>major histocompatibility complex 1, Haupthistokompatibilitätskomplex 1</i>
MIC1-1C3	<i>Macrophage inhibitory cytokine 1–1C3</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane perforation</i>
mTOR	<i>mechanistic (mammalian) target of rapamycin</i>
mTORC1/2	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1/2</i>
MW	Molekulargewicht
NaF	Natriumfluorid
NaPPi	Natriumpyrophosphatdecahydrat
NDEA	N-Nitrosodiethylamin (DEN)
Nef	Negativfaktor des HIV-1
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NKT	Natürliche Killerzellen
NLS	<i>Nuclear localization signal/sequence</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NQO1	NAD(P)H-Dehydrogenase, Quinon 1
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
p-	phospho-
PACS1/2	<i>Phosphofurin-acidic cluster sorting protein 1/2</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>
(sq)PCR	(semi-quantitative) <i>Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
PERP	<i>p53 apoptosis effector related to PMP-22</i>
PH	<i>partial hepatectomy, Leberteilresektion</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
PKC	Proteinkinase C
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis/ Bcl-2-binding component 3 (BBC3)</i>
RAF1	<i>proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (c-Raf)</i>
Rag	<i>Recombination-activating gene</i>
Ras	<i>GTPase family</i>

RNS	<i>Reactive Nitric Species, Reaktive Stickstoffspezies</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies</i>
S6	ribosomales Protein S6
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sesn2	Sestrin 2
SGK1	<i>Serine/threonine-protein kinase/ serum and glucocorticoid-regulated kinase 1</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SIRT1	Deacetylase Sirtuin 1
Smac/DIABLO	<i>Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low PI</i>
SREBP1/2	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1/2</i>
SSC	<i>sideward scatter, Seitwärtsstreulicht</i>
Stat3	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TLR	Toll-like Rezeptoren
TM	Trockenmilch
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp53	Tumorprotein p53 (Homo sapiens)
Trp53bp1	Tumorprotein p53-bindendes Protein
TSC 1/2	<i>Tuberous sclerosis complex 1/2</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
ULK1	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>
WB	<i>Western Blotting</i>
WHO	<i>World Health Organization/ Weltgesundheitsorganisation</i>
Wnt	<i>Wingless-type</i>
$\beta$ 2Mg	<i>Beta-2 microglobulin</i>
$\gamma$ H2Ax	<i>H2A histone family, member X, phosphorylated on serine 139</i>
18SrRNA	<i>18S rRNA (adenine<sup>1779</sup>-N<sup>6</sup>/adenine<sup>1780</sup>-N<sup>6</sup>)-dimethyltransferase</i>
4E-BP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Funktionelles Leberläppchen. ....	18
Abbildung 2 Inzidenz von Leberkrebs weltweit. ....	19
Abbildung 3 Chronologische Entwicklung des Hepatozellulären Karzinoms. ....	20
Abbildung 4 Entgiftungswege der Leber. ....	21
Abbildung 5 Extrinsischer und Intrinsischer Verlauf der Apoptose. ....	22
Abbildung 6 PACS2- Modulation durch Akt-abhängige Phosphorylierung. ....	25
Abbildung 7 Entwicklungsstadien der Leberschädigung bis zum Leberkrebs. ....	27
Abbildung 8 Schema der Leber einer Maus. ....	35
Abbildung 9 Tumorinzidenz, Tumorgröße und Tumoranzahl der PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäuse 4, 8 und 12 Monate nach DEN-Injektion. ....	55
Abbildung 10 Makroskopische Aufnahmen von Lebertumoren von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäusen 8 und 12 Monate nach DEN-Behandlung. ....	55
Abbildung 11 Körpergewicht, Lebergewicht und Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen 8 und 12 Monate nach Injektion von DEN mit chronischer Hepatitis, teilweise mit Tumoren. ....	56
Abbildung 12 Plasmalevel der Lebertransaminasen, Bilirubin und Glukose von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen zum Zeitpunkt der Tumormanifestation. ....	57
Abbildung 13 Zellgröße der Hepatozyten von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen bei zunehmendem Alter sowie fortschreitender Hepatokarzinogenese und beispielhafte Darstellung der $\beta$ -Catenin-Färbung. ....	57
Abbildung 14 Blutparameter bei DEN-induzierter akuter Hepatitis. Alanintransferase (ALT), Aspartat-Transferase (AST), Bilirubin und Glukose aus dem Plasma von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion. ....	58
Abbildung 15 Entwicklung von Lebergewicht und Körpergewicht. Lebergewicht und Körpergewicht und Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion. ....	59
Abbildung 16 Proliferation und Apoptose in Hepatozyten nach DEN-Injektion bei PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren. ....	60
Abbildung 17 Größe der Hepatozyten von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren. ....	61
Abbildung 18 Westernblot-Analysen verschiedener Proteine aus Leberlysat von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion. ....	61
Abbildung 19 Entwicklung von Leber- und Körpergewicht von 8 Wochen alten PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von 100 $\mu\text{g DEN} \cdot \text{g}^{-1}$ Körpergewicht. ....	63
Abbildung 20 Plasmamesswerte von Alanin-Transferase (ALT) und Aspartat-Transferase (AST), Bilirubin und Glukose von 8 Wochen alten PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von 100 $\mu\text{g DEN} \cdot \text{g}^{-1}$ Körpergewicht. ....	64
Abbildung 21 Immunhistochemische Färbung von Lebergewebe von 8 Wochen alten PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von 100 $\mu\text{g DEN} \cdot \text{g}^{-1}$ Körpergewicht. ....	65

Abbildung 22 Immunhistochemische Färbung von $\gamma$ H2Ax (Marker für DNA-Doppelstrangbrüche) von Lebergewebe von 8 Wochen alten PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von 100 $\mu$ g DEN $\cdot$ g <sup>-1</sup> Körpergewicht. ....	66
Abbildung 23 Westernblot-Analysen von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren nach Injektion einer Hochdosis von 100 $\mu$ g DEN $\cdot$ g <sup>-1</sup> Körpergewicht.....	67
Abbildung 24 Gating-Strategie und Menge der durchflusszytometrisch gemessenen Immunzellen bei PACS2 <sup>+/+</sup> -Mäusen 48 h nach DEN-Injektion sowie unbehandelte Kontrollen.....	68
Abbildung 25 Lebergewicht und Körpergewicht von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren im Verlauf der präneoplastischen Phase. ....	69
Abbildung 26 Messwerte der Alanin (ALT)- und Aspartat (AST)-Transferase sowie Bilirubin und Glukose im Blutplasma von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren im Verlauf der präneoplastischen Phase.....	70
Abbildung 27 Makroskopische Leberaufnahmen und mikroskopische Aufnahmen von Leberschnitten mit Hämatoxylin- & Eosin- Färbung (H&E) von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren im Verlauf der präneoplastischen Phase. ....	71
Abbildung 28 Proliferation (Ki67-Färbung) und Zellgröße ( $\beta$ -Catenin-Färbung) von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren im Verlauf des Versuches. ....	72
Abbildung 29 Westernblot-Analysen aus Lebergewebe von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren in der präneoplastischen Phase.....	73
Abbildung 30 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion von DNA, isoliert aus Lebergewebe von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Tieren in der präneoplastischen Phase. ....	74
Abbildung 31 Körpergewicht, Lebergewicht und Verhältnis von Körper- zu Lebergewicht bei PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen nach partieller Hepatektomie. ....	75
Abbildung 32 Blutplasma-Parameter für Leberschädigung in PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Tieren nach induzierter Regeneration durch partielle Hepatektomie.....	76
Abbildung 33 Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe nach partieller Hepatektomie PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	77
Abbildung 34 Menge proliferierender Zellen (Ki67) sowie Zellgröße ( $\beta$ -Catenin) regenerierender Lebern von PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen nach partieller Hepatektomie.....	78
Abbildung 35 Gating-Strategie der Zellzyklusanalyse von Hepatozyten von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäusen der präneoplastischen Phase nach DEN-Injektion. ....	79
Abbildung 36 Zellzyklusanalyse isolierter Hepatozyten von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäusen 4 Monate nach DEN-Injektion.....	79
Abbildung 37 Gating-Strategie der Ovalzell-Analyse von Hepatozyten der PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäuse nach DEN-Injektion. ....	80
Abbildung 38 Ovalzell-Analyse von Leberlysaten der PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäuse.....	81
Abbildung 39 Überlebenskurve der PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäuse nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 nach vorangegangener DEN-Behandlung. ....	82
Abbildung 40 Lebertransaminasen nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 bei PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen. ....	83
Abbildung 41 Makroskopische Aufnahmen entnommener Lebern von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> - Mäusen nach Apoptoseinduktion mit dem CD95-Antikörper Jo2.....	83

Abbildung 42 Lebergewicht und Körpergewicht 2 h sowie (bei Überleben) 24 h nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 mit vorangegangener DEN-Behandlung bei PACS2 <sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2 <sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen. ....	84
Abbildung 43 Caspase 8- und Caspase 3-Aktivität (relative Lumineszenz) nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 bei PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> - Tiere. ....	85
Abbildung 44 Färbung apoptotischer Zellen (TUNEL) in Lebergewebeschnitten von PACS2 <sup>+/+</sup> - und PACS2 <sup>-/-</sup> -Mäusen nach induzierter Apoptose durch den CD95-Antikörper Jo2. ....	85
Abbildung 45 Westernblot-Analyse von Proteinen sensibel für oxidativem Stress und verbundenen DNA-Schäden bei Hepa1c1c7-Zellen nach Transfektion mit siRNA und Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oder Cisplatin. ....	86
Abbildung 46 Schematischer Überblick des mTor-Signalweges mit den wichtigsten Faktoren und ihrer Wirkung. ....	91

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Allgemeine Chemikalien.....	28
Tabelle 2 Fluoreszenz-Antikörper zur Färbung von Immunzellen zur FACS-Analyse.....	32
Tabelle 3 Fluoreszenz-Antikörper zur Färbung von Ovalzellen zur FACS-Analyse .....	34
Tabelle 4 PCR-Ansatz für PACS2-Genotypisierung .....	36
Tabelle 5 Chemikalien für die Immunhistochemie .....	37
Tabelle 6 Lysepuffer 5x zur Proteinisolierung.....	41
Tabelle 7 Lysepuffer 1x zur Proteinisolierung.....	42
Tabelle 8 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE .....	43
Tabelle 9 Antikörper für Western Blot Analysen .....	43
Tabelle 10 Reagenzien für das Caspase 3 Assay .....	46
Tabelle 11 Reagenzien für das Caspase 8 Assay .....	46
Tabelle 12 Probenansatz für semi-quantitative Polymerasekettenreaktion.....	48
Tabelle 13 Primersequenzen und Zyklenanzahl der semi-quantitativen Polymerasekettenreaktion.....	48
Tabelle 14 Sequenzen der verwendeten siRNA.....	51
Tabelle 15 Ansätze für die Transfektion mit siRNA.....	52

# 1 Einleitung

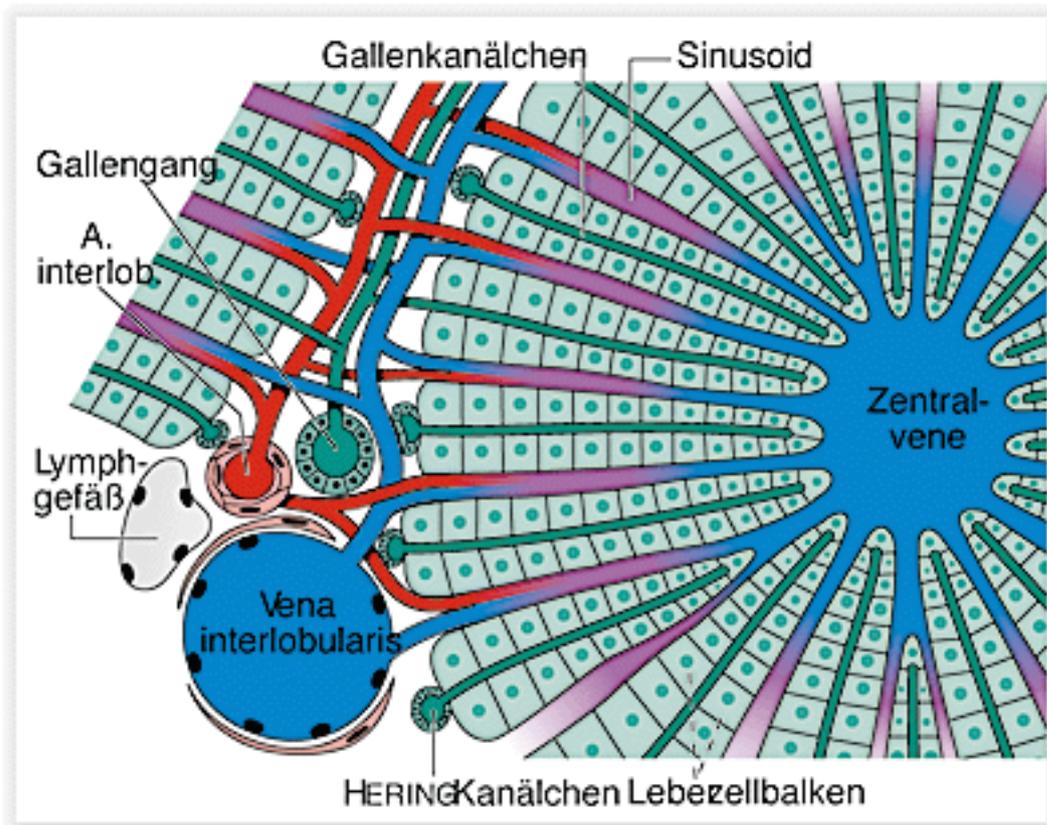
Zu Beginn dieser Arbeit steht eine kurze Einführung in die Bedeutung der Leber und des Leberkrebses. Hierzu gehört eine Beschreibung der Leber und ihrer Funktionsweise sowie die Häufigkeit und Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms. Es erfolgt eine Beschreibung des Proteins PACS2 und seiner Funktionen ebenso wie des der Arbeit zugrunde liegenden Mausmodells.

## 1.1 Die Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen. Sie befindet sich im rechten Oberbauch direkt unter dem Zwerchfell in direkter Nähe von Gallenblase, Bauchspeicheldrüse und Zwölffingerdarm. Sie besteht aus vier unterschiedlich großen Lappen und ist mit ca. 1,5 kg Gewicht die größte Drüse des Körpers. Nahezu 2000 Liter Blut fließen täglich durch die Leber und werden dort von verschiedenen Stoffen gereinigt. Sie ist Hauptstoffwechselorgan für Lipide, Toxine und reguliert den Blutglukosespiegel mit Hilfe der Hormone Insulin und Glukagon. Überschüssige Lipide und Kohlenhydrate werden als Lipoproteine bzw. Glykogen gespeichert und bei Bedarf wieder an das Blut abgegeben. Den Körper schädigende Stoffe wie Bilirubin, Medikamente und andere Toxine werden beispielsweise durch Glukuronidierung wasserlöslich gemacht und später ausgeschieden oder gebunden und gespeichert. Täglich werden in der Leber 600-700 ml Gallenflüssigkeit gebildet, mit deren Hilfe Bilirubin, Cholesterol, Phospholipide und Toxine ins Duodenum weitergeleitet und mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Durch die Synthese von Gerinnungsfaktoren und Akut-Phase-Proteinen ist die Leber direkt an Reaktionen des Immunsystems beteiligt. Durch die Oxidation von Fettsäuren gewinnt die Leber ihre benötigte Energie.

Die Leber ist in viele Läppchen (Abbildung 1) gegliedert, die aus radiär verlaufenden, balkenartig formierten Leberzellen, den Hepatozyten, gebildet werden. Innerhalb dieser Zellbalken werden durch Aussparungen der gegenüberliegenden Hepatozyten die Gallenkanäle gebildet, die am Balkenende in einen Gallengang, den *Ductus biliferus*, münden. Zwischen den Zellbalken befinden sich Kapillaren, Lebersinusoide genannt. Diese bestehen aus fenestrierten Endothelzellen und Kupffer-Zellen, den leberspezifischen Makrophagen. Die Sinusoide sind von den Hepatozyten durch den Disse-Raum getrennt.

In der räumlichen Nähe der Gallengänge befinden sich Äste der *Arteria hepatica* sowie der *Vena portae* (Glisson' Trias im Periportalfeld), von welchen das Blut durch die Sinusoide der radiär aufgebauten Leberläppchen zur zentral liegenden Zentralvene fließt.



**Abbildung 1 Funktionelles Leberläppchen.**  
(Sobotta, J. 2005. Atlas Histologie. Elsevier, München)

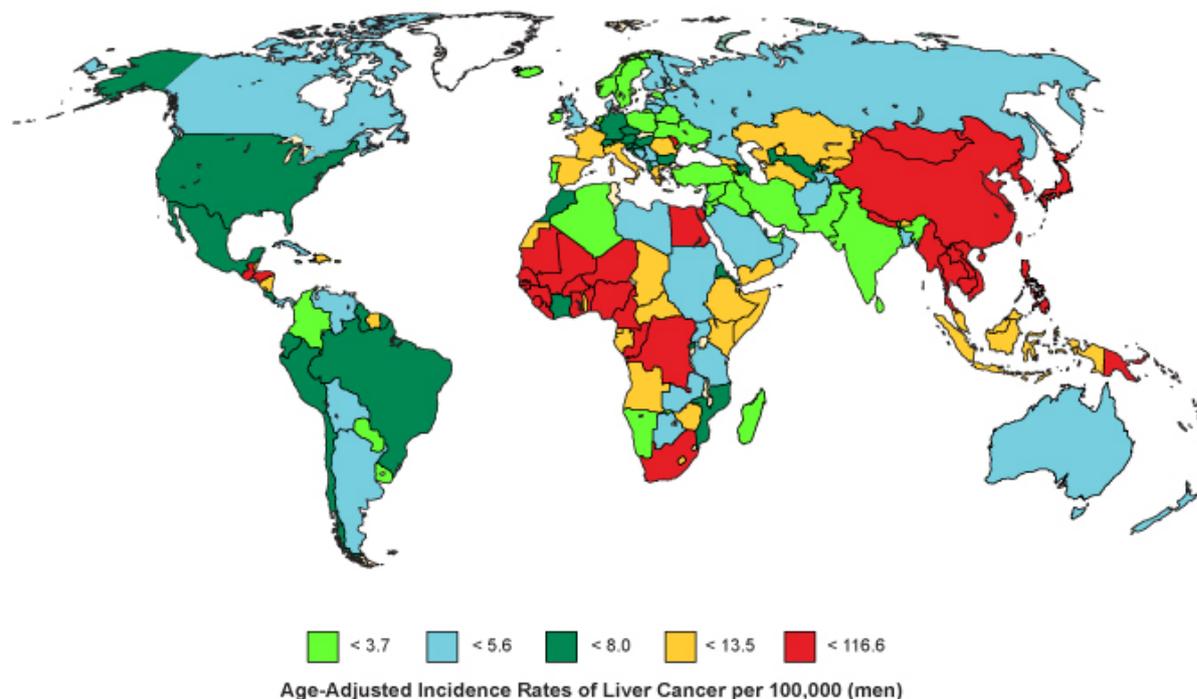
Die von den Hepatozyten gebildete Galle fließt in den Gallenkanälen in Richtung Gallengang (Glisson' Trias). Kurz vor dem Austritt aus der Leber vereinen sich die Gallengänge zum *Ductus hepaticus*, der die Galle in das *Duodenum* (digestiv, während der Verdauungsphase) oder über den abzweigenden *Ductus cysticus* in die Gallenblase (interdigestiv, außerhalb der Verdauungsphase) abführt.

Das in der Leber ankommende arterielle und venöse Blut wird über die Sinusoide an den Hepatozyten vorbei geleitet. Im dazwischenliegenden Disse-Raum findet der Stoffaustausch statt. Im Blut enthaltene Giftstoffe wie Medikamente, Toxine aber auch Bilirubin werden nun mit Glukuronsäure konjugiert und somit wasserlöslich und über die Gallenkanäle abtransportiert. Überschüssige Lipide werden in den Ito-Zellen des Disse-Raums gespeichert. Glukose aus dem Blut wird als Glykogen in den Hepatozyten gespeichert oder aus Glykogen gewonnen in das Blut abgegeben. Gesteuert durch die Hormone Insulin und Glukagon wird der Blutzuckerspiegel so möglichst konstant gehalten. Auch in den Hepatozyten gebildete

Proteine oder gespeicherte Vitamine können über das Blut in den Körperkreislauf abgegeben werden. Geschädigte Erythrozyten werden von Kupffer-Zellen aus dem Blut entfernt und abgebaut.

## 1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom

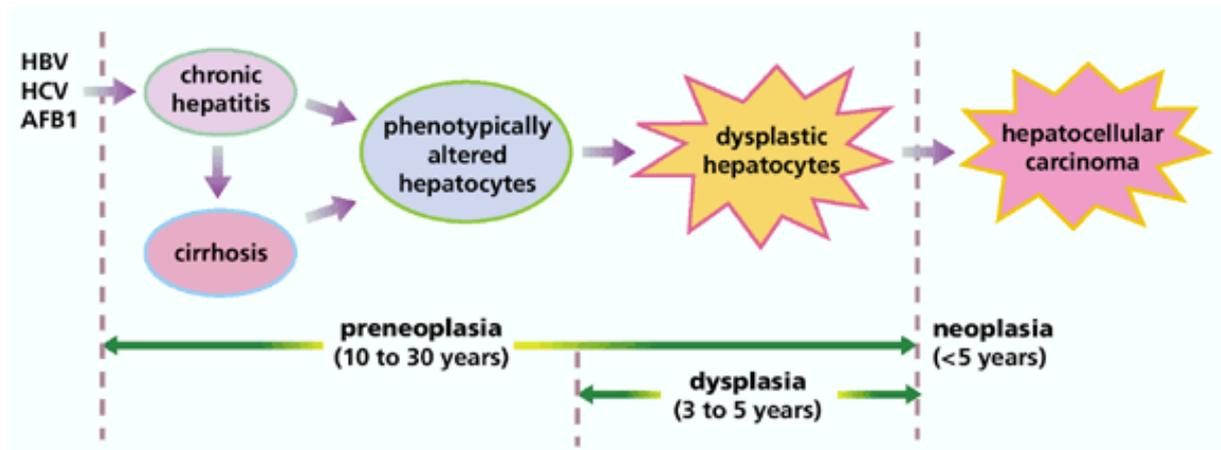
Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC), umgangssprachlich auch Leberkrebs genannt, ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit (Parkin *et al.*, 2001; Befelder und Di Bisceglie, 2002; Llovet *et al.*, 2003). Nach aktuellen Angaben ist es die zweithäufigste Ursache Tumor-assoziiertes Todesfälle (WHO Fact sheet N°297, 2017). Neben dem selteneren Cholangiozellulären Karzinom haben 70-85% der primären Leberkrebskranken ein Hepatozelluläres Karzinom (Ahmed *et al.*, 2008). 83% aller Fälle treten in Entwicklungsländern auf (Abbildung 2). Die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung ist am höchsten in West- und Zentralafrika sowie in Ost- und Südostasien (Ferlay *et al.*, 2015). Dabei führen geographisch unterschiedliche Ursachen zur Tumorentstehung. Während in Afrika und Asien die Hepatitis B-Infektion, verstärkt durch Aflatoxin B1- (ein natürlich vorkommendes Schimmelpilzgift) kontaminierte Lebensmittel ursächlich ist, sind in den entwickelten Ländern Hepatitis C-Infektionen, Eisenspeicherkrankheiten, Alkoholabusus sowie Adipositas und Diabetes Mellitus Hauptursachen des HCC (Llovet *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2004).



**Abbildung 2 Inzidenz von Leberkrebs weltweit.**  
(International Agency for Research on Cancer, 2013)

Da die Leber Abbauorgan für Schadstoffe ist, können Giftstoffe und toxische Metabolite zu oxidativem Stress, DNA-Schäden und somit zur Leberschädigung führen (Liska, 1998). Als oxidativen Stress bezeichnet man dabei ein erhöhtes Aufkommen oxidativer Moleküle bei einer zu geringen Menge Antioxidantien. Diese Schäden führen zu einer Entzündung des Lebergewebes (Hepatitis) und zur kompensatorischen Proliferation. Bleibt die Hepatitis über einen längeren Zeitraum bestehen, kommt es zur Synthese von Kollagenfasern (Fibrose), welche die funktionale Struktur der Leber einschränken. Die fortschreitende Fibrose führt zur zunehmenden Zerstörung der anatomischen Leberstruktur (Zirrhose) bis hin zum Leberversagen (Abbildung 3).

Aus dem nicht-funktionalen Gewebe entwickelt sich nach einiger Zeit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ein HCC. An der Entstehung eines HCCs sind somit mehrere Prozesse beteiligt, die sich untereinander sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können und unter bestimmten Bedingungen zur Tumorentstehung führen (Thorgeirsson und Grisham, 2002).

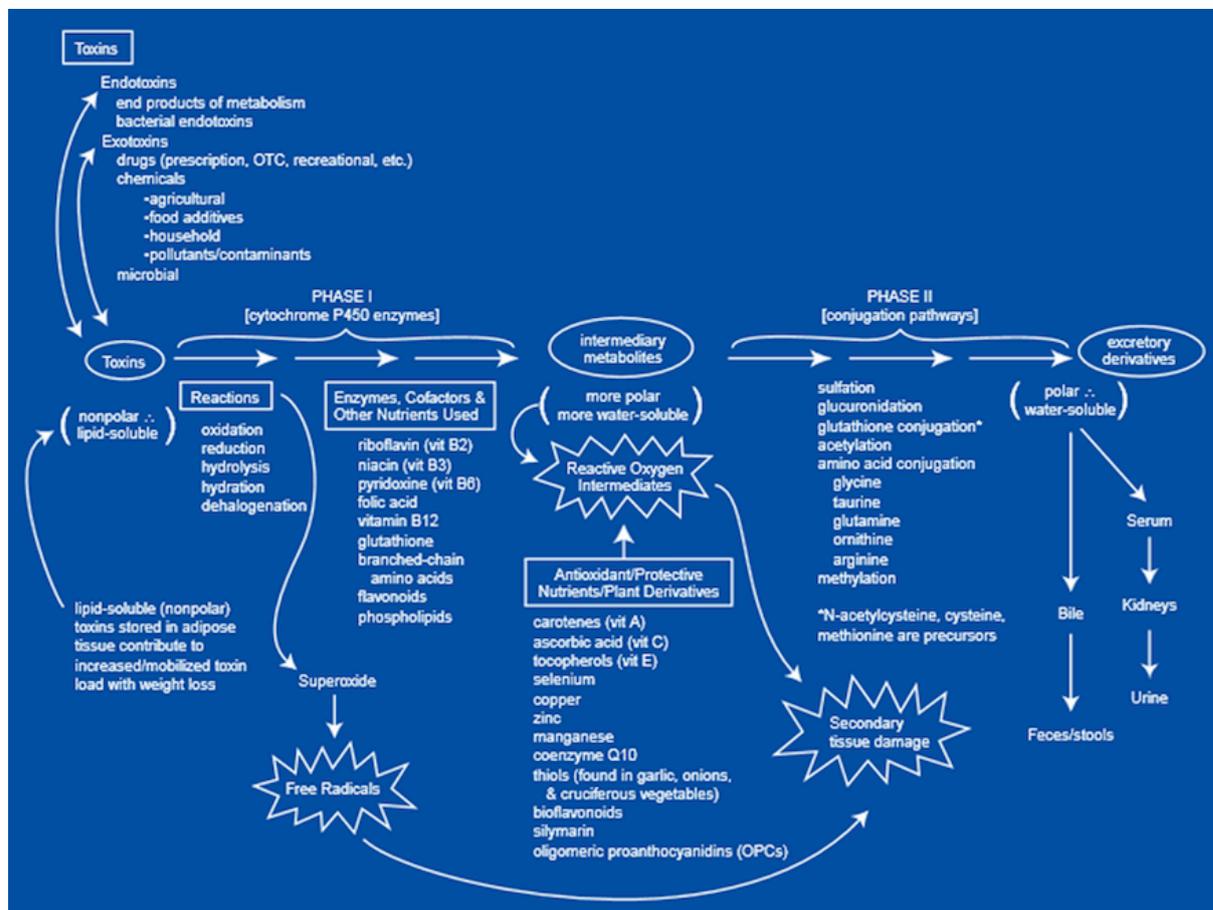


**Abbildung 3 Chronologische Entwicklung des Hepatozellulären Karzinoms.**

Vor allem Hepatitis-B-Viren (HBV) und Hepatitis-C-Viren (HCV) sowie Aflatoxin B1 (AFB1) induzieren chronische Leberentzündungen, die meist über eine Zirrhose zu veränderten Hepatozyten über einen präneoplastischen Zeitraum von 10 bis 30 Jahren zu einer Neoplasie, dem Hepatozellulären Karzinom, führen. (Thorgeirsson und Grisham, 2002)

Stickstoffverbindungen aus gerösteten Nahrungsmitteln, Inhaltsstoffe von Zigarettenrauch sowie Alkohol, Abbauprodukte von Medikamenten und andere Toxine führen in der Leber zu oxidativem Stress. Durch ihre Verstoffwechslung entstandene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bzw. Stickstoffspezies (RNS), genauso wie Hepatitis B- und C-Viren und Aflatoxin-B1, führen zu Schäden der DNA. Die Verstoffwechslung schädlicher Stoffe in der Leber kann außerdem zu einer metabolischen Aktivierung führen, d.h. das Stoffwechselprodukt ist toxischer als der ursprünglich aufgenommene Schadstoff (Park *et al.*, 2005). Auch UV-

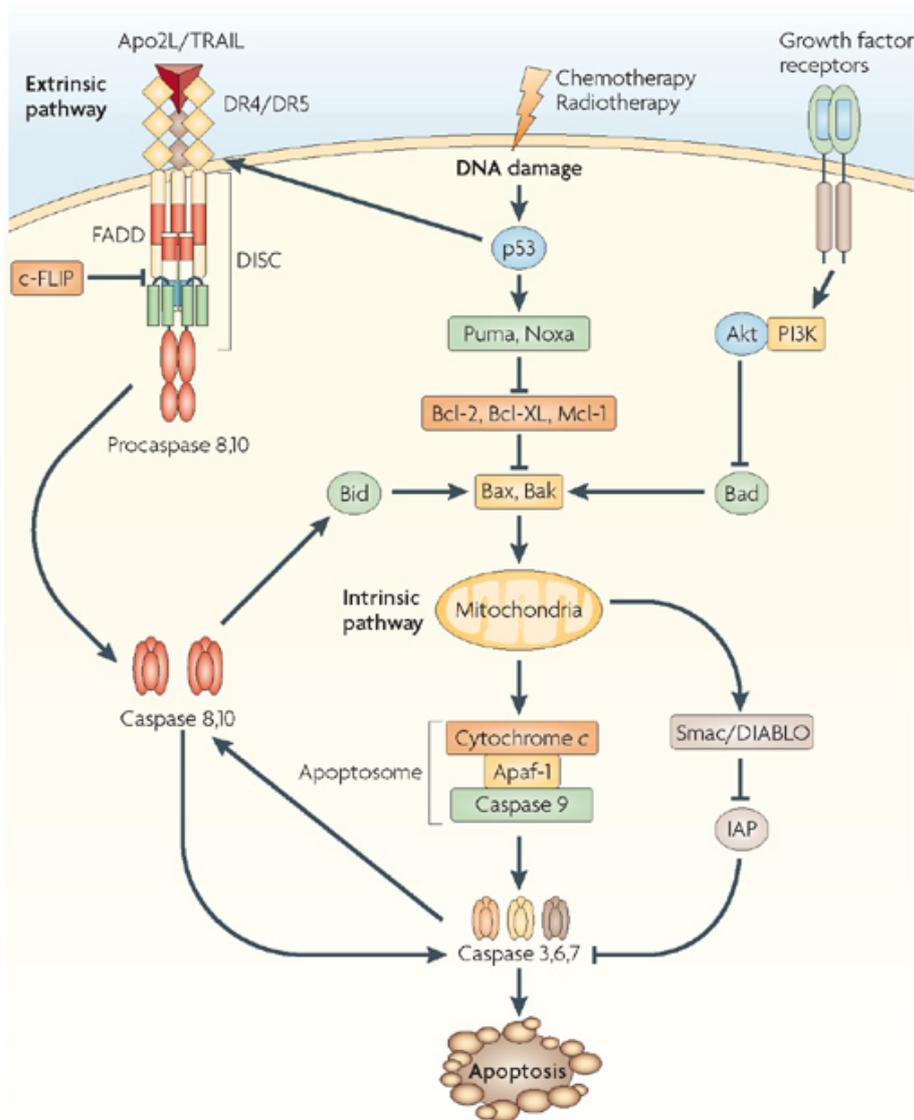
Strahlung, Umweltmutagene sowie durch Abbau der Nahrung entstandene endogene Sauerstoffradikale (Li *et al.*, 2013; Higgs *et al.*, 2014) führen insbesondere in der Leber zu oxidativem Stress. Entstandener oxidativer Stress wird durch antioxidative Moleküle und Reaktionen abgebaut (Abbildung 4).



**Abbildung 4 Entgiftungswege der Leber.**  
(Liska, 1998)

Durch erhöhtes Auftreten von oxidativem Stress entsteht jedoch ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien woraus zelluläre Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA resultieren. Darauf reagieren die Zellen mit Mechanismen für Reparatur oder Apoptose, dem "programmierten" Zelltod. Sowohl apoptotische Hepatozyten als auch Hepatitis B- und C-Viren aktivieren über Toll-like-Rezeptoren (TLR) die Kupffer-Zellen. Diese produzieren zur Immunabwehr sowie zur Induktion von Apoptose selbst ROS (z.B. zur Zerstörung von Bakterien) und rekrutieren ROS-produzierende Neutrophile und Monozyten in die Leber (Jaeschke, 2011). So entsteht eine Entzündung, die sich auch auf unbeteiligte Hepatozyten ausweitet. Auch die Mitochondrien der Hepatozyten produzieren aus Hyperoxid-Anionen der Elektronen-Transport-Kette und Wassermolekülen reaktive Sauerstoffperoxid-Radikale, welche zur Aktivierung bzw. Produktion proinflammatorischer Zytokine führen (Naik und

Dixit, 2011; Li *et al.*, 2013). Dadurch wird die Entzündungsreaktion verstärkt und die Einwirkung der schädlichen Faktoren kann dauerhaft bestehen bleiben. Die Radikale interagieren mit der DNA und führen zu Läsionen, d.h. zum Austausch oder Fehlen einzelner Basen. DNA-Schäden können durch komplexe Reparaturmechanismen behoben werden. Basenexzisionsreparatur (base excision repair, BER) heißt der Reparaturmechanismus bei Fehlern einzelner Basen. Bei größeren DNA-Schäden ist eine sogenannte Nukleotidexzisionsreparatur (nucleotide excision repair, NER) notwendig. Diese DNA-Reparaturmechanismen erkennen und ersetzen falsche Basen oder ganze Basenstränge. Sind die DNA-Schäden zu häufig oder zu groß, kommt es durch nicht-erfolgende Reparatur zu Genmutationen. Dies kann sowohl genomische als auch mitochondriale DNA betreffen (Thorgeirsson und Grisham, 2002).



