

Die Bedeutung des Immunsystems bei der Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms im murinen Modell der Hereditären Tyrosinämie Typ-1

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

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von
DIPL.-BIOL. Jessica Endig
geboren am 07. September 1982 in Berlin

2013

Referent: Prof. Dr. med. Arndt Vogel

Koreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Falk

Tag der Promotion: 03.04.2013

Hepatocellular carcinoma, inflammation, Fah^{-/-}-mice

Hepatozelluläres Karzinom, Entzündung, Fah^{-/-}-Maus

Abstract

Tumors often arise at sites of inflammation and chronic inflammation is increasingly recognized to be important in the pathogenesis of many malignancies. Activation of the adaptive immune system in response to tumors might result in eradication of malignant cells. On the other hand, immune cells, which infiltrate tumors and pre-neoplastic lesions, produce a variety of cytokines and chemokines that propagate a localized inflammatory response and that can also enhance the growth and survival of pre-malignant cells. Hepatocellular carcinoma, which is one of the most lethal and prevalent cancers worldwide, represents a classic case of inflammation-linked cancer. Although many studies have reported significant alterations in the expression of different cytokines in chronic liver disease, the critical components linking inflammation and hepatocarcinogenesis are not fully understood.

In order to characterize the role of the immune system in chronic liver injury and hepatocarcinogenesis a mouse model of hereditary tyrosinemia type-1 (HT-1) was used. HT-1 is an autosomal-recessive disease caused by a genetic inactivation of the enzyme fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) and is characterized by an extremely high susceptibility for liver cancer. Flares of liver injury were induced in $Fah^{-/-}$ mice. This procedure led to the accelerated HCC formation within 3-4 months. To determine the role of the immune system, $Fah^{-/-}$ Rag-2 $^{-/-}$ c γ $^{-/-}$ mice (FCR) were treated in the same way. Interestingly, survival of alymphoid $Fah^{-/-}$ mice was dramatically shorter than that of $Fah^{-/-}$ mice. Almost 70% of the FCR mice died within the first 2 months whereas over 90% of $Fah^{-/-}$ mice survived the FAA-induced hepatitis suggesting that the immune system plays an important pro-survival function during chronic liver injury. The activation of the immune system not only increased liver damage but also promoted liver regeneration. Interestingly however, liver tumor development was completely suppressed in surviving FCR mice. To better understand the role of the immune system in the $Fah^{-/-}$ model, extensive molecular and immunological profiling, hepatocyte and hematopoietic stem cell transplantations, partial hepatectomies adoptive transfer of specific immune cell populations were performed. These experimental studies revealed that specifically T-cells are important for liver regeneration by supporting proliferation of hepatocytes and hepatic progenitor cells/ oval cells allowing the survival of Fah -deficient mice. Importantly however, we also provide evidence that additional cells such as myeloid cells are required for tumor development in these mice. Together, our analysis identifies distinct functions of the immune system which are required for liver regeneration and survival and for hepatocarcinogenesis on the other hand. Targeting specifically the tumor-promoting pathways may be an attractive chemopreventive strategy for patients at risk.

Zusammenfassung

Viele Tumorerkrankungen entstehen auf dem Boden einer andauernden, chronischen Entzündungsreaktion. Ein Paradebeispiel für die Krebsentstehung auf dem Boden einer chronischen Entzündung ist das hepatozelluläre Karzinom. Das Leberzellkarzinom ist weltweit eine der häufigsten bösartigen Krebserkrankungen. Bislang ist nicht abschließend geklärt welche Rolle das Immunsystem für die Tumorentstehung in der Leber spielt. Auf der einen Seite kommt dem Immunsystem eine wichtige protektive Rolle bei der Überwachung und Elimination von prämaligen Zellen zu. Auf der anderen Seite kann das Immunsystem unter bestimmten Umständen Tumorwachstum sogar begünstigen und zur Entstehung von aggressiveren Tumoren beitragen. Diese das Tumorwachstum begünstigende Rolle des Immunsystems wird durch die Rekrutierung und Interaktion verschiedener Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems und die Freisetzung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des Immunsystems für die Leberregeneration und die Hepatokarzinogenese in einem Mausmodell der hereditären Tyrosinämie Typ-1 (HT-1) weiter zu untersuchen. Bei der HT-1 wird aufgrund eines autosomal rezessiv vererbten Defektes der Fumarylazetoacetat-Hydrolase (FAH) Tyrosin nicht vollständig abgebaut und resultiert in einer Akkumulation des toxischen, elektrophilen Metaboliten Fumarylazetoacetat (FAA), welcher in der Folge zu einer raschen Tumorentwicklung führt. Um die Rolle des Immunsystems in diesem Modell zu untersuchen wurden immunsupprimierte $Fah^{-/-}$ $Rag-2^{-/-}$ $c\gamma^{-/-}$ Mäuse (FCR) generiert. Interessanterweise konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass die Aktivierung des Immunsystems nicht nur zur primären Leberschädigung beiträgt, sondern auch in Folge für eine effektive Leberregeneration notwendig ist. Sowohl die Leberregeneration durch Aktivierung von Leberstammzellen (ovalen Zellen) als auch durch Hypertrophie und Teilung der Hepatozyten war in den immunsupprimierten Mäusen deutlich beeinträchtigt. In der Folge zeigte sich eine deutlich erhöhte Mortalität der FCR-Mäuse. In Langzeitversuchen war interessanterweise die sehr schnelle Tumorentstehung, die in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen zu beobachten war, in den überlebenden FCR-Mäusen nahezu vollständig verhindert. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass insbesondere die Aktivierung von T-Zellen im Rahmen der chronischen Lebererkrankung sowohl für die Leberschädigung als auch für die effiziente Leberregeneration entscheidend ist. Einerseits ist für die Tumorentstehung nicht nur die Aktivierung von T-Zellen, als auch andererseits die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems wie den myeloiden Zellen notwendig.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die zweifache Rolle des Immunsystems im Rahmen einer chronischen Lebererkrankung gezeigt werden. Auf der einen Seite ist es für das Überleben der Mäuse und eine effiziente Leberregeneration wichtig, auf der anderen Seite trägt es entscheidend zur Leberschädigung und langfristig zur Tumorentwicklung bei. Ein besseres Verständnis dieser unterschiedlichen Prozesse wird in der Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten zur Verhinderung als auch Therapie von Tumorerkrankungen eröffnen.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	IV
Zusammenfassung	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
Abbildungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	15
1.1 Relevanz der Grundlagenforschung zur molekularen Entschlüsselung von Tumorerkrankungen beim Menschen	15
1.2 Funktion der Leber im Organismus	16
1.3 Die Hereditäre Tyrosinämie Typ-1 (HT-1) und ihr Verlauf	17
1.3.1 Das Mausmodell zur humanen Erkrankung	20
1.4 Die Entstehung von Krebs	21
1.5 Das Immunsystem	24
1.5.1 Überblick über das Immunsystem	24
1.5.2 Das angeborene Immunsystem	26
1.5.3 Das adaptive Immunsystem	27
1.5.4 Die Leber als ein immunogenes Organ	29
1.5.5 Das Immunsystem in der Krebsentstehung	31
1.6 Die Bedeutung dieser Arbeit	34
2 Material und Methoden	35
2.1 Material	35
2.1.1 Mäuse	35
2.1.2 Medikamente für Mäuse	35
2.1.3 Antikörper	35
2.1.4 Primer	38
2.1.5 Chemikalien	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Tierexperimentelle Methoden	40
2.2.2 Mausmodelle	40
2.2.3 Tierhaltung	40
2.2.4 Behandlung der Tiere	41
2.2.5 Tötung und Entnahme von Gewebe	42
2.2.6 Leberteilresektion	43