**Abbildung 5** Extrinsischer und Intrinsischer Verlauf der Apoptose. (Ashkenazi, 2008)

Akut hoher oder kontinuierlicher oxidativer Stress führt durch DNA-Schäden zur Entzündung in der Leber, welche durch Regeneration sowie Apoptose (Abbildung 5) eine kompensatorische Proliferation zur Folge hat. Über einen längeren Zeitraum entstehen sehr wahrscheinlich, früher oder später, kanzerogene Zellen, aus denen sich ein HCC entwickelt.

### 1.3 Die Bedeutung von PACS2

Das Phosphofurin acidic cluster sorting protein-2 (PACS2) ist, wie auch PACS1, ein nahezu ubiquitär vorkommendes Protein. Das humane PACS2 ist auf Chromosom 14q32.33 lokalisiert und beinhaltet 26 Exons. Zwölf Tierarten, darunter auch die Maus, haben ein homologes PACS2-Gen (Fagerberg *et al.*, 2014).

Wan *et al.* (1998) beschrieben erstmalig eine PACS1-Proteinfamilie als Membrantransportproteine der Proteinase Furin (FES upstream region-localized paired basic amino acid cleaving enzyme), welche durch Abspaltung von Aminosäuren Proteine aktiviert. PACS1 und PACS2 verfügen über eine Furin-bindende Region (FBR), welche Cluster aus sauren Aminosäuren (z.B. von Furin) binden kann. Diese Cluster können anschließend, vor allem durch Casein Kinase 2 (CK2), phosphoryliert und zu dem trans-Golgi-Netzwerk (PACS1) bzw. zu dem Endoplasmatischen Retikulum (ER; PACS2) vermittelt werden (Wan *et al.*, 1998; Köttgen *et al.*, 2005; Youker *et al.*, 2009).

Köttgen *et al.* (2005) konnten PACS1 und PACS2 als Transportproteine für den Calcium-permeablen nicht-selektiven Kationenkanal Polycystin-2 identifizieren. Abhängig von der Phosphorylierung durch die Caseinkinase 2 (CK2) binden PACS1 und PACS2 an die carboxy-terminale Domäne von Polycystin-2 und vermitteln sie so zwischen Endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Plasmamembran, wobei der Kationenkanal sowohl am ER als auch an der Plasmamembran aktiv ist.

Des Weiteren ist PACS2 an der Regulierung von Oberflächenmolekülen zur Antigenpräsentation an Immunzellen beteiligt. Die transmembranäre Ubiquitinligase K5 des Kaposi sarcoma-Herpesvirus (KSHV) baut CD31 auf Monocyten, Neutrophilen und T-Zellen durch ein PACS2-gebundenes Proteasom ab (Mansouri *et al.*, 2006).

Der Negativfaktor Nef des Humanen Immunodefizienten Virus Typ1 (HIV-1) reguliert den Histokompatibilitätskomplex 1 (major histocompatibility complex 1, MHC-1) PACS2-vermittelt herunter. PACS2 bindet Nef an die paranukleare Region, wodurch eine Multikinasenkaskade am trans-Golgi-Netzwerk ausgelöst wird, die zur Endozytose des MHC-1 führt (Atkins *et al.*, 2008; Dikeakos *et al.*, 2012). Mit Hilfe von PACS2 ist es sowohl KSHV

als auch HIV-1 möglich die Antigenerkennung durch Immunzellen und damit die humane Immunabwehr zu umgehen.

Das Chaperon Calnexin, welches an der Proteinfaltung am rauen ER beteiligt ist, wird von PACS2 zwischen ER, Mitochondrien-assoziiierter Membran (MAM) und Plasmamembran verteilt. Die Phosphorylierung von PACS2 durch CK2 vermindert die Bindung von Calnexin (Myhill *et al.*, 2008).

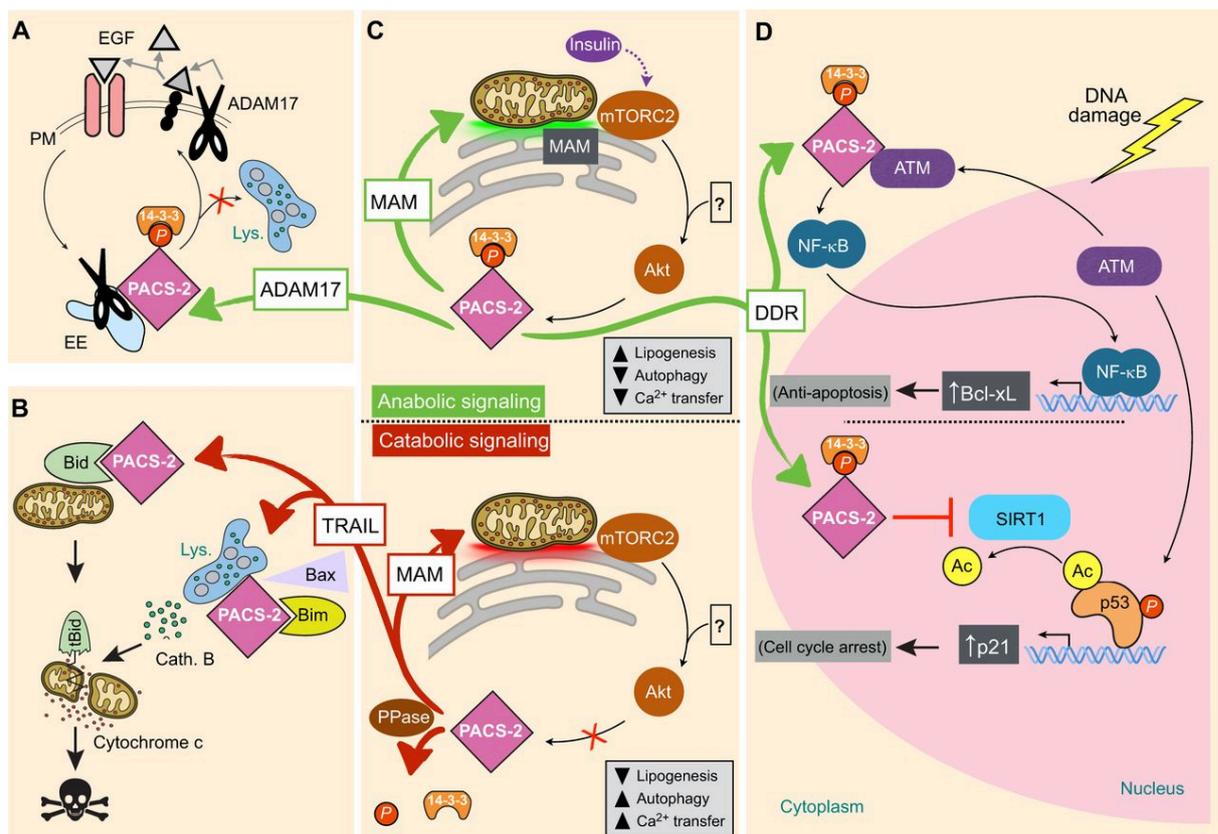
Aslan *et al.* (2009) konnten eine Beteiligung von PACS2 bei der Apoptose (Abbildung 5) durch den TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) zeigen. TRAIL veranlasst dabei die Dephosphorylierung von PACS2 an Serin<sup>437</sup>. Damit steht PACS2 nicht mehr für den Membrantransport von Proteinen zur Verfügung, sondern vermittelt den Transport von Bid zum Mitochondrium, wo es zu tBid gespalten wird und die Freigabe von Cytochrom C (Cyt C) und in Folge dessen die Perforierung der äußeren Mitochondrienmembran (Mitochondrial outer membrane perforation, MOMP) veranlasst (Simmen *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2009; Werneburg *et al.*, 2012). Jedoch sprechen nicht alle Zellen auf TRAIL an. Die zellulären Apoptoseinhibitoren (cellular inhibitors of apoptosis) cIAP1 und cIAP2 binden PACS2 und vermitteln seine Ubiquitinierung, welche zum Abbau von PACS2 führt (Guicciardi *et al.*, 2014). Somit wird die PACS2-vermittelte TRAIL-induzierte Apoptose verhindert. Durch Unterdrückung von cIAP1 und cIAP2 steigen die PACS2-Level jedoch wieder und die Zellen werden sensitiv für TRAIL.

Zeitgleich konnte eine zellprotektive Funktion von PACS2 nachgewiesen werden. Bei Auftreten von DNA-Schäden bindet die Furin-bindende Region (FBR) von PACS2 die zum Histokompatibilitätskomplex III-gehörige Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) und verhindert somit die Deacetylierung des Transkriptionsfaktors p53. Eine der vielseitigen Funktionen von p53 ist die Transaktivierung von p21, welches Apoptose hemmt sowie zum Stillstand des Zellzyklus führt, um eine Reparatur der DNA zu ermöglichen (Atkins *et al.*, 2014; Barroso-González und Thomas, 2015).

Arruda *et al.* (2014) konnten einen direkten Zusammenhang zwischen PACS2 und oxidativem Stress aufzeigen. Bei Mäusen mit Diät-induzierter Fettleibigkeit wurde eine Neuorganisation der Mitochondrien-assoziierten Membran (MAM) festgestellt, d.h. bei zunehmender Fetteinlagerung in die Hepatozyten reorganisierte sich die MAM durch Zusammenlagerung von ER und Mitochondrium. An dieser vergrößerten Kommunikationsfläche kommt es zu einem vermehrten Transport von Calcium zum Mitochondrium und in Folge dessen zu einer Überladung im Mitochondrium. Dadurch sinkt die oxidative Kapazität und es entsteht (zusätzlicher) oxidativer Stress. Durch das Herunterregulieren von PACS2 oder des Inositoltriphosphat-Rezeptors 1 (IP3R1) konnte die oxidative Kapazität der Mitochondrien

sowie die Insulin-Sensitivität der pankreatischen  $\beta$ -Zellen verbessert werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von PACS2 die induzierte Fettleibigkeit sowie die metabolischen Veränderungen verhindert.

Die bisherigen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass PACS2, abhängig vom Energiestatus, zwei unterschiedliche Rollen hat (Abbildung 6). Bei einem erhöhten Insulinspiegel aktiviert mTORC2 (mechanistic target of rapamycin) Akt und somit die Phosphorylierung von PACS2 an Ser<sup>437</sup> (Aslan *et al.*, 2009; You und Thomas, 2009; Betz *et al.*, 2013). So bindet PACS2 mit hoher Affinität 14-3-3-Proteine und ist beteiligt an Aktivitäten der MAM sowie dem Proteintransfer. In katabolischen Zuständen wird PACS2 nicht phosphoryliert und kann nun apoptotisch aktiv werden und ist durch Translokation von Bid zum Mitochondrium an einer reversiblen Form der extrinsischen Apoptose beteiligt (Thomas *et al.*, 2017). Die vielfältigen Funktionen von PACS2 im Zusammenhang mit Transkriptionsfaktoren und Apoptose lässt eine wesentliche Bedeutung im Verlauf chronischer Entzündungen und der Karzinogenese vermuten.



**Abbildung 6 PACS2- Modulation durch Akt-abhängige Phosphorylierung.**

Die PACS2-Akt-Bindungsstelle und die Kern-Lokalisationssequenz (nuclear localization sequence, NLS) modulieren gemeinsam den Proteintransfer zwischen den Membranen, die TRAIL-induzierte Apoptose, die Integrität der Mitochondrien-assoziierten Membran sowie die Reaktion auf DNA-Schäden.

A Das Akt-phosphorylierte pSer437-PACS2 (pPACS-2) interagiert mit ADAM17 an frühen Endosomen (EE) und vermittelt die Protease an der Zelloberfläche, wo sie Liganden des

Epidermalwachstumsfaktors (EGF) abstößt und die Signalübertragung am EGF-Rezeptor stimuliert. Bei Fehlen von PACS2 wird ADAM17 in Lysosomen (Lys.) abgebaut.

B TRAIL induziert die Dephosphorylierung von pSer437-PACS2. PACS2 bindet Bid und transloziert es zum Mitochondrium. Außerdem formt PACS2 durch Bindung mit Bim und Bax an Lysosomen das *PIXosome*, welches zur Cathepsin B-Freigabe (Cath. B) aus den Lysosomen durch Membranpermeabilisierung führt. Beide Aktivitäten von PACS2 sind beteiligt an der Perforierung der äußeren Mitochondrienmembran.

C Anabole Signalwege: An Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAM) wird durch Insulin oder Wachstumsfaktoren der mTor-Komplex2 (mTORC2) aktiviert, was zur Phosphorylierung von PACS2 durch Akt führt. pPACS2 erhöht die Kontakte der MAM, was den Proteinaustausch zwischen Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Mitochondrium verändern und eine erhöhte Lipogenese bewirken könnte. Das ? steht für eine mögliche mTORC2-unabhängige, Akt-abhängige Phosphorylierung von PACS2.

C Katabole Signalwege: in hungernden oder TRAIL-behandelten Zellen ist AKT inhibiert und pPACS2 wird durch eine Phosphatase (PPase) dephosphoryliert. Dadurch wird die MAM verändert, was womöglich zu reduzierter Lipogenese und erhöhtem Kalziumaustausch zwischen ER und Mitochondrium sowie zu Autophagie führt.

D Nach DNA-Schäden (DDR) interagiert PACS2 im Cytoplasma mit der Serin/Threonin-Kinase (ATM). ATM aktiviert den I $\kappa$ B $\alpha$ -NF- $\kappa$ B-Signalweg und induziert das anti-apoptotische Bcl-xL (oben). pPACS2 inhibiert im Nukleus durch Bindung Sirtuin 1 (SIRT1) und schützt p53 vor Acetylierung (Ac.). An den p21-Promotor gebundenes p53 induziert p21 und den Zellzyklusarrest (unten). (Thomas *et al.*, 2017)

#### 1.4 Das HCC-Mausmodell

Diethylnitrosamin (DEN), auch *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) genannt, ist ein krebserregendes Nitrosamin. Es ist eine gelbe, klare Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 177°C, einer Dichte von 0,95 g·mol<sup>-1</sup> und einer molaren Masse von 102,14 g·mol<sup>-1</sup>. Bereits in den 1960er Jahren war die kanzerogene Wirkung von DEN auf die Leber von Nagetieren wie Ratten, Hamster, Meerschweinchen und Mäuse bekannt (Herrold, 1964). Die Internationale Agentur für Krebsforschung nahm NDEA in die Liste der karzinogenen Stoffe auf, da seine krebsauslösende Wirkung in allen getesteten Spezies nachgewiesen war. NDEA erhielt, trotz fehlender epidemiologischer Studien, die Klassifikation "wahrscheinlich karzinogen für den Menschen" (Gruppe 2A, Monograph 17, IARC, 1978; Gruppe 1B, KMR-Liste, IFA, 2017). Der Pathologe Farber beschrieb bereits hyperplastische Areale und Knoten und ihre Eigenschaften als Vorstufen des HCCs (Farber, 1976; Solt *et al.*, 1977). Marker für diese preneoplastischen Areale sind  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT), Glutathion-S-Transferase plazentalen Typs (GSTp), Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) sowie die kanalikuläre Adenosin-Triphosphatase (cATPase; Farber E., 1976; Park *et al.*, 2009). Diese können auch chemisch induziert werden, beispielsweise durch DEN. Bereits eine einzige Dosis DEN induziert Leberkrebs (Craddock, 1975). Später wurde DEN genutzt, um die

Wirkung anderer Umweltchemikalien auf die Entstehung von Leberkrebs zu testen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen aufzustellen (Sakata *et al.*, 1983; Pitot *et al.*, 1987).



**Abbildung 7 Entwicklungsstadien der Leberschädigung bis zum Leberkrebs.**

Die gut durchblutete gesunde Leber verändert sich durch kompensatorische Proliferation und zunehmende Bindegewebsbildung (Fibrose) bis zur Nekrose der Leberzellen (Zirrhose). Mit abnehmender Durchblutung und zunehmender Dysplasie entwickeln sich Leberzellkarzinome. (<https://uctclinic.com>)

DEN ist Initiator eines mehrstufigen Prozesses an dessen Ende das HCC steht (Abbildung 7; Pitot *et al.*, 1987; Kato *et al.*, 1993). So ist bereits die Gabe einer niedrigen Dosis von 10 mg DEN·kg<sup>-1</sup> Körpergewicht kanzerogen. Eine Hochdosis von 150 mg DEN·kg<sup>-1</sup> Körpergewicht hat zusätzlich eine nekrotische Wirkung und führt zur kompensatorischen Proliferation der Leberzellen (Fausto, 1999; Kato *et al.*, 1993; Ying *et al.*, 1981).

Aufgrund des nahezu identischen Genexpressionsmusters zwischen DEN-induzierten HCCs in Mäusen und humanen HCCs Unterklasse A mit schlechter Prognose (nach Lee *et al.*, 2004), ist die Gabe von DEN ein geeignetes Modell um die Bedeutung von PACS2 auf die Leberkrebsentstehung beim Menschen zu untersuchen.

## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Bedeutung des Proteins PACS2 bei der Entstehung und Progression des HCC. Dabei sollte das Protein sowohl bei der akuten sowie chronischen Leberschädigung, chemisch-induziert durch das kanzerogene Nitrosamin DEN, in seiner Wirkungsweise untersucht werden. Anhand eines Mausmodelles sollten die Analysen in einem bestehenden Organismus durchgeführt werden. Des Weiteren diente die Entwicklung und Analyse von Lebertumoren im Mausmodell zur Erforschung der Bedeutung von PACS2 für die Entwicklung des HCC. Zusätzlich diente die Behandlung der murinen Hepatomazelllinie Hepalclc7 mit chemischen Stressoren zur Untersuchung der Rolle von PACS2 in der Leberschädigung. Nach ausführlicher Analyse des PACS2-Proteins soll eine mögliche Anwendung der Erkenntnisse für die zukünftige Prävention sowie Therapie des HCCs diskutiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Chemikalien

Allgemein verwendete Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1 Allgemeine Chemikalien**

Produktname	Produktnummer	Hersteller
Agarose	16500500	Invitrogen
Aqua ad injectabilia	2000352	B. Braun Melsungen
Borsäure	B0394	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	B3269	Sigma-Aldrich
BSA	9998	Cell Signaling
$\beta$ -Mercaptoethanol	63689	Sigma-Aldrich
DTT	43815	Fluka/ Sigma-Aldrich
EDTA	E5134	Sigma-Aldrich
Ethanol	8006	J.T.Baker
Ethanol	10002723003	Th. Geyer
Formaldehyd-Lösung	200-001-00-S	Fisher Scientific
Glycin	G8898	Sigma-Aldrich
Glycerol	G8773	Sigma-Aldrich
HCl (37%)	1.09057.1000	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	216763	Sigma-Aldrich
Isopropanol	8067	J.T.Baker
D-Mannitol	M4125	Fluka/ Sigma-Aldrich
Methanol	8045	J.T.Baker
NaCl	71376	Sigma-Aldrich
NaCl 0,9%	2000511	B. Braun Melsungen
NaOH	1.06482.1000	Merck
Natriumcitrat	S1804	Sigma-Aldrich
PBS (10x)	14200-083	Gibco Life Technologies
Proteinase K	1.24568.0500	Merck
SDS	75746	Sigma-Aldrich

Produktname	Produktnummer	Hersteller
Sucrose	S9378	Sigma-Aldrich
Tris Base	15504-020	Invitrogen Life Technologies
Triton X	T8787	Sigma-Aldrich
Trockenmilch	9999	Cell Signaling
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> O	Milli-Q-System	Merck Millipore
GelStar Nucleic Acid Gelstain	50535	Lonza

## 2.2 Mäuse

Für diese Studien wurden B6;129Sv-PACS2<sup>tm1</sup>-Mäuse (Aslan *et al.*, 2009) verwendet. Die heterozygoten PACS2<sup>+/-</sup>-Mäuse wurden von Gary Thomas (Vollum Institute, Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA) zur Verfügung gestellt. Es wurden heterozygote PACS2-Tiere verwendet um homozygote Wildtyp- sowie Knockout-Eltern zu generieren. Wurfgeschwister dieser homozygoten Eltern wurden für die Versuche verwendet. Weitere Zuchttiere wurden jeweils wieder von heterozygoten Großeltern gewonnen, sodass keine Segregation zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren entstehen konnte.

Alle Tiere wurden bei konstanter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden mindestens wöchentlich begutachtet.

Soweit nicht anders angegeben erhielten alle Tiere 4 Tage vor der Probengewinnung (+)-5-Bromo-2'-deoxy-uridin (BrdU; #39073, Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 0,8 mg·ml<sup>-1</sup> im Trinkwasser.

## 2.3 Tierexperimentelle Methoden

Die Haltung der Tiere sowie die durchgeführten Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover sowie dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt.

### 2.3.1 Behandlung mit Diethylnitrosamin (DEN)

DEN-behandelte Tiere erhielten am 15. Tag nach Geburt eine intraperitoneale (*i.p.*) Injektion von  $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht DEN (#N0258, Sigma-Aldrich), verdünnt 1:10 in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS). Kontrolltiere erhielten keine Injektion. Zur Beobachtung der akuten Leberschädigung wurden die Tiere 0, 24, 48 und 72 Stunden sowie 10 Tage nach Injektion getötet (keine BrdU-Gabe). Zur Beobachtung langfristiger Leberschäden und der Tumorentstehung wurden die Tiere nach 4, 8 und 12 Monaten getötet.

Als Hochdosis erhielten 8 Wochen alte Männchen eine Injektion *i.p.* von  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht DEN unverdünnt. Die Tiere wurden 0 h (keine DEN-Injektion, Kontrollen), 4 h, 24 h, 72 h und 10 Tage nach Behandlung getötet. 2 Stunden zuvor erhielten alle Tiere eine BrdU-Injektion *i.p.* von  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  in PBS.

Jede Versuchsgruppe bestand aus mindestens 4 und maximal 10 Tieren.

### 2.3.2 Behandlung mit dem CD95-Antikörper Jo2

Acht Wochen alte Weibchen (mit DEN-Behandlung bzw. Kontrolltiere) erhielten eine Injektion *i.p.* von  $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht Jo2 (#554254, BD Pharmingen; letale Dosis), aufgenommen in einem Volumen von 150  $\mu\text{l}$  PBS. Die Tiere wurden 0 h (keine Jo2-Injektion), 2 h und 24 h nach Injektion bzw. moribund (unter sehr engmaschiger Überwachung, kurz vor dem Versterben) getötet (keine BrdU-Gabe).

Eine nicht-letale Dosis von  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht wurde in 5 Wochen alte männliche Tiere *i.p.* injiziert (3 Wochen nach initialer DEN-Injektion). Im Abstand von je 3 Wochen wurde die Jo2-Injektion 5 mal wiederholt. Die Tiere wurden langfristig beobachtet, auf Tumorentstehung geprüft und dazu 8 Monate nach der Injektion mit DEN getötet.

### 2.3.3 Leberteileresektion

Acht Wochen alte weibliche Tiere wurden morgens zwischen 8 und 10 Uhr auf einer Wärmematte bei  $37^\circ\text{C}$  operiert. Die Betäubung erfolgte mittels  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht Ketanest S (Pfizer) und  $16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht Xylazin (Rompun 2% Injektionslösung Bayer Healthcare) als subkutane Injektion. Es erfolgte eine mediane Laparotomie und mit Hilfe chirurgischer Ligaturen wurden die 3 größten Leberlappen (70% der Leber) so nah wie

möglich an den portalen Gefäßen abgeschnürt und entfernt. Anschließend wurde der Bauchraum zweischichtig verschlossen. Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen warm gehalten und engmaschig überwacht. 37 Stunden bzw. 1 Woche nach Leberteileresektion wurden die Tiere nach vorangegangener BrdU-Injektion getötet.

#### 2.3.4 Isolierung von Hepatozyten und Zellzyklus-Messung mittels Propidiumiodid-Färbung

Vier Monate alte männliche Tiere wurden anästhesiert, der Bauchraum geöffnet und die Leber über die Portalvene perfundiert. Zuerst erfolgte eine Spülung mit EBSS (Earle's balanced salt solution, #14155 Gibco Life Technologies) ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 0,5 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, #E4378, Sigma-Aldrich). Danach erfolgte eine Spülung mit EBSS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (#24010, Gibco Life Technologies) mit 10 mM Hepes pH 7,4 (#H0887, Sigma-Aldrich). Anschließend wurden der zweiten Spüllösung 0,04  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Trypsin Inhibitor (#T9128, Sigma-Aldrich) und 0,05  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Liberase (#05401127001, Roche) zugegeben. Sobald sich die Leberstruktur aufzulösen begann, wurde die Leber mit Hilfe von Pinzetten in der Spüllösung zerrissen. Die Zellsuspension wurde durch ein 100  $\mu\text{m}$  Nylonsieb gefiltert und mit ca. 40 ml Williams E-Medium (#32551, Gibco Life Technologies) in ein Falcon Tube überführt. Durch Zentrifugieren für 5 min mit 0,5 g wurden die Hepatozyten pelletiert, anschließend in PBS resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde, abhängig von der Gesamtzellmenge, so verdünnt bzw. konzentriert, dass  $1 \times 10^6$  Zellen in 300  $\mu\text{l}$  PBS enthalten waren. Dazu wurden 700  $\mu\text{l}$  tiefgekühltes Ethanol gegeben, sodass die Zellen in einer 70%-igen Ethanollösung 1 h bei 4°C inkubiert wurden. Nach einer Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS wurde erneut für 5 min mit 0,5 g zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Zellpellet in 1 ml PBS erfolgte ein RNA-Verdau durch Zugabe von 50  $\mu\text{g}$  RNase (#11119915001, Roche) und einer Inkubation von 30 min bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurden 50  $\mu\text{g}$  Propidiumiodid zugegeben. Die Zellzyklus-Messung wurde am LSR II (BD Biosciences), einem Durchflusszytometer, durchgeführt. Die Datenerfassung erfolgte mit der FACSDiva™ Software, die Auswertung mit Hilfe der FlowJo Software (Tree Star).

### 2.3.5 Isolierung von Immunzellen

Acht Wochen alte männliche Tiere wurden anästhesiert und der Bauchraum geöffnet. Über die Portalvene wurde die Leber mit PBS mit 2% FBS (Fetales Kälberserum, FBS Gold #A15-751, PAA Laboratories/GE Healthcare) perfundiert. Nach Entnahme der Leber und Entfernen der Gallenblase wurde das Lebergewebe mit dem Stempel einer 5 ml-Spritze zerdrückt. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Nylonsieb filtriert und in ein Falcon Tube überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 7 min bei 290 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml 40% Percoll (#P1644, Sigma-Aldrich) aufgenommen. Die Percoll-Zellsuspension wurde vorsichtig auf 5 ml 80% Percoll pipettiert. Zur Einstellung des Percollgradienten wurde 20 min bei 800 g bei 4°C (ohne Bremse) zentrifugiert. So entstanden 3 übereinanderliegende Schichten. Die oberste, Fette und Zellrückstände enthaltende Schicht wurde mit Hilfe einer Pipette entfernt und verworfen. Die mittlere Schicht, ein schmaler Ring aus Leukozyten und roten Blutkörperchen, wurde großzügig abgenommen und in ein neues Falcon Tube überführt. Zum Waschen wurde diese Schicht in 10 ml PBS mit FBS aufgenommen und 7 min bei 4°C mit 1500 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml 1:10-verdünntem Lysepuffer für rote Blutkörperchen (BD Biosciences) resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml PBS mit FBS wurde nochmals 7 min bei 4°C mit 1700 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl PBS mit FBS resuspendiert und zum Blockieren von Fc-Membranrezeptoren in einer Verdünnung von 1:100 mit CD16/32-Antikörper (eBioscience) für 15 min bei 4°C inkubiert. Nun wurden die Proben in eine 96-Well-Platte überführt, je Probe wurden mindestens 4 Wells belegt: Je 1 Well für die ungefärbte Probe, sowie die spätere Färbung von T-Lymphozyten (T-Zellen), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen. Zusätzliche Wells wurden belegt für Einzelfärbungen bzw. Färbemixansätze. Die Platte wurde für 5 min bei 4°C mit 1200 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit Hilfe fluoreszierender Antikörper (AK) für 20 min bei 4°C (Tabelle 2). Danach wurden die Zellen bei 4°C mit 1200 g zentrifugiert und 2 mal mit 100 µl PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert und zur Messung am LSR II in einem Volumen von 200 µl PBS in FACS-Röhrchen überführt.

**Tabelle 2 Fluoreszenz-Antikörper zur Färbung von Immunzellen zur FACS-Analyse**

AK gegen	AK-gerichtetes Antigen	Fluorochrom	Menge/Probe	Hersteller
Immunzellen (T-Zellen)	CD45	PE	0,6 µl	eBioscience

AK gegen	AK-gerichtetes Antigen	Fluorochrom	Menge/Probe	Hersteller
T-Zellen	CD3	PB	2 µl	eBioscience
T-Zellen	CD4	APC	0,5 µl	eBioscience
T-Zellen	CD8	FITC	1 µl	eBioscience
Immunzellen (NK-Zellen)	CD45	FITC	1,25 µl	eBioscience
NK-Zellen	CD3	PB	2 µl	eBioscience
NK-Zellen	NK1.1	PerCP-Cy5.5	1,5 µl	eBioscience
NK-Zellen	CD19	APC	2 µl	eBioscience
Makrophagen	CD115	PE	0,6 µl	eBioscience
Makrophagen	CD11b	PB	0,5 µl	eBioscience
Dendritische Zellen (Makrophagen)	CD11c	PE-Cy7	1 µl	eBioscience
Neutrophile (Makrophagen)	Ly6G/Gr.1	PerCP-Cy5.5	1,5 µl	Biolegend
Monozyten (Makrophagen)	Ly6C	FITC	0,5 µl	Biolegend

(APC = Allylphycocyanin, Anregungswellenlänge (Ex) 650 nm, Emissionswellenlänge (Em) 660 nm; FITC = Fluorescein, Ex 495, Em 519; PB = Pacific Blue, Ex 403, Em 455; PE = R-Phycoerythrin, Ex 480/565, Em 578; PE-Cy7 Ex 480/565/743, Em 767; PerCP-Cy5.5 = Peridinin chlorophyll protein TruRed, Ex 490/675, Em 695)

### 2.3.6 Isolierung von leberspezifischen Stammzellen/ Ovalzellen

Jungtieren wurde 0, 24, 48 oder 72 Stunden nach DEN-Injektion die Leber entnommen. Dabei wurden die Lebern von 2-4 Männchen bzw. Weibchen eines Wurfes zu einer Probe zusammengefasst. Die Lebern wurden in kaltem PBS in einer Petrischale mit Hilfe von Pinzetten in kleine Stücken gerissen, durch ein 40 µm Nygonsieb gefiltert und in ein Falcon Tube überführt und auf Eis ruhen gelassen (1. Fraktion). Der Siebinhalt wurde für 20 min bei 37°C in einer Petrischale in 5ml EBSS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> und 2,5 mg·ml<sup>-1</sup> Collagenase D (#5001740, Roche) inkubiert (2. Fraktion). Danach wurde der Inhalt der Petrischale mehrmals mit einer Pipette zur Vereinzelnung der Zellen aufgezogen, durch ein neues Sieb in das auf Eis ruhende Falcon Tube überführt und die Zellsuspension 10 min bei 4°C mit 400 g zentrifugiert, das Pellet anschließend in kaltem DMEM (#41965; Gibco Life Technologies) mit 10% FBS resuspendiert. Der im Sieb verbliebene Inhalt wurde in 5 ml Accutase (#00-4555-56, eBioscience) nochmals 20 min bei 37°C inkubiert (3. Fraktion). Nach erfolgtem Verdau wurde der Inhalt der Petrischale nochmals durch ein Sieb filtriert und in ein

Falcon Tube überführt, 10 min bei 4°C mit 400 g zentrifugiert und das Pellet in kaltem DMEM mit FBS aufgenommen und zu den auf Eis ruhenden Fraktionen gegeben. Die nun vollständige Zellsuspension wurde 2 min bei 500 g zentrifugiert um Hepatozyten zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Falcon Tube überführt und 10 min bei 4°C mit 400 g zentrifugiert. Zur Lyse der roten Blutkörperchen wurde das Zellpellet 1 min mit 2 ml kalter, 0,2%-iger NaCl-Lösung inkubiert, danach mit 2 ml 1,6%-iger NaCl-Lösung sowie mit 4 ml DMEM mit FBS vermischt und 10 min bei 4°C mit 400 g zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 10 ml 35%-igem Percoll resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 min mit 900 g zentrifugiert. Der oben abgesetzte Ring mit Zellrückständen und möglichst das gesamte Percoll wurde abgenommen, das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen und 7 min bei 4°C mit 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl PBS mit 2% FBS und dem CD16/32-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 für 15 min auf Eis inkubiert und nachfolgend in eine 96-Well-Platte überführt. Dafür wurde je Probe je 1 Well für die ungefärbte und die gefärbte Zelllösung benötigt sowie weitere Wells für Einfachfärbungen verwendet. Nach Zentrifugieren der Platte für 7 min bei 4°C mit 300 g wurden die Zellen in 100 µl des Färbeansatzes (Tabelle 3) bzw. PBS mit FBS für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 7 min bei 4°C mit 300 g zentrifugiert. Durch Aufnahme in 100 µl PBS mit FBS wurden die Zellen gewaschen, nochmals 7 min bei 4°C mit 300 g zentrifugiert und anschließend in einem Volumen von ca. 300 µl PBS mit FBS aufgenommen und in FACS-Tubes überführt und am LSR II gemessen.

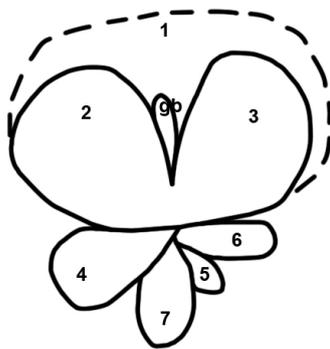
**Tabelle 3 Fluoreszenz-Antikörper zur Färbung von Ovalzellen zur FACS-Analyse**

AK-gerichtetes Antigen	Fluorochrom	Menge/Probe	Hersteller
CD45.2	FITC	2 µl	BD Bioscience
CD26	PE-Cy5.5	2 µl	eBioscience
CD11b	FITC	1 µl	eBioscience
MIC1-Ac3	APC	3,75 µl	zur Verfügung gestellt von M. Grompe, Oregon Health & Science University, USA
CD31	FITC	2 µl	eBioscience
CD133	PE	2 µl	eBioscience
TER119	FITC	2 µl	eBioscience

(APC = Allylphycocyanin, Anregungswellenlänge (Ex) 650 nm, Emissionswellenlänge (Em) 660 nm; FITC = Fluorescein, Ex 495, Em 519; PE = R-Phycoerythrin, Ex 480/565, Em 578)

### 2.3.7 Probengewinnung und Blutplasmamessung

Zur Probengewinnung wurden die Mäuse mit  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht Ketanest und  $16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht Xylazin anästhesiert. Soweit nicht anders beschrieben wurde der Bauchraum geöffnet und die Leber über die Portalvene mit Hilfe einer Venenverweilkanüle punktiert. Nach Entnahme von Blut aus der Kanüle und Überführung in ein Heparin-Röhrchen wurde die Leber mit 0,9%-iger NaCl-Lösung perfundiert und vollständig entnommen. Nach Entfernen der Gallenblase wurde die Leber nach Lappen getrennt (Abbildung 8) und stets auf die gleiche Weise verwahrt. Lappen 1 wurde geteilt, eine Hälfte wurde in Formalin gespült und für spätere histologische Auswertung in Paraffin gebettet. Die zweite Hälfte des Lappens 1 wurde wie auch die Lappen 2, 3 sowie 5-7 in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Lappen 4 wurde in Tissue Tec O.C.T. Compound (#4583, Sakura Finetek) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.