2.2.7	Isolation von Hepatozyten aus C57BL/6N-Mäusen und Transplantation in Fah ^{-/-} - und FCR-Mäuse.....	43
2.2.8	Transplantation von fetalen Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aus der Leber von Fah ^{-/-} -Mäusen in neugeborene FCR-Mäuse.....	44
2.2.9	Isolation von T-Zellen aus der Milz von Fah ^{-/-} -Mäusen und Transplantation in die FCR-Mäuse.....	45
2.2.10	Induktion der Ovalzell-Proliferation in den Fah ^{-/-} - und FCR-Mäusen durch die Cholin-defiziente Diät (CDE-Diät)	45
2.2.11	Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration	45
2.2.12	Serumanalysen.....	46
2.2.13	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.2.14	Histologische Methoden	48
	H&E-Färbung	48
	Ki67-immunhistochemische Färbung.....	49
	Tunel-Färbung	49
	Fah-immunhistochemische Färbung	50
	A6-immunhistochemische Färbung.....	51
	β-Catenin-immunhistochemische Färbung.....	52
	Gespaltene Caspase-3-immunhistochemische Färbung	52
2.2.15	Isolierung, Messung, und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	53
	Isolierung von DNA aus einer Biopsie der Schwanzspitze.....	53
	Isolierung von RNA aus Lebergewebe.....	54
	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	54
2.2.16	cDNA Synthese und semi-quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	54
2.2.17	Standard Agarose-Gelelektrophorese	54
2.2.18	Mikroarray	55
2.2.19	RT-PCR Arrays: RT Profiler PCR Array Mouse Chemokine & Receptor und Common Cytokines.....	55
2.2.20	Isolierung, Färbung und Analyse verschiedener Zelltypen aus der murinen Leber.....	55
	Zellen des Immunsystems	55
	Ovalzellen aus der Leber	56
2.2.22	Statistische Auswertungen.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Der zyklische Entzug von NTBC führt zu einer fulminanten Hepatitis und zur beschleunigten Entstehung eines HCC.....	59
3.1.1	Mechanismen der Regeneration nach zyklischer FAA-induzierter Leberschädigung in Fah-defizienten Mäusen.....	61
3.3	Fah ^{-/-} / common gamma chain ^{-/-} / Rag2 ^{-/-} -Mäuse entwickeln unter zyklischer Schädigung der Hepatozyten kein Hepatozelluläres Karzinom	65

3.3.1	Die FCR-Mäuse haben eine geringere Proliferationsrate und zeigen eine stärkere Aktivierung von p21.....	67
3.4	Regenerationsmechanismen in der murinen Leber nach partieller Hepatektomie und allogener Transplantation von Hepatozyten.....	70
3.5	Durch die Schädigung der Leber kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems.....	72
3.6	Die Transplantation von T-Zellen und Hämatopoetischen Stammzellen stellt den inflammatorischen Phänotyp in den FCR-Mäusen wieder her.....	74
3.7	Aktivierung von Stress-Signalwegen in der Leber.....	77
3.8	Tumorentstehung in Fah ^{-/-} - und Fah/ common gamma chain/ Rag2 ^{-/-} -Mäusen nach chronischer Leberschädigung.....	78
3.9	Nach vollständigem NTBC-Entzug versterben die Mäuse an einem akuten Leberversagen.....	79
3.10	Expressionsanalysen zeigen differentiell regulierte Gene unter zyklischem NTBC-Entzug.....	81
4	Diskussion.....	84
4.1	Durch inflammatorische Prozesse kann in den Fah ^{-/-} -Mäusen eine schwere Leberschädigung ausgelöst werden.....	85
4.2	Das Immunsystem verstärkt die Leberschädigung in Fah ^{-/-} -Mäusen.....	87
4.3	Tumorentstehung in Fah ^{-/-} -Mäusen.....	89
Fazit	90
Danksagung	92
Anhang	93
A	Expressionsanalysen.....	93
B	Real-time RT-PCR-Analysen.....	96
C	Zellzyklusregulation.....	98
Literaturverzeichnis	99
Curriculum Vitae	105
Erklärung zur Dissertation	107

Abkürzungsverzeichnis

ALT/GPT	Alanin-Aminotransferase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase
APAP	N-acetyl-p-aminophenol
APC	Antigen presenting cell/ Antigen präsentierende Zelle
AST/GOT	Aspartat-Aminotransferase/Glutamat-Oxalazetat-Transaminase
BCR	B-Zellrezeptor
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DANN
cgc	common gamma chain
d	Tag
DC	Dendritic cell/ Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfid
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FADD	Fas-associated Death Domain
Fah	Fumarylazetoazetathydrolase
FCS	fetal calve serum (Fötales Kälberserum)
h	Stunde
GPC3	Glypican 3
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	Horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase
HSP-70	Heat Shock Protein 70
HT-1	Hereditäre Tyrosinämie Typ I
IBD	Inflammatory Bowel Disease/ entzündliche Darmerkrankung
Ig	Immunglobulin
Igf1/2	Insulin-like growth factor 1/2
IL	Interleukine
IVC	Individuell ventilierte Käfige
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliamper
mg	Milligramm
MHC	Haupt-Gewebekompatibilitäts-Komplex
min.	Minute
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NLR	NOD-like receptor
nm	Nanometer
NTBC	2-(2-nitro-4-trifluormethyl)1,3-cyclohexanedion