**Abbildung 8 Schema der Leber einer Maus.**

1-7 = Nummerierung der Leberlappen, gb = Gallenblase

Zur Gewinnung des Plasma wurde das Blut 3 min mit  $9000 \text{ g}$  zentrifugiert und der Überstand in einem Eppendorf-Gefäß bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Bestimmung von Bilirubin, Glukose sowie den Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) erfolgte in einem Olympus AU 400.

### 2.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde bei allen Mäusen durchgeführt, sowohl für die Zucht als auch zur Überprüfung des Genotypes aller experimentell verwendeter Tiere.

#### 2.4.1 DNA-Isolierung aus Mausschwänzen

Ein 2-3 mm langes Stück Schwanz wurde über Nacht bei 56°C in einem Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,2, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA) mit 2% SDS und 50U·ml<sup>-1</sup> Proteinase K inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde gesättigtes NaCl zu dem Lysat gegeben und 10 min mit 15500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, Isopropanol enthaltendes Eppendorf-Gefäß überführt, mehrfach invertiert und nochmals 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanol wurde das Pellet vollständig getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) für 1 h bei 50°C gelöst.

#### 2.4.2 Genotypisierung von PACS2-Mäusen

Verwendete Primer:

PACS2 forward primer 5'- TGG AGT CTG AGG TTG AGG CCT TGA G -3'

PACS2 reverse primer 5'- ATG CAT ACC TGC CCT TAG CAG AGG -3'

PACS2 B-geo-vector 5'- ATG GCG TTA CTT AAG CTA GCT TGC -3'

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die aus den Schwänzen gewonnene DNA mittels PACS2-spezifischer Primer amplifiziert. Der Probenansatz ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4 PCR-Ansatz für PACS2-Genotypisierung**

µl	Reagenz	Endkonzentration	Hersteller
2	DNA		
10	5xPuffer	1x	#M791A, Promega
3	dNTPs 2 mM	0,1 mM	#GC-013-006/7/8/9, Gene Craft Ares Bioscience
1	Primer PACS2 for	200 nM	Eurofins MWG Operon
1	Primer PACS2 rev	200 nM	Eurofins MWG Operon
1	Primer B-geo vector	200 nM	Eurofins MWG Operon
0,4	Taq Polymerase	1,5 U	#M791A, Promega
31,6	H <sub>2</sub> O		#2000352, B.Braun Melsungen

Die PCR wurde in einem Mastercycler ep gradient von Eppendorf wie folgt durchgeführt: Die initiale Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95°C. Es wurden 34 Zyklen mit einer Denaturierung für 30 s bei 94°C, einer Annealingphase von 30 s bei 60°C und einer Extension für 1 min bei 72°C durchgeführt. Die finale Extension erfolgte für 7 min bei 72°C, anschließend wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aus 0,5% TBE-Puffer (44,5 mM Tris/HCl pH 8,3, 44,5 mM Borsäure, 1 mM EDTA) mit 3 µl Gel Star Gelstain/150 ml Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 40 min bei 180 V in einer Bio-Rad Elektrophoresekammer mit Hilfe eines Bio-Rad Electrophoresis Power Supply. Die PCR-Produkte haben eine Größe von 881 bp für PACS2<sup>+/+</sup> bzw. 700 bp für PACS2<sup>-/-</sup>.

## 2.5 Immunhistochemie

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter dem Mikroskop betrachtet und es wurden je mindestens 10 Fotos aufgenommen, wovon mindestens 4 repräsentative Aufnahmen zur Analyse herangezogen wurden. Fluoreszenz-gekoppelte Färbungen wurden einem Fluoreszenz-Mikroskop (BX51 mit XC50-Kamera und Cell F 3.4 Software, Olympus) und nicht-Fluoreszenz-gekoppelte Färbungen mit einem Lichtmikroskop (AX10 mit AxioCam MRm-Kamera und AxioVision 4.8 Software, Zeiss) mit je 200 x Vergrößerung aufgenommen.

### 2.5.1 Allgemeine Chemikalien für die Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurden neben den spezifischen Antikörpern die in Tabelle 5 aufgeführten Chemikalien verwendet.

**Tabelle 5 Chemikalien für die Immunhistochemie**

Produktname	Produktnummer	Hersteller
AEC Histostain-SP Kit	95-9943	Invitrogen Life Technologies
Avidin/Biotin	SP-2001	Vector Laboratories
Faramount Aqueous mounting Medium	S3025	Dako
HRP-Streptavidin Plus	50-420Z	Zymed Life Technologies
M.O.M. Immunodetection Kit	PK-2200	Vector Laboratories

Produktname	Produktnummer	Hersteller
Mounting Medium with DAPI	H-1200	Vector Laboratories
Pap Pen		Kisker Biotech
Pferdeserum	S-2000	Vector Laboratories
Weigert's Eisenhämatoxylin	1.09249.2500	Merck
Xylol	8080	J.T.Baker
Ziegenserum	S-1000	Vector Laboratories

### 2.5.2 Hämatoxylin-Eosin- (H&E) Färbung

Paraffinschnitte von 5 µm wurden durch Waschen in Xylol, 100% Ethanol und Rehydrierung in 96% Ethanol, 70% Ethanol und deionisiertem Wasser deparaffiniert. Anschließend erfolgte die Färbung der Kerne für 15 s in Hämatoxylin. Nach gründlichem Waschen mit warmem Wasser erfolgte die Färbung des Zytoplasmas durch Tauchen in Eosin (#HT11.0232, Sigma-Aldrich) für 2 min. Nach dem Waschen mit Wasser wurden die Schnitte in einer Reihe von 70%, 96% und 100% Ethanol sowie Xylol dehydriert und mit Xylol-basiertem Eindeckmedium Entellan (#1.07961.0100, Merck Millipore) eingedeckt und über Nacht getrocknet.

### 2.5.3 Ki67-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden wie unter 2.5.2 beschrieben deparaffiniert. In einem 96°C-heißen Wasserbad wurden die Schnitte 45 min in EDTA-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,05% Tween 20) gekocht und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Waschen in destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) wurden durch Inkubation in 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endogene Peroxidasen blockiert und die Schnitte anschließend nochmals mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit Avidin und Biotin. Zwischen allen Schritten erfolgte, soweit nicht anders angegeben, das Waschen der Schnitte in PBS mit 0,1% Tween 20 (PBST). Nun folgte die Inkubation mit 5% Ziegenserum in PBST für 30 min. Nach Abklopfen der Flüssigkeit wurden die Schnitte mit dem Ki67-Antikörper (#VP-K451, Vector Laboratories) 1:1000-1:500 in PBST mit 2% Ziegenserum bei 4°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte mit dem 2. AK anti-rabbit IgG (#B2770, Invitrogen Life Technologies) 1:1000 in PBST und anschließend mit HRP-Streptavidin inkubiert. Danach erfolgte die Farbentwicklung mit dem AEC-Kit unter Beobachtung am Mikroskop. Die Reaktion wurde

durch Waschen in dH<sub>2</sub>O gestoppt, die Schnitte durch kurzes Tauchen in Hämatoxylin gegengefärbt und abschließend in warmem Wasser gründlich gespült. Zum Eindecken wurde ein Medium auf Wasserbasis verwendet.

#### 2.5.4 BrdU-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden wie unter 2.5.2 beschrieben deparaffiniert. Die Schnitte wurden für 35 min bei ca. 98°C in Citratpuffer (10 mM Natriumcitrat, 0,05% Tween 20, pH 6.0) gekocht und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach kurzem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für 1 h in 2N HCl bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Inkubation in 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und nachfolgendem Waschen in dH<sub>2</sub>O erfolgte eine Inkubation in PBST mit 10% Ziegen Serum. Nach Abklopfen der Flüssigkeit inkubierten die Schnitte mit dem BrdU-Antikörper (#RPN202, GE Healthcare) 1:200 in PBST mit 5% Ziegen Serum bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag folgte die Inkubation mit dem 2. AK anti-mouse IgG (#B2763, Invitrogen Life Technologies) 1:200 in PBST mit 5% Ziegen Serum. Von nun an wurden zwischen den einzelnen Schritten eine Waschung mit PBST vorgenommen. Nach Inkubation mit HRP-Streptavidin erfolgte die Farbentwicklung mit Hilfe des AEC-Kits, welche mit dH<sub>2</sub>O gestoppt wurde. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, gut in warmem Wasser gespült und mit Eindeckmedium auf Wasserbasis mit Deckgläschen versehen.

#### 2.5.5 $\beta$ -Catenin-Färbung

Die Deparaffinierung wurde, wie unter 2.5.2 beschrieben, durchgeführt. Danach erfolgte die Antigen-Demaskierung im Wasserbad bei 96°C mit einer 1:50 Puffer-Lösung (2 M Tris, 50 mM EDTA, pH 9). Nach Abkühlen der Schnitte bei Raumtemperatur und Waschen in PBS wurden diese in PBS mit 1% BSA inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte kurz mit Proteinkonzentrat aus dem M.O.M Kit 1:8 in PBS inkubiert und nach Abklopfen der Flüssigkeit mit dem  $\beta$ -Catenin-Antikörper (#610153, BD Bioscience) 1:50 in PBS mit 12,5% Proteinkonzentrat bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde nach gründlichem Waschen mit PBS der anti-mouse IgG<sub>1</sub> Alexa Fluor 488-gekoppelte 2. AK (#A11001, Invitrogen Life Technologies) 1:150 in PBS mit 1% BSA auf die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Danach wurden die Schnitte gewaschen, mit DAPI-enthaltendem Eindeckmedium eingedeckt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

### 2.5.6 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-(TUNEL) Färbung

Nach erfolgter Deparaffinierung (siehe 2.5.2) wurden die Peroxidasen mittels 3%-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  geblockt. Danach wurden die Schnitte in  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend in Citratpuffer (10 mM Citronensäure, 0,05% Tween 20, pH 6,0) in der Mikrowelle für 5 min bei 750 W und weitere 15 min bei 150 W gekocht und nachfolgend auf Raumtemperatur abgekühlt. Zwischen allen weiteren Schritten erfolgte jeweils eine Waschung mit PBS. Zur Permeabilisierung des Gewebes wurden die Schnitte mit Proteinase K  $20 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  in PBS inkubiert. Danach erfolgte die Fixierung mit 4%-iger Formaldehydlösung und ein weiterer Permeabilisierungsschritt mit 0,1% Natriumcitrat und 0,1% Triton X in PBS. Die TUNEL-Reaktion erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur mittels der TdT-Enzymlösung 1:10 in einer Fluorescein-dUTP-Markierungslösung (#11684795910, Roche). Die Schnitte wurden mit DAPI-enthaltendem Medium eingedeckt und im Dunkeln bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.5.7 p21-Färbung

Die Schnitte wurden wie in 2.5.2 beschrieben deparaffiniert und im Wasserbad bei ca.  $96^\circ\text{C}$  in Citratpuffer (10 mM Citronensäure, 0,05% Tween 20, pH 6,0) gekocht und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach einem Waschschrift mit  $\text{dH}_2\text{O}$  erfolgte die Inkubation mit Avidin und anschließend Biotin. Zwischen allen Schritten wurde im Weiteren mit PBST gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mit 5% Pferdeserum in PBST inkubiert. Nach Abklopfen der Flüssigkeit erfolgte die Inkubation mit dem p21-Antikörper (#sc-471, Santa Cruz Biotechnology) 1:50 in PBST mit 2% Pferdeserum über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ . Am nächsten Tag folgte die Blockierung der Peroxidasen mit 3%-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 30 min mit einem spezifischen anti-Ziegen-Antikörper (#A10518, Invitrogen Life Technologies) 1:100 in PBST inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit HRP-Streptavidin inkubiert und mit Hilfe des AEC-Kits die Farbentwicklung herbeigeführt und mit  $\text{dH}_2\text{O}$  beendet. Nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin und dem intensiven Waschen mit warmem Wasser wurden die Schnitte mit Wasser-basiertem Medium eingedeckt.

### 2.5.8 $\gamma$ H2Ax-Färbung

Nach der Deparaffinierung der Schnitte wie in 2.5.2 beschrieben, erfolgte die Antigen-Demaskierung mit Citratpuffer (10 mM Natriumcitrat, 0,05% Tween 20, pH 6,0) für 3 min bei 125°C in einem Hochdrucktopf. Nach dem Abkühlen erfolgte das Blockieren der Peroxidasen in 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zwischen allen Schritten wurde mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem  $\gamma$ H2Ax-Antikörper (#05-636, Merck Millipore) erfolgte 1:10.000 in PBS über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem anti-Maus-Zweitantikörper (#B2763, Invitrogen Life Technologies) 1:20.000 in PBS für 30 min. Danach wurden die Schnitte mit HRP-Streptavidin inkubiert. Nach der Farbentwicklung mit dem AEC-Kit wurden die Schnitte in Hämatoxylin getaucht, gut mit warmem Wasser gewaschen und mit wässrigem Medium eingedeckt.

## 2.6 Proteinanalysen

Die hier aufgeführten Analysen beziehen sich auf aus Lebergewebe gewonnene Proteine.

### 2.6.1 Proteinisolierung aus Lebergewebe

Zur Isolierung von Proteinen aus dem Lebergewebe wurden ca. 5 mm große gefrorene Leberstücke in 500  $\mu$ l Lysepuffer (Tabelle 6, Tabelle 7) mittels eines Homogenisators für ca. 10 s zerkleinert. Zum Reduzieren des entstandenen Schaumes wurde das Lysat einige Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

**Tabelle 6 Lysepuffer 5x zur Proteinisolierung**

Reagenz	Endkonzentration	Menge (250 ml)	Produkt-nummer	Hersteller
Hepes, 1 M	250 mM	62,5 ml	H0887	Sigma-Aldrich
KCl, 2 M	250 mM	31,25 ml	P5405	Sigma-Aldrich
NaF	250 mM	2,62 g	S7920	Sigma-Aldrich
NaPPi	25 mM	2,79 g	71501	Fluka
EDTA, 50 mM	5 mM	25 ml	E5134	Sigma-Aldrich

Reagenz	End-konzentration	Menge (250 ml)	Produkt-nummer	Hersteller
EGTA	5 mM	475,5 mg	E4378	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Glycerophosphat	25 mM	1,35 g	G6376	Sigma-Aldrich

(Der Puffer wurde mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf 250 ml aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.)

**Tabelle 7 Lysepuffer 1x zur Proteinisolierung**

Reagenz	End-konzentration	Menge (50 ml)	Produkt-nummer	Hersteller
Lysepuffer 5x	1x	10 ml		
DTT, 100 mM	1 mM	500 $\mu$ l	43815	Fluka/ Sigma-Aldrich
Complete, 25x	1x	2 ml	11697498001	Roche
Vanadat, 160 mM	1 mM	312,5 $\mu$ l	S6508	Sigma-Aldrich
NP40	1% (v/v)	500 $\mu$ l	492018	Calbiochem

(Der Puffer wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.)

## 2.6.2 Western Blot Analyse

Zur Proteinanalyse mittels Western Blot wurde eine Konzentrationsmessung der isolierten Proteine durchgeführt. Dazu wurde die Probe 1:2000 in H<sub>2</sub>O (Injektionslösung) verdünnt und 1:5 mit dem Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (#500-0006, Bio-Rad) in Dreifachbestimmung in einem Tecan Sunrise Basic mit Hilfe der Magellan 6-Software gemessen und anhand einer Standardkurve die Proteinkonzentration ermittelt. Die Proben wurden entsprechend ihrer Konzentration auf 10  $\mu$ g· $\mu$ l<sup>-1</sup> mit H<sub>2</sub>O (Injektionslösung) und 4x ESB-Puffer (0,5 M Tris, 40% Glycerol, 12% SDS, 0,08 w/w Bromphenolblau, 20%  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8) eingestellt. Soweit nicht anders angegeben wurden je Probe 100  $\mu$ g Protein eingesetzt.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wurden Acrylamidgele gegossen (Tabelle 8) und nach Auftragen der zuvor 5 min bei 96°C denaturierten Proteinproben sowie eines Proteinstandards (#26616, Fisher Thermo Scientific) erfolgte die Elektrophorese bei 20 mA/Gel für ca. 100 min in einer vertikalen Nass-Kammer (Mini Protein System, Bio-Rad) mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3, 0,1% SDS).

**Tabelle 8 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE**

	Sammelgel	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%
30% Bis-/Acrylamid	1,3 ml	6,6 ml	8 ml	9,9 ml
0,5 M Tris	2,5 ml			
1,5 M Tris		5 ml	5 ml	5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
H <sub>2</sub> O	6 ml	8,2 ml	6,8 ml	4,9 ml
APS	100 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	50 µl	50 µl	50 µl

(30% Acrylamid/Bisacrylamid #161-0158, Bio-Rad; APS #9592.3, Carl Roth; TEMED #T9281, Sigma-Aldrich)

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Immuno-Blot PVDF-Membran (#162-0177, Bio-Rad) erfolgte eingebettet in Whatman Paper (#3017-915, GE Healthcare) in einer Kammer (Mini-Protean, Bio-Rad) mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3) für 1 h bei 100 V. Danach wurden die Membranen 20 min mit 5% Trockenmilch (TM) in TBS-T-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (Tabelle 9) erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler.

**Tabelle 9 Antikörper für Western Blot Analysen**

Antikörper	MW	Konzentration	Medium	2. AK	#	Hersteller
4E-BP1	15-20 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9452	Cell Signaling
Akt	60 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9272	Cell Signaling
AMPK	70 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	2532	Cell Signaling
Bax	23 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	sc-493	Santa Cruz Biotechnologies
Bcl-x <sub>L</sub>	26 kDa	1:1000	5% TM	α-rat	610211	BD Biosciences
Bid	23 kDa	1:2000	5% TM	α-goat	AF860	R&D Systems
Caspase 8	18/55 kDa	1:1000	5% TM	α-rat	ALX-804-447	Alexis/ Enzo Life Sciences
Caspase 9	49 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9504	Cell Signaling
cFlip	28/58 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	AAP-440	Stressgen/ Gentaur Molecular Products

Antikörper	MW	Konzentration	Medium	2. AK	#	Hersteller
cIAP <sub>1</sub>	72 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	ab2399	Abcam
cJun	43/48 kDa	1:500	5% BSA	α-rabbit	9165	Cell Signaling
cleaved Caspase 3	17/19 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9661	Cell Signaling
Cyclin D <sub>1</sub>	37 kDa	1:500	5% BSA	α-rabbit	sc-718	Santa Cruz Biotechnologies
Cytochrom C	12 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	sc-7159	Santa Cruz Biotechnologies
ERK	42 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	4695	Cell Signaling
Flip <sub>1/s</sub>	32/59 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	3210	Cell Signaling
GAPDH	38 kDa	1:3000	5% TM	α-mouse	sc-32233	Santa Cruz Biotechnologies
HO <sub>1</sub>	30 kDa	1:750	5% TM	α-rabbit	ADI-SPA-896F	Enzo Life Sciences
IκB <sub>α</sub>	35 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	sc-847	Santa Cruz Biotechnologies
IκB <sub>β</sub>	30 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	sc-969	Santa Cruz Biotechnologies
LC3	500 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	14600-1-AP	Proteintech
Mcl <sub>1</sub>	40 kDa	1:1000	5% TM	α-mouse	559027	BD Biosciences
NQO1	30 kDa	1:1000	5% TM	α-goat	ab2346	Abcam
p21	21 kDa	1:500	2% TM	α-goat	sc-471	Santa Cruz Biotechnologies
p38	43 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9212	Cell Signaling
p-4E-BP1	15-20 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	2855	Cell Signaling
p53	53 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	sc-6243	Santa Cruz Biotechnologies
PACS2 (Q20)	98 kDa	1:500	5% TM	α-goat	sc-160645	Santa Cruz Biotechnologies
PACS2	98 kDa	1:200	5% TM	α-rabbit	19506-1-AP	Proteintech
p-Akt (Thr 308)	60 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	2965	Cell Signaling
p-Akt (Ser 473)	60 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	4060	Cell Signaling
p-AMPK	70 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	2535	Cell Signaling

Antikörper	MW	Konzentration	Medium	2. AK	#	Hersteller
p-cJun	43 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9261	Cell Signaling
p-Erk	42 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	4376	Cell Signaling
p-p38	43 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9215	Cell Signaling
p-S6	32 kDa	1:2000	5% BSA	α-rabbit	2215	Cell Signaling
p-SAPK/ JNK	46 kDa	1:500	5% BSA	α-rabbit	9251	Cell Signaling
p-Stat3 (Ser 727)	80 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9134	Cell Signaling
p-Stat3 (Y 705)	80 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9131	Cell Signaling
Sesn2	62 kDa	1:1000	5% TM	α-rabbit	10795- 1-AP	Proteintech
Stat3	80 kDa	1:1000	5% BSA	α-rabbit	9139	Cell Signaling
anti-goat		1:3000	5% TM		sc-2020	Santa Cruz Biotechnologies
anti-mouse		1:3000	5% TM		sc-2005	Santa Cruz Biotechnologies
anti-rabbit		1:3000	5% TM		7074	Cell Signaling
anti-rat		1:3000	5% TM		sc-2006	Santa Cruz Biotechnologies

Nach gründlichem Waschen mit TBS-T erfolgte am nächsten Tag die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Membranen nochmals gewaschen, für 1 min mit Western Lightning ECL-Lösung (#NEL101001EA, Perkin Elmer) inkubiert und aufgenommen mit dem Fusion FX7 Chemilumineszenzsystem (Peqlab) und der dazugehörigen Software. Teilweise wurden die Membranen anschließend ca. 1 h mit TBS-T gewaschen und über Nacht mit einem weiteren Antikörper inkubiert.

### 2.6.3 Immunologischer Nachweis von Caspasen in Lebergewebe

Für den Nachweis von Caspasen wurde je ein ca. 3 mm großes Stück Lebergewebe in 300 µl Cell Lysis Buffer (#559759, BD Biosciences) mit einem Homogenisator zerkleinert, bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde 1:5 mit Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent in einem Tecan Sunrise Basic bestimmt. Für das Assay wurden die Proben auf eine

Proteinkonzentration von  $50 \mu\text{g} \cdot 10 \mu\text{l}^{-1}$  eingestellt. In eine 96-Well-Platte mit schwarzem Boden wurden je Probe in 4 Wells  $50 \mu\text{g}$  Protein vorgelegt (Triplikate und 1 Kontrolle) und dazu  $200 \mu\text{l}$  des jeweiligen Assay-Puffers (Tabelle 10 und Tabelle 11),  $5 \mu\text{l}$  Substrat sowie in je das erste der 4 Wells  $5 \mu\text{l}$  Caspase-Inhibitor pipettiert. Die Platte wurde 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend im SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices) mit Hilfe der zugehörigen Software die Caspase-Aktivität gemessen.

**Tabelle 10 Reagenzien für das Caspase 3 Assay**

Assay-Puffer	Caspase-Substrat	Caspase-Inhibitor
$200 \mu\text{l}$ Puffer pH 7,4	$5 \mu\text{l}$ Substrat	+/- $5 \mu\text{l}$ Caspase-Inhibitor
40 mM HEPES	#556449, BD Biosciences	#556465, BD Biosciences
20% Glycerol		
4 mM DTT		

**Tabelle 11 Reagenzien für das Caspase 8 Assay**

Assay-Puffer	Caspase-Substrat	Caspase-Inhibitor
$200 \mu\text{l}$ Puffer pH 7,2	$5 \mu\text{l}$ Substrat	+/- $5 \mu\text{l}$ Caspase-Inhibitor
20 mM Pipes #P3768, Sigma-Aldrich	#556552, BD Biosciences	#556554, BD Biosciences
100 mM NaCl		
10 mM DTT		
1 mM EDTA		
0,1% CHAPS #C3023, Sigma-Aldrich		
10% Sucrose #S9378, Sigma-Aldrich		

## 2.7 Genexpressionsanalysen

Zur Analyse der Genexpression wurden, wie nachfolgend beschrieben, semiquantitative Polymerasekettenreaktionen durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Lebergewebe isoliert und in cDNA umgeschrieben.

### 2.7.1 RNA-Isolierung aus Lebergewebe

Es wurde ein kleines Stück Leber von 20-30 mg mit Hilfe eines Homogenisators in 350 µl Puffer zerkleinert und die RNA nach allen Anweisungen des NucleoSpin RNA II-Protokolls (#740955.50, Macherey-Nagel) isoliert. Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte am Spektrophotometer NanoDrop-1000 (Peqlab).

### 2.7.2 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde das Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (#05081955001, Roche) verwendet, in dem alle erforderlichen Reagenzien enthalten sind. Je Probe wurde 1 µg RNA eingesetzt und mit 1 µl Oligo dT und RNase-freiem H<sub>2</sub>O (20 µl Ansatz abzüglich Mastermix, Oligo dT und RNA) 10 min in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt und der Mastermix (4 µl Puffer, 2 µl dNTPs, 1 µl DTT, 1,1 µl Reverse Transkriptase, 0,5 µl RNase-Inhibitor) zugegeben. Die Proben wurden 30 min bei 55°C und anschließend 5 min bei 85°C inkubiert. Die cDNA wurde auf Eis gekühlt und die cDNA-Konzentration am Spektrophotometer NanoDrop-1000 (Peqlab) gemessen.

### 2.7.3 Semi-quantitative Polymerasekettenreaktion (sqPCR)

Zur Quantifizierung der Genexpression mittels PCR wurden die Proben auf eine cDNA-Konzentration von 0,5 µg/µl mit H<sub>2</sub>O (Injektionslösung) eingestellt. Dabei wurden entweder Einzelproben oder Probenpools aus 4 Tieren/Gruppe verwendet. Es wurde die Go Taq Polymerase von Promega mit dem zugehörigen 5x Puffer (#M791A) mit dem in Tabelle 12 dargestellten Probenansatz verwendet.

**Tabelle 12 Probenansatz für semi-quantitative Polymerasekettenreaktion**

Reagenz	Konzentration	eingesetzte Menge
cDNA	0,5 µg/µl	2 µl
Puffer	5x	10 µl
dNTPs	2 mM	4 µl
Vorwärtsprimer	10 µM	2 µl
Rückwärtsprimer	10 µM	2 µl
Polymerase	1x	0,3 µl
H <sub>2</sub> O		29,7 µl

Die PCR wurde in einem Mastercycler ep gradient von Eppendorf stets wie folgt durchgeführt:

Initiale Denaturierung 5 min 95°C

x Zyklen: Denaturierung 30 s 95°C

    Annealing 30 s 60°C

    Extension 40 s 72°C

Finale Extension 10 min 72°C

Die jeweilige Anzahl der Zyklen ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Die PCR-Produkte sowie ein DNA-Standard (SM0383, Fisher Thermo Scientific) wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aus 0,5% TBE-Puffer (44,5 mM Tris/HCl pH 8,3, 44,5 mM Borsäure, 1 mM EDTA) mit 3 µl Gel Star Gelstain/150 ml Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde 35 min bei 180 V in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad) mit Hilfe eines Electrophoresis Power Supply (Bio-Rad) durchgeführt.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13 Primersequenzen und Zyklenanzahl der semi-quantitativen Polymerasekettenreaktion**

Primer	Sequenz	Größe PCR-Produkt	Zyklen
18rsRNA for	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT	180	22
18rsRNA rev	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG		

Primer	Sequenz	Größe PCR-Produkt	Zyklen
ATR for ATR rev	TGC GCT CTG CTA GAG CAC GGT AGT GCT GGC TGG CTG TGC TG	100	30
$\beta$ 2Mg for $\beta$ 2Mg rev	CTG ATA CAT ACG CCT GCA GAG TTA A ATG AAT CTT CAG AGC ATC ATG AT	150	22
$\beta$ -Actin for $\beta$ -Actin rev	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA	220	22
Brcal for Brcal rev	TAC CGG AAC CGT GTC AGA A TGA TCT CAC GAT TCC AAG GTT	100	35
Cdc25A for Cdc25A rev	ACG AGA ATA AAT TCC CTA CC AAA TTT CCT GAT TCA CTT TC	256	35
Chk2 for Chk2 rev	CTC GGC TAT GGG CTC TTC AG CTT CTC AAC AGT GGT CCA TCG	100	30
cmyc for cmyc rev	TGG ATT TCC TTT GGG CGT TGG CTG CTG GTG GTG GGC GGT GTC TC	800	30
Cxcl1 for Cxcl1 rev	CTG GGA TTC ACC CTC AAG AAC ACT CAG GGT CAA GGC AAG CCT C	115	30
Cyclin D1 for Cyclin D1 rev	GCG TAC CCT GAC ACC AAT CT ATC TCC TTC TGC ACG CAC TT	110	30
Foxm1 for Foxm1 rev	CCA GCA GCT AAG GGT GTG C CCA GCC CGT CAG AAC TCA TC	153	35
Gadd45 $\alpha$ for Gadd45 $\alpha$ rev	CAG ATC CAT TTC ACC CTC ATC C CCA CTG ATC CAT GTA GCG ACT	254	30
Gadd45 $\beta$ for Gadd45 $\beta$ rev	GGG GGA TTT TGC AAT CTT CT TCA GCG TTC CTC TAG AGA G	670	30
Gadd45 $\gamma$ for Gadd45 $\gamma$ rev	CAT TTC ACG TTG ATT CAG GCG AAC AAA CTG AGC TTC TCC AAG GC	193	30
GAPDH for GAPDH rev	TGC ACC ACC AAC TGC TTA G GGA TGC AGG GAT GAT GTT C	175	22/26
HNF4 for HNF4 rev	CAC GCG GAG GTC AAG CTA C CCC AGA GAT GGG AGA GGT GAT	99	30
IL6 for IL6 rev	GAT GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC GGT CCT TAG CCA CTC CTT CTG TG	111	30
Klf6 for Klf6 rev	CTT CCA GGA ACT ACA GAT TGT GC GGC TCA CTC TGA AGA TAG CGT T	100	30

Primer	Sequenz	Größe PCR-Produkt	Zyklen
Lamin for Lamin rev	GGA TGC TGA GAA CAG GCT ACA CTC TCG CTG CTT CCC GTT ATC	170	26
Mcp1/Ccl2 for Mcp1/Ccl2 rev	TCC ATG CAG GTC CCT GTC ATG CTT CTA GTT CAC TGT CAC ACT GGT C	550	35
Mdm2 for Mdm2 rev	TGG GCG AGC GGG AGA CCG AC AGA GTC TCT TGT TCC GAA GC	158	30
Noxa for Noxa rev	CGT CGG AAC GCG CCA GTG AAC CC TCC TTC CTG GGA GGT CCC TTC TTG C	334	35
p21 for p21 rev	ATC ACC AGG ATT GGA ACA TGG CGG TGT CAG AGT CTA GGG GA	93	30
PACS2 for PACS2 rev	TCT GGA TCG TCT CCC TGT CC TTT CCC ACA TCA AAG TCG TCC	187	30
PUMA for PUMA rev	ATG GCG GAC GAC CTC AAC AGT CCC ATG AAG AGA TTG TAC ATG AC	103	30
PERP for PERP rev	CAG AGC CTC ATG GAG TAC G GAG AAT GAA GCA GAT GCA CAG G	86	30
TNF $\alpha$ for TNF $\alpha$ rev	AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA AGG TAC AAC CCA TCG GCT GG	500	35
Trp53 for Trp53 rev	AGA GAC CGC CGT ACA GAA GA GCA TGG GCA TCC TTT AAC TC	225	30
Trp53bp1 for Trp53bp1 rev	TGA AGA GTG TGT GTG AGC AG AAC TGG GTA AGG CAA AAT CT	538	35
Sesn2 for Sesn2 rev	TGC TGC TGC ATA CGG ATG G GGA ACC CAC CAG GTA AGA ACA	500	35

(Alle Primer wurde von Eurofins MWG Operon bezogen.)

## 2.8 *In vitro*-Versuche mit Hepa1c1c7-Gewebekulturzellen

Für die *in vitro*-Versuche wurde die murine Hepatomazelllinie Hepa1c1c7 (ATCC® CRL-2026™) verwendet.

### 2.8.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in "Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium" (DMEM, #41965, Gibco Life Technologies) mit 10% FBS (#A15-101, PAA/ GE Healthcare) und 1% Penicillin/Streptomycin (#A2213, Merck) gehalten. Zur Passage wurde nach Abnahme des Mediums mit PBS gespült und zur Ablösung der Zellen 10-15 min im Inkubator mit Accutase (#00-4555-56, eBioscience) inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 300 g wurden die Zellen in frischem Medium verdünnt und in neue Kulturflaschen ausgesät. Die Hepal1c7 wurden alle 5-7 Tage passagiert.

### 2.8.2 Transfektion mit PACS2-siRNA

Die Hepal1c7-Zellen wurden 16-18 Stunden vor Transfektion ausgesät. Die siRNA wurde nach Anweisung des Herstellers in 100 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Somit betrug die Stammlösung eine Konzentration von 20 µM. Die Stammlösung wurde aliquotiert, bei -80°C aufbewahrt, kurz vor Transfektion auf Eis aufgetaut und mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 5 µM eingestellt.

**Tabelle 14 Sequenzen der verwendeten siRNA**

siRNA	Produktnummer	Sequenz
PACS2-1	D-059648-01	GCUCAGGCCUUACUUCGAA
PACS2-2	D-059648-02	CCAACAGCCUAGACAAUGA
PACS2-3	D-059648-03	GGACGAUCCUGGGCUACAA
PACS2-4	D-059648-17	UCUCUCGGAUACAGCGAUA
non-targeting siRNA #1	D-001210-01	

Für die Transfektion wurde HiPerFect (#301705, Qiagen) sowie die siRNA (Fisher Thermo Scientific, Tabelle 14) in 100 µl DMEM ohne Zusätze vorgelegt und nach einer Inkubationszeit von 5-10 min zur Komplexbildung tropfenweise in die Schalen bzw. Wells pipettiert. Anschließend wurden die Gefäße vorsichtig geschwenkt um den Transfektionsansatz gleichmäßig über den Zellrasen zu verteilen. In Tabelle 15 sind die Konzentrationen und Volumina für die jeweilige Gefäßgröße aufgeführt.

**Tabelle 15 Ansätze für die Transfektion mit siRNA**

Format	Zellzahl	Volumen	5 $\mu$ M siRNA	HiPerFect	DMEM
6-Well	2-2,5x10 <sup>5</sup>	2,5 ml	2,6 $\mu$ l	3 $\mu$ l	100 $\mu$ l
6 cm Schale	6x10 <sup>5</sup>	5 ml	5 $\mu$ l	12 $\mu$ l	100 $\mu$ l

### 2.8.3 Ernten der Zellen, Isolierung von RNA und cDNA-Synthese

Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten, jedoch frühestens 24 h nach Transfektion geerntet. Dazu wurde mit einem Zellschaber vorsichtig der Zellrasen vom Gefäßboden gelöst und die Zellsuspension in ein Falcon Tube überführt. Nach der Zentrifugation von 5 min bei 300 g wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Nun wurde für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l RA1-Puffer mit 2  $\mu$ l TCEP entsprechend dem NucleoSpin RNA XS-Kit (#740902, Macherey-Nagel) wurden die Zellmembranen mit Hilfe eines Pistills aufgebrochen. Die Isolierung der RNA erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop-1000 (Peqlab) gemessen. Die cDNA-Synthese erfolgte wie bereits unter 2.7.2 beschrieben mit dem Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (#05081955001, Roche). Die Konzentrationsmessung der cDNA wurde am Spektrophotometer NanoDrop-1000 (Peqlab) vorgenommen. Für die spätere Durchführung einer Polymerasekettenreaktion wurde die cDNA auf eine Konzentration von 0,5  $\mu$ g $\cdot\mu$ l<sup>-1</sup> eingestellt.

### 2.8.4 Ernten der Zellen und Isolierung von Protein

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst und die Zellsuspension in ein Falcon Tube transferiert. Es wurde für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 g wurde der Überstand abgenommen und nach Zugabe von 50  $\mu$ l Lysepuffer (siehe Tabelle 7) das Zellpellet mit Hilfe eines Pistills homogenisiert. Das Zelllysate wurde für 10 min bei 9000 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gekühlt. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde eine Verdünnung von 1:100 angefertigt und in einem Verhältnis von 1:5 mit

dem Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent in einem Tecan Sunrise Basic gemessen. Da die Proteinkonzentration stets sehr gering war, wurden die Ansätze mit einer Konzentration von 30 µg Protein in unterschiedlichen Volumina und direkt vor Verwendung ohne Puffer mit der entsprechenden Menge 4x ESB-Buffer vorbereitet. Die immunologische Proteinanalyse mittels Western Blot erfolgte wie in 2.6.2 beschrieben.

### 2.8.5 Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Cisplatin

Zur Induktion von oxidativem Stress wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Cisplatin behandelt. Dazu wurden Hepa1c1c7-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, 16-18 h später mit siRNA transfiziert (siehe 2.8.2) und 48 h nach Transfektion behandelt. Für den Ansatz wurde ein Volumen von 200 µl gewählt, in dem jeweils unterschiedliche Konzentrationen des Stressors enthalten waren. Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#216763, Sigma-Aldrich) wurde dazu 1:1000 verdünnt und steril filtriert und einige Tage bei 4°C gelagert, die Behandlungsansätze wurden daraus jeweils frisch angesetzt. Die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte mit folgenden Konzentrationen: 50 µM, 100 µM und 500 µM. Die Zellen wurden nach 4 h, 8 h und 24 h je siRNA bzw. Kontrolle (ohne siRNA) und Konzentration geerntet und gleich behandelte Zellen zu einer Probe zusammengefasst. Cisplatin wurde in einer Konzentration von 2 mg·ml<sup>-1</sup> aus der Krankenhausapotheke der Medizinischen Hochschule Hannover frisch zubereitet und unter Lichtausschluss wenige Tage bei 4°C aufbewahrt und frisch für die Behandlung auf die gewünschten Konzentrationen von 25 µM, 50 µM und 75 µM eingestellt. Die Zellen wurden je Konzentration und siRNA 10 h und 24 h nach Behandlung geerntet, gleich behandelte Zellen wurden zu einer Probe zusammengefasst.

### 2.9 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit der Software Prism5 (GraphPad Software) ausgewertet. Einzelwerte wurden dabei zu Gruppen zusammengefasst und der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Die Gruppen wurden mittels Varianzanalyse bzw. Student's t-Test verglichen. Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

### 3 Ergebnisse

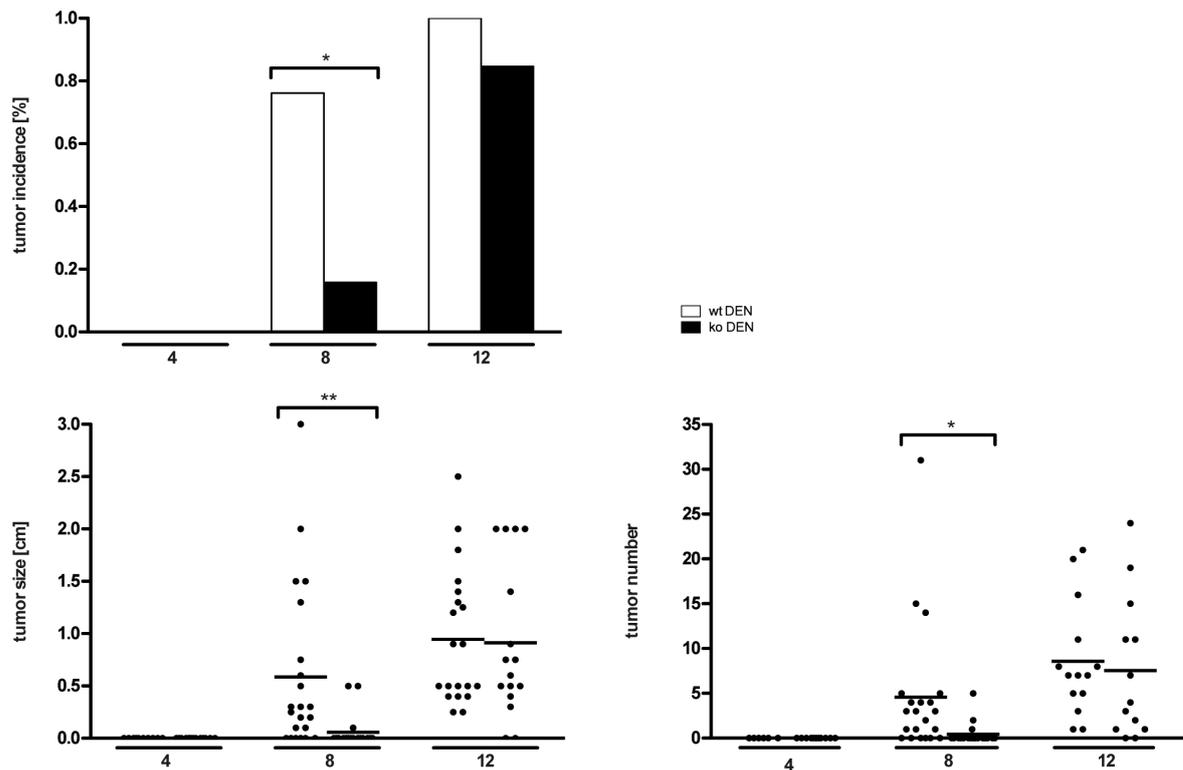
PACS2<sup>-/-</sup>-Mäuse sind phänotypisch unauffällig und unterscheiden sich grundsätzlich nicht von Wildtyp-Tieren. Um den Einfluss von PACS2 in der Hepatokarzinogenese zu untersuchen, wurden PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere mit der karzinogenen Substanz DEN behandelt. Wildtyp-Tiere und PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere wurden gleichermaßen behandelt. Beide Gruppen sowie deren unbehandelte Kontrollen wurden auf akute und chronische Hepatitis, Regenerationsfähigkeit der Leber, Apoptoseverhalten und die Tumorentstehung untersucht. Zusätzlich wurden *in-vitro*-Analysen mit PACS2-spezifischer siRNA durchgeführt.

#### 3.1 Hepatozelluläres Karzinom

Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war die Darstellung der Bedeutung von PACS2 für die Hepatokarzinogenese. Zu diesem Zweck wurden alle weiteren Teilversuche durchgeführt. Ob und inwiefern PACS2 eine Bedeutung bei der Entstehung des HCC hat, wurde an dem vielfach erprobten und etablierten Beispiel der chemisch-induzierten Tumorentstehung durch DEN-Gabe realisiert. Da vor Versuchsbeginn nicht bekannt war, in welchem Zeitraum PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere möglicherweise Tumore entwickeln, wurden die Endpunkte 4, 8 und 12 Monate festgelegt.

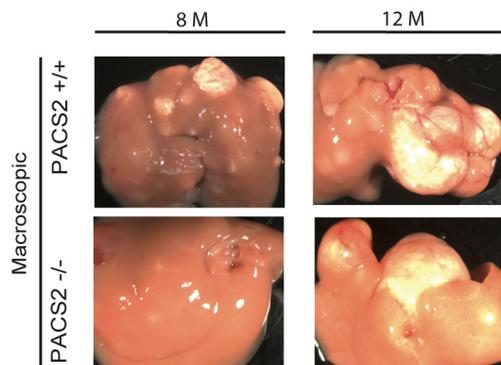
##### 3.1.1 Der Verlust von PACS2<sup>-/-</sup> verzögert die Tumorentstehung nach initialer Injektion von DEN

4 Monate nach DEN-Injektion hat keines der Tiere Tumoren in der Leber, hingegen haben nach 8 Monaten 76% der Wildtyp-Tiere und 16% der Knockout-Tiere mindestens einen Lebertumor. Nach 12 Monaten liegt die Tumorrage bei PACS2<sup>+/+</sup>-Mäusen bei 100% und bei PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen bei 85% (Abbildung 9 und Abbildung 10). Auch die bei 8 Monaten geringere Größe und Anzahl bei PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren gleicht sich den Wildtyp-Tieren bis zum Zeitpunkt von 12 Monaten an. Somit führt der Verlust von PACS2 zu einer zeitlichen Verzögerung der Hepatokarzinogenese. Dieser Vorteil geht im Zeitraum zwischen 8 und 12 Monaten nach initialer DEN-Gabe jedoch verloren.



**Abbildung 9 Tumorinzidenz, Tumorgröße und Tumoranzahl der PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Mäuse 4, 8 und 12 Monate nach DEN-Injektion.**  
 p-Wert\* < 0,05; p-Wert\*\* < 0,01

Abbildung 10 zeigt repräsentative Lebern und deren Tumore zum Zeitpunkt von 8 und 12 Monaten nach DEN-Injektion.

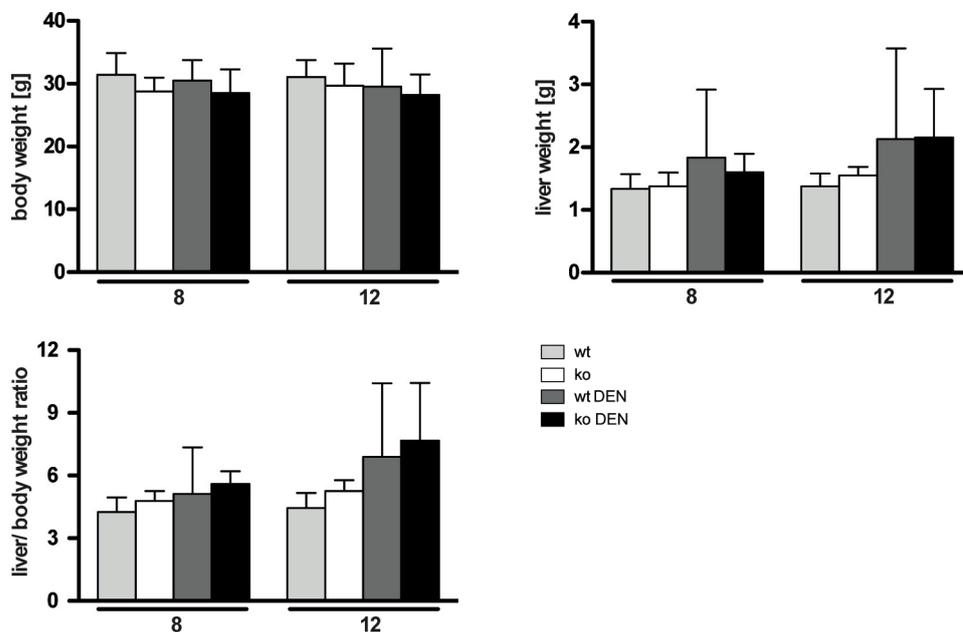


**Abbildung 10 Makroskopische Aufnahmen von Lebertumoren von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen 8 und 12 Monate nach DEN-Behandlung.**

### 3.1.2 Der leichte Anstieg des Lebergewichtes korreliert mit der Tumorentwicklung

Bei Wildtyp-Tieren zeigt sich bereits 8 Monate nach DEN-Behandlung, bei Knockout-Tieren erst nach 12 Monaten eine Erhöhung des Lebergewichtes bei relativ großer

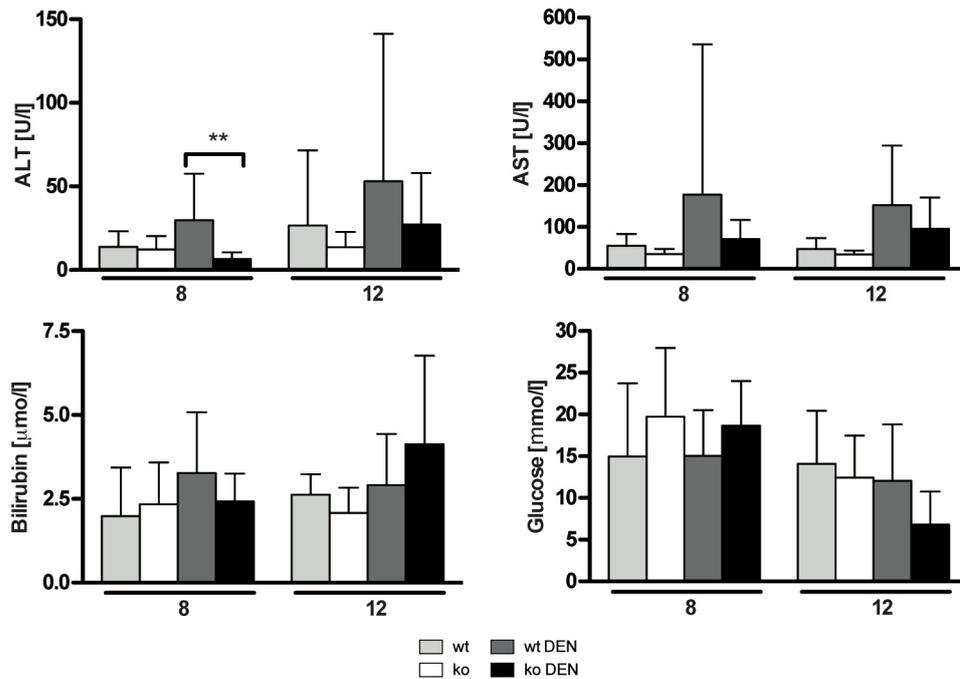
Standardabweichung (Abbildung 11). Dies betrifft genau die Gruppen, welche eine starke Tumorentwicklung verzeichnen. Da die Tumore von Tier zu Tier unterschiedlich in Menge und Größe sind, erklären sich die Unterschiede bei dem Lebergewicht.



**Abbildung 11 Körpergewicht, Lebergewicht und Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Mäusen 8 und 12 Monate nach Injektion von DEN mit chronischer Hepatitis, teilweise mit Tumoren.**

### 3.1.3 Im Plasma sind die Leber-sensiblen Transaminasen bei vorliegenden Tumoren deutlich erhöht

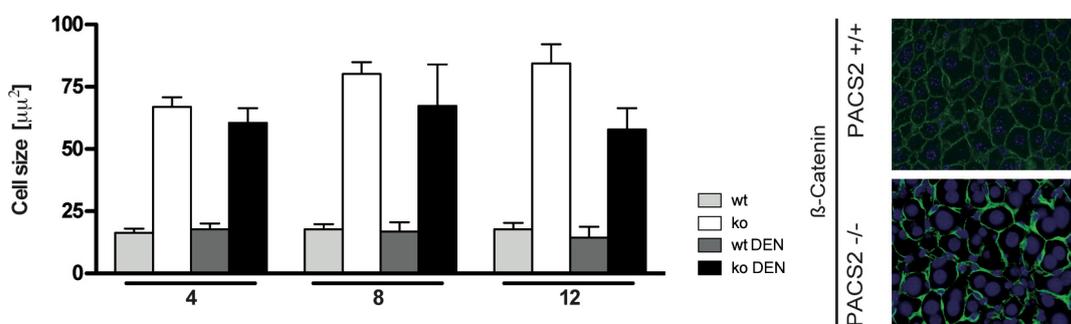
Die für Leberschäden sensitiven Transaminasen steigen bei zunehmendem Alter der Mäuse beider Phänotypen an. 4 Monate nach DEN-Injektion sind die Transaminasen im Plasma kaum messbar. Im Alter von 8 Monaten sind die Plasmalevel bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren minimal erhöht, bei den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren bei großer Varianz signifikant erhöht. Dabei besteht jedoch kein Unterschied zwischen DEN-behandelten und unbehandelten Tieren (keine Tumore; Abbildung 26). Bei Tieren mit Tumoren sind die Transaminasen noch stärker erhöht. So sind die Serumlevel der Alanin-Aminotransferase verdoppelt und der Aspartat-Aminotransferase nahezu verdreifacht (Abbildung 12). Aufgrund der großen Varianz und dem alleinigen Vergleich von Tieren mit Tumoren ist hier kein statistischer Unterschied zwischen PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen vorhanden.



**Abbildung 12** Plasmalevel der Lebertransaminasen, Bilirubin und Glukose von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Mäusen zum Zeitpunkt der Tumormanifestation. 8 und 12 Monate nach Injektion von DEN, teilweise mit Tumoren; ALT = Alanin-Aminotransferase, AST = Aspartat-Aminotransferase. p-Wert\*\* < 0,01

### 3.1.4 Das Fehlen von PACS2<sup>-/-</sup> führt zu einer Vergrößerung der Hepatozyten

Bereits 4 Monate nach DEN-Injektion kann eine signifikante Vergrößerung der Hepatozyten bei PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen anhand der  $\beta$ -Catenin-Färbung ermittelt werden. Mit zunehmendem Alter der Tiere nimmt auch die Zellgröße noch weiter zu bei gleichbleibender Größe der PACS2<sup>+/+</sup>-Hepatozyten (Abbildung 13). Keine der verwendeten Methoden der Leberschädigung oder Regeneration weist auf eine Erklärung für dieses Phänomen hin.



**Abbildung 13** Zellgröße der Hepatozyten von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Mäusen bei zunehmendem Alter sowie fortschreitender Hepatokarzinogenese und beispielhafte Darstellung der  $\beta$ -Catenin-Färbung.

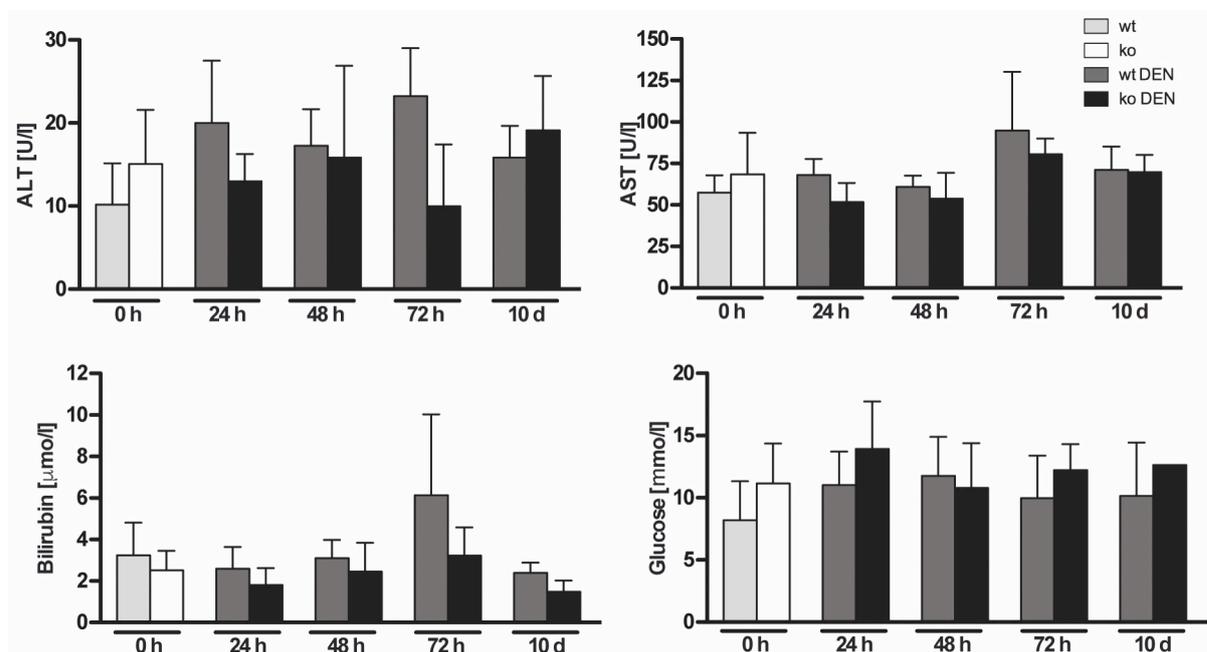
4, 8 und 12 Monate ohne/nach Injektion von DEN

### 3.2 Akute Leberschädigung

Leberschäden und akute Entzündungen äußern sich schnell in biochemischen Blutparametern. Schwere Schäden können sich auch an vermindertem Körpergewicht sowie an verändertem Lebergewicht bzw. an einem geänderten Verhältnis zwischen beiden zeigen. Eine makroskopische sowie mikroskopische Betrachtung der Leber zeigt mögliche Veränderungen in der Struktur des funktionalen Gewebes sowie nicht-funktionale Areale. Die Menge betroffener Hepatozyten kann durch Färbungen von Proliferations- und Apoptosemarkern und der Gewebestruktur veranschaulicht werden.

#### 3.2.1 Die Blutparameter zeigen eine geringere Leberschädigung bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren

Die Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) kommen in großer Menge in der Leber vor und werden bei Leberschäden freigesetzt, sodass eine erhöhte Konzentration im Blut messbar ist.



**Abbildung 14 Blutparameter bei DEN-induzierter akuter Hepatitis. Alanintransferase (ALT), Aspartat-Transferase (AST), Bilirubin und Glukose aus dem Plasma von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion.**

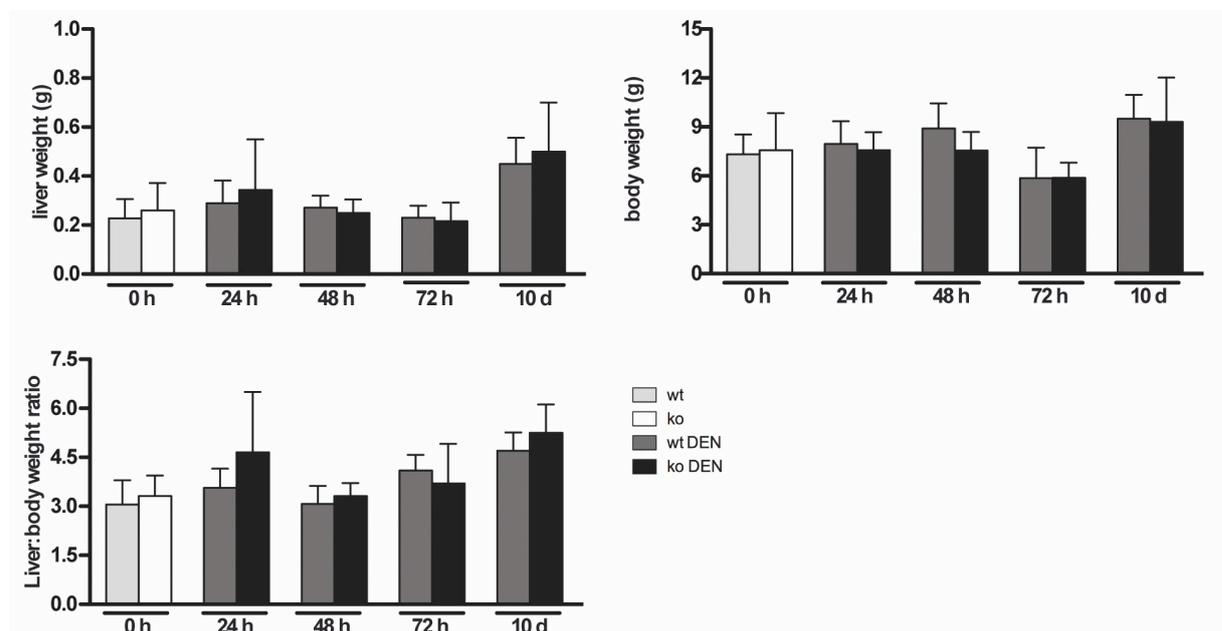
Kontrollwert (0 h) vom Zeitpunkt der Injektion

Nach Injektion von DEN kommt es zu einem leichten Anstieg der Aminotransferasen, welcher nach 72 Stunden seine Höchstwerte vor allem bei den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren hat

(Abbildung 14). Die Transaminasen sind bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren zu diesem Zeitpunkt deutlich geringer. Dies weist auf eine milde Leberschädigung bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren hin. Auch die Bilirubinwerte sind 72 Stunden nach DEN-Injektion bei den Wildtyp-Tieren deutlich höher als bei den Knockout-Tieren, nach 10 Tagen sind in beiden Gruppen wieder Ausgangswerte erreicht. Die Glukosemessung zeigt keine deutliche Veränderung, unabhängig vom Genotyp.

### 3.2.2 Leichte Veränderungen von Körpergewicht und Lebergewicht sind unabhängig vom Genotyp

Veränderungen im Gewicht der Leber oder des Tieres deuten auf eine starke Schädigung hin. Akute Schäden können durch Zelluntergang zu einer Verringerung des Lebergewichtes führen. Eine starke Belastung führt zur Verringerung des Tiergewichtes. Fetteinlagerungen sowie Tumorwachstum erhöhen das Lebergewicht. Wenn sich das Lebergewicht im Verhältnis zum Körpergewicht verändert, deutet dies möglicherweise auf eine massive Leberschädigung hin.



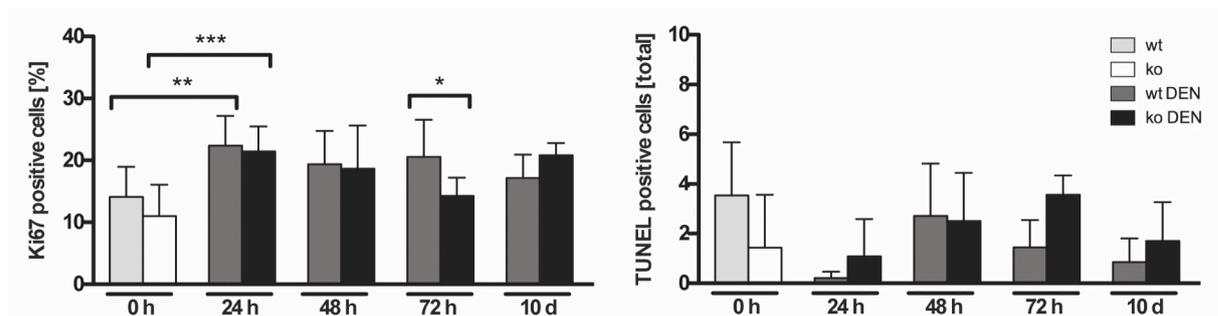
**Abbildung 15 Entwicklung von Lebergewicht und Körpergewicht. Lebergewicht und Körpergewicht und Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion. Kontrollwert (0 h) vom Zeitpunkt der Injektion**

Nach DEN-Injektion erfolgt keine Veränderung des Lebergewichtes. Es kann nur eine geringe Verminderung des Körpergewichtes 72 Stunden nach DEN-Injektion gemessen werden bei stabilem Lebergewicht (Abbildung 15). Insgesamt lässt sich in den Mäusen nur eine

schwache Leberschädigung nach Gabe von niedrig dosiertem DEN nachweisen. Die höheren Gewichte von Maus und Leber 10 Tage nach DEN-Behandlung zeigen lediglich die starke Wachstumsphase, in der sich die jungen Tiere (14 + 10 Tage alt) befinden.

### 3.2.3 Anstieg von Proliferation und Apoptose ist ähnlich bei PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren

Infolge der DEN-induzierten Leberschädigung lässt sich ein geringer Anstieg der Hepatozyten-Proliferation mittels Ki67-Färbung nachgewiesen. So steigt die Menge proliferierender Zellen von basalen 14% bei Wildtyp-Mäusen und 11% bei Knockout-Mäusen auf 22% bzw. 21% 24 Stunden nach DEN-Injektion an und verbleiben für einige Tage auf erhöhtem Niveau (Abbildung 16). Eine Apoptoseaktivität aufgrund der DEN-Injektion kann zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden. Zu allen gemessenen Zeitpunkten sind lediglich vereinzelte TUNEL-positive Zellen in beiden Gruppen sichtbar (Abbildung 16).

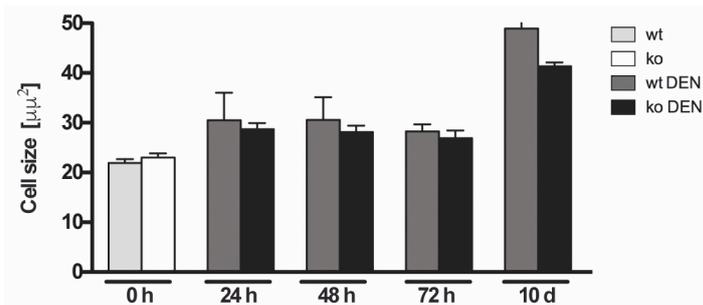


**Abbildung 16 Proliferation und Apoptose in Hepatozyten nach DEN-Injektion bei PACS2<sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2<sup>-/-</sup> (ko)-Tieren.**

Immunhistochemische Färbung von Lebergewebeschnitten mit Proliferationsmarker Ki67 und Apoptosemarker TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion. Kontrollwert (0 h) vom Zeitpunkt der Injektion. p-Wert\* < 0,05; p-Wert\*\* < 0,01; p-Wert\*\*\* < 0,001

### 3.2.4 Frühe Hepatozytenvergrößerung ist unabhängig vom Genotyp

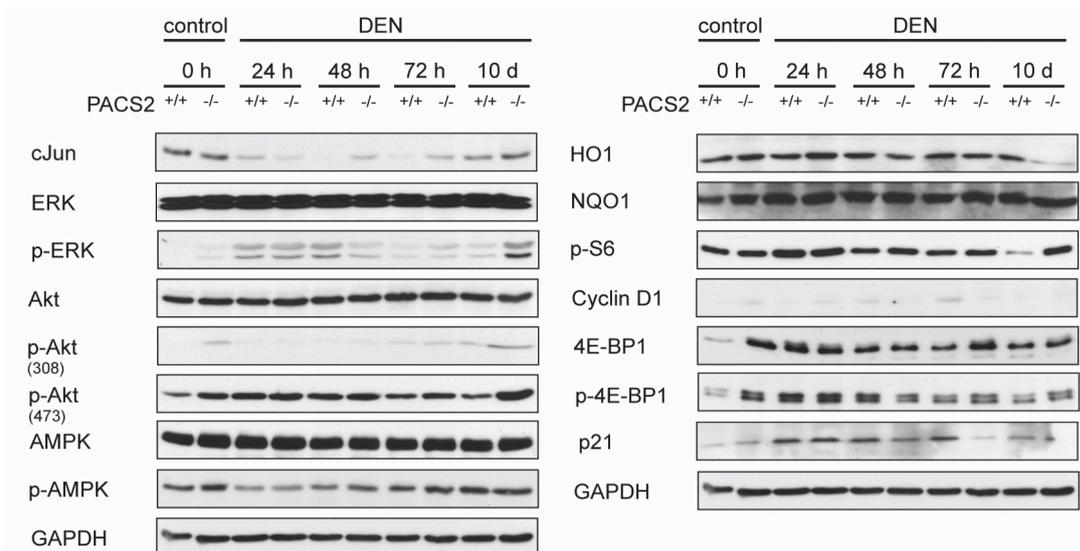
Eine Form der Regeneration von Geweben ist die Hypertrophie. Dabei bleibt die Menge der Zellen gleich, es erfolgt jedoch eine Zunahme der Zellgröße. Dies kann auch in den Lebern nach DEN-Injektion festgestellt werden. Bereits 24 Stunden nach der Behandlung mit DEN ist die durchschnittliche Zellgröße der Hepatozyten von basalen 22  $\mu\text{m}^2$  bei PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren und 23  $\mu\text{m}^2$  bei PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren auf Werte von 31  $\mu\text{m}^2$  bzw. 29  $\mu\text{m}^2$  angestiegen und nach 10 Tagen mit 49  $\mu\text{m}^2$  und 41  $\mu\text{m}^2$  nochmals erhöht (Abbildung 17).



**Abbildung 17 Größe der Hepatozyten von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren.** Immunhistochemische Färbung von Lebergewebeschnitten mit dem Zellwandmarker  $\beta$ -Catenin zum Nachweis der Zellgröße zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion.

### 3.2.5 Proteine mit Beteiligung an Zellzyklus, Zellproliferation sowie Apoptose zeigen keine erhöhte Aktivität

Es wurden Westernblot-Proteinanalysen aus Leberlysaten (Pool aus je 4 Tieren) angefertigt. Dabei wurden Proteine verschiedener Signalwege quantifiziert. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Protein-Ladung wurde das Haushaltsgen GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) nachgewiesen.



**Abbildung 18 Westernblot-Analysen verschiedener Proteine aus Leberlysaten von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach DEN-Injektion.** Kontrolle (0 h) vom Zeitpunkt der Injektion. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Es wurde bereits gezeigt, dass DEN zu oxidativem Stress mit Aktivierung von Nrf2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2) sowie Nrf2-Zielgenen wie beispielsweise NQO1 (NADPH quinone oxidoreductase) führt (Dewa *et al.*, 2008; Nishimura *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2014; Hanna *et al.*, 2016). Um den Einfluss von PACS2 auf diese oxidative Stressantwort

zu untersuchen, wurden in den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren sowohl mit als auch ohne DEN-Behandlung mittels Westernblot-Analyse Nrf2-Zielgene analysiert. Dabei kann gezeigt werden, dass eine niedrige Dosis DEN nicht zur Aktivierung von NQO1, HO1 (Hämoxigenase 1) führt (Abbildung 18).