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
PVDF	Polyvenylidenfluorid
Rag2	recombination activation gene 2
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodezylsulfat
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TP53	Tumorsuppressorgen 53
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethyl
U	Units/ Einheit (Enzymaktivität)
ü.N.	über Nacht
V	Volt
W	Watt
WB	Westernblot
wks	Weeks/ Wochen
wt	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chronische Entzündung und Krebs	32
Tabelle 2: Mäusestämme	35
Tabelle 3: Medikamente und Diäten	35
Tabelle 4: Antikörper für Western Blot	35
Tabelle 5: Primär-Antikörper für die Immunhistochemie (ICH)	36
Tabelle 6: Sekundär-Antikörper für die Immunhistochemie	37
Tabelle 7: Antikörper für die FACS Analyse	37
Tabelle 8: Primersequenzen für die Genotypisierung der Mäusestämme	38
Tabelle 9: Primer für die semi-quantitative PCR	38
Tabelle 10: Chemikalien	39
Tabelle 11: 5x Zellysepuffer für die Proteinisolierung	46
Tabelle 12: 1x Zellysepuffer für die Proteinisolierung	46
Tabelle 13: Parameter der Serummessung	47
Tabelle 14: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen	48
Tabelle 15: relative Expression von Genen	93
Tabelle 16: Zellzyklusregulierende Gene	95
Tabelle 17: Gene in der Kontrolle von DNA-Schäden	96
Tabelle 18: Chemokine, Zytokine und deren Rezeptoren	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Leberaufbaus:.....	17
Abbildung 2: Abbauweg des Tyrosins in der Leber:.....	18
Abbildung 3: Genetische und urbane Faktoren in der Entwicklung des HCC:.....	23
Abbildung 4: schematische Darstellung der Arme des Immunsystems in Säugern:.....	25
Abbildung 5: Zellulärer Aufbau der Leber:.....	30
Abbildung 6: Schematische Abbildung des Behandlungsschemas von Fah ^{-/-} - und FCR-Mäusen:.....	41
Abbildung 7: Schematische Abbildung des Behandlungsschemas von Fah ^{-/-} -Mäusen:.....	42
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Leberlappen in der Maus:.....	43
Abbildung 9: Beschleunigte Tumorentstehung in Fah ^{-/-} -Mäusen:.....	60
Abbildung 10: Dysplastische Hepatozyten und Infiltration von nicht-parenchymatischen Zellen nach zyklischem NTBC-Entzug:.....	61
Abbildung 11: Unter NTBC-Entzug ist die Proliferation differenzierter Hepatozyten gehemmt:.....	62
Abbildung 12: Leberstammzellen proliferieren und transmigrieren nach NTBC-Entzug in das Leberparenchym:.....	63
Abbildung 13: Leberhomeostase und Regeneration nach 14-tägigem NTBC-Entzug in den Fah ^{-/-} -Mäusen:.....	64
Abbildung 14: Der Verlust des Adaptiven Immunsystems führt zu einer erhöhten Mortalität nach zyklischem NTBC-Entzug und verhindert die Entstehung eines HCC:.....	65
Abbildung 15: Dysplastische Hepatozyten und Infiltration von nicht-parenchymatischen Zellen nach zyklischen NTBC-Entzug sind in den FCR-Mäusen deutlich reduziert:.....	66
Abbildung 16: Oxidativer Stress in Fah-defizienten Mausstämmen:.....	67
Abbildung 17: Fah ^{-/-} /common gamma chain ^{-/-} / Rag2 ^{-/-} -Mäuse zeigen signifikant weniger Regeneration nach zyklischer Schädigung der Hepatozyten:.....	68
Abbildung 18: Keine Proliferation von Leberstammzellen in den FCR-Mäusen:.....	69
Abbildung 19: Keine Proliferation von Ovalzellen nach CDE-Diät in den FCR-Mäusen:.....	69
Abbildung 20: Partielle Hepatektomie:.....	70
Abbildung 21: Allogene Transplantation von Hepatozyten aus C57/Bl6N-Mäusen in die Fah ^{-/-} - und FCR-Mäuse:.....	71
Abbildung 22: Das Adaptive Immunsystem in Fah ^{-/-} -Mäusen:.....	72
Abbildung 23: Zellen des Angeborenen Immunsystems in der inflammatorischen Leber:.....	73
Abbildung 24: Das Überleben von FCR-Mäusen ist nach der Transplantation von HSC und T-Zellen deutlich verbessert:.....	75
Abbildung 25: Durch die Transplantation von HSC und T-Zellen in die FCR-Mäuse wird eine Hepatitis gefördert:.....	75

Abbildung 26: Die Zahl der Makrophagen nimmt durch die Transplantation von T-Zellen leicht zu:	76
Abbildung 27: Aktivierung von Stresssignalwegen unter zyklischem NTBC-Entzug:..	77
Abbildung 28: Chronischer Leberschaden und HCC in Fah ^{-/-} und FCR auf 2.5% NTBC:	78
Abbildung 29: Akutes Leberversagen nach vollständigem NTBC-Entzug:	80
Abbildung 30: Heatmap von über 41.000 Genen in der Expressionsanalyse:	81
Abbildung 31: Relative Expression von Genen in den DNA-Damage Signalwegen: ...	82
Abbildung 32: Wnt-Signalweg nach zyklischer FAA-induzierter Schädigung:	82
Abbildung 33: Modell zur Aktivierung von Typ-1/ Typ-2 CD4 ⁺ T-Helferzellen.....	88
Abbildung 34: Relative Expression zellzyklusregulierender Gene in den Fah ^{-/-} und FCR-Mäusen.....	98

1 Einleitung

1.1 Relevanz der Grundlagenforschung zur molekularen Entschlüsselung von Tumorerkrankungen beim Menschen

Unter den Sterbefällen von 2011 in Deutschland, gewertet durch die International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10), rangieren neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen bösartige Neubildungen verschiedener Gewebe immer öfter unter den zehn häufigsten Todesursachen. Am vierthäufigsten vertreten sind in Deutschland bösartige Neubildungen der Bronchien und der Lunge. Auf Platz neun und zehn rangieren bereits die Neoplasien des Dickdarms und der Brustdrüsen. Diese drei Krebserkrankungen waren allein im Jahr 2011 ursächlich für über 134.000 Sterbefälle in Deutschland (Angaben vom Statistischen Bundesamt). Durch die fortschreitenden diagnostischen Möglichkeiten ist die Dokumentation der Krebserkrankungen deutlich verbessert worden. Krebs ist aber keine Erkrankung der modernen Gesellschaft. Bereits bei mumifizierten Leichnamen aus aller Welt konnten Fälle von Krebs nachgewiesen werden. Dennoch ist Krebs eine Erkrankung des Alters und die steigende Bedeutung in der heutigen Gesellschaft korreliert klar mit der zunehmenden Lebenserwartung und paradoxerweise auch mit den hygienischen und medizinischen Fortschritten der vergangenen Dekaden. Es wird deutlich, dass auch der Lebenswandel in unserer modernen Gesellschaft seinen Teil zur Entstehung von Krebs beitragen kann. So gelten unlängst der übermäßige Konsum von Alkohol und Tabak, sowie Fettleibigkeit als Risikofaktoren. Krebserkrankungen beruhen auf Veränderungen im Erbmaterial einer Zelle. Die meisten Schädigungen des genetischen Materials sammeln sich erst nach der Geburt in den Zellen an und werden daher nicht vererbt. In der Regel wirkt nicht die einzelne Mutation kanzerogen, sondern die Summe der über die Jahre in den Zellen angesammelten genetischen Veränderungen. In etwa 5-10% der Fälle besteht eine familiäre Veranlagung für eine Krebsart. Hier findet sich eine Mutation der Gene schon in den Gameten und kann damit auf die nächste Generation vererbt werden. In diesen Fällen tritt die Erkrankung besonders häufig in aufeinanderfolgenden Generationen und meist schon in jungen Jahren auf.

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) hat eine jährliche Inzidenz von über 600.000 Neuerkrankungen (Thorgeirsson & Grisham, 2002). Das HCC stellt damit die häufigste Krebserkrankung der Leber beim Erwachsenen dar und ist die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit (Befeler & Di Bisceglie, 2002, Parkein *et al.*, 2001). Betrachtet man die Sterberate, so ist diese Tumorerkrankung die dritthäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen weltweit.

Das HCC stellt eine primär maligne Neoplasie der epithelialen Leberzellen da. Es kann sehr gut differenziert sein und ist damit nur schwer von „gesunden“ Leberzellen unterscheidbar. Oder es ist nur wenig differenziert und die entarteten Zellen können sowohl gleichförmig als auch deutlich pleomorph sein. Die Prävalenz der Fälle liegt bei Patienten über 50 Jahren, jedoch erkranken auch Kinder an dieser Tumorart. Das HCC scheint verbreiteter in der männlichen Bevölkerung und ist meist mit einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis C Virus (in den USA, Europa und Japan) oder dem Hepatitis B Virus (Afrika südlich der Sahara und Südostasien), übermäßigem Alkoholabusus und einer Zirrhose assoziiert. Das HCC metastasiert sehr rasch in regionale Lymphknoten und in die Lunge. Die mediane Überlebensrate beträgt nicht mehr als vier Monate. Meist bleibt als einzige Heilungsaussicht nur die totale Resektion des Tumors. Zwischen 1999 und 2007 starben in den USA 54.411 Personen an einem HCC (*ICD-10 C22.0). Die Tumorzinzidenz und die Mortalität haben sich in den letzten 25 Jahren allein in den USA mehr als verdoppelt und der Trend ist weiter steigend (El-Serag et al., 2003, El-Serag & Mason, 1999).