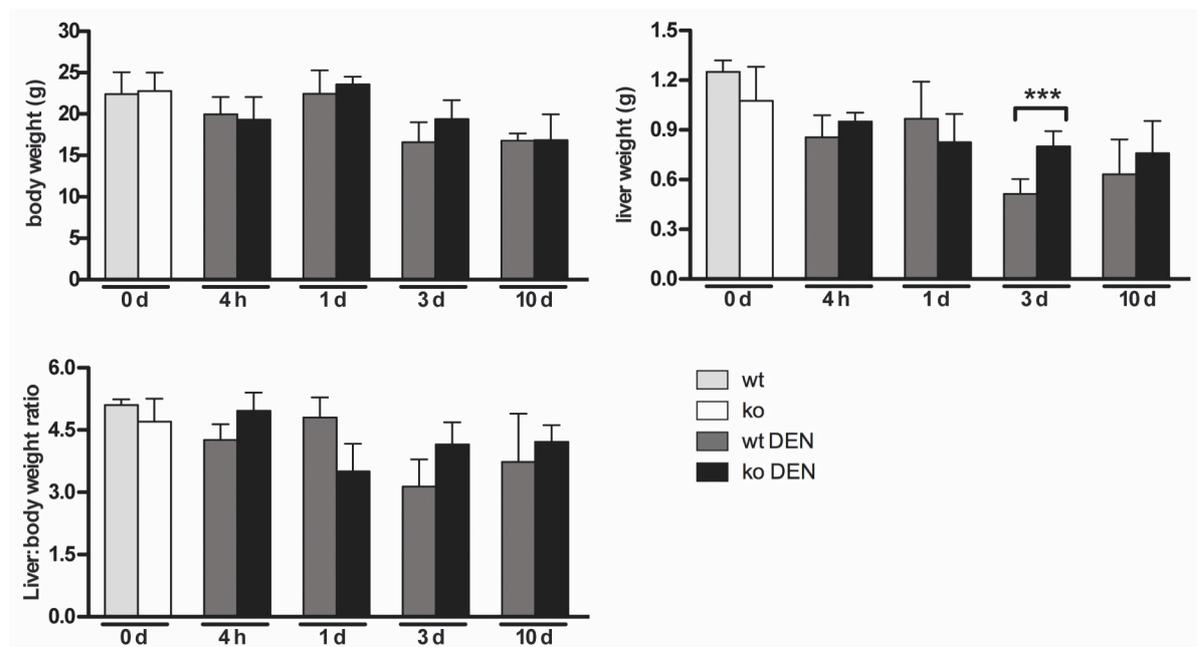
Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg reguliert intrazellulär den Zellzyklus. Die aktivierte Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert Akt (Proteinkinase B) durch Phosphorylierung. Neben anderen Effektoren aktiviert Akt mTOR (mechanistic/ mammalian target of rapamycin), welches die ribosomale Protein S6 sowie 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) aktiviert (Mamane *et al.*, 2006; Matter *et al.*, 2014). Das phosphorylierte ribosomale Protein S6 (p-S6) und 4E-BP1 werden zur Proteinsynthese und Proliferation benötigt. 4E-BP1 und auch Akt selbst aktivieren Cyclin D1, was die Zellzyklusprogression von der G1 zur S-Phase ermöglicht. Dadurch ist Cyclin D1 ein Gegenspieler zu p21 (cyclin-dependent kinase-inhibitor 1), welches p53-aktiviert, den Zellzyklus stoppt und bei nicht-möglicher Reparatur die Apoptose einleitet. Die von Park *et al.* (2009) gezeigte Expression von Cyclin D1 nach DEN-Behandlung kann weder in PACS2<sup>+/+</sup>- noch in PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren gezeigt werden, jedoch eine Aktivierung von p21 in allen behandelten Gruppen (Abbildung 18). Andererseits zeigen weder Akt noch die phosphorylierten Varianten Veränderungen nach Gabe von DEN. Das aktivierte 4E-BP1 und das deaktivierte p-4E-BP1 sind basal bei Knockout-Tieren messbar, nicht jedoch bei Wildtyp-Tieren. Nach DEN sind die Proteinlevel beider Gruppen dagegen sehr ähnlich. p-S6 ist nach DEN ebenfalls leicht induziert und nach 2, 3 und 10 Tagen in PACS2<sup>-/-</sup>-Lebern etwas höher als in den PACS2<sup>+/+</sup>-Proben.

Ein weiterer möglicherweise relevanter Signalweg ist die MAPK/ERK-Signalkaskade. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen MAPK, auch ERK (extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen) genannt, werden durch Bindung eines Mitose-aktivierenden Proteins (Mitogen) an einem Membran-ständigen Zelloberflächenrezeptor wie z.B. dem EGF (epidermal growth factor) phosphoryliert und aktiviert. Ziel ist die Modifizierung der Translation von mRNA zu Proteinen. Zu den MAP-Kinasen zählen unter anderem JNK (cJun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase), ERK und p38 (p38-aktivierte Proteinkinase). Zielproteine der MAP-Kinasen sind beispielsweise das mTOR-aktivierte ribosomale Protein S6, STAT3 (signal transducers and activators of transcription) sowie p21 (Hui *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2014) und NFκB (Sakurai *et al.*, 2006). Sakurai *et al.* zeigten nach niedrigdosierter einmaliger DEN-Gabe eine Induktion von JNK sowie erhöhte Expression von p-cJun und Cyclin D1. Bei Verlust von JNK1 waren nicht nur die Expressionslevel von Cyclin D1 und p-cJun reduziert, sondern auch die Proliferation der Hepatozyten sowie das Tumorwachstum, gemessen in Tumoranzahl und

Tumorgröße. Außer einer geringen cJun-Verminderung direkt nach DEN-Gabe kann bei keinem Protein dieses Signalweges eine Veränderung durch DEN zwischen den verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden (Abbildung 18). Eine Aktivierung der MAP-Kinasen im Allgemeinen und von JNK im Besonderen kann somit nicht gezeigt werden (JNK ohne Induktion, Daten nicht gezeigt).

### 3.2.6 Induktion einer akuten Hepatitis mit Hilfe einer Hochdosis DEN von $100 \mu\text{g DEN}\cdot\text{g}^{-1}$ Körpergewicht bei 8 Wochen alten männlichen Mäusen

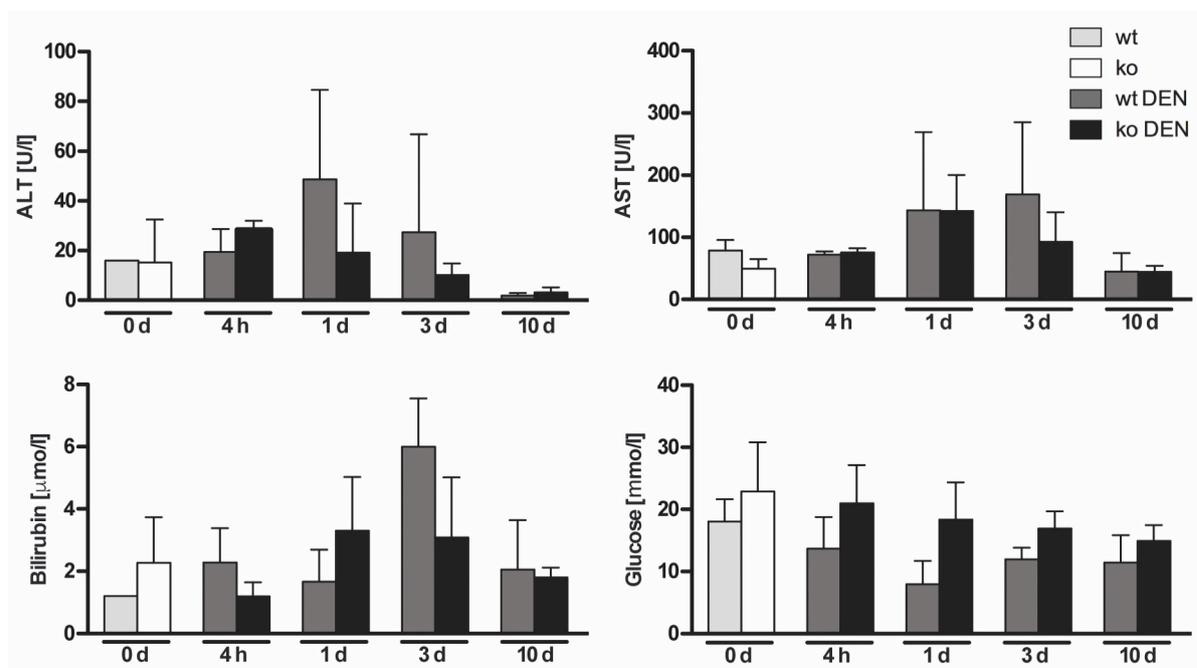
DEN ist Initiator einer mehrstufigen Hepatokarzinogenese in Nagetieren. Kato *et al.* (1993) zeigten, dass durch eine hohe DEN-Dosis eine Nekrose von Hepatozyten induziert werden kann, die nachfolgend eine Leberregeneration auslöst, während eine niedrige Dosis DEN keine nekrotische Wirkung hat oder zu Veränderungen der Transaminasen führen. Da die niedrige Dosis an DEN bei den PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren zu einer sehr niedrigschwelligem Reaktion in den Signalwegen des oxidativen Stresses, der Leberschädigung und der Regeneration führten, wurde ein weiterer Versuch der akuten Leberschädigung mit einer hohen Dosis DEN durchgeführt. Da das erwartete Schädigungspotential deutlich höher ist, wurden ältere Tiere verwendet.



**Abbildung 19** Entwicklung von Leber- und Körpergewicht von 8 Wochen alten PACS2<sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2<sup>-/-</sup> (ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von  $100 \mu\text{g DEN}\cdot\text{g}^{-1}$  Körpergewicht. p-Wert\*\*\* < 0,001

Mit Hilfe dieser Behandlung kann eine stärkere Reaktion auf die Gabe von DEN gezeigt werden. So verringert sich das Lebergewicht 72 Stunden nach DEN-Injektion auf 50% des Ursprungsgewichtes bei den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren (Abbildung 19), was auf eine deutliche Schädigung der Hepatozyten hinweist. Bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren unterliegt das Lebergewicht nur geringen Schwankungen im beobachteten Zeitraum.

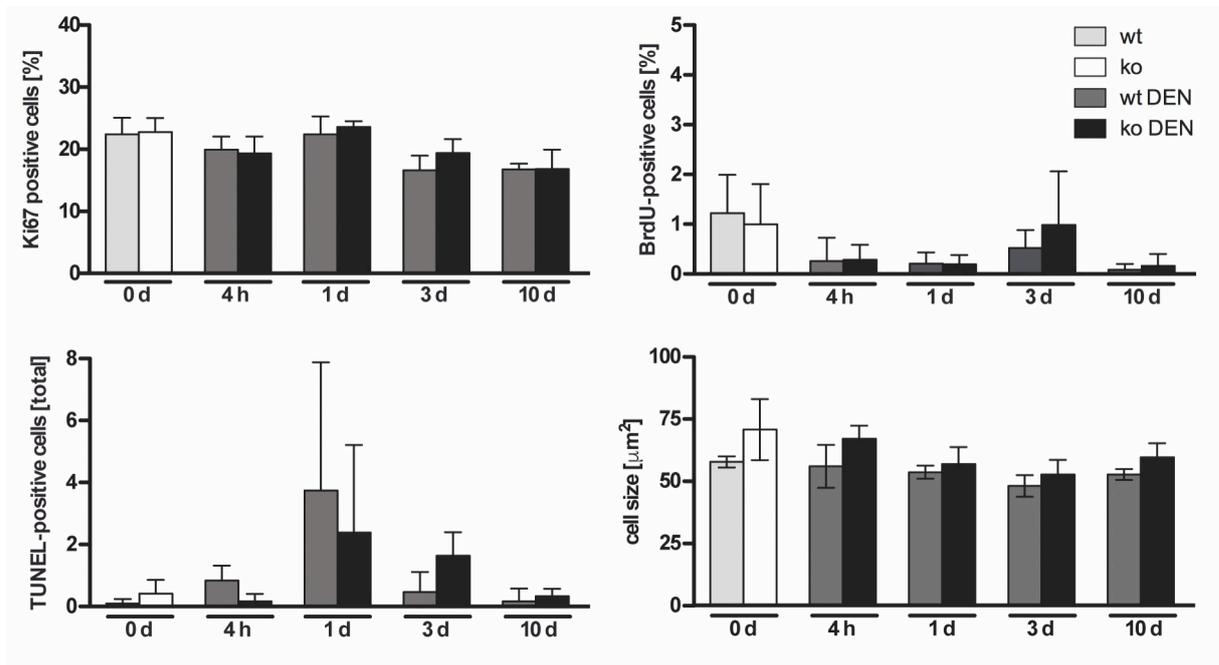
Wie bereits nach niedrig dosierter DEN-Gabe wurden auch in den Tieren mit DEN-Hochdosis die Lebertransaminasen, sowie Bilirubin und Plasmaglukose gemessen (Abbildung 20). Während die Alanin-Aminotransferase bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen noch im Normalbereich schwankt, steigen ALT und AST bei den PACS2<sup>+/+</sup>-Mäusen auf höhere Werte, welche jedoch zwischen den Tieren dieser Gruppe stark schwanken und dadurch nicht signifikant unterschiedlich sind. Auch die Bilirubinwerte steigen an, parallel dazu sinken die Blutglukoselevel in den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren. Die Schwankungen in den Knockout-Tieren sind deutlich geringer.



**Abbildung 20** Plasmamesswerte von Alanin-Transferase (ALT) und Aspartat-Transferase (AST), Bilirubin und Glukose von 8 Wochen alten PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von 100 µg DEN·g<sup>-1</sup> Körpergewicht.

Ebenso wie in den Tieren nach niedrig-dosierter DEN-Gabe wurde auch nach der Hochdosis die Proliferation, Apoptoseaktivität sowie Zellgröße der Hepatozyten mit Hilfe immunhistochemischer Färbung von Leberschnitten bestimmt. Die Färbung von Proliferationsmarkern und dem Zellwandprotein β-Catenin in Lebergewebeschnitten zeigen keine Veränderungen nach hochdosierter DEN-Gabe. Die Färbung apoptotischer TUNEL-

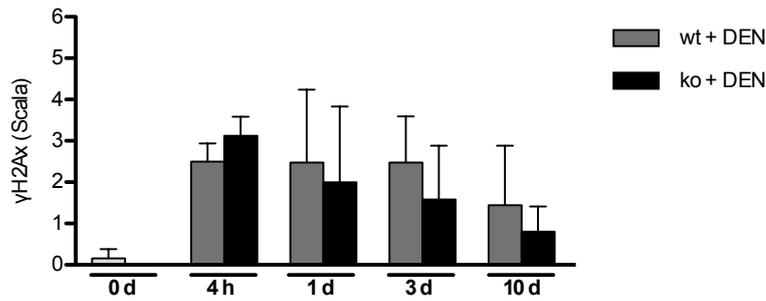
positiver Zellen zeigt eine minimal erhöhte Anzahl in den Tieren beider Gruppen nach 24 Stunden (Abbildung 21).



**Abbildung 21 Immunhistochemische Färbung von Lebergewebe von 8 Wochen alten PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von 100 µg DEN·g<sup>-1</sup> Körpergewicht.**

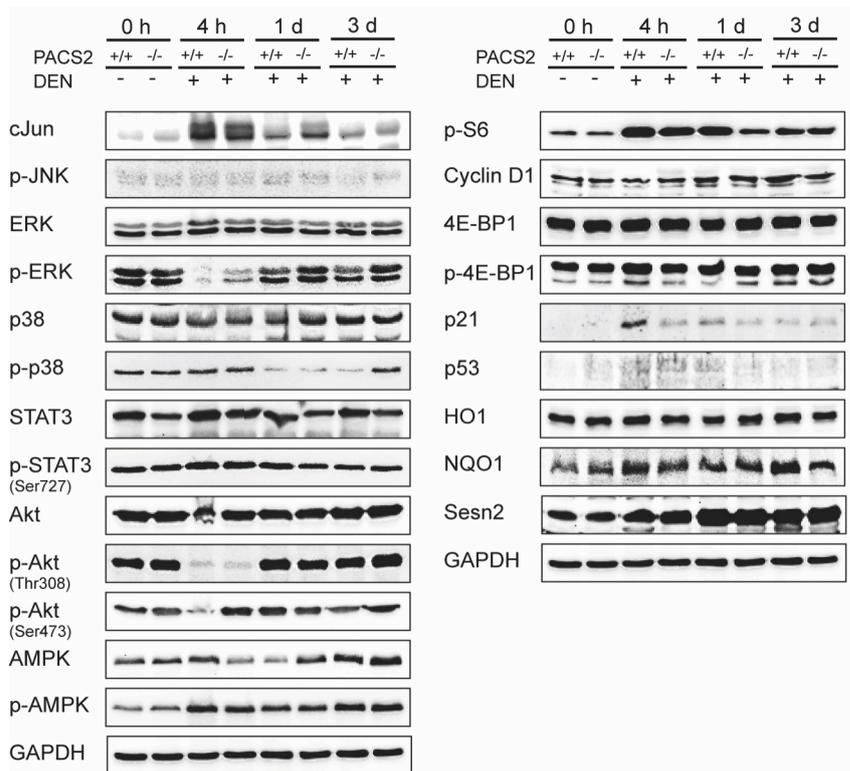
Färbung von Lebergewebeschnitten mit Proliferationsmarkern (Ki67 und BrdU) sowie Apoptosemarker (TUNEL). Zellgrößenmessung mit Hilfe von Färbung des Zellwandmarkers β-Catenin.

Zur Quantifizierung der durch DEN verursachten DNA-Schäden wurden Lebergewebeschnitte mit einem Antikörper gegen γH2Ax, einem Biomarker für Doppelstrangbrüche (Kuo und Yang, 2008) behandelt. Bereits 4 Stunden nach DEN-Gabe ist ein deutlicher Anstieg an Doppelstrangbrüchen in den Tieren beider Genotypen zu sehen (Abbildung 22), der jedoch 20 Stunden später in den Wildtyp-Tieren stagniert und in den Knockout-Tieren bereits zu sinken begonnen hat. Die Ausgangslevel von γH2Ax sind jedoch nach 10 Tagen noch nicht wieder erreicht. Es liegen somit nach hochdosierter DEN-Behandlung, unabhängig von PACS2, nicht nur kurzfristige DNA-Schäden vor.



**Abbildung 22 Immunhistochemische Färbung von  $\gamma$ H2Ax (Marker für DNA-Doppelstrangbrüche) von Lebergewebe von 8 Wochen alten PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion einer Hochdosis von 100  $\mu$ g DEN·g<sup>-1</sup> Körpergewicht.**

Die bereits unter 3.2.5 beschriebenen Signalwege wurden nun mit dem Hintergrund der erhöhten Transaminasen nach erhöhter DEN-Dosis mit Hilfe von Westernblot-Analysen betrachtet (Abbildung 23). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Protein-Ladung diente GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Die Nrf2-Zielgene HO1, NQO1 und Sestrin 2 (Sesn2) werden bei Leberschädigung durch oxidativen Stress aktiviert. So ist bei Sesn2 und NQO1 eine leichte Aktivierung ermittelbar. NQO1 zeigt in Wildtyp-Tieren ein etwas stärkeres Signal als in Knockout-Tieren. Bei der Proteinkonzentration von Akt und p-Akt<sub>Ser473</sub> können keine Veränderungen gezeigt werden. p-Akt<sub>Thr308</sub> ist 4 Stunden nach DEN-Injektion nicht mehr detektierbar, zeigt jedoch nach 24 Stunden wieder Basallevel. p-S6 ist 4 Stunden nach Behandlung erhöht. Während in PACS2<sup>-/-</sup>-Proben bereits nach 24 Stunden wieder Normallevel erreicht werden, zeigen die Proben der PACS2<sup>+/+</sup>-Tiere zu diesem Zeitpunkt noch erhöhte Proteinmengen. (p-)4E-BP1, Cyclin D1 und p53 zeigen in keiner Probe erhöhte Proteinlevel. p21 erreicht 4 Stunden nach DEN-Gabe in den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren erhöhte Proteinlevel, sonst sind nur minimale Proteinmengen nachweisbar.



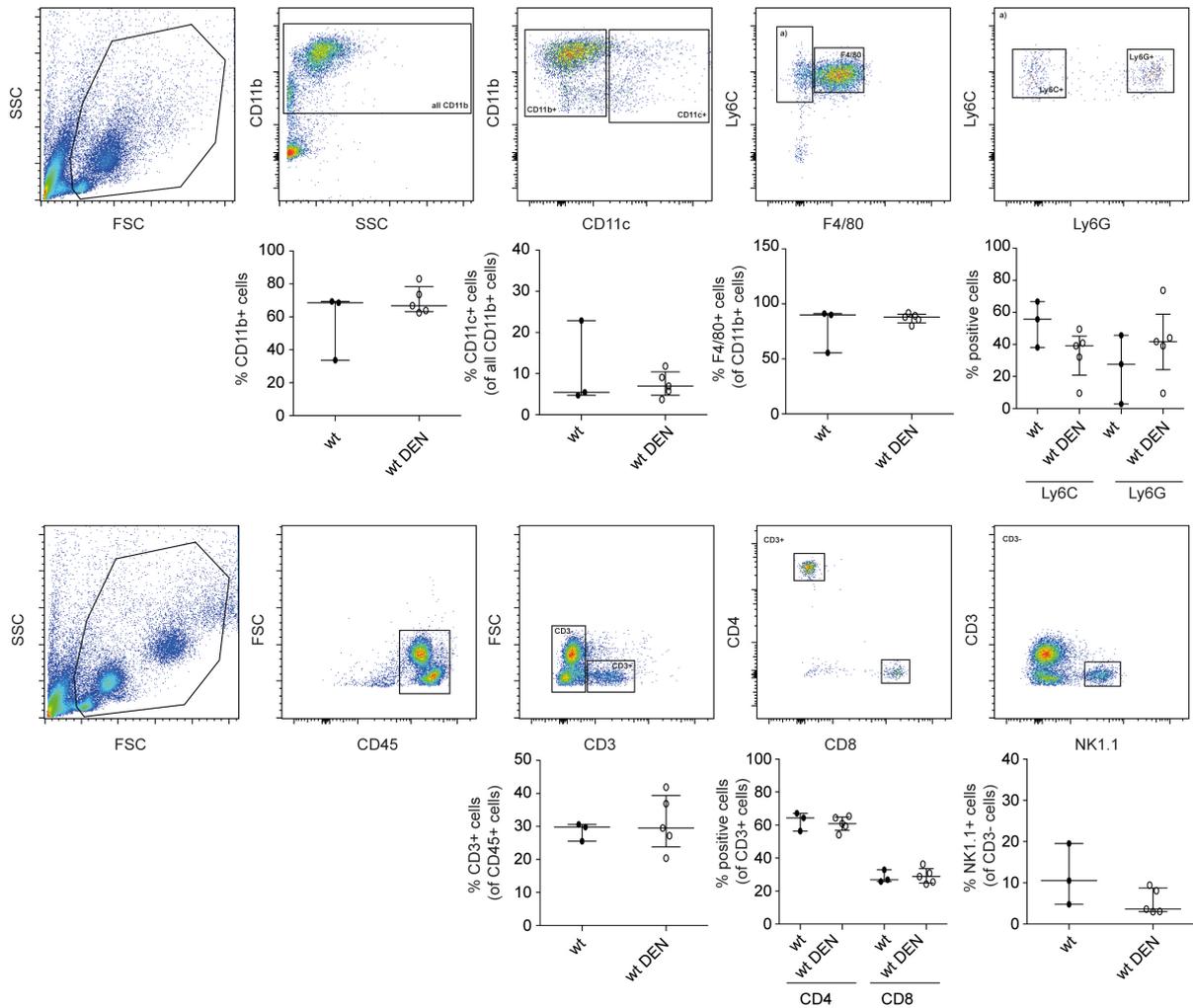
**Abbildung 23** Westernblot-Analysen von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren nach Injektion einer Hochdosis von 100 µg DEN·g<sup>-1</sup> Körpergewicht.

0 h = Kontrollen, Zeitpunkte: 4 h, 1 d und 3 d nach DEN-Injektion. GAPDH dient als Ladekontrolle

Aus dem Bereich der MAP-Kinasen kann eine Induktion von c-Jun 4 Stunden nach DEN in beiden Gruppen dargestellt werden, welche bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren auch nach 24 Stunden noch erkennbar ist. Bereits nach 72 Stunden sind wieder Basallevel erreicht. p-ERK ist, ähnlich p-Akt<sub>Thr308</sub>, 4 Stunden nach DEN-Injektion kaum noch detektierbar, zeigt jedoch nach 24 Stunden wieder basale Proteinmengen. p-JNK, ERK, (p-)p38 sowie (p-)STAT3 zeigen in allen Proben gleich bleibende Proteinlevel.

### 3.2.7 Akute Leberschädigung durch DEN hat keinen Einfluss auf die Immunzellen von PACS2<sup>+/+</sup>-Mäusen

Bei einer Lebergewebeschädigung kommt es meist zu einer erhöhten Infiltration von Immunzellen. Diese führen zur Entstehung und zum Erhalt der Entzündung in der Leber.



**Abbildung 24 Gating-Strategie und Menge der durchflusszytometrisch gemessenen Immunzellen bei PACS2<sup>+/+</sup>-Mäusen 48 h nach DEN-Injektion sowie unbehandelte Kontrollen.**

Oberer Teil: Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>). Unterer Teil: Natürliche Killerzellen (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>). SSC = Seitwärts-Streulicht, FSC = Vorwärtsstreulicht

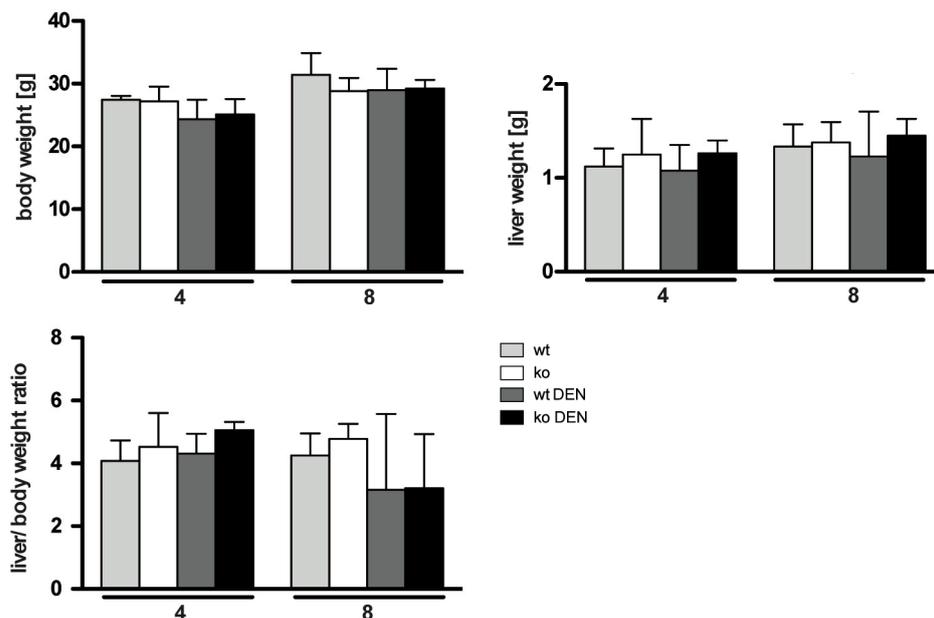
Zur Quantifizierung der Immunzellen wurden alle männlichen Tiere (2-4) eines Wurfes als Pool in einer Probe verwendet, da sonst die Menge an Zellen viel zu gering für eine aussagefähige durchflusszytometrische Messung ist. Die Messung zeigt eine gleichbleibende Menge an Makrophagen (Monocyten und Neutrophile) sowie Natürlichen Killerzellen (NKT-Zellen). Die Analyse stellte sich als technisch schwierig heraus, da die Zellzahl der gepoolten Proben dennoch sehr gering war und die Messung der Leberproben von PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren deshalb keine auswertbaren Ergebnisse lieferte.

### 3.3 Präneoplastische Phase

Die DEN-Gabe führt nicht zur Belastung der Mäuse. Die Tiere mit niedrigdosierter DEN-Gabe wurden nach 4, 8 und 12 Monaten getötet und die Lebern entnommen. Dabei wurden die tumorfreien Lebern und die Lebern mit Tumoren separat analysiert.

#### 3.3.1 Die Entwicklung von Körpergewicht und Lebergewicht ist Genotyp-unabhängig und unauffällig

Durch eine Leberschädigung kann sich das Lebergewicht vor allem im Langzeitversuch verändern. Zelluntergang und Fibrose führen zu einem verringerten Lebergewicht. Fetteinlagerungen sowie Tumorwachstum erhöhen das Lebergewicht. Eine Veränderung des Lebergewichtes hat auch eine Veränderung im Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht zur Folge.



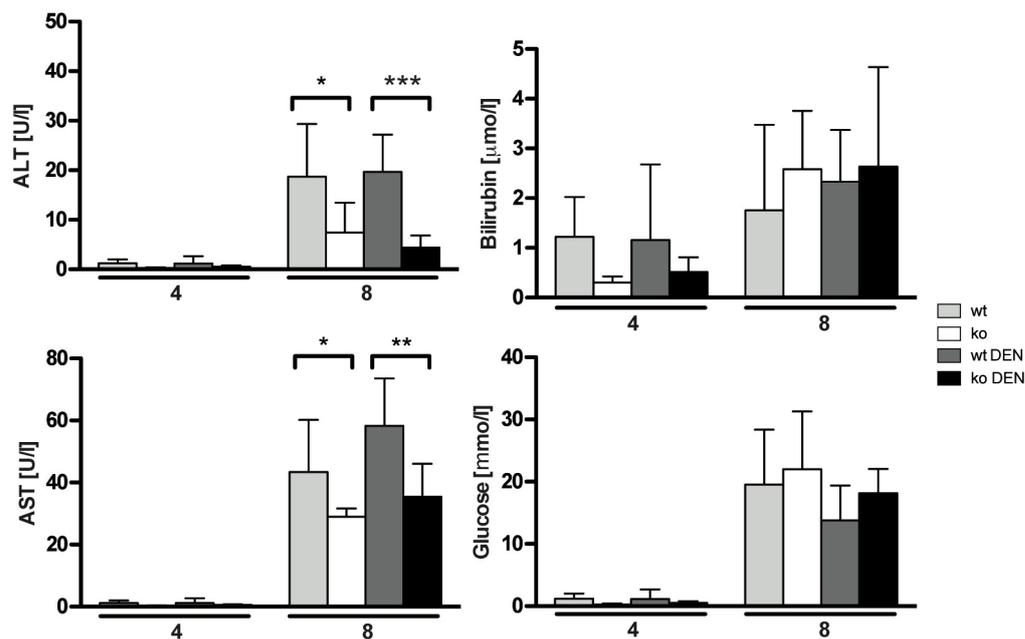
**Abbildung 25 Lebergewicht und Körpergewicht von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren im Verlauf der präneoplastischen Phase.**

4 und 8 Monate nach DEN-Injektion

Wie bereits in den vorherigen Untersuchungen zeigen weder das Körpergewicht, das Lebergewicht noch das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht eine Veränderung zwischen den PACS2<sup>+/+</sup>- und den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren (Abbildung 25).

### 3.3.2 PACS2<sup>+/+</sup>-Tiere zeigen stärker erhöhte Transaminase-Level als PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere

Die Transaminasen und Plasmaglukosewerte zeigten 4 Monate nach DEN-Behandlung minimale Werte bei den Kontrolltieren sowie den DEN-injizierten Tieren beider Genotypen. Nach 8 Monaten zeigen die Transaminasen ALT und AST bei PACS2<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant höhere Werte als bei PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen, unabhängig von der Behandlung (Abbildung 26). Die etwas höheren und starken Schwankungen unterliegenden Messwerte von Bilirubin und Plasmaglukose sind dem fortgeschrittenen Alter der Tiere zuzuordnen.

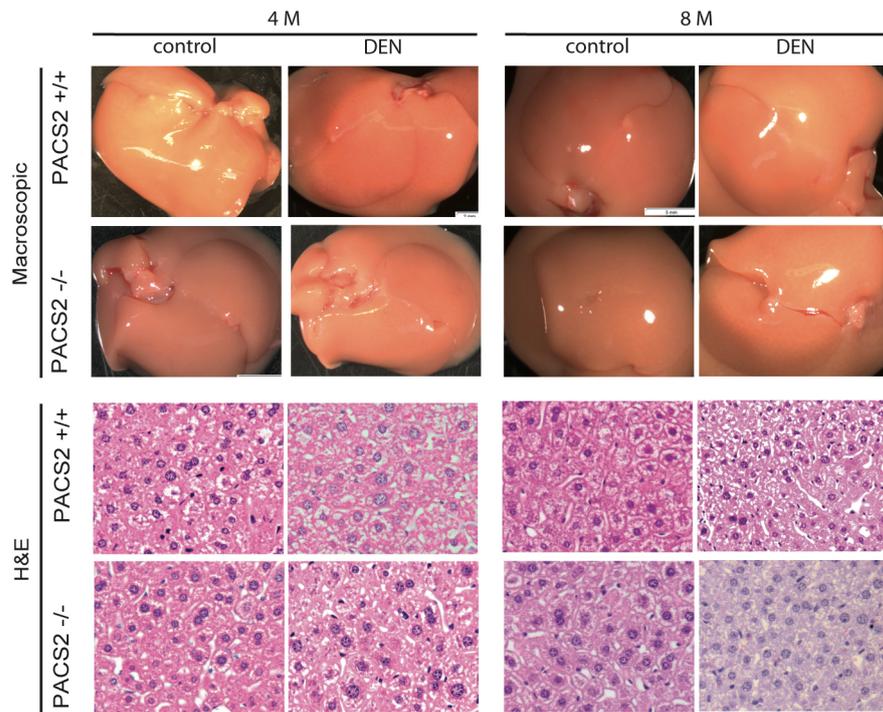


**Abbildung 26** Messwerte der Alanin (ALT)- und Aspartat (AST)-Transferase sowie Bilirubin und Glukose im Blutplasma von PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren im Verlauf der präneoplastischen Phase.

4 und 8 Monate nach DEN-Injektion. p-Wert\* < 0,05; p-Wert\*\* < 0,01; p-Wert\*\*\* < 0,001

### 3.3.3 Das Lebergewebe zeigt sich intakt und unauffällig im Verlauf der präneoplastischen Phase bei PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren

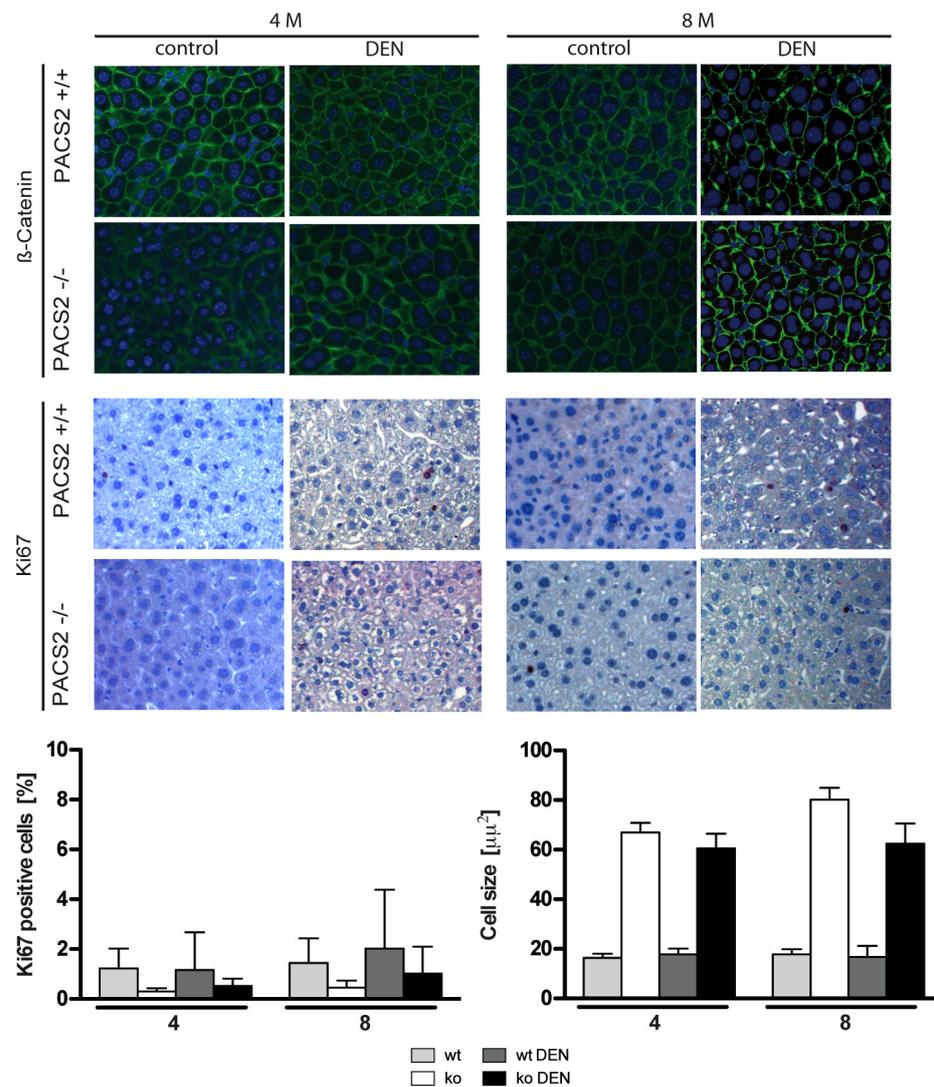
Makroskopisch ist kein Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrolltieren und den DEN-behandelten Tieren zu erkennen. Die mikroskopische Auswertungen der H&E-Färbungen zeigen intaktes Lebergewebe. In den Lebern sind keine Anzeichen von Entzündungen oder Fibrose ersichtlich. (Abbildung 27).



**Abbildung 27 Makroskopische Leberaufnahmen und mikroskopische Aufnahmen von Leberschnitten mit Hämatoxylin- & Eosin- Färbung (H&E) von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren im Verlauf der präneoplastischen Phase. 4 und 8 Monate nach DEN-Injektion**

3.3.4 Im Verlauf der Zeit zeigen die PACS2<sup>+/+</sup>-Tiere eine leicht erhöhte Proliferation der Hepatozyten während PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere eine Vergrößerung der Hepatozyten aufweisen.

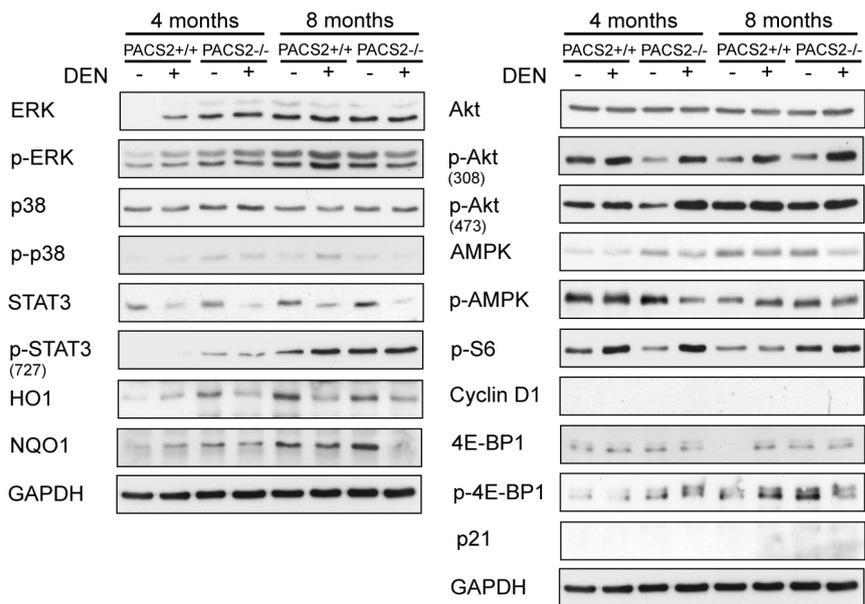
In Abbildung 28 dargestellt sind behandlungsunabhängige phänotypische Formen der Regeneration. Wenn auch sehr gering, so ist doch der Anteil proliferierender Zellen bei PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren konstant höher als bei PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren. Hingegen sind die Hepatozyten von PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren deutlich größer als von PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren. Somit zeigen die Hepatozyten bei Verlust von PACS2 ein anderes Verhaltensmuster als mit PACS2.



**Abbildung 28 Proliferation (Ki67-Färbung) und Zellgröße (β-Catenin-Färbung) von PACS2<sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2<sup>-/-</sup> (ko)-Tieren im Verlauf des Versuchs. 4 und 8 Monate nach DEN-Injektion**

### 3.3.5 Proteinanalysen von Lebern der präneoplastischen Phase zeigen geringfügige Aktivitäten des AKT/mTOR-Signalweges

Proteine, welche bei Leberschädigung und im Besonderen bei auftretendem oxidativem Stress aktiviert werden, zeigen in diesen Tieren keine Aktivierung. Auch die MAP-Kinasen zeigen gleich niedrige Proteinkonzentrationen in allen analysierten Gruppen. Lediglich die beiden phosphorylierten Formen von Akt, p-Akt<sub>308</sub> und p-Akt<sub>473</sub> sowie das über Akt und die S6-Kinase aktivierte ribosomale Protein S6 zeigen eine erhöhte Proteinkonzentration 4 und 8 Monate nach Behandlung mit DEN sowohl bei PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren als auch bei PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren (Abbildung 29).

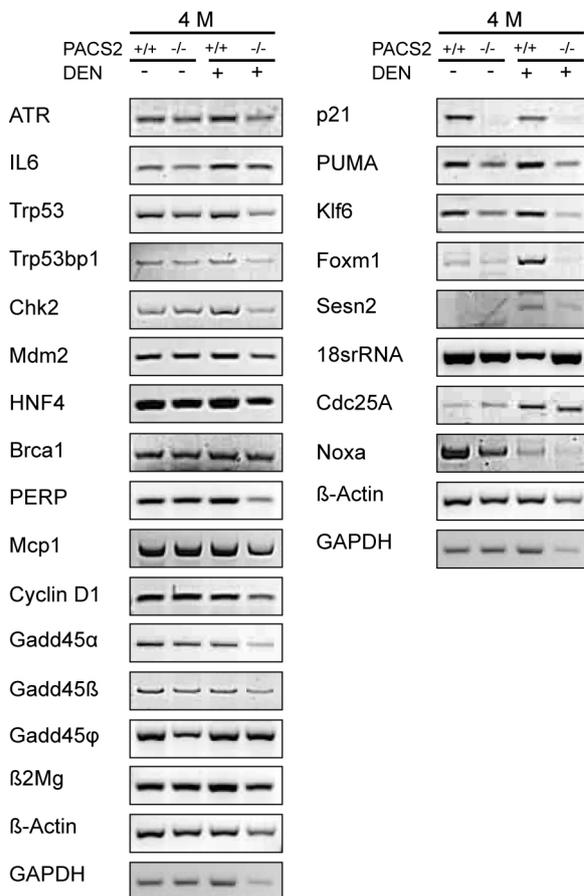


**Abbildung 29** Westernblot-Analysen aus Lebergewebe von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren in der präneoplastischen Phase.

### 3.3.6 Der Verlust von PACS2 zeigt keine Regulierung Tumor-assoziiertes Gene in der präneoplastischen Phase

Bei der Genexpressionsanalyse mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion (sqPCR) wird aus Leberlysat DNA gewonnen, welche in RNA umgeschrieben wird. Die Genexpression gibt Aufschluss, welche Gene durch zuvor aktivierte Transkriptionsfaktoren aktiviert und transkribiert wurden, bevor sie zu funktionalen oder noch inaktiven Proteinen translatiert werden. So ist es möglich, dass Gene aktiv vervielfältigt werden, die spätere Translation jedoch gehemmt wird und das Protein somit nicht vermehrt vorliegt. Aufgrund der geringen Hinweise der ablaufenden Hepatokarzinogenese auf Proteinebene erfolgte eine Überprüfung der vorgelagerten Genexpression. Es kann gezeigt werden, dass neben vielen gleichmäßig exprimierten Genen Sestrin2 (Sesn2) und Interleukin 6 (IL-6) 4 Monate nach DEN-Gabe etwas höher exprimiert waren (Abbildung 30). Sestrin2 ist ein Entgiftungsenzym zum Abbau von oxidativem Stress und zum Erhalt von Zellwachstum und Überleben. Sestrin2 ist ein Zielgen des Nuklearfaktors Nrf2, einem Transkriptionsfaktor der bei oxidativem Stress die Expression antioxidativer Proteine reguliert, um inflammatorische Prozesse zu verhindern. IL-6 ist ein pro-inflammatorisches Cytokin, welches von T-Zellen und Makrophagen zur Stimulation der Immunreaktion und entzündlicher Prozesse freigesetzt wird. Zusätzlich wird in PACS2<sup>+/+</sup>-Proben mit DEN-Behandlung Foxm1 (forkhead box protein M1) detektiert. Foxm1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Aktivierung das Fortschreiten des Zellzyklus von der G2- zur M-Phase fördert. Da die Regulierung des

Zellzyklus bei Krebszellen häufig gestört ist, beispielsweise durch permanent aktivierte Transkriptionsfaktoren, wird Foxm1 auch als Proto-Onkogen bezeichnet, also ein Gen, welches potentiell das ungehemmte Wachstum von Tumorzellen fördern kann.



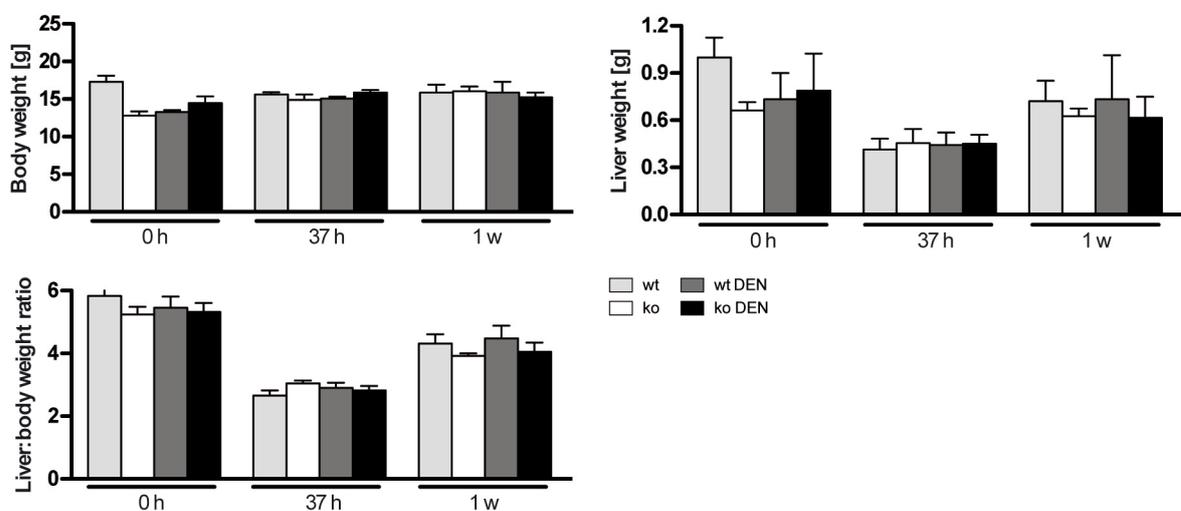
**Abbildung 30** Semiquantitative Polymerasekettenreaktion von DNA, isoliert aus Lebergewebe von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren in der präneoplastischen Phase. 4 Monate nach DEN-Injektion

### 3.4 Leberregeneration

Die Regeneration der Leber kann über verschiedene Wege ablaufen. Nach induzierter Schädigung wie z.B. auftretendem oxidativem Stress kann es zu einer kompensatorischen Proliferation kommen, d.h. apoptotische Zellen (beispielsweise durch irreparable DNA-Schäden) können durch Zellteilungen ersetzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Hypertrophie der Zellen. Dabei sind Hepatozyten nicht auf einen Zellkern beschränkt, sie können auch mehrere Zellkerne enthalten. Eine zusätzliche Möglichkeit der Regeneration bietet die Rekrutierung von Stammzellen (Fausto und Campbell, 2003).

### 3.4.1 Induzierte Leberregeneration durch Partielle Hepatektomie zeigt eine identische Entwicklung in Körpergewicht und Lebergewicht bei PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen

Wie bereits von Higgins und Anderson (1931) beschrieben wurden zur Provokation einer massiven Regeneration der Leber DEN-behandelte weibliche Mäuse und ihre unbehandelten Kontrollen im Alter von 6 Wochen einer 2/3-Leberteilektomie unterzogen. Basalwerte (0 h) stammen von nicht-operierten Tieren. Die Proben wurden 37 Stunden (maximaler Anstieg der Proliferation) sowie 1 Woche (vollständige Regeneration des entfernten Gewebes) nach Hepatektomie gewonnen und zur weiteren Analyse verwendet.



**Abbildung 31 Körpergewicht, Lebergewicht und Verhältnis von Körper- zu Lebergewicht bei PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Mäusen nach partieller Hepatektomie.**

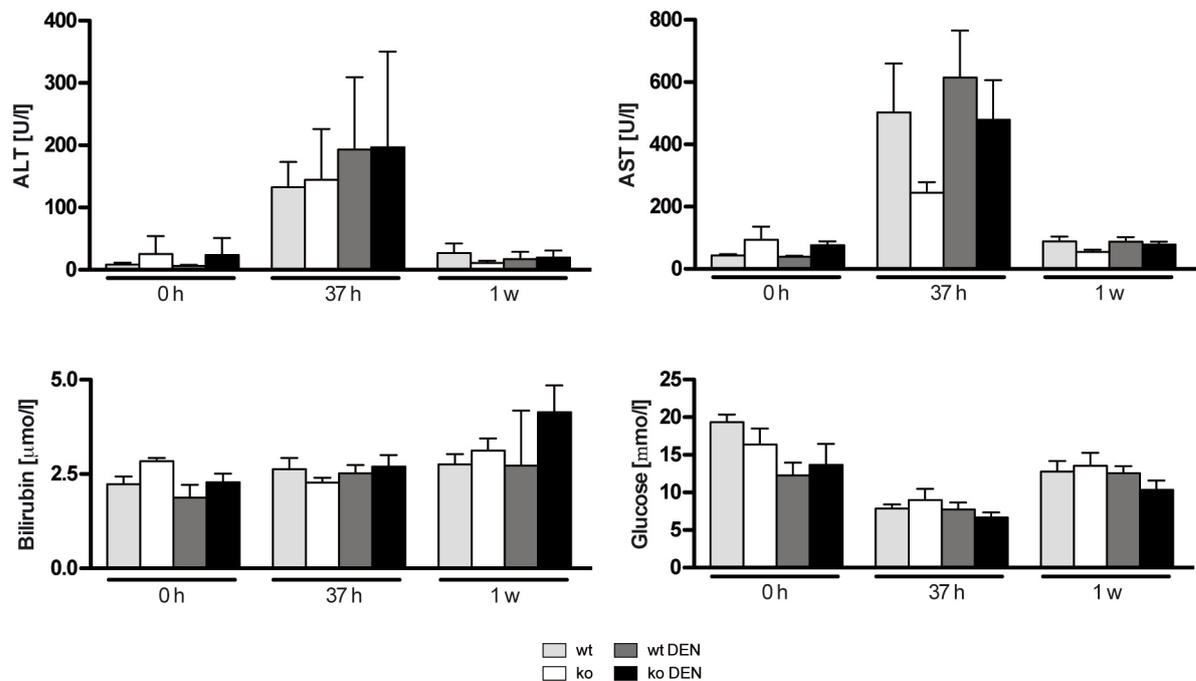
0 h = Kontrollen, 37 h und 1 Woche postoperativ

Nach der Leberteilektomie wurden als erster Indikator einer unterschiedlichen Regenerationsfähigkeit durch den Verlust von PACS2 die Gewichte der Lebern wie auch der Tiere selbst gemessen. So zeigen sich in unbehandelten und DEN-behandelten Tieren beider Tierstämme sowohl nach 37 Stunden wie auch nach 1 Woche keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 31).

### 3.4.2 Parameter im Blutplasma zeigen Genotyp-unabhängige Veränderungen nach Leberteilektomie

Als weiterer Indikator einer veränderten Regenerationsfähigkeit wurden die Level der Alanin- und Aspartat-Transferase, sowie Bilirubin und Glukose im Blutplasma analysiert (Abbildung

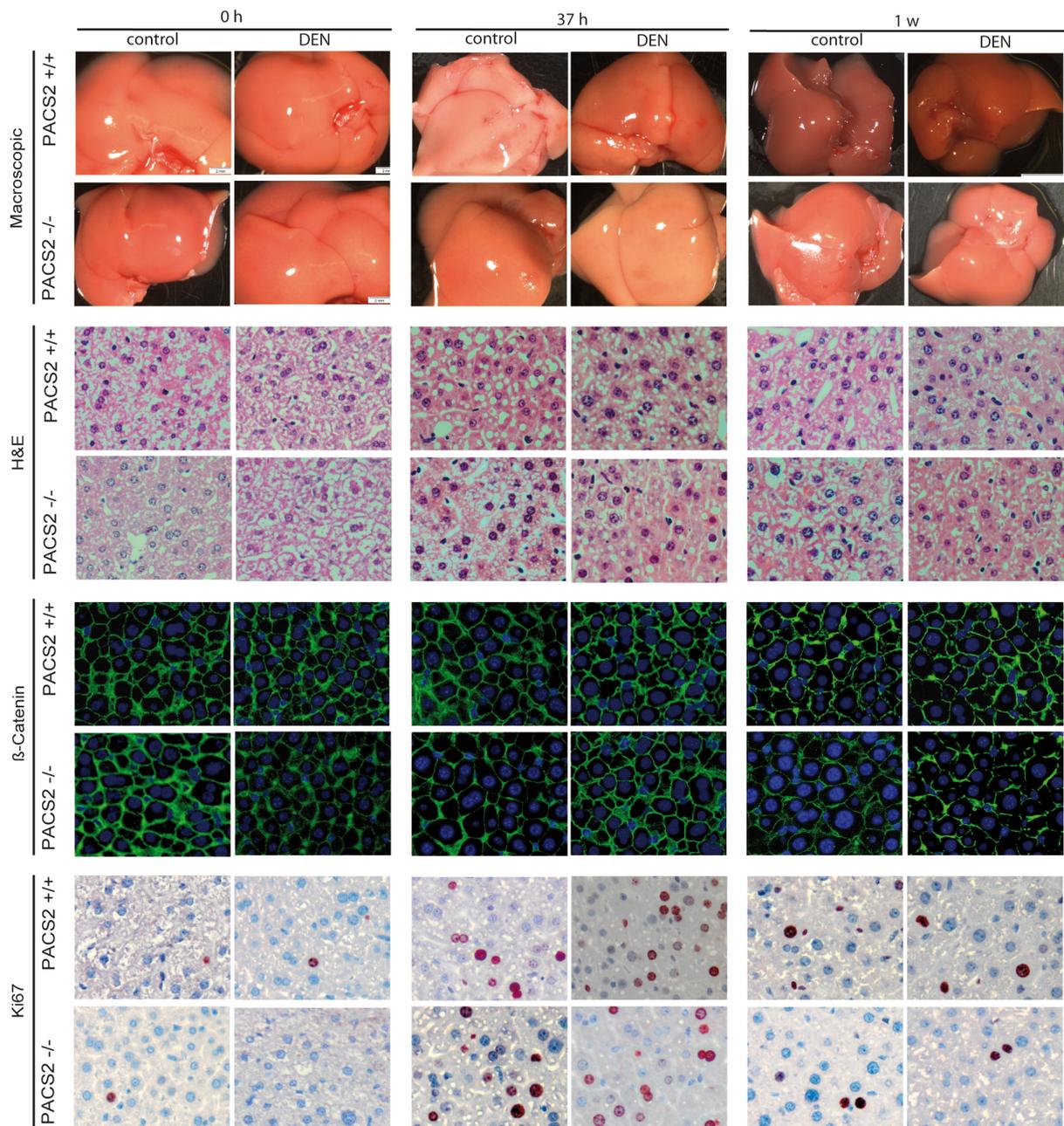
32). Diese zeigen einen enormen Anstieg der ALT- und AST-Werte 37 Stunden nach Hepatektomie, wobei die AST-Level in der Kontrollgruppe mit PACS2-Knockout deutlich geringer ausfallen. Die Bilirubinwerte bleiben über den gesamten Zeitraum relativ konstant. Die Glukosewerte sind proportional zum Lebergewicht 37 Stunden postoperativ verringert und nach 1 Woche wieder auf Ausgangsniveau.



**Abbildung 32 Blutplasma-Parameter für Leberschädigung in PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Tieren nach induzierter Regeneration durch partielle Hepatektomie.** ALT = Alanin-Transferase, AST = Aspartat-Transferase, 0 h = Kontrollen, 37 h und 1 Woche postoperativ

### 3.4.3 Makroskopische und mikroskopische Darstellung der Lebern von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren nach partieller Hepatektomie sind äquivalent

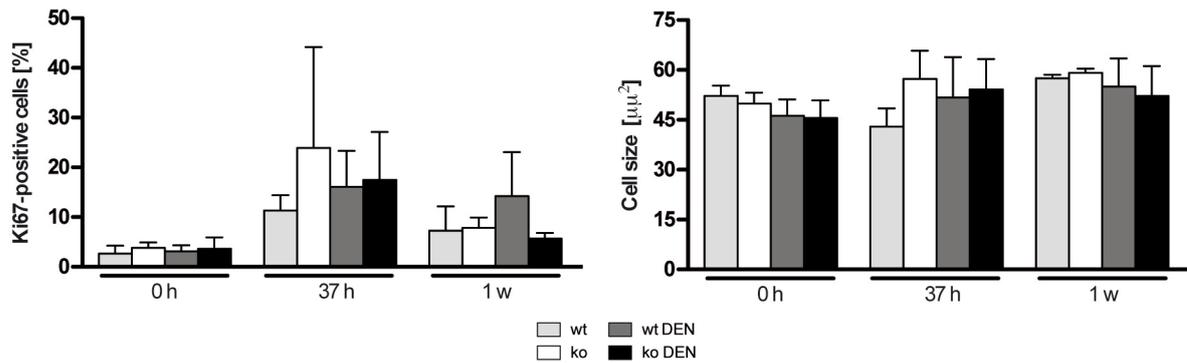
Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch zeigt das Lebergewebe ein gleiches Bild bei PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit sowie ohne DEN-Behandlung (Abbildung 33).



**Abbildung 33 Makroskopische und mikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe nach partieller Hepatektomie PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

H&E = Hämatoxylin-Eosin-Färbung, β-Catenin = Zellwandmarker zur Bestimmung der Zellgröße, Ki67 = Proliferationsmarker; 0 h: ohne Hepatektomie, Probenentnahme: 37 h und 1 Woche nach Hepatektomie

Die histochemische Färbung proliferierender Zellen (Ki67) bzw. der Zellgröße (β-Catenin) zeigt ein identisches Regenerationsverhalten der Hepatozyten in allen verglichenen Gruppen (Abbildung 34).



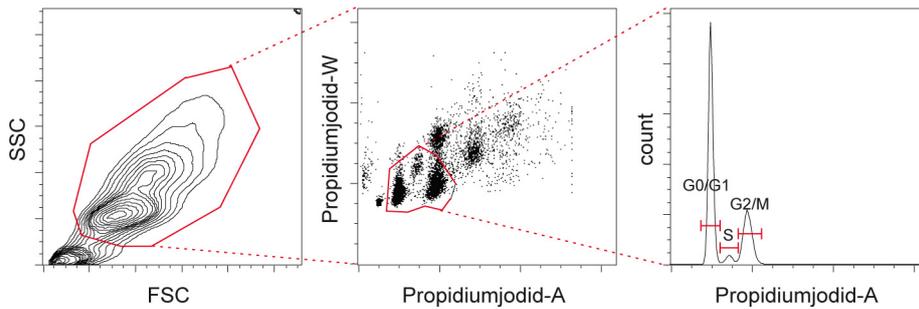
**Abbildung 34** Menge proliferierender Zellen (Ki76) sowie Zellgröße ( $\beta$ -Catenin) regenerierender Lebern von PACS2<sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2<sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen nach partieller Hepatektomie.

0 h: Kontrollen ohne Hepatektomie, Probenentnahme: 37 h und 1 Woche nach Hepatektomie

Somit lässt sich zusammenfassen, dass weder die Behandlung von DEN noch das Fehlen von PACS2, noch eine Kombination aus beiden Faktoren einen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit von Hepatozyten nach partieller Hepatektomie haben.

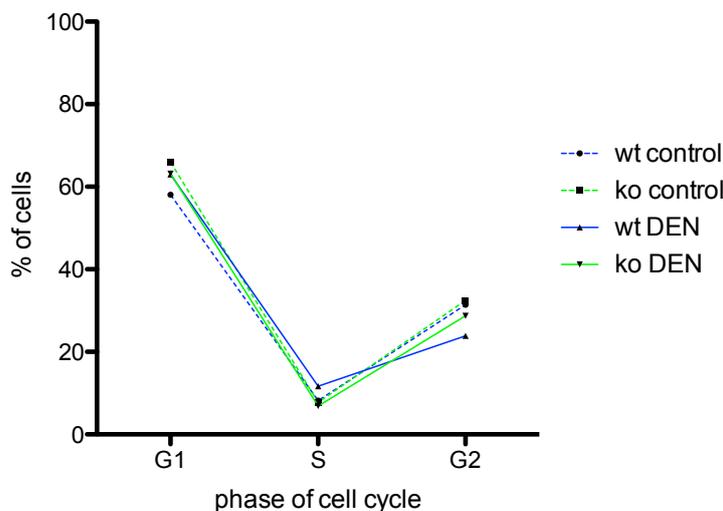
#### 3.4.4 Zellzyklusanalyse von Hepatozyten in der präneoplastischen Phase

Die Zellzyklusanalyse dient als weitere Methode zur Ermittlung der Regenerations- bzw. Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten. Mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) wird die DNA gefärbt. Die Intensität der PI-Färbung entspricht der enthaltenen DNA-Menge (Krishan, 1975). In einem Durchflusszytometer wird jede Zelle von Lasern erfasst und gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) gibt dabei Aufschluss über die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC) über die Granularität der Zellen. Der Durchtritt einer jeden Zelle durch den Messbereich der Laser wird als Kurve dargestellt, die sich durch eine spezifische Breite (W = width), Höhe (H = height) und Fläche (A = area) auszeichnet. Anhand dieser Messwerte werden nacheinander verschiedene Messbereiche ein- oder ausgeschlossen (Gating), um die gewünschten Informationen herauszufiltern. Abbildung 35 zeigt nach welchen Kriterien die Zellsignale ausgewählt und dargestellt werden.



**Abbildung 35 Gating-Strategie der Zellzyklusanalyse von Hepatozyten von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen der präneoplastischen Phase nach DEN-Injektion.**  
 SSC = Seitwärtsstreulicht, FSC = Vorwärtsstreulicht, W = Weite, A = Fläche

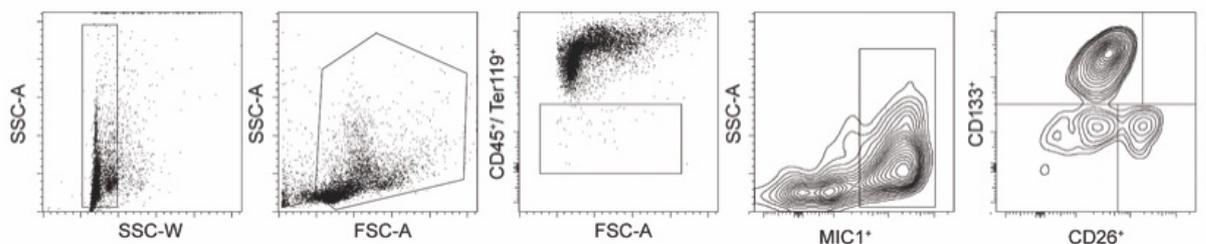
Der Zellzyklus besteht aus mehreren Phasen. Am Ende steht die Mitose-Phase, in welcher die tatsächliche Teilung der Zellen erfolgt. Nach abgeschlossener Teilung befindet sich jede Zelle wieder in der zu Beginn stehenden G1-Phase mit einfacher DNA-Menge. Von dort tritt sie in die Teilungs-inaktive G0-Phase oder beginnt einen neuen Zellzyklus. In diesem Fall geht sie in die S-Phase über, bei der sich die DNA verdoppelt. Während der nachfolgenden G2-Phase werden Proteine synthetisiert und das Endoplasmatische Retikulum eingeschmolzen. In der Analyse der aufbereiteten Leberproben wurde die PI-markierte DNA der durchfließenden Zellen im *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS) gemessen und mit Hilfe der Software *FlowJo* ausgewertet. Die prozentualen Anteile der Zellen in der jeweiligen Phase sind in Abbildung 36 dargestellt. Dabei stellt sich bei den Proben mit und ohne DEN-Behandlung sowie mit oder ohne PACS2 eine stark ähnelnde Aufteilung der Zellzyklusphasen dar: ca. 60% der Zellen befinden sich in der G0- und G1-Phase, ca. 10% in der S-Phase sowie um die 30% in der G2 oder M-Phase. Die Zellzyklusanalyse ergibt damit keinen Hinweis auf einen veränderten Proliferationsmechanismus durch PACS2-Mangel.



**Abbildung 36 Zellzyklusanalyse isolierter Hepatozyten von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen 4 Monate nach DEN-Injektion.**

### 3.4.5 Ovalzell-Analyse

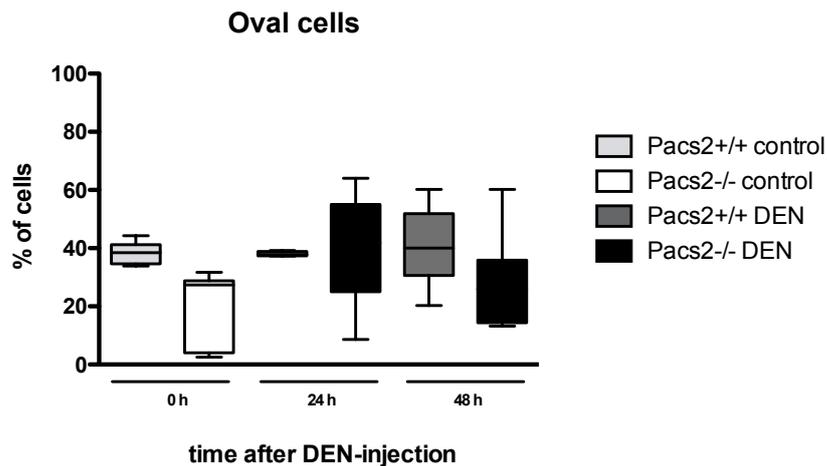
Bereits 1956 berichtet Farber von bipotenten Leberstammzellen, die aufgrund der ovalen Form ihres Zellkerns *Oval cells* genannt werden (Farber, 1956; Lázaro *et al.*, 1998). Dorrell *et al.* (2008) gelang es mit MIC1-1c3 ein Oberflächenmolekül der Ovalzellen zu identifizieren. Mit einem gegen MIC1-1c3-gerichteten Fluoreszenz-markierten Antikörper kann nun aus der Gesamtmenge der Leberzellen die Menge der Ovalzellen mit Hilfe Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie bestimmt werden. Dabei werden zusätzlich als Ausschlusskriterien weitere Marker verwendet: CD45 als Oberflächenmolekül von Immunzellen, Ter119 als Marker der Erythrozyten und CD26 als Oberflächenmolekül für Epithel- sowie Immunzellen. Ovalzellen besitzen keines dieser Oberflächenmoleküle. Nach Ausschluss aller mit diesem Marker gefärbter Zellen werden nun alle Zellen mit positivem Signal für MIC1-1c3 berücksichtigt, sowie eine zweite Gruppe von Zellen, welche zusätzlich das Endothelzell-Oberflächenmolekül CD133 trägt. In Abbildung 37 ist die Strategie, mit der erfasste Zellen ein- oder ausgeschlossen werden, beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 37 Gating-Strategie der Ovalzell-Analyse von Hepatozyten der PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäuse nach DEN-Injektion.**

SSC = Seitwärtsstreulicht (Granularität); FCS = Vorwärtsstreulicht (Größe); W = Weite; A = Fläche; Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenmoleküle: CD45 (Immunzellen), Ter119 (Erythrozyten), CD26 (Epithelzellen, Immunzellen), MIC1-1c3 (Ovalzellen), CD133 (Endothelzellen)

Für die Ovalzellanalyse wurden 15 Tage alte Tiere mit niedrig dosiertem DEN behandelt und 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach Behandlung die Lebern entnommen. Gleichgeschlechtliche Wurfgeschwister wurden als Pool in einer Probe weitergeführt. Da sich keine geschlechtlichen Unterschiede zeigten (Daten nicht gezeigt), wurden Proben unterschiedlichen Geschlechts zum gleichen Zeitpunkt gemeinsam analysiert.