1.2 Funktion der Leber im Organismus

Die Leber hat zentrale Stoffwechsellaufgaben im Organismus die nicht durch ein anderes Organ kompensiert werden können. Der komplexe Aufbau der Leber wird verständlich, wenn man die vielschichtigen Aufgaben betrachtet. Die Leber bildet die Galle und ist an vielseitigen Stoffwechsellvorgängen wie dem Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel beteiligt. Außerdem speichert sie Vitamine, Kohlenhydrate und Lipide und ist an der Sekretion von Bilirubin, dem Abbauprodukt des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin, beteiligt. Eine der Hauptfunktionen der Leber stellt die Entgiftung dar. Hierbei gelangen vor allem Schadstoffe, die über den Darm in das Blut aufgenommen werden, wie zum Beispiel Alkohol oder Medikamente, zur Entgiftung in die Leber. Aus dieser Entgiftungsfunktion erklärt sich auch die Schädigung der Leber durch übermäßigen Alkoholkonsum. Das Voranschreiten der Leberzerstörung durch chronischen Alkoholkonsum ist ein vielschichtiger Prozess der sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse mit einschließt. Die Leber wird über zwei Systeme mit Blut versorgt. Dabei erhält sie circa 20% des Blutes als sauerstoffreiches Blut über die *Arteria hepatica* und circa 80% über die Pfortader (*Vena portae*).

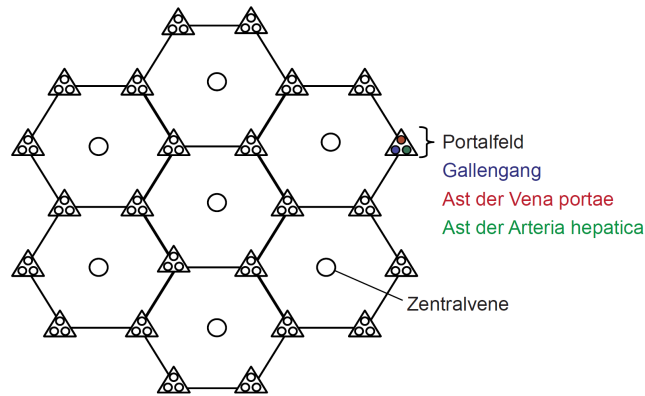


Abbildung 1: Schema des Leberaufbaus: (in Anlehnung an das Lehrbuch Klinische Hepatologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen von H. Dancygier). Um eine Zentralvene ordnen sich regelmäßige Portalfelder an. Ein Portalfeld ist aus einem Gallengang, einem Ast der Vena portae und einem Ast der Arteria hepatica aufgebaut.

Das Blut gelangt hauptsächlich über die Gefäße der Portalfelder in das Leberparenchym und passiert die Lebersinusoiden. In den Lebersinusoiden mischt sich das arterielle mit dem Pfortaderblut und fließt sternförmig zur Zentralvene jedes Leberläppchens. Das Pfortaderblut ist mit resorbierten Nährstoffen aus dem Dünndarm, Abbauprodukten der Milz sowie pathogenen Peptiden und Hormonen aus dem Pankreas angereichert. Der Unterschied der Versorgung der Leber mit Blut dieser zwei Gefäßsysteme wird zum Beispiel auch in der Therapie von Leberzellkarzinomen ausgenutzt, da jeder Tumor ab einer Größe von wenigen Millimetern bereits durch ein eigenes Gefäßsystem versorgt werden muss. Die Verhältnisse kehren sich um und das HCC erhält bis zu 95% seines Blutes über eine arterielle Versorgung. Dadurch kann zum Beispiel bei der Chemotherapie gezielt entartetes Gewebe behandelt werden.

1.3 Die Hereditäre Tyrosinämie Typ-1 (HT-1) und ihr Verlauf

Die HT-1 ist ein autosomal-rezessiv vererbter Defekt im Tyrosinkatabolismus. Dieser Defekt wird durch einen Mangel an der Fumarylazetoacetathydrolase hervorgerufen. Hierbei werden vornehmlich die Leber, die Nieren (Tubulopathie mit hypophosphatämischer Rachitis) und das periphere Nervensystem (Parästhesien, vegetative Symptome, progressive Paralyse) geschädigt. Bei der Schädigung der Leber kommt es direkt zu einem akuten Leberversagen oder zu einer Leberzirrhose die zur Ausbildung eines Hepatozellulären Karzinoms führen kann. Die Leberzirrhose ist durch eine dramatische Bindegewebsvermehrung und dem damit einhergehenden Verlust von funktionalem Leberparenchym gekennzeichnet. Eine Zirrhose stellt den vorläufigen Endpunkt vieler Krankheitsbilder der Leber dar. Die Diagnose einer HT-1 wird bei den betroffenen Patienten durch die Hypertyrosinämie gestellt und zusätzlich durch den Nach-

weis der für diese Erkrankung typischen pathologischen Metabolite des Tyrosinstoffwechsels im Urin gesichert. Der Therapieansatz besteht in erster Linie aus einer Phenylalanin-/ Tyrosin-definierten Diät. In den letzten Jahren steht auch eine sehr wirksame medikamentöse Therapie zur Verfügung. Das Medikament 2-(2-nitro-4-trifluor-methylbenzyl)-1,3-zyklohexanedion (NTBC), blockiert effizient das Enzym Hydroxyphenylpyruvatdehydrogenase (HPD) und hemmt effektiv den weiteren Katabolismus von Tyrosin. Durch die Inhibition wird die Assimilation der kanzerogenen Metabolite Maleylazetoazetat und Fumarylazetoazetat verhindert. Beides sind elektrophile Stoffe, die zu oxidativem Stress und zur Schädigung von DNA und Proteinen führen. Die Krankheit kann sowohl einen akuten als auch einen chronischen Verlauf nehmen. Bei dieser Erkrankung entwickeln 36% der Patienten ein HCC. Diese Erbkrankheit ist neben dem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, der Hämochromatose (Eisenspeicherkrankheit) und z.B. der Glykogen Speicherkrankheit Typ-1 nur eine, die in der Entstehung eines HCC gipfeln kann. Die HT-1 hat allerdings die höchste Inzidenz für ein HCC überhaupt.

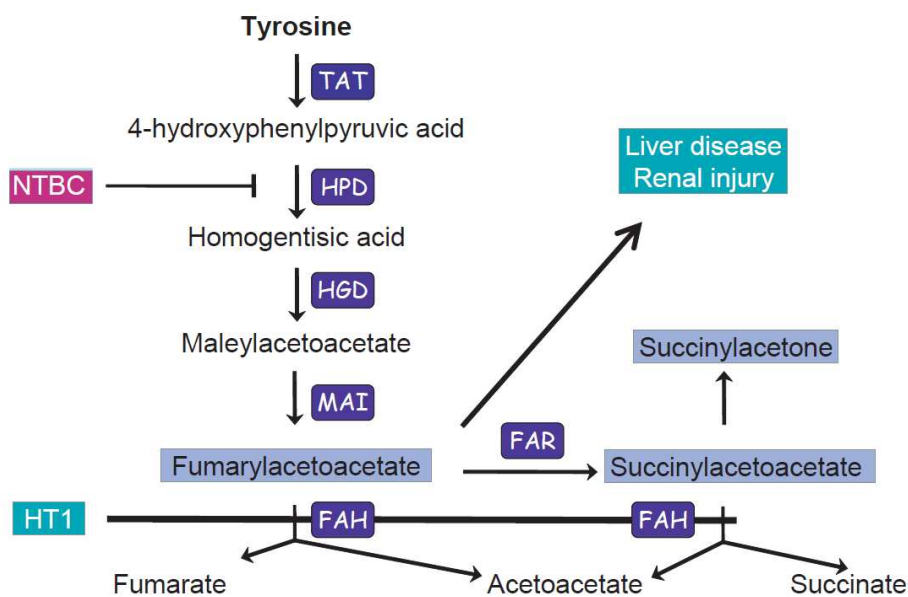


Abbildung 2: Abbauweg des Tyrosins in der Leber: Der Tyrosinkatabolismus ist schematisch dargestellt. Die im Abbau von Tyrosin beteiligten Enzyme sind: TAT = Tyrosinaminotransferase; HPD = 4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase; HGD = Homogentisic acid oxidase; MAI = Maleylazetoazetatisomerase; und FAH = Fumarylazetoazetathydrolase

Präliminäre Arbeiten zur „humanen“ Hereditären Tyrosinämie Typ-1

Die erste Veröffentlichung zu einem Defekt im Tyrosinmetabolismus erschien bereits 1932. Grace Medes arbeitete damals als Medizinerin am Universitäts-hospital in Minnesota und beschrieb als Erste den Fall eines 49-jährigen Mannes russischer Abstammung. Der Mann wurde bereits 1927 im Minneapolis General Hospital aufgenommen, wo man die Diagnose *Myasthenia gravis* stellte und ihn dahingehend behandelte. Vier Jahre blieb der Patient frei von akuten Symptomen der *Myasthenia gravis*. Die *Myasthenia gravis* ist eine neurologische Erkrankung, bei der es zu einer gestörten Reizweiterleitung kommt. Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der sich die Autoantikörper gegen die motorische Endplatte eines Neurons richten. Der Patient wies konstant einen erhöhten Kreatininwert im Urin auf. Anfänglich brachte man diesen Befund nur mit der *Myasthenia gravis* in Verbindung. Doch es zeigte sich, dass nur der Urin des 49-Jährigen in der Lage war Phosphormolybdänsäure zu reduzieren, nicht jedoch der Urin von mehr als einem Dutzend klar diagnostizierter *Myasthenia gravis*-Patienten. Daher vermutete Medes schon 1932 eine andere Erkrankung und publizierte diesen Fall. Im Urin des Patienten konnte 4-Hydroxyphenylpyruvic acid (4-HPPA) nachgewiesen werden. Dieser Metabolit entsteht beim Katabolismus von Phenylalanin wobei die aromatische Seitenkette des Phenylalanins durch die Phenylalaninhydroxylase hydroxyliert wird. Hierbei wird Tyrosin gebildet. Als auch bei der Verstoffwechslung von Tyrosin zu 4-HPPA, durch die Tyrosinaminotransferase (TAT). Tyrosin kann weiterhin zu Homogentisinsäure (HGA) umgewandelt werden. Homogentisinsäure wiederum induziert ein fulminantes Sterben von Hepatozyten (Vogel *et al.* 2004). Medes erkannte in ihrer Arbeit nicht nur den Zusammenhang zwischen der exogenen Zufuhr von Phenylalanin und Tyrosin, sondern konnte durch die Gabe verschiedener Diäten die Konzentration von allen schädlichen Metaboliten im Urin regulieren. Sakai und Kitagawa (1956/57), Zetterström (1963) und Fritzell *et al.* (1964) beschrieben alle verschiedene Fälle von Hepatomegalie, Splenomegalie und Leberfunktionsstörungen bei Kleinkindern. Diese Fälle hatten gemein, dass bei allen Patienten 4-HPPA oder Hydroxyphenylazetatsäure zusammen mit Tyrosin im Urin und Tyrosin im Serum nachgewiesen wurden. In einer Publikation von Taniguchi und Gjessing (1965) konnte gezeigt werden, dass bei einem Patienten mit Tyrosinosis das Enzym Hydroxyphenylpyruvatdioxigenase nicht nachweisbar war. Außerdem gab es schon 1964 durch Taniguchi und Gjessing erste Hinweise darauf, dass es sich um einen rezessiven Erbdefekt handelt. Bei zwei Patienten handelte es sich um Schwestern, von jedoch gesunden Eltern.

Im Jahr 1977 wurde weiterhin festgestellt, dass der Urin von Patienten mit HT-1 Succinylazeton und Sukzinylazetoazetat enthält. Beides sind potente Inhibitoren der Porphobilinogensynthase. Dieses Enzym katalysiert einen wichtigen Schritt in der Synthese von Porphyrinen, wie zum Beispiel dem Häm in dem häm-basierten Protein Hämoglobin, einem wichtigen Bestandteil der roten Blutkörperchen.

perchen. In den Erythrozyten dieser Patienten ist das Enzym in seiner Aktivität stark eingeschränkt. Sukzinylazeton und Sukzinylazetoazetat werden maßgeblich in einer Nebenreaktion aus Maleylazetoazetat und Fumarylazetoazetat gebildet. Aus der Akkumulation von Maleylazetoazetat und Fumarylazetoazetat schlussfolgerten die Autoren richtig, dass es sich nicht um einen Defekt an der Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase handelt, sondern dass der Defekt bei der Fumarylazetoazetathydrolase liegt (Lindblad *et al.* 1977). Der nächste entscheidende Schritt wurde von Sven Lindstedt und Kollegen gemacht. Sie veröffentlichten 1992 eine Studie, bei der sie die Gabe von NTBC an Patienten mit HT-1 beschrieben. Wie von den Autoren beschrieben konnte die Konzentration der Metabolite des Tyrosinstoffwechsels im Urin und im Serum unter das Detektionslimit gesenkt werden. Bei allen Patienten stellte sich nach einer siebenneunmonatigen Behandlung mit NTBC eine deutliche Verbesserung der Leberfunktion ein.

Bei der Hereditären Tyrosinämie unterscheidet man heute drei Typen dieser genetischen Erkrankung mit unterschiedlichem klinischem Verlauf. Die HT-1 ist ein Defekt im Gen kodierend für die Fumarylazetoazetathydrolase. Die HT Typ-2 und HT Typ-3 werden durch Defekte an zwei unterschiedlichen Enzymen im Tyrosinabbauweg verursacht (siehe Abbildung 2). Bei der HT-2 ist es ein Defekt in der Tyrosinaminotransferase und bei der HT-3 in der 4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase. Bei beiden Formen der Hereditären Tyrosinämie ist der Tyrosinspiegel im Plasma der Patienten zwar stark erhöht, aber die Leber weist keine Schäden auf. Dies gilt als Beleg, dass Tyrosin kein kanzerogener Metabolit ist (Mitchell *et al.* 2001). Die Hereditäre Tyrosinämie ist in ihrer akuten Form eine fulminante Erkrankung im Kindesalter, die durch das frühe Auftreten hepatorener Dysfunktionen gekennzeichnet ist (Weinberg *et al.* 1976). Die betroffenen Kinder haben keine hohe Lebenserwartung und entwickeln ein HCC bereits in einer frühen Lebensphase.

1.3.1 Das Mausmodell zur humanen Erkrankung

Die Fumarylazetoazetathydrolase-defiziente Maus ist ein etabliertes Modell bei dem sich die humane Erkrankung HT-1 in all ihren Facetten widerspiegelt. Diese Mäuse entwickeln nach vollständigem Entzug des Medikaments NTBC ein akutes Leberversagen sowie eine Schädigung der Nieren. Die Tiere versterben an einem akuten Leberversagen innerhalb weniger Wochen. Die Haltung und Zucht dieser Mäuse bedarf der Gabe von NTBC, dem einzigen Medikament in der Behandlung der humanen Erkrankung. Über das Trinkwasser kann die Medikamentengabe genau reguliert werden. Der chronische Verlauf der Krankheit kann durch eine reduzierte Gabe von NTBC simuliert werden. Die Mäuse entwickeln eine Hepatitis, versterben aber nicht innerhalb weniger Wochen, sondern durchlaufen alle Krankheitsstadien bis hin zur Entstehung eines HCC. Die

Therapie mit NTBC ist ein wirksamer, aber kein hundertprozentiger Schutz vor einem Hepatozellulären Karzinom. Bei einer Dosis von 2,5% NTBC entwickeln alle Tiere ein HCCs binnen neun Monaten. Bei einer 100%-igen NTBC-Therapie entwickeln immerhin noch rund ein Viertel der Tiere ein HCC binnen 24 Monaten. Für diese Arbeit stand ein zweiter Mausstamm zur Verfügung. Durch die Kreuzung des bereits etablierten $Fah^{-/-}$ -Stamms mit einem common gamma chain (γc)/ Rag2 Doppel-Knock-out-Stamm konnte eine immunsuppressive $Fah^{-/-}$ -Maus generiert werden. Diesem neu generierten Mausstamm fehlen bedingt durch den Knock-out der common gamma chain funktionale Rezeptorketten für viele Zytokine wie zum Beispiel Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15. Dies resultiert darin, dass die Entwicklung von Lymphozyten sehr stark eingeschränkt ist. Daher bilden diese Mäuse keine NK-Zellen und nur geringfügig T-Zellen und B-Zellen aus. Um auch die letzten T- und B-Zellen zu eliminieren sind diese Mäuse zusätzlich für das recombination activation gene 2 (Rag2) defizient. Dieses Gen ist essentiell für das Genrearrangement der Rezeptorketten der B- und T-Zellrezeptoren. Dieser Defekt resultiert wiederum in einem Verlust reifer T- und B-Zellen, da diese nur durch die positive Selektion über ihre funktionsfähigen Rezeptoren in Knochenmark und Thymus ein Überlebenssignal bekommen. Da dieses Signal fehlt, wird in den unreifen T- und B-Zellen der programmierte Zelltod induziert. Dieser Knock-out erlaubt es die Rolle von T-, B- und NK-Zellen in der Entstehung eines HCC in diesem Modell zu untersuchen.

1.4 Die Entstehung von Krebs

„That this seemingly simple mechanism – cell growth without barrier – can lie at the heart of this grotesque and multifaceted illness is a testament to the unfathomable power of cell growth. Cell division allows us as organisms to grow, to adopt, to recover, to repair – to live. And distorted and unleashed, it allows cancer cells to grow, to flourish, to adopt, to recover and repair – to live at the cost of our living. Cancer cells grow faster, adapt better. They are more perfect versions of ourselves.”

The Emperor of All Maladies, Siddhartha Mukherjee

Die Krebsentstehung ist zwar immer ein mehrstufiger Prozess und Krebszellen müssen verschiedene biologische Fähigkeiten in sich vereinen, die es ermöglichen unabhängig vom Gewebeverband zu agieren, doch das auffälligste Merkmal einer Krebszelle ist wohl als grenzenlose Proliferation. Zu den Eigenschaften einer Krebszelle zählen ausserdem die Fähigkeit einem induzierten Zelltod zu entgehen, die Bildung von neuen Gefäßen zur Versorgung zu induzieren,

einen invasiven und metastasierenden Charakter zu entwickeln und die Kontrolle durch das Immunsystem zu umgehen (Hanahan, D. und Weinberg, R.A. 2011). Anders als im gesunden Gewebe, wo die Bildung von Wachstumsfaktoren einer strengen Kontrolle unterliegt um die Funktion und die Gewebehomöostase zu gewährleisten, scheint es der Krebszelle fortwährend möglich in den Zellzyklus einzutreten. Die Ursache für die chronische Proliferation kann in einer Überexpression von Wachstumsfaktoren durch die entartete Zelle, eine stimulierte Überexpression durch die umgebenden Zellen, eine Überexpression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche oder in gestörten Feedbackmechanismen liegen. Ein Beispiel für eine solche negative Feedback-Schleife sind die PTEN-Phosphatasen. Sie sind die Gegenspieler der PI3-Kinasen (PI3K). Ein Funktionsverlust von PTEN steigert die Signalweiterleitung über PI3K und fördert so die Krebsentstehung in vielen Krebsmodellen (Jiang, B.H. and Liu, L.Z. 2009). Auch mTOR ist ein wichtiger Regulator im Zellwachstum und im Metabolismus. So induziert mTOR die Zellzyklus-Progression in Hepatozyten mit DNA-Schäden und mTOR-Inhibitoren können das Wachstum von HCC reduzieren und erhöhen die Wirksamkeit von Chemotherapeutika (Buitrago-Molina, L.E. *et al.* 2009). Mit der unkontrollierten Zellteilung geht oft der Verlust zur Fähigkeit der Differenzierung verloren wie zum Beispiel bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), die von bösartig entarteten Vorläuferzellen der Lymphozyten ausgeht.

Auf das HCCs übertragen definiert das Lehrbuch Klinische Hepatologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen von H. Danczyg den Leberkrebs als einen: „bösartigen, von Hepatozyten ausgehenden, epithelialen Tumor, der aus hepatozytenähnlichen, aber abnormen Zellen besteht.“ Ausgehend von „normalen“ gesunden Hepatozyten entwickelt sich ein HCC über Stadien der Schädigung des Leberparenchyms. In den letzten zwanzig Jahren hat sich die Auffassung verbreitet, dass sich aus frühen Stadien hepatischer Knoten das HCC entwickelt. Im Jahr 1995 wurde vom Weltkongress der Gastroenterologie eine internationale Arbeitsgruppe gegründet, die einheitliche Richtlinien zur Nomenklatur und diagnostische Kriterien erarbeiten sollte. Die von der Arbeitsgruppe vorgeschlagene Klassifizierung der in chronischen Lebererkrankungen vorkommenden nodulären Läsionen ist folgende (International Working Party (IWP) 1995). Unterschieden wird heute zwischen großen regenerativen Knoten, den wenig differenzierten Dysplastischen Knoten (L-DN), hochdifferenzierten Dysplastischen Knoten (H-DN) und als letzte Stufe, dem HCC. Als eine weitere Neuerung schlug die IWP die Existenz von Dysplastischen Foci als ein Cluster von Hepatozyten mit klaren Eigenschaften von frühen Neoplasien vor. Diese Neoplasien sind zum Beispiel kleine Zellveränderungen oder eisenfreie Bereiche im Hintergrund einer Eisenspeicherkrankheit. Diese Nomenklatur wurde weitgehend in die Diagnostik übernommen. Abbildung 3 zeigt

eine vereinfachte Zusammenfassung der Ereignisse, ausgehend von der normalen Hepatozyte über die IWP-definierten Stadien bis hin zum HCC.

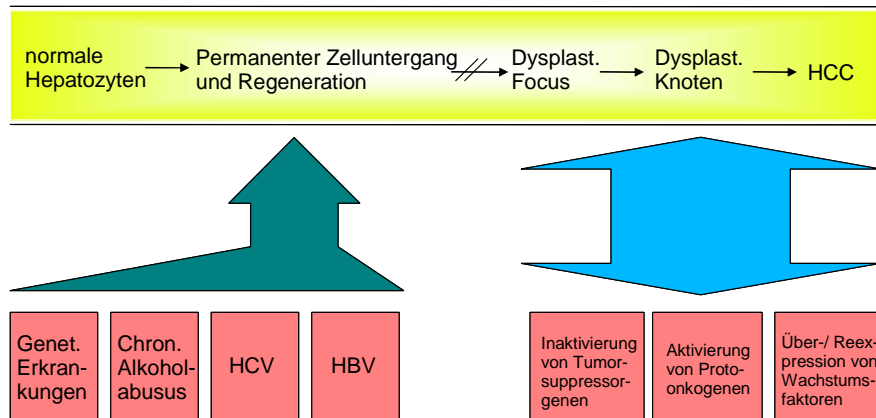


Abbildung 3: Genetische und urbane Faktoren in der Entwicklung des HCCs: Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Ereignisse, die zur Entstehung eines HCCs beitragen. Genetische Erkrankungen, Umweltfaktoren aber auch Infektionen mit Hepatitisviren führen zu einer Entgleisung der Homöostase des Leberparenchyms.

Weitgehend akzeptiert ist auch die Unterteilung in ein frühes HCC, welches eine unklare noduläre Struktur aufweist und meist als gut differenziert erscheint, von einem fortgeschrittenen HCC mit einer moderaten Differenzierung und Anzeichen von Gefäßeinwanderungen. Ein frühes HCC ist bereits durch eine doppelt so hohe Zelldichte, ein erhöhtes Nukleus/ Zytosoma-Verhältnis, einer variierenden Zahl von Portalfeldern und einer variierenden Anzahl von Arterien gekennzeichnet. In den letzten Jahren intensiver Forschung wurden verschiedene Tumormarker identifiziert. Unter ihnen ist beispielsweise Glypican-3 (GPC3), das mit einer 96%-igen Spezifität im frühen HCC einen starken Anhaltspunkt für die Malignität von nodulären Veränderungen liefert (Midorikawa Y. *et al.* 2003). Des Weiteren findet sich im frühen HCC das heat shock Protein 70 (HSP70). Dieses Protein gehört zu einer Gruppe von Genen, deren Funktionen in der Zellzykluskontrolle, der Apoptose und in der Tumorentstehung liegen (Garrido C *et al.* 2001 und Jolly C. *et al.* 2000). Viele HCCs sind mit chronischen Entzündungen und Fibrose assoziiert. Beides wirkt als ein potenter Trigger für die Synthese von HSP70, welches wiederum unter diesen Bedingungen sein anti-apoptisches Potential entfalten kann. Im programmierten Zelltod, der Apoptose, liegt eine natürliche Barriere für die Krebsentstehung. Es konnte gezeigt werden, dass dieser natürliche Schutzmechanismus in *Fah^{-/-}*-Mäusen nach Entzug von NTBC nicht mehr greift. Geschädigte Hepatozyten sind resistent gegen eine Fas-induzierte Apoptose mit Jo₂, sowie gegen eine Induktion nekrotischer Schädigung durch Azetaminophen (APAP) (Vogel. A. *et al.* 2004). Eine verringerte Apoptose-Sensitivität spielt nicht nur eine entscheidende Rolle am Hebel zur Karzinogenese, sondern ist auch entscheidend für Therapieansätze, die in der Regel darauf abzielen die entarteten Zellen zu töten und ge-

sundes Gewebe möglichst zu erhalten. Daher ist ein detailliertes Verständnis der Apoptosemechanismen in normalen und neoplastischen Zellen unerlässlich. Adams und Cory (2007) beschreiben in einem Übersichtsartikel die beiden Hauptwege zur Induktion von Apoptose in Säugerzellen. Unterschieden wird hier ein extrinsischer Weg, der über Rezeptor-Liganden-Bindung den Zelltod induziert und Caspase-8/10 über Adaptermoleküle mit einer Fas-associated death domain (FADD) aktiviert sowie ein intrinsischer Weg, der unterschiedliche Stress-signale aus dem Zellinneren, zum Beispiel von geschädigten Mitochondrien, übersetzt. TP53 gilt als ein Tumorsuppressor und nimmt Chromosomenabnormalitäten und DNA-Strangbrüche wahr. Diese Zellschäden werden von TP53 über die Regulierung der Expressionslevel der BH-3-only Proteine Noxa und Puma in ein Apoptosesignal übersetzt. In Tumorzellen können die Apoptosesignalwege auf verschiedenen Ebenen blockiert sein. In vielen Tumorzellen ist die Tumorsuppressorfunktion von TP53 verloren gegangen oder es werden anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie bzw. Überlebenssignale, wie beispielsweise Igf1/2, überexprimiert. Beides verschiebt das Gleichgewicht von apoptotischen und anti-apoptotischen Signalen und bewirkt eine Zelltodresistenz von neoplastischen Zellen und fördert somit die Karzinogenese. Ein vollständiges Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen der Zellzyklusregulation, der Apoptose und der Beteiligung des Immunsystems in der Tumorentstehung sind von grundlegender Bedeutung für die Therapie von Tumorerkrankungen.

1.5 Das Immunsystem

1.5.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem hat sich in allen vielzelligen Organismen unter dem evolutionären Druck von Pathogenen entwickelt und ist bei den Säugetieren wahrscheinlich am komplexesten ausgebildet. Es stellt ein kompliziertes Geflecht aus zellulären und humoralen Bestandteilen dar und ist in seiner Komplexität nicht, wie beispielsweise die Leber oder das Herz, als ein Organ mit klaren Grenzen zu erkennen. Vielmehr befinden sich die zellulären und humoralen Bestandteile im Organismus verteilt: im Blut, im Lymphsystem und vielen anderen Organen und Geweben, wie beispielsweise der Leber, der Milz und der Haut. Man schätzt die Masse des Immunsystems auf 2-3 kg. Damit gehört das Immunsystem zu einem der größten Organe. Zum Immunsystem zählt man eine Vielzahl von Zellen, die weißen Blutzellen/ Leukozyten, aber auch Eiweißstoffe, die im Blut und in der Lymphe gelöst vorliegen. Die Vorläuferzellen des Immunsystems werden bereits während der Embryogenese im Knochenmark der langen Röhrenknochen, des Beckens und der Wirbelkörper gebildet und

schützen das ungeborene Leben bereits in den Wochen vor der Geburt. Das Immunsystem hat sich entwickelt, um den Körper durch eine Vielzahl von Strategien vor fremden und körpereigenen Gefahren zu schützen. Es ist immer wachsam und bereit, auf eine Bedrohung durch Bakterien, Viren und Pilze, etc. zu reagieren. Ein Pionier auf diesem Gebiet war Edward Jenner, der schon 1796 entdeckte, dass beim Mensch eine Infektion mit den Rinderpocken zu einem Schutz gegen die humanpathogenen Pocken führen kann. Er prägte als Erster den Begriff „Vaccination“ – Impfung. Weiterentwickelt wurde die Impfung durch Louis Pasteur, der entdeckte, dass es möglich ist, Pathogene zu töten oder abzuschwächen und sie dann gezielt als Impfstoff einzusetzen. In den 80er Jahren des 19. Jahrhunderts entwickelte er einen ersten Impfstoff gegen die Cholera in Hühnern und heilte einen Jungen, der von einem tollwütigen Hund gebissen wurde. Im 19. Jahrhundert trat Robert Koch mit einer Entdeckung in Erscheinung, dass Infektionskrankheiten durch Mikroorganismen hervorgerufen werden. Ab diesem Zeitpunkt begann die Blüte der Immunologie und viele weitere Entdeckungen folgten. Heute wird das Immunsystem in zwei grundlegende Komponenten gegliedert, dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem. Dabei ist es nicht nur die Aufgabe des Immunsystems eindringende Mikroorganismen zu bekämpfen, sondern auch das sensible Gleichgewicht zwischen Immunität und „self-tolerance“ aufrecht zu erhalten. Einblicke in die Komplexität des Immunsystems gewinnt man bei der Lektüre von Charles Janeway „Immunology - The immune system in health and disease“. Die Abbildung 4 stellt einen groben Überblick über die zwei Arme des Immunsystems dar.

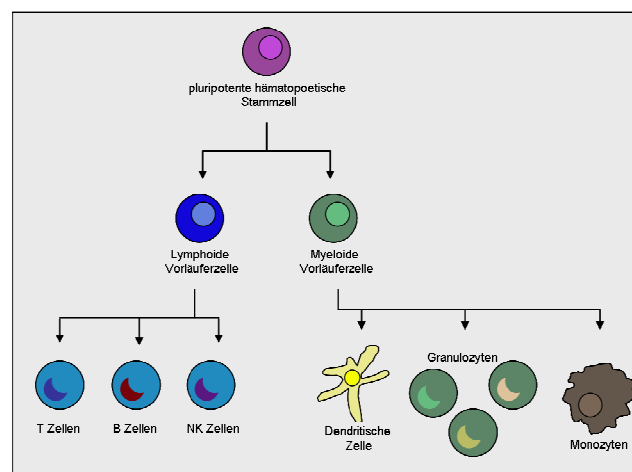


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Arme des Immunsystems in Säugern: ausgehend von einer pluripotenten hematopoetischen Stammzelle bilden sich aus zwei Typen von Vorläuferzellen das angeborene und das adaptive Immunsystem.

1.5.2 Das angeborene Immunsystem

Man geht heute davon aus, dass sich das angeborene Immunsystem vor dem adaptiven Immunsystem entwickelt hat. Einige Punkte sprechen für diese Hypothese. Erstens findet sich das angeborene Immunsystem in allen vielzelligen Organismen, das adaptive Immunsystem tritt erst in der Gruppe der Vertebraten auf. Zweitens kann das angeborene Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen unterscheiden, eine Eigenschaft, die das adaptive Immunsystem nicht besitzt. Drittens unterscheidet das angeborene Immunsystem zwischen „self“ und „non-self“ durch keimbahnkodierte Rezeptoren. Eine wichtige Funktion des angeborenen Immunsystems ist die Entzündung, ein schneller und sich selbst regulierender Prozess. Die an entzündlichen Prozessen beteiligten Chemokine locken Effektorzellen in das betroffene Gewebe. Diese Effektorzellen des angeborenen Immunsystems befinden sich zum Beispiel in der Haut sowie den Schleimhäuten, wie etwa denen der Lunge und des Intestinal- und Urogenitaltrakts. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich dabei durch seine schnelle Reaktion wie auch durch seine vielfältigen Möglichkeiten aus. Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind zum Beispiel Makrophagen, spezialisierte phagozytierende Zellen und die Granulozyten. Letztere stellen eine weitere Gruppe von Leukozyten dar, die durch ihre namensgebenden Granula charakterisiert werden. Die Zellen des angeborenen Immunsystems tragen, wie bereits erwähnt, keimbahnkodierte Rezeptoren, mit denen sie zwischen verschiedenen körpereigenen Strukturen und Pathogenen unterscheiden können. Die Unterscheidung findet durch sogenannte „pattern recognition molecules“ statt. Diese Moleküle erkennen hochspezifisch pathogen-assoziierte Strukturen. Zu den Erkennungsrezeptoren zählt die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), die ihren Namen wegen ihrer Homologie zu einem in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Moleküls erhielten, und die Familie der NOD-like Rezeptoren (NLR). Die TLR erkennen dabei ein weites Spektrum an Strukturen auf der Oberfläche von Pathogenen wie zum Beispiel das Lipopolysaccharid (LPS) der gram-negativen Bakterien (TLR4), aber auch viele andere pathogen-assoziierte Motive, wie beispielsweise doppelsträngige RNA (TLR3) von Viren, oder CpG DNA-Motive und Lipoteichonsäure (TLR9) von gram-positiven Bakterien. Die Familie der NLR bilden ausschließlich intrazelluläre Rezeptoren, die Pathogene im Zytosol erkennen. Mit den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ist keine antigenspezifische Erkennung von Pathogenen möglich. Ein wichtiger Zelltyp des angeborenen Immunsystems ist die NK-Zelle. NK-Zellen werden trotz eines fehlenden antigenspezifischen Rezeptors auf ihrer Oberfläche zu den Lymphozyten gezählt. Sie wurden 1975 von einer Arbeitsgruppe um H. Wigzell entdeckt. Sie fanden „natürlich“ vorkommende Killer-Zellen in der Maus, die eine selektive lytische Aktivität gegenüber Moloney Leukemia Zellen aufweisen. Sie sind in der Lage den Organismus vor einer Vielzahl eindringender Mikroorganismen zu schützen. NK-Zellen erkennen

dabei Zellen die kein oder nur sehr wenig Major Histocompatibility complex I (MHC I) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Hans-Gustaf Ljunggren und Klas Kärre, 1990). Eine weitere wichtige Gruppe von Immunzellen sind die Monozyten. Sie stellen die Vorläuferzellen für Makrophagen und einen Teil der Dendritischen Zellen dar. Unter Beteiligung von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise GM-CSF und M-CSF entwickeln sich aus den hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark die Monozyten. Monozyten finden sich vor allem in der Milz, zirkulieren aber auch im Blut. Nach Antigenkontakt wandern sie in das betroffene Gewebe ein und entwickeln sich zu Makrophagen. Es werden dabei zwei Klassen von Makrophagen unterschieden. M1 Makrophagen sind an der sogenannten Typ 1-Reaktion beteiligt. Diese Makrophagen werden klassischerweise durch mikrobielle Produkte aktiviert. Aktivierte M1 Makrophagen produzieren dann wiederum reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffintermediate. M2 Makrophagen werden über einen alternativen Weg aktiviert. Sie regulieren die Entzündungsreaktion. Sie fördern aber auch Zellwachstum und Zellteilung in dem sie Wachstumsfaktoren bilden, die Angiogenese unterstützen und die Gewebestruktur verändern (Balkwill, 2005). Nach Schädigung der Leber durch beispielsweise hepatotoxische Substanzen oder eine Hepatitis B-Virusinfektion kann es zu einem akuten Leberversagen kommen. Der massive Zelltod in der Leber führt hier zu einer sterilen inflammatorischen Reaktion. Hierbei kommt vor allem den in der Leber residierenden Makrophagen eine besondere Rolle zu, da sie eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Mediatoren bilden, wie beispielsweise TNF und IL-6, die eine direkte Wirkung auf Apoptosemechanismen in den Hepatozyten haben und so die Schädigung der Leber fördern (Zimmermann, 2012). Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es nicht nur schnell Pathogene zu eliminieren, sondern auch maßgeblich an der Gewebheilung mitzuwirken und die langfristige Immunantwort des adaptiven Immunsystems zu initiieren.

1.5.3 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem unterscheidet sich wesentlich vom angeborenen Immunsystem. Konnte das angeborene Immunsystem schnell und effektiv durch die Erkennung von allgemeinen pathogenen Strukturen reagieren, so geht die Evolution mit der Entwicklung des adaptiven Immunsystems weiter. Das zentrale Paradigma des adaptiven Immunsystems ist die „klonale Selektion“. Es wird von antigenspezifischen, klonal-expandierenden Zellen gebildet, den B-Zellen und T-Zellen. Die B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren sind hochspezifische Antigenerkennungsstrukturen, die durch einen komplizierten mehrstufigen Prozess (Genrearrangement) gebildet werden und jeden T-Zell