**Abbildung 38 Ovalzell-Analyse von Leberlysaten der PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäuse.** 0 h (Kontrollen), 24 h und 48 h nach DEN-Injektion

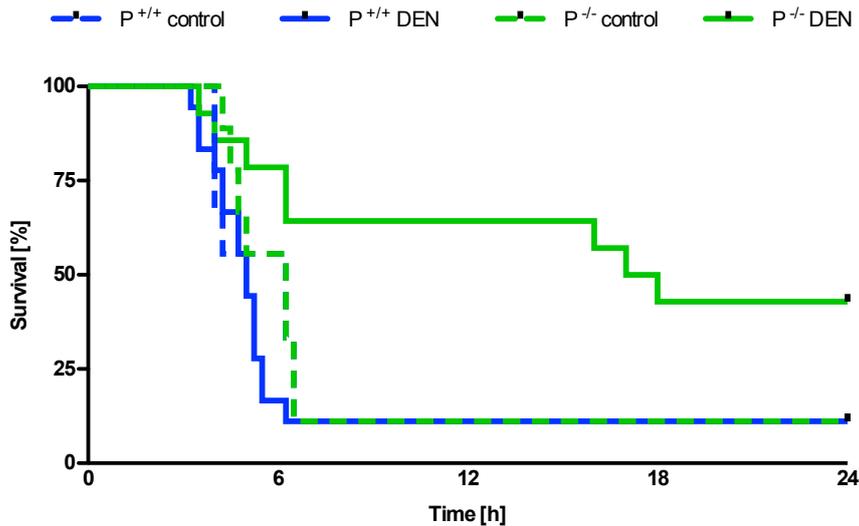
Der prozentuale Anteil der Ovalzellen von allen Leberzellen liegt sowohl vor als auch nach DEN-Behandlung und bei PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren bei ca. 40% (Abbildung 38), wobei die Werte innerhalb der Gruppen größeren Schwankungen unterliegen. Auch hier ergibt sich kein Hinweis auf den Einfluss von PACS2 auf die Regenerationsmechanismen.

### 3.5 Apoptose

Im Verlauf akuter Schädigung wie auch während der Karzinogenese spielt Apoptose, der von der Zelle selbst induzierte Zelltod, eine wichtige Rolle im Umgang reparabler und irreparabler Schäden. Da Aslan *et al.* (2009) eine Beteiligung von PACS2 an der induzierten Apoptose am TRAIL-Rezeptor zeigen konnten, wurde in dieser Arbeit die Beteiligung von PACS2 an der induzierten Apoptose am CD95-Rezeptor mittels Jo2-Antikörper nach vorangegangener DEN-Behandlung sowie unbehandelten Kontrollen untersucht.

#### 3.5.1 Nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 ist das Überleben der PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere länger als das der PACS2<sup>+/+</sup>-Tiere nach DEN-Injektion

Um den Effekt von Todesrezeptor-vermittelter Apoptose nach akuter Leberschädigung zu testen, bekamen PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäuse eine DEN-Injektion und wurden 6 Wochen später mit dem CD95-Antikörper Jo2 behandelt.

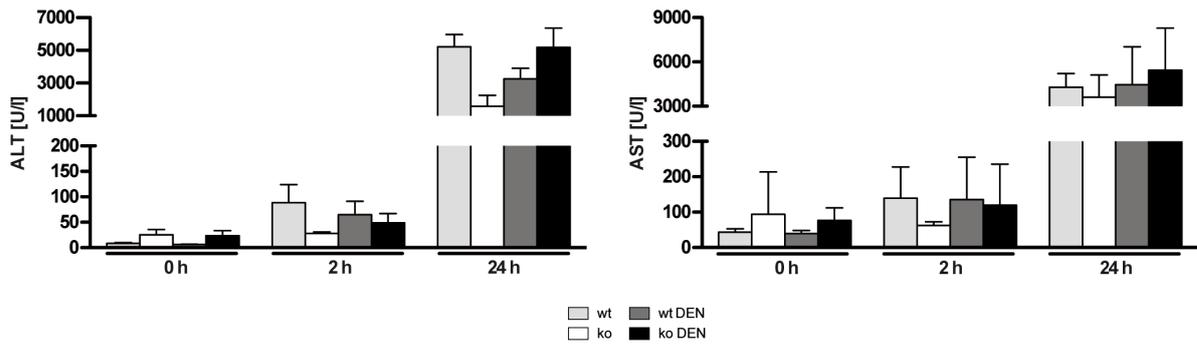


**Abbildung 39 Überlebenskurve der PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 nach vorangegangener DEN-Behandlung.**  
Kontrollen erhielten kein DEN; P = PACS2

Im zugrunde liegenden Versuch mit dem CD95-Antikörper Jo2 nach akuter Leberschädigung mit DEN kann ebenfalls eine Beteiligung von PACS2 an der induzierten Apoptose gezeigt werden. Bis 6,75 Stunden nach Jo2-Injektion verstarben 89% der Kontrolltiere und DEN-injizierten PACS2<sup>+/+</sup>-Tiere (in jeder Gruppe überlebte ein Tier). Aus der Gruppe der DEN-behandelten PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere verstarben im gleichen Zeitraum 37%, weitere 21% verstarben in einem Zeitraum von 16-18 Stunden nach Jo2-Gabe. Nach 24 Stunden befanden sich 42% in einem unauffälligen Allgemeinzustand (Abbildung 39).

### 3.5.2 Nach Behandlung mit CD95-Antikörper Jo2 steigen die Lebertransaminasen unabhängig vom Genotyp an

Zur Quantifizierung der Leberzellschädigung wurden die Alanin- und Aspartat-Transferasen vor (0 h) sowie 2 Stunden und (bei Überleben) 24 Stunden nach Jo2-Behandlung gemessen. Bereits 2 Stunden nach Jo2-Administration sind deutlich erhöhte Transaminasen messbar (Abbildung 40).



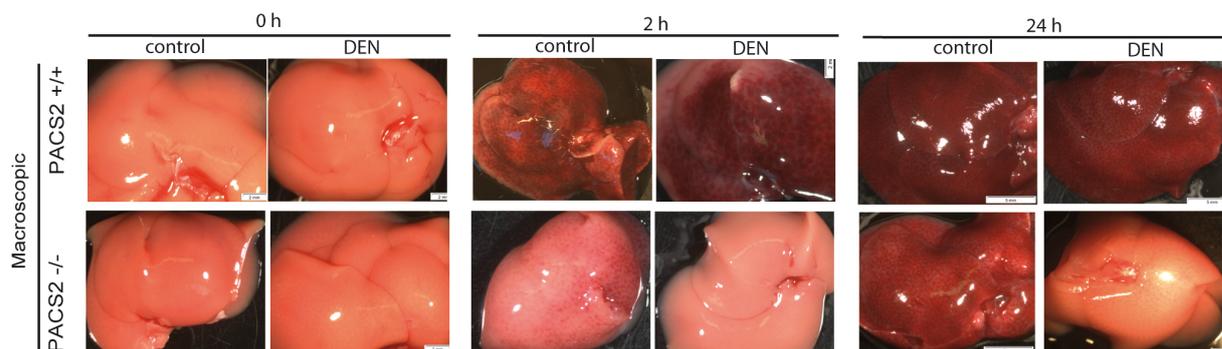
**Abbildung 40** Lebertransaminasen nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 bei PACS2<sup>+/+</sup>(wt)- und PACS2<sup>-/-</sup>(ko)-Mäusen.

ALT = Alanin-Transferase, AST = Aspartat-Transferase

Nach 24 Stunden sind diese auf ein extrem hohes Niveau angestiegen. Dabei zeigen sich jedoch keine Unterschiede in den DEN-behandelten und Kontrolltieren oder bei PACS2-Verlust. Aufgrund der Leberschädigung war die Einwanderung von Blutzellen in die Leber stark erhöht und der Allgemeinzustand der Tiere teilweise sehr schlecht, weshalb sich die Blutentnahme zur Messung geeigneter Mengen als schwierig herausstellte.

3.5.3 Nach Behandlung mit dem CD95-Antikörper Jo2 zeigen sowohl PACS2<sup>+/+</sup>- wie auch PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere einen leichten Anstieg des Lebergewichtes bei Überleben der ersten 24 Stunden

Das Körpergewicht der Mäuse zeigt keine Veränderung nach Jo2-Behandlung aller betrachteter Gruppen zu den betrachteten Zeitpunkten (Abbildung 42).

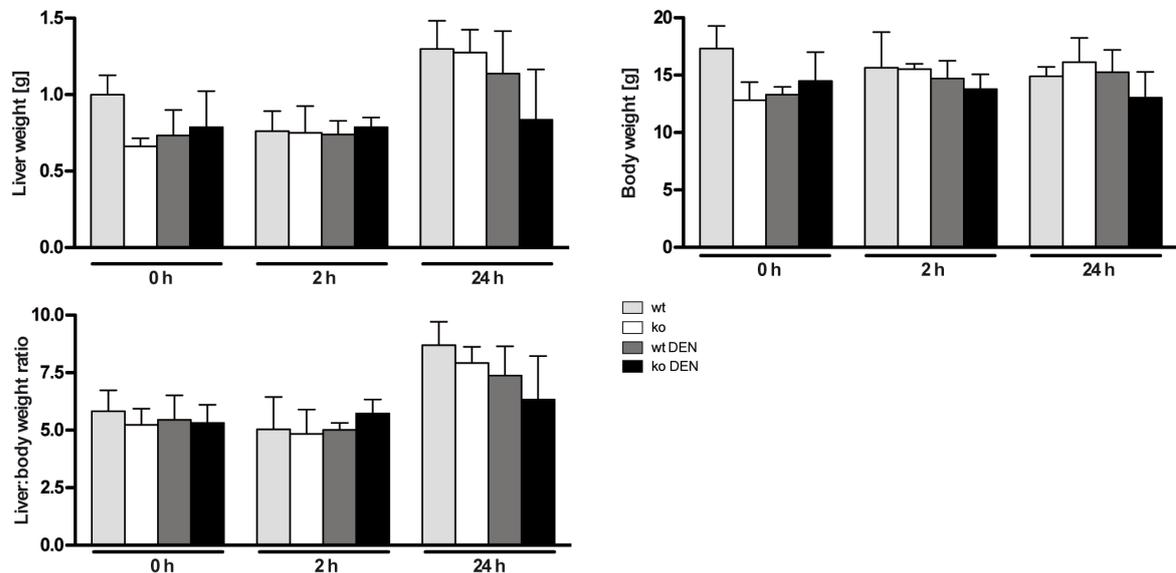


**Abbildung 41** Makroskopische Aufnahmen entnommener Lebern von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>- Mäusen nach Apoptoseinduktion mit dem CD95-Antikörper Jo2.

0 h = Kontrollen

Das Lebergewicht ist 24 Stunden nach Jo2-Injektion in den Kontrolltieren sowie in den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren mit vorangegangener DEN-Injektion erhöht, korrelierend mit der hohen

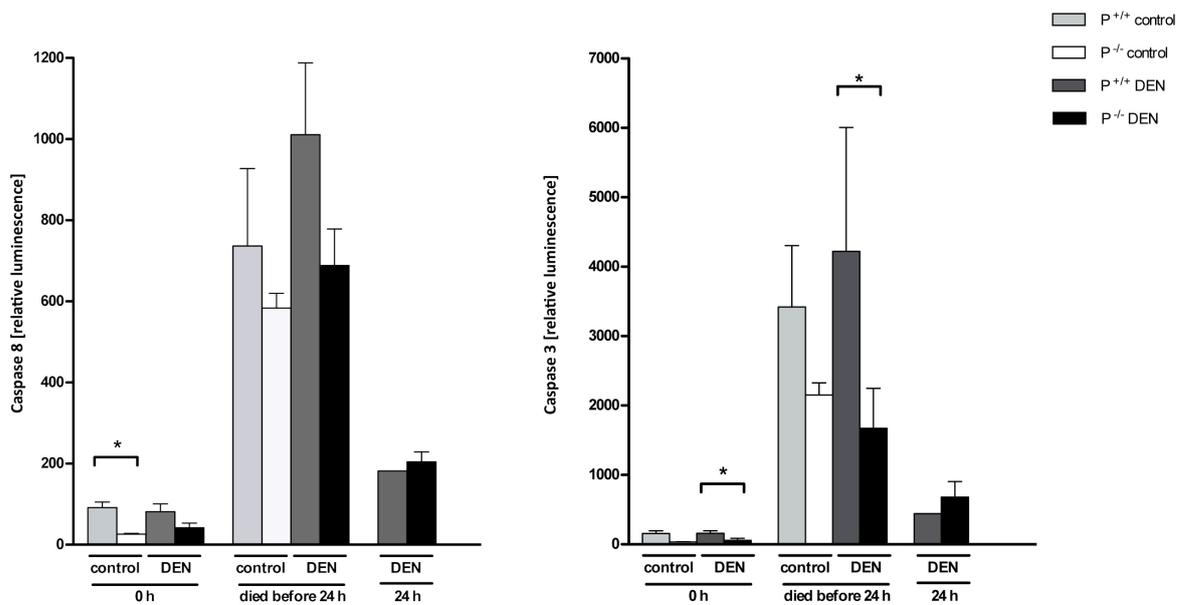
Sterblichkeit der Tiere. Dies ist auf eine starke Ansammlung von Blut in der Leber zurückzuführen, makroskopisch sichtbar durch eine dunkelrote Färbung des gesamten Gewebes (Abbildung 41). Die DEN-behandelten Tiere mit PACS2-Verlust hatten 24 Stunden nach Jo2-Behandlung, mit einigen Schwankungen, ein normales Lebergewicht.



**Abbildung 42 Lebergewicht und Körpergewicht 2 h sowie (bei Überleben) 24 h nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 mit vorangegangener DEN-Behandlung bei PACS2<sup>+/+</sup> (wt)- und PACS2<sup>-/-</sup> (ko)-Mäusen.**  
Kontrollen ohne DEN, 0 h = ohne Jo2-Injektion

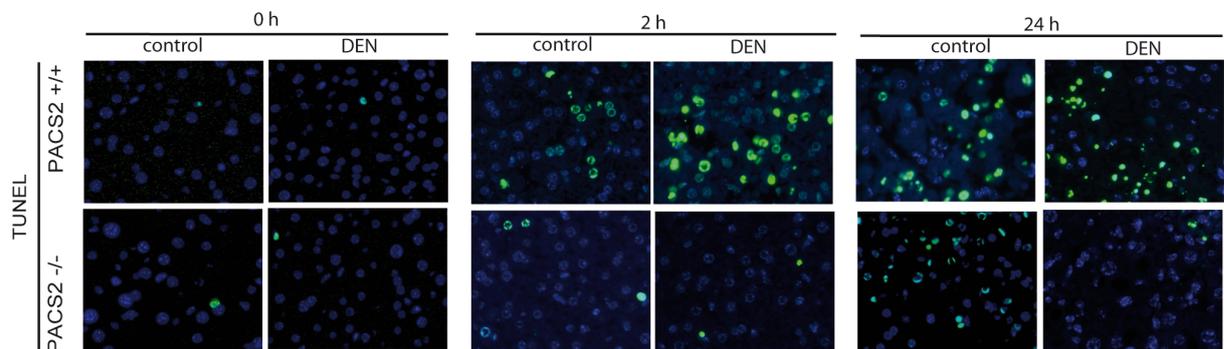
### 3.5.4 Die Aktivität der Caspasen 3 und 8 korreliert mit der Sterberate der PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere nach Injektion mit dem CD95-Antikörper Jo2

Mittels eines Caspase-Assays wurde die Caspase-Aktivität der an der Apoptose beteiligten Caspasen 8 und 3 quantifiziert. Dabei zeigen sich bereits in den basalen Werten sowohl ohne als auch mit DEN-Behandlung verminderte Caspaselevel in den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren (Abbildung 43). Nach Apoptose-Induktion durch Jo2 steigen die Caspasen der daran versterbenden Tiere massiv an, wobei die Level der wenigen verstorbenen PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere deutlich unter denen der PACS2<sup>+/+</sup>-Tiere liegen. Bei den 24 Stunden überlebenden Tieren ist die Caspase-Aktivität zwar erhöht, jedoch deutlich geringer als bei verstorbenen Tieren.



**Abbildung 43 Caspase 8- und Caspase 3-Aktivität (relative Lumineszenz) nach Injektion des CD95-Antikörpers Jo2 bei PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere.**  
p-Wert\* < 0,05

Der immunhistochemische Nachweis apoptotischer TUNEL-positiver Hepatozyten ist in allen Gruppen möglich (Abbildung 44).



**Abbildung 44 Färbung apoptotischer Zellen (TUNEL) in Lebergewebeschnitten von PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach induzierter Apoptose durch den CD95-Antikörper Jo2.**  
0 h = Kontrollen

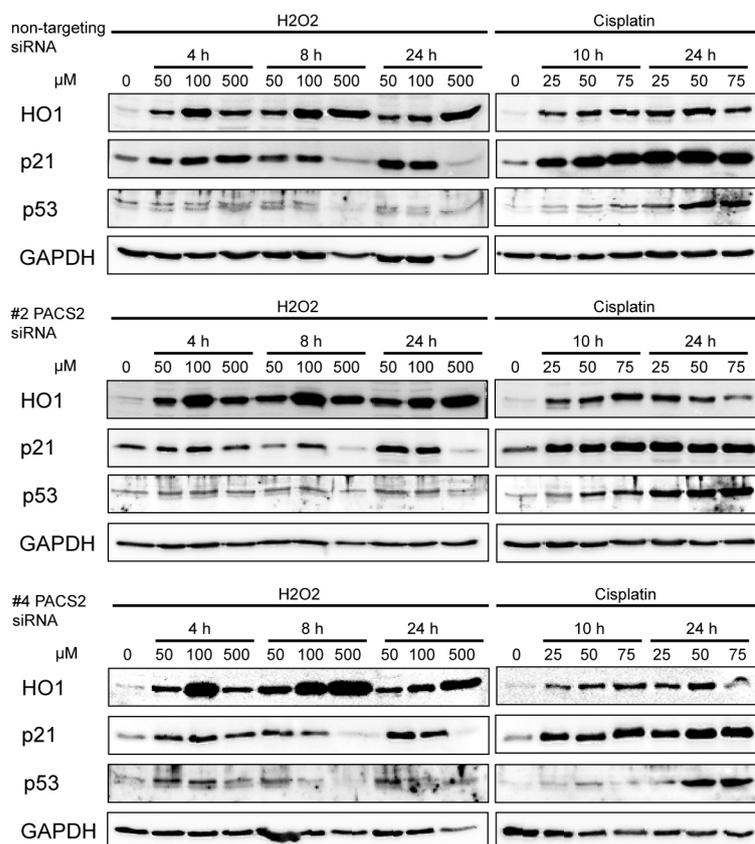
### 3.6 *In-vitro*-Analysen

Zum Verständnis der verminderten Apoptose-Sensitivität nach Jo2-induzierter Rezeptor-vermittelter Apoptose und der verzögerten Tumorentstehung bei PACS2<sup>-/-</sup> *in vivo* bei geringen Hinweisen auf die ursächlichen Mechanismen erfolgte ein Knockdown von PACS2 *in vitro*. Ziel war die Untersuchung, ob der Verlust von PACS2 zu einer veränderten Antwort auf eine DNA-Schädigung führt. Dazu wurde die humane Hepatomazelllinie Hepa1c1c7 mit siRNA gegen PACS2 transfiziert. Eine Schädigung der Zellen erfolgte durch oxidativen

Stress, verursacht durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder durch Apoptose-Induktion mit Hilfe des Zytostatikums Cisplatin. Beide Stressoren wurden in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

### 3.6.1 PACS2-siRNA-transfizierte Hepa1c1c7-Zellen reagieren auf DNA-Schäden vergleichbar mit Kontrollen

Die transfizierten Zellen wurden auf Erfolg des PACS2-Knockdown überprüft und anhand der Effektivität des Knockdowns wurde die siRNA #2 und #4 ausgewählt. Es kann gezeigt werden, dass sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch Cisplatin eine Aktivierung der nach Leberschädigung aktivierten Proteine HO1, p21 sowie p53 Dosis-abhängig induziert (Abbildung 45). Jedoch zeigen die PACS2-Knockdown-Zellen gleich hohe Proteinkonzentrationen wie non-targeting siRNA-behandelte Zellen.



**Abbildung 45** Westernblot-Analyse von Proteinen sensibel für oxidativem Stress und verbundenen DNA-Schäden bei Hepa1c1c7-Zellen nach Transfektion mit siRNA und Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Cisplatin.

siRNA: non-targeting = nicht gegen ein Zielgen gerichtet, #2 und #4 gegen PACS2; Behandlung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50, 100 und 500 μM, Zellernte nach je 4, 8 und 12 h; Behandlung mit Cisplatin: 25, 50 und 75 μM, Zellernte nach je 10 und 24 h

Somit ergibt sich kein Hinweis eines Einflusses von PACS2 bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder Cisplatin-verursachten DNA-Schäden bzw. oxidativem Stress in Hepa1c1c7-Zellen.

## 4 Diskussion

Es ist bekannt, dass Leberkrebs stufenweise entsteht. Leberschädigungen durch Viren, übermäßigen Genuss von Alkohol oder Nahrungsmitteln sowie genetische Erkrankungen führen zu einer chronischen Hepatitis mit zunehmenden Gewebeveränderungen und ansteigendem Risiko maligner Dysplasien. Tumorzellen entgehen oft immunologischen und apoptotischen Kontrollmechanismen (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Induktion der Apoptose oder die Verbesserung der Apoptosesensitivität der Tumorzellen ist Ziel der chemotherapeutischen Tumorthherapie. In ihrer Liste der Essentiellen Medikamente beschreibt die WHO 51 Antineoplastika und Immunsuppressiva, davon 40 Zytostatika (Essential Medicines List, WHO, 2017). Rich *et al.* (2017) benennen Sorafenib und Regorafenib als einzige systemische Therapien mit verlängertem Überleben bei fortgeschrittenem, lokal nicht behandelbarem HCC. Die *European Association for the Study of the Liver* beschreibt in ihren Richtlinien für die Medizinische Praxis zur Behandlung des HCC zusätzlich neuere, in klinischen Studien befindliche systemische Therapien (EASL, 2018). Jedoch ist mit diesen Chemotherapeutika bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC weiterhin keine Heilung zu erreichen. Neue Therapieansätze sind dringend notwendig um die Prognosen bei ansteigender Inzidenz des HCC bei weiterhin oft später Diagnose zu verbessern.

PACS2 ist als Transportprotein zwischen ER, Plasmamembran und Golgi-Apparat ein wichtiger Regulator der Signaltransduktion und Zellhomöostase. So ist PACS2 verantwortlich für die Lokalisation des Kalzium (Ca)-permeablen nicht-selektiven Kationenkanals Polycystin-2 (Köttgen *et al.*, 2005). Zeitgleich kann gezeigt werden, dass nicht nur der Austausch von Molekülen, sondern eine direkte Anlagerung verschiedener Zellorganellen PACS2-abhängig ist (Simmen *et al.*, 2005). Eine Form dieses Kompartimentkontaktes ist die Mitochondrien-assozierte Membran (MAM), welche das ER mit Mitochondrien verbindet. Wie empfindlich diese Kontakte für die Zellhomöostase sind, zeigt eine Studie mit adipösen Mäusen (Arruda *et al.*, 2014). Mit zunehmender Fetteinlagerung in die Hepatozyten reorganisiert sich die MAM bei erhöhter Zusammenlagerung von ER und Mitochondrium und führt so zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Mitochondrien und Abnahme der oxidativen Kapazität. Die zelluläre Kalzium-Homöostase ist zusätzlich abhängig von der Bindung und Verteilung des Kalziumpumpen-Chaperons Calnexin durch PACS2 (Myhill, 2008). Eine weitere bedeutende Transportfunktion von PACS2 konnte im Zusammenhang mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) Typ 1 Gruppe M gezeigt werden. Der Negativfaktor (Nef) wird

mit Hilfe von PACS2 in die Nähe des Zellkerns gebracht und stimuliert dort eine Phosphoinositid-3-Kinase-Kaskade, welche zur Endozytose des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) führt und die Immunpräsentation umgeht, da beispielsweise CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen diese zur Antigen-Erkennung benötigen (Atkins *et al.*, 2008; Dikeakos *et al.*, 2012). So zeigen sich immer vielfältigere und sehr differenzierte Funktionen von PACS2. Leider liegen bisher nahezu ausschließlich Daten aus *in vitro*-Studien vor.

Um mögliche präventive oder therapeutische Ansätze zu erarbeiten, wird in dieser Arbeit untersucht, ob und wie PACS2 bei der Tumorentstehung in den Lebern von Mäusen beteiligt ist. Bereits seit Jahrzehnten wird die Wirkung kanzerogener Substanzen wie beispielsweise Diethylnitrosamin (DEN) auf die Leber untersucht (Herrold, 1964; Craddock, 1975; Schneider *et al.*, 2012). Bei niedriger Dosis induziert DEN die Hepatokarzinogenese sowie die Fibrose in der Leber (Kim *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2009). Nach Bioaktivierung durch Cytochrom P450-Isozyme initiiert DEN DNA-Addukte, DNA-Reparatur und regenerative Zellproliferation (Verna *et al.*, 1996). In einem mehrstufigen Prozess entsteht später Leberkrebs (Pitot *et al.*, 1987; Kato *et al.*, 1993). Deutlich ist stets, dass auch sehr geringe Dosen von DEN final zur Entwicklung von Lebertumoren führen. Aus diesem Grund ist die Verwendung von DEN geeignet, die Prozesse der Tumorentstehung zu verfolgen und eine mögliche Regulation aufzuzeigen.

#### 4.1 Die Bedeutung von PACS2 für die Hepatokarzinogenese

Der Verlust von PACS2 führt zu einer verzögerten Tumorentstehung in der Leber. Die Tumorzinidenzen, gemeinsam betrachtet mit Tumoranzahl und Tumorgöße (Abbildung 9), legen den Schluss nahe, dass sich sowohl bei PACS2<sup>+/+</sup>- als auch bei PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeitversetzt mehrere kleine Tumore bilden, die mit zunehmender Größe zusammenwachsen. Eindeutig ist, dass zwischen 4 und 8 Monaten nach DEN-Injektion die Hepatokarzinogenese stattfindet (Abbildung 9). Während sich bei den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren in diesem Zeitraum bereits 76% sichtbare Lebertumoren entwickeln, so sind es nur 17% bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren, wobei die Tumoren in Größe und Anzahl ebenfalls geringer sind. Das bedeutet, dass der Übergang der Präneoplasie in die Neoplasie bei den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren zumeist abgeschlossen ist, während er bei den PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren gerade erst beginnt. Dafür erscheint das Tumorstadium der PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere schneller voranzuschreiten, denn weitere 4 Monate später ist bei Tumorstadium und Tumoranzahl kein Unterschied mehr erkennbar. Somit führt der Verlust von

PACS2 tatsächlich nur zu einer Verzögerung in der präneoplastischen Phase. Die Tumorprogression erfolgt PACS2-unabhängig. Bislang fehlen weitere veröffentlichte Daten zu PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen. So bleibt die Vermutung, dass frühe, geringe Veränderungen die Mechanismen der Tumorentwicklung zwar verzögern, jedoch langfristig die protektiven Eigenschaften eines PACS2-Verlustes kompensiert werden.

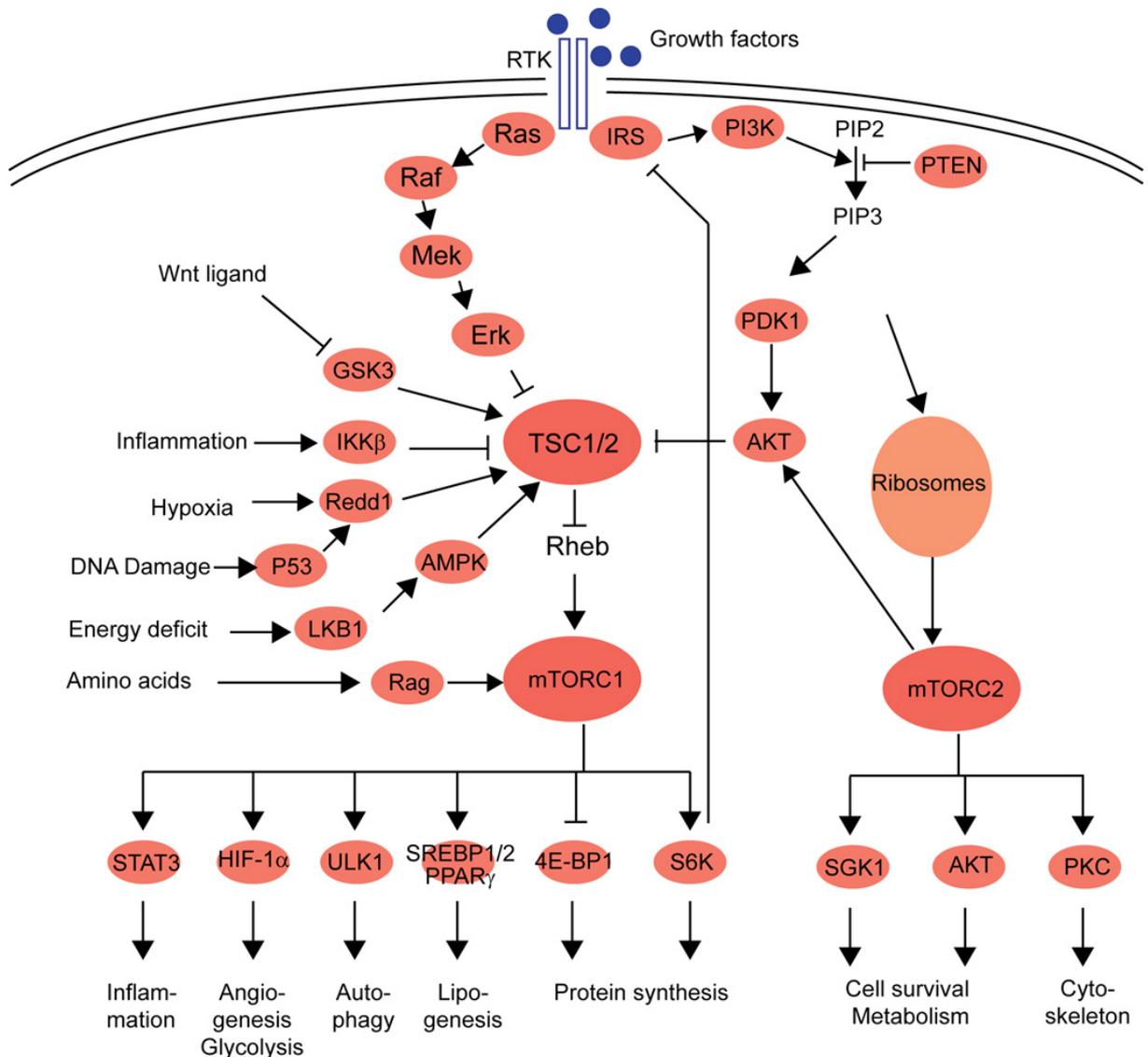
Zur Ergründung der Ursache der verzögerten Hepatokarzinogenese wurden der Einfluss von PACS2 auf die Leberschädigung und die DNA-Schädigung, die Leberregeneration sowie die Apoptosesensitivität untersucht.

#### 4.2 Die Bedeutung von PACS2 für die DEN-induzierte Leberschädigung

Wie von Kato *et al.* (1993) gezeigt, hat eine niedrige DEN-Dosis kaum Einfluss auf das Körpergewicht sowie die Schädigungs-sensitiven Transaminasen ALT und AST. Da die in dieser Arbeit gewählte geringe Dosis die von Kato *et al.* gewählte um 50% übersteigt, kann eine minimale Aktivierung der Transaminasen sowie eine Erhöhung der Bilirubinwerte vor allem bei den PACS2<sup>+/+</sup>-Mäusen gemessen werden. Nach Injektion einer DEN-Hochdosis kann bereits nach 4 Stunden eine Schädigung der DNA anhand von  $\gamma$ H2Ax als Marker für Doppelstrangbrüche gezeigt werden (Abbildung 22). Nachfolgend nimmt die Menge apoptotischer, TUNEL-positiver Zellen zu (24 Stunden nach DEN-Injektion, Abbildung 21). 3 Tage nach DEN-Injektion ist infolge dessen eine Abnahme des Lebergewichtes bei gleichzeitig leicht aktivierter Proliferation (BrdU-Färbung, Abbildung 21) messbar, welche sich nach 10 Tagen noch etwas erhöht. Bei einer akuten Leberschädigung durch niedrig dosiertes DEN liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen PACS2-Wildtyp- und PACS2-Knockout-Mäusen vor.

Die von Park *et al.* (2009) mit wiederholenden DEN-Injektionen gezeigte Überexprimierung Zellzyklus-regulierender Proteine (beispielsweise Cyclin D1 und p21) kann mit der verwendeten initialen Dosis nicht gezeigt werden. Während Cyclin D1 zu keinem Zeitpunkt in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden kann, sind die p21-Level nach DEN-Injektion in den kurzen Zeitpunkten nach niedriger sowie hoher Dosis minimal erhöht (Abbildung 18 und Abbildung 23). Zu den langfristigen Zeitpunkten ist p21 nicht detektierbar (Abbildung 29). Eine p38-aktivierte Stressreaktion, wie im Zusammenhang mit der verzögerten Hepatokarzinogenese bei Verlust des apoptotischen Proteins Bid (Orlik *et al.*, 2015), liegt hier nicht vor. Die Proteinmengen von p38 und p-p38 zeigen keine Veränderungen durch DEN-Behandlung oder Verlust von PACS2. Das ribosomale Protein p-

S6 zeigt zu den kurzen Zeitpunkten nach DEN-Gabe eine gleich hohe Konzentration bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen (Abbildung 18 und Abbildung 23). Zu den späteren Zeitpunkten verschiebt sich das Gleichgewicht. Während nach 4 Monaten erhöhte Werte in beiden Genotypen gezeigt werden, ist nach 8 Monaten die p-S6-Konzentration in den PACS2<sup>+/+</sup>-Lebern auf Basallevel, in den Lebern der PACS2<sup>-/-</sup>-Mäuse jedoch weiterhin erhöht und dies auch in der Kontrollgruppe (Abbildung 29). Nachdem bereits 1974 die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 in der Regeneration von hepatektomierten Ratten (Gressner und Wool, 1974) entdeckt wurde, folgten weitere Studien die zeigen, dass S6 in Reaktion auf verschiedene Agentien und vor allem auf Veränderungen des zellulären Milieus phosphoryliert wird (Chan und Wool, 1988; Ruvinsky *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von S6 in Mäusen erfolgt durch die S6-Kinasen 1 und 2 in Abhängigkeit von mTOR (Dufner und Thomas, 1999). Später wurde gezeigt, dass p-S6 die Zellgröße sowie die Glukose-Homöostase, im Besonderen in pankreatischen  $\beta$ -Zellen, reguliert. Das Fehlen von S6 führte zu kleineren Zellen und verminderter Glukosetoleranz. 2005 haben Ruggero und Sonenberg gezeigt, dass p-S6 wesentlich an der Proteinsynthese und Proliferation beteiligt ist. Im Westernblot kann nach DEN-Injektion eine erhöhte p-S6-Menge gezeigt werden (in PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren etwas höher als in PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren). Nach anfänglichem minimalem Anstieg der Zellgröße, ist dieser 10 Tage nach DEN-Gabe deutlicher. Dabei waren die PACS2<sup>+/+</sup>-Hepatozyten ebenfalls etwas größer als die PACS2<sup>-/-</sup>-Hepatozyten. Das ist möglicherweise auf die erhöhten p-S6-Mengen zurückzuführen, ist jedoch im Zusammenhang mit der Wachstumsphase der jungen Tiere zu betrachten und kaum ungewöhnlich. Nach 4 Monaten sind die p-S6-Level bei Hepatozyten der PACS2<sup>+/+</sup>- und der PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere gleich erhöht im Vergleich zu den Kontrollen, wobei die PACS2<sup>-/-</sup>-Hepatozyten basal bereits deutlich größer sind als die PACS2<sup>+/+</sup>-Hepatozyten (mit und ohne DEN-Behandlung, Abbildung 28). Jedoch nach 8 Monaten ist die p-S6-Konzentration bei DEN-behandelten Wildtyp-Tieren auf Kontrollniveau während sie bei Knockout-Tieren erhöht sind und dies unabhängig von DEN (Abbildung 29). Die S6-Kinasen, welche das ribosomale Protein S6 phosphorylieren, werden durch den mTOR-Komplex1 (mTORC1) aktiviert, welcher Akt-abhängig von dem Tuberous Sclerosis Complex 1 oder 2 (TSC 1/2) aktiviert wird (Abbildung 46). Akt wird entweder an Threonin308 durch die Phosphoinositol3-abhängige Kinase 1 (PK1) oder an Serin 473 von dem mTOR Komplex 2 (mTORC2) phosphoryliert und damit aktiviert (Ruggero und Sonenberg, 2005).



**Abbildung 46 Schematischer Überblick des mTor-Signalweges mit den wichtigsten Faktoren und ihrer Wirkung.**

Matter *et al.*, 2014

Betz *et al.* (2013) haben gezeigt, dass der mTORC2 an der MAM lokalisiert ist und dort mit dem IP3-Rezeptor-Komplex interagiert. Die Anlagerung von mTORC2 wird durch Wachstumsfaktoren stimuliert und kontrolliert die MAM-Integrität sowie die mitochondriale Funktion durch Akt-vermittelte Phosphorylierung des IP3-Rezeptors, der Hexokinase 2 sowie PACS2. mTORC2-Mangel lockert die MAM-Anlagerung und verursacht Defekte der Mitochondrienfunktion wie beispielsweise erhöhtes Membranpotential, erhöhte ATP-Produktion und vermehrte Calcium-Aufnahme. An diesen Dysfunktionen ist PACS2 nach den Erkenntnissen von Arruda *et al.* (2014) direkt beteiligt. Ein Beispiel dafür ist der erhöhte Transport von Calcium in die Mitochondrien. Fehlt die Phosphorylierung von PACS2 durch Akt, da die Aktivierung von Akt durch mTORC2 fehlt, so steht PACS2 für apoptotische Mechanismen zur Verfügung (Thomas *et al.*, 2017). Das Fehlen von PACS2 führt somit bei

auftretendem oxidativem Stress zu einer Verbesserung der metabolischen Veränderungen (Arruda *et al.*, 2014). Das Auftreten von oxidativem Stress durch die metabolische Bioaktivierung von DEN ist bekannt (Liska, 1998; Park *et al.*, 2005). Nun stellt sich die Frage, inwiefern der Verlust von PACS2 bei auftretendem oxidativem Stress tatsächlich zu Veränderungen in der Mitochondrienfunktion führt. Direkt nach niedrig-dosierter DEN-Gabe sind keine Veränderungen der p-Akt-Konzentrationen messbar (Abbildung 18). Das bedeutet, dass der mTORC2 keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von PACS2 und somit seine Funktion im Zusammenhang mit apoptotischen Reaktionen nimmt. Erstaunlicherweise sind die Proteinbanden des mTORC2-phosphorylierten Akt nach 3 und 10 Tagen bei den Wildtyp-Tieren im Vergleich zu allen anderen Proben vermindert. Bei einer hohen Dosis DEN tritt nach 4 Stunden eine kurzfristige Reduktion von p-Akt auf (Abbildung 23). So ist das PDK1-phosphorylierte Akt sowohl in PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren als auch in PACS2<sup>-/-</sup>-Tieren kaum noch detektierbar, p-Akt<sub>Ser473</sub> ist nur in den PACS2<sup>+/+</sup>-Tieren stark vermindert. Nach 4 Monaten sind unabhängig vom Genotyp p-Akt<sub>Thr308</sub> sowie p-Akt<sub>Ser473</sub> in den behandelten Gruppen erhöht (Abbildung 29). Weitere 4 Monate später ist p-Akt<sub>Thr308</sub> in beiden behandelten Gruppen in größerer Menge vorhanden, p-Akt<sub>Ser473</sub> ist zu diesem Zeitpunkt auch in den Kontrollen erhöht. Da die Phosphorylierung von mTORC2-abhängigem p-Akt nicht grundsätzlich inhibiert ist, ist der durch DEN-ausgelöste oxidative Stress so gering, dass mTORC2 nicht beeinträchtigt wird. Ob PACS2-abhängige, geringe metabolische Veränderungen im Mitochondrium auftreten, welche langfristig zur Tumorentstehung in der Leber führen, kann in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, es wäre jedoch eine mögliche, wenn auch spekulative, Erklärung für die verzögerte Tumorentstehung in den PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Auch die verminderte Apoptosesensitivität nach Jo2-Behandlung ließe sich durch eine verminderte PACS2-Phosphorylierung durch Akt und damit erhöhte Bereitsstellung von PACS2 für die Apoptose erklären: Durch das Fehlen von PACS2 ist die CD95-Rezeptor-induzierte und PACS2-vermittelte Apoptose inhibiert, jedoch die Apoptose ohne Mitochondrien-Beteiligung z.B. durch direkte Caspasen-Aktivierung möglich.

Zur Untersuchung der Rolle von PACS2 bei der DNA-Schädigung wurden zusätzlich ein *in vitro*-Modell herangezogen. Zellen der Tumorzelllinie Hepa1c1c7 wurden mit PACS2-siRNA transfiziert und nachfolgend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. dem Zytostatikum Cisplatin behandelt, um DNA-Schäden zu verursachen und nachfolgend die Apoptose einzuleiten. Entgegen der Erwartung reagieren PACS2-siRNA-transfizierte Zellen nicht anders auf die Behandlung als non-targeting siRNA-behandelte Zellen. Aus diesem Grund wurde der Versuch nicht weiter vertieft.

### 4.3 Die Bedeutung von PACS2 für die Leberregeneration

Das Proliferationsverhalten der Hepatozyten ist in den PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen relativ gering und steigt durch DEN-Behandlung, unabhängig von PACS2, moderat an, (Abbildung 16 und Abbildung 21). Die Zellgröße der Hepatozyten nimmt bei den jungen Tieren altersgerecht und PACS2-unabhängig zu (Abbildung 17 und Abbildung 21). Bei einem Alter von 4 Monaten führt der Verlust von PACS2 jedoch zu einer deutlichen Vergrößerung der Hepatozyten, die mit ansteigendem Alter der Tiere weiter zunimmt (Abbildung 13). Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von PACS2 auf das Regenerationsverhalten der Hepatozyten wurde das Modell der partiellen Hepatektomie verwendet. Bereits in den 1930er Jahren wurde die Leberteileresektion an Nagetieren als Modell für die Regeneration der Leber etabliert und ist bis heute die Standardmethode im Tierversuchsmodell (Higgins und Anderson, 1931; Brues und Marble, 1937; Nevzorova *et al.*, 2015). Dabei kommt es vor allem zur Proliferation, d.h. zu einer häufig mehrfachen Zellteilung verbleibender Hepatozyten (Michalopoulos und DeFrances, 1997; Fausto und Campbell, 2003). Zusätzlich tritt eine Entzündung der Leber auf, was sowohl durch Ansteigen der Transaminasen ALT und AST als auch durch Rekrutierung von Immunzellen wie Natürliche Killerzellen (NKT-Zellen) und Granulozyten nachweisbar ist (Kato *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die NKT-Zellen an dem Anstieg der Transaminasen beteiligt sind. Um die Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten und eine mögliche Veränderung der Immunreaktion bei PACS2-Verlust zu untersuchen, wurden 6 Wochen alte weibliche PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere sowohl ohne vorherige DEN-Gabe als auch nach DEN-Injektion einer 2/3-Hepatektomie unterzogen. So kann eine inflammatorische Reaktion anhand der Transaminasen gezeigt werden, welche ähnlich hohe Werte in allen betrachteten Gruppen zeigen. Die Anzahl proliferierender Zellen, die Hepatozytengröße sowie Leber- und Körpergewicht unterschieden sich nicht, unabhängig von Behandlung oder Genotyp. Aufgrund fehlender Hinweise auf den Einfluss von PACS2 auf die Proliferation nach partieller Hepatektomie wurde dieses Regenerationsmodell nicht weiter verfolgt (Abbildung 34).

Nach einer tolerablen Zellschädigung ist die Regeneration über verschiedene Mechanismen möglich. So ist möglicherweise nach chemischen Einflüssen die Regeneration nicht durch Proliferation aktiviert. Dann kann eine Aktivierung bipotenter Stammzellen der Leber, Ovalzellen genannt, erfolgen (Alison und Sarraf, 1998; Fausto und Campbell, 2003; Santoni-Rugiu *et al.*, 2005). Ovalzellen können auch während der Hepatokarzinogenese aktiviert werden (Dorrell *et al.*, 2011). So wurden die Lebern von Jungtieren nach DEN-Injektion einer durchflusszytometrischen Ovalzell-Analyse unterzogen. Die Messungen ergeben, dass weder

DEN noch der Verlust von PACS2 eine notable Veränderung in der Aktivierung von Ovalzellen herbeiführen. Da die leichte Leberschädigung, hervorgerufen durch die niedrige DEN-Dosis, nur einen geringen Anstieg proliferierender Zellen zeigt, erschien eine Ovalzellaktivierung zur Regeneration mit dem Hintergrund der nachfolgenden Hepatokarzinogenese aussichtsreich, kann jedoch nicht bestätigt werden.

#### 4.4 Die Bedeutung von PACS2 für die Apoptose

Bereits 2005 haben Simmen *et al.* gezeigt, dass PACS2 an dem intrazellulären Proteintransport zwischen Membranen sowie an dem Transport von Bid zur Mitochondrienmembran, welcher über die Freigabe von Cytochrom C und die Aktivierung der Caspase 3 zur Apoptose führt, beteiligt ist. Aslan *et al.* (2009) beschrieben PACS2 als Effektor der induzierten Apoptose Virus-infizierter sowie maligner Zellen mittels TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Dabei bildete PACS2 gemeinsam mit den proapoptotischen Bcl2-Familienmitgliedern Bim und Bax ein sogenanntes *Pixosome*, einen mit dem Lysosom assoziierten Komplex, der zur Membranpermeabilisierung und der Ausschüttung von Cathepsin B führt (Werneburg, 2012). Cathepsin B induziert gemeinsam mit dem durch PACS2 zur Mitochondrienmembran transportierten Bid zur massiven Freisetzung von Cytochrom C. Das cytosolische Cytochrom C aktiviert die apoptotische Signalkaskade der Caspasen. Guicciardi *et al.* konnten darstellen, dass PACS2 bei der TRAIL-vermittelten Apoptose direkt durch die zellulären Apoptose-Inhibitoren 1 und 2 (*cellular Inhibitors of Apoptosis*, cIAP-1 und cIAP-2) ubiquitiniert und somit unterdrückt wird (Guicciardi *et al.*, 2014). Eine Hemmung von cIAP-1 und cIAP-2 erhöhte die PACS2-Level und die Apoptosesensitivität der verwendeten Tumorzelllinie. In einem weiteren Zellkulturversuch konnte die Sensitivität für Doxorubicin-induzierte Apoptose erhöht werden, indem PACS2 herunterreguliert wurde (Atkins *et al.*, 2014; Barroso-Gonzalez und Thomas, 2015). Hier inhibierte PACS2 die Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1), welche die transkriptionelle Aktivität von p53 nach genotoxischen Zuständen reguliert. Durch die Bindung von SIRT1 an PACS2 steigerte sich die p53-abhängige Aktivierung des CDK-Inhibitors p21 und es kam vermehrt zum Zellzyklusarrest. Auch an der Apoptose von Herzmuskelzellen nach Wasserstoffperoxid-Exposition konnte eine Beteiligung von PACS2 nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass PACS2 auch an der Apoptose durch CD95-Rezeptor-Bindung beteiligt ist (Abbildung 41). Nach Behandlung mit DEN führt der Verlust von PACS2 zu einer verminderten Apoptosesensitivität gegenüber Jo2, nicht jedoch

zu einer absoluten Apoptoseresistenz wie in den vorangegangenen Arbeiten mit dem TRAIL-Rezeptor beschrieben. Vermutlich sind in Abhängigkeit des Todesrezeptors unterschiedliche Ligasen zur Ubiquitinierung von PACS2 zuständig (Guicciardi *et al.*, 2014). Da TRAIL die Todesrezeptoren DR4 und DR5 (TNF superfamily member 10), Jo2 jedoch den CD95-Rezeptor (TNF superfamily member 6) benutzt, ist dies bei der Vielzahl der existierenden Ligasen sehr wahrscheinlich. Durch die Beteiligung von PACS2 an der Apoptose, z.B. durch den Transport von Bid zum Mitochondrium und die nachfolgende Freisetzung von Cytochrom C, welche zur Aktivierung der Apoptose-einleitenden Caspasen führt, erscheint das verbesserte Überleben der PACS2<sup>-/-</sup>-Tiere logisch. Warum auch bei Verlust von PACS2 Apoptose eintreten kann, kann nicht final geklärt werden. Möglicherweise erfolgt die Apoptose Mitochondrien- und PACS2-unabhängig durch Bid und die Aktivierung der Caspase 8 (Schüngel *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2017). Das Umgehen von PACS2 kann zu einer geringeren Apoptoseinduktion führen, was die verringerte Aktivierung der Caspasen 3 und 8 erklärt.

#### 4.5 Fazit

Die Untersuchung eines Einflusses von PACS2 auf die Tumorentstehung in der Leber ist Ziel dieser Arbeit. Der Verlust von PACS2 führt zu einer Verzögerung der Tumorentstehung. 4 Monate nach DEN-Behandlung sind zwischen den Gruppen kaum Unterschiede zu erkennen. Weder akut noch chronisch treten starke Leberschäden oder Veränderungen in Regenerationsfähigkeit oder apoptotischem Verhalten auf. Nach 8 Monaten bestehen deutliche Unterschiede in der Tumorinzidenz. Die Tumorprogression erfolgt wiederum PACS2-unabhängig, denn nach 12 Monaten ist die Tumorlast in PACS2<sup>+/+</sup>- und PACS2<sup>-/-</sup>-Mäusen nahezu gleich. Diese Verzögerung ist möglicherweise auf eine verminderte Schädigung der Hepatozyten bei erhöhter Apoptosetoleranz zurückzuführen. Weder die Plasmalevel Leberschädigungs-sensitiver Marker noch immunohistochemische Färbungen von Apoptose- oder Proliferationsmarkern geben eindeutige Hinweise auf die verzögernden Prozesse im Übergang der Präneoplasie zur Neoplasie bei Verlust von PACS2 (Abbildung 26). Auch fehlen Hinweise auf abweichende Genexpression oder Proteinmenge von Enzymen, die an Zellzyklus, Proliferation oder Apoptose beteiligt sind. Nachgewiesen ist ein verlängerter Übergang der präneoplastischen Phase in die Neoplasie, möglicherweise mit nachfolgender, verstärkter Tumorprogression. Die Apoptosesensitivität ist bei PACS2-Verlust vermindert, eine Apoptoseresistenz nach Aktivierung des CD95-Rezeptors liegt jedoch nicht

vor. Eine Veränderung der Zellzyklusmechanismen kann dabei nicht gezeigt werden. Auffällig ist die Vergrößerung der Hepatozyten ab einem Zeitpunkt von 4 Monaten bei Verlust von PACS2, unabhängig von der DEN-Behandlung. Ob diese regenerative Vergrößerung der Hepatozyten im Zusammenhang mit der verzögerten Hepatokarzinogenese steht, ist jedoch wenig wahrscheinlich. Weitere Untersuchungen in dem kritischen Zeitraum von 4 bis 8 Monaten und zusätzlich zwischen 8 und 12 Monaten sind nötig, um den Übergang von präneoplastischer Phase zur Neoplasie genauer zu erfassen.

Da der Verlust von PACS2 lediglich zu einer Verzögerung der Tumorentstehung sowie zu einer verminderten Apoptose-Sensitivität, jedoch nicht zur Apoptose-Resistenz nach Aktivierung des CD95-Rezeptors führt, scheint PACS2 wenig therapeutische Ansätze in der Therapie des HCC zu bieten. Zum Verständnis der vielfältigen beteiligten Signalwege in der Hepatokarzinogenese bietet PACS2 jedoch reichlich Potential für weitere Untersuchungen.

## Literaturverzeichnis

- Ahmed F., Perz J.F., Kwong S., Jamison P.M., Freidman C., Bell B.P. 2008. National trends and disparities in the incidence of hepatocellular carcinoma, 1998-2003. *Preventing Chronic Disease* 5 No.3
- Alison M., Sarraf C. 1998. Hepatic stem cells. *Journal of hepatology* 29(4), 676-682.
- Arruda A.P., Pers B.M., Parlakgöl G., Güney E., Inouye K., Hotamisligil G.S. 2014. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nature Medicine* 20(12), 1427-1435
- Ashkenazi A., 2008. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 1001-1012
- Aslan E.A., You H., Williamson D.M., Endig J., Youker R.T., Thomas L., Shu H., Milewski R., Brush M.H., Possemato A., Spratt K., Fu H., Greis K.D., Runckel D.N., Vogel A., Thomas G. 2009. Akt and 14-3-3 control a PACS-2 homeostatic switch that integrates membrane traffic with TRAIL-induced apoptosis. *Molecular Cell* 34(4), 497-509
- Atkins K.M., Thomas L., Youker R.T., Harriff M.J., Pissani F., You H., Thomas G. 2008. HIV-1 Nef Binds PACS-2 to Assemble a Multikinase Cascade That Triggers Major Histocompatibility Complex Class 1 (MHC-1) Down-regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 17, 11772-11784
- Atkins K.M., Thomas L.L., Barroso-González J., Thomas L., Auclair S., Yin J., Kang H., Chung J.H., Dikeakos J.D., Thomas G. 2014. The multifunctional sorting protein PACS-2 regulates SIRT1-mediated deacetylation of p53 to modulate p21-dependent cell-cycle arrest. *Cell Reports* 8(5), 1545-1557
- Barroso-González J., Thomas G. 2015. Endosome traffic machinery meets the p53-p21 axis. *Molecular & Cellular Oncology* 2(2), e975075
- Befeler A. S. & Bisceglie A. M. 2002. Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment. *Gastroenterology* 122, 1609-1619
- Betz C., Hall M.N. 2013. Where is mTOR and what is it doing there? *The Journal of cell biology* 203(4), 563-574
- Bosch F. X., Ribes J., Díaz M., Cléries R. 2004. Primary Liver Cancer: Worldwide Incidence and Trends. *Gastroenterology* 127, S5-S16
- Brues A.M., Marble B.B. 1937. AN ANALYSIS OF MITOSIS IN LIVER RESTORATION. *The journal of experimental medicine* 65(1), 15-27
- Chan Y. and Wool, I. 1988. The primary structure of rat ribosomal protein S6. *The Journal of biological chemistry* 263, 2891-2896
- Columbano S., Rajalakshmi S., Sarma D.S.R. 1981. Requirement of Cell Proliferation for the Initiation of Liver Carcinogenesis as Assayed by Three Different Procedures. *Cancer Research* 41, 2079-2083
- Craddock V.M. 1975. Effect of single treatment with the alkylating carcinogens dimethylnitrosamine, diethylnitrosamine and methyl methanesulphonate on liver regenerating after partial hepatectomy. I. Test for induction of liver carcinomas. *Chemico-biological interactions* 10(5), 313-321

- Dewa Y., Nishimura J., Muguruma M., Jin M., Saegusa Y., Okamura T., Tasaki M., Umemura T., Mitsumori K. 2008. beta-Naphthoflavone enhances oxidative stress responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats. *Toxicology* 244(2-3), 179-189
- Dikeakos J.D., Thomas L., Kwon G., Elferich J., Shinde U., Thomas G. 2012. An interdomain binding site in HIV-1 Nef interacts with PACS-1 and PACS-2 on endosomes to down-regulate MHC-1. *Molecular Biology of the Cell* 23, 2184-2197
- Dorrell C., Erker L., Lanxon-Cookson K.M., Abraham S.L., Victoroff T., Ro S., Canaday P.S., Streeter P.R., Grompe M. 2008. Surface markers for the murine oval cell response. *Hepatology* 48(4), 1282-1291
- Dorrell C., Erker L., Schug J., Kopp J.L., Canaday P.S., Fox A.J., Smirnova O., Duncan A.W., Finegold M.J., Sander M., Kaestner K.H., Grompe M. 2011. Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes and development* 25(11), 1193-1203
- Dufner A., Thomas G. 1999. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental cell research* 253(1), 100-109
- EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma [http://www.easl.eu/medias/cpg/2018/Hepatocellular carcinoma/English-report.pdf](http://www.easl.eu/medias/cpg/2018/Hepatocellular%20carcinoma/English-report.pdf)
- Fagerberg L., Hallström B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpoor S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjöstedt E., Lundberg E., Szigartyo C.A., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J.M., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zwahlen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlén M. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and cellular proteomics*. 13 (2), 397-406
- Farber E. 1956. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Research* 16(2), 142-148
- Farber E. 1976. Hyperplastic Areas, Hyperplastic Nodules, and Areas as Putative Precursor Lesions. *Cancer Research* 36, 2532-2533
- Fausto D. 1999. Mouse Liver Tumorigenesis: Models, Mechanisms, and Relevance to Human Disease. *Seminars in Liver Disease* 19, 3, 243-250
- Fausto N., Campbell J.S. 2003. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*. 120(1), 117-130
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136, E359-E386
- Gressner A.M. and Wool, I.G. 1974. The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *The Journal of biological chemistry* 249, 6917-6925
- Guicciardi M.E., Werneburg N.W., Bronk S.F., Franke A., Yagita H., Thomas G., Gores G.J. 2014. Cellular inhibitor of apoptosis (cIAP) - mediated ubiquitination of phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (PACS-2) negatively regulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity. *PLoS One* 9(3), e92124
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57-70

- Hanna D., Riedmaier A.E., Sugamori K.S., Grant D.M. 2016. Influence of sex and developmental stage on acute hepatotoxic and inflammatory responses to liver procarcinogens in the mouse. *Toxicology* 373, 30-40
- Herrold K.M. 1964. EFFECT OF ROUTE OF ADMINISTRATION ON THE CARCINOGENIC ACTION OF DIETHYLNITROSAMINE (N-NITROSODIETHYLAMINE). *British journal of cancer* 18, 763-767
- Higgins G.M., Anderson R.M. 1931. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. Experimental pathology of liver. *Archives of pathology* 12, 186-202.
- Higgs M.R., Chouteau P., Lerat H. 2014. Liver let die: oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. *Journal of General Virology* 95
- <https://uctclinic.com/liver-diseases-treatment> (10.06.2018)
- Hui L., Zatloukal K., Scheuch H., Stepniak E., Wagner E.F. 2008 Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *The Journal of clinical investigation* 118(12), 3943-3953
- International Agency for Research on Cancer, *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans* Vol.17, 83-124, Lyon, 1978
- Jaeschke H. 2011. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26, Suppl. 1, 173-179
- Kamangar F., Dores G. M., Anderson W. F. 2006. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *Journal of Clinical Oncology* 24, 2137-2150
- Kato M., Popp J.A., Conolly R.B., Cattley R.C. 1993. Relationship between Hepatocyte Necrosis, Proliferation, and Initiation Induced by Diethylnitrosamine in the Male F344 Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 20, 155-162
- Kato T., Sato Y., Takahashi S., Kawamura H., Hatakeyama K., Abo T. 2004. Involvement of natural killer T cells and granulocytes in the inflammation induced by partial hepatectomy. *The journal of hepatology* 40(2), 285-290
- Kim M.R., Kim H.S., Lee M.S., Lee M.J., Jang J.J. 2005. Cell cycle protein profile of the hepatic stellate cells (HSCs) in dimethylnitrosamine-induced rat hepatic fibrosis. *Experimental and molecular medicine* 37(4), 335-342
- KMR-Liste, IFA, 2017. <https://www.dguv.de/ifa/fachinfos/kmr-liste/index.jsp>
- Köttgen M., Benzing T., Simmen T., Tauber R., Buchholz B., Feliciangeli S., Huber T.B., Schermer B., Kramer-Zucker A., Höpker K., Simmen K.C., Tschucke C.c., Sandford R., Kim E., Thomas G., Walz G. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. 2005. *The EMBO Journal* 24, 705-716
- Krishan A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The journal of cell biology* 66(1), 188-193
- Kuo L.J., Yang L.X. 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22(3), 305-309
- Lázaro C.A., Rhim J.A., Yamada Y., Fausto N. 1998. Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Research* 58(23), 5514-5522
- Lee J.-S., Chu I.-S., Mikaelyan A., Calvisi D.F., Heo J., Reddy J.K., Thorgeirsson SS. 2004. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature Genetics* 36, 12, 1306-1311

- Lee J.-S., Chu I.-S., Heo J., Calvisi D.F., Sun Z., Roskams T., Durnez A., Demetris A.J., Thorgeirsson S.S. 2004. Classification and Prediction of Survival in Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling. *Hepatology* 40, 3, 667-676
- Li X., Fang P., Mai J., Choi E.T., Wang H., Xang X.F. 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*. 6, 1-19
- Liska J.D. The Detoxification Enzyme Systems. *Alternative Medicine Review* 3, No.3, 187-198
- Liu Q., Thoreen C., Wang J., Sabatini D., Gray N.S. mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug discovery today. Therapeutic strategies* 6(2), 47-55.
- Llovet J. M., Burroughs A., Bruix J. 2003. Hepatocellular Carcinoma. *The Lancet* 362, 1907-1917
- Mamane Y., Petroulakis E., LeBacquer O., Sonenberg N. 2006. mTOR, translation initiation and cancer. 2006. *Oncogene* 25(48), 6416-6422.
- Mansouri M., Douglas J., Rose P.P., Gouveia K., Thomas G., Means R.E., Moses A.V., Früh K. 2006. Kaposi sarcoma herpesvirus K5 removes CD31/PECAM from endothelial cell. *Blood* 108, 6, 1932-1940
- Matter M.S., Decaens T., Andersen J.B., Thorgeirsson S.S. 2014. Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: current state and future trends. *Journal of hepatology* 60(4), 855-865
- Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. 1997. Liver regeneration. *Science* 276(5309), 60-66
- Moreira A.J., Rodrigues G., Bona S., Cerski C.T., Marroni C.A., Mauriz J.L., González-Gallego J., Marroni N.P. 2014. Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats. *Toxicology reports* 2, 333-340
- Myhill N., Lynes E.M., Nanji J.A., Blagoveshchenskaya A.D., Fei H., Simmen K.C., Cooper T.J., Thomas G., Simmen T. 2008. The Subcellular Distribution of Calnexin Is Mediated by PACS-2. *Molecular Biology of the Cell* 19, 2777-2788
- Naik E., Dixit V.M. 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *The Journal of experimental medicine* 208, 417-420
- Nevzorova Y.A., Tolba R., Trautwein C., Liedtke C. 2015. Partial hepatectomy in mice. *Laboratory animals* 49(1 Suppl), 81-88
- Nishimura J., Dewa Y., Okamura T., Jin M., Saegusa Y., Kawai M., Umemura T., Shibutani M., Mitsumori K. 2008. Role of Nrf2 and oxidative stress on fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Toxicology sciences* 106(2), 339-349
- Orlik J., Schüngel S., Buitrago-Molina L.E., Marhenke S., Geffers R., Endig J., Lobschat K., Rössler S., Goepfert B., Manns M.P., Gross A., Vogel A. 2015. The BH3-only protein BID impairs the p38-mediated stress response and promotes hepatocarcinogenesis during chronic liver injury in mice. *Hepatology* 62(3), 816-828
- Park P.K., Kitteringham N.R., Maggs J.L., Pirmohamed M., Williams D.P. 2005. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45, 177-202
- Park D.H., Shin J.W., Park S.K., Seo J.N., Li L., Jang J.J., Lee M.J. 2009. Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-phase regulatory proteins in rat. *Toxicology letters* 191(2-3), 321-326

- Parkin D. M., Bray F. I., Cevesa S. S. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European Journal of Cancer* 37, S4-S66
- Pitot H.C., Goldsworthy T.L., Moran S., Kennan W., Glauert H.P., Maronpot R.R., Campbell H.A. 1987. A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to altered hepatic foci. *Carcinogenesis* 8, 10, 1491-1499
- Rich N.E., Yopp A.C., Singal A.G. 2017. Medical Management of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Oncology Practice* 13:6, 356-364
- Ruggero D., Sonenberg N. 2005. The Akt of translational control. *Oncogene* 24(50), 7426-7434
- Ruvinsky I., Meyuhas O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in biochemical science* 31(6), 342-348
- Sakata T., Watanabe A., Takei N., Shiota T., Nakatsuka H., Fujiwara M., Kobayashi M., Nagashima H. 1983. EFFECT OF AZATHIOPRINE AND CARBON TETRACHLORIDE ON INDUCTION OF HYPERPLASTIC LIVER NODULE AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA BY DIETHYLNITROSAMINE AND N-2-FLUORENYLACETAMIDE IN RATS. *Annals of the New York Academy of Sciences* 417, 288-293
- Sakurai T., Maeda S., Chang L., Karin M. 2006. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proceedings of the national society of sciences of the United States of America* 103(28), 10544-10551
- Santoni-Rugiu E., Jernes P., Thorgeirsson S.S., Bisgaard H.C. 2005. Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 113, 876-902
- Schneider C., Teufel A., Yevsa T., Staib F., Hohmeyer A., Walenda G., Zimmermann H.W., Vucur M., Huss S., Gassler N., Wasmuth H.E., Lira S.A., Zender L., Luedde T., Trautwein C., Tacke F. 2012. Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer. *Gut* 61(12), 1733-1743
- Schüngel S., Buitrago-Molina L.E., Nalapareddy P., Lebofsky M., Manns M.P., Jaeschke H., Gross A., Vogel A. 2009. The strength of the Fas ligand signal determines whether hepatocytes act as type 1 or type 2 cells in murine livers. *Hepatology* 50(5):1558-66
- Simmen T., Aslan J.e., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas L., Wan L., Xiang Y., Feliciangeli S.F., Hung C.-H., Crump C.M., Thomas G. 2005. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *The EMBO Journal* 24, 717-729
- Sobotta, Johannes: Atlas Histologie. 2005. Elsevier, München
- Solt D.B., Medline A., Farber E. 1977. Rapid Emergence of Carcinogen-Induced Hyperplastic Lesions in a New Model for the Sequential Analysis of Liver Carcinogenesis. *American Journal of Pathology* 88, 3, 595-610
- Tang C., Liang J., Qian J., Jin L., Du M., Li M., Li D. 2014. Opposing role of JNK-p38 kinase and ERK1/2 in hydrogen peroxide-induced oxidative damage of human trophoblast-like JEG-3 cells. *International journal of clinical and experimental pathology* 7(3):959-68
- Thomas G., Aslan J.E., Thomas L., Shinde P., Shinde U., Simmen T. 2017. Caught in the act - protein adaptation and the expanding roles of the PACS proteins in tissue homeostasis and disease. *Journal of Cell Science* 130, 1865-1876

- Thorgeirsson S. S. & Grisham J. W. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* 31, 339-346
- Verna L., Whysner J., Williams G.M. 1996. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & therapeutics* 71(1-2), 57-81
- Wan L., Molloy S.S., Thomas L., Liu G., Xiang Y., Rybak S.L., Thomas G. 1998. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-golgi network localization. *Cell* 94, 205-216
- Wang J., Jia Z., Zhang C., Sun M., Wang W., Chen P., Ma K., Zhang Y., Li X., Zhou C. 2014. miR-499 protects cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via its effects on Pcd4 and Pacs2. *RNA Biology* 11(4), 339-350
- Werneburg N.W., Bronk S.F., Guicciardi M.E., Thomas L., Dikeakos J.D., Thomas G., Gores G.J. 2012. Tumor Necrosis Factor- related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Protein-induced Lysosomal Translocation of Proapoptotic Effectors Is Mediated by Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein-2 (PACS-2). *The Journal of Biological Chemistry* 287, 29, 24427-24437
- WHO Fact sheet N°297, 2017. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en)
- WHO Essential Medicines List N°20, 2017.  
[http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20th\\_EML2017\\_FINAL\\_ameendedAug2017.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML2017_FINAL_ameendedAug2017.pdf?ua=1)
- Ying T.S., Sarma D.S.R., Farber E. 1981. Role of Acute Hepatic Necrosis in the Induction of Early Steps in Liver Carcinogenesis by Diethylnitrosamine. *Cancer Research* 41, 2096-2102
- You H., Thomas G. 2009. A homeostatic switch in PACS-2 links membrane-traffic to TRAIL-induced apoptosis. *Cell cycle* 8(17), 2679-2680.
- Youker R.T., Shinde U., Daay R., Thomas G. 2009. At the crossroads of homeostasis and disease: roles of the PACS proteins in membrane traffic and apoptosis. *Biochemical Journal* 421, 1-15

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich in der langen Zeit dieser Promotion begleitet und unterstützt haben.

Zuerst danke ich Arndt Vogel, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten, mitzugestalten, zu lernen und zu promovieren, für seine Vorschläge und so manche Diskussion.

Ich danke meiner Arbeitsgruppe, in der wir uns stets gegenseitig unterstützt und voneinander gelernt haben und sowohl Freud als auch Leid geteilt haben. Jessica, Johanna, Jutta, Laura, Meriame, Silke und Sven - ihr ward meine Laborfamilie, in der ich mich weiterentwickeln konnte und dabei auch viel Spaß hatte.

Mein besonderer Dank gilt allen, die mir hilfreiche Hinweise, Verbesserungsvorschläge und wertvollen Beistand beim Schreiben geleistet und teilweise sehr viel Zeit mit dem Lesen dieser Arbeit verbracht haben: Anja, Birgit, Elfi, Jan, Jessica, Mama, Michael und Silke.

Ich danke meiner Familie, die ich immer hinter mir wusste, meinen Eltern für alles, was sie mir ermöglicht und mit auf den Weg gegeben haben. Im Besonderen danke ich Luise, Anton und Emil, die mir immer wieder zeigen, was wichtig ist, wofür es sich zu kämpfen lohnt und von denen ich täglich dazulerne.

Und ich danke dir, Jan, für alles. Niemand weiß wie du, was mir diese Arbeit bedeutet, was sie mich und uns an Zeit, Kraft und auch Opfern gekostet hat. Du hast mich vielfältig unterstützt, motiviert, manchmal getragen, stets ertragen und gehst den Weg mit mir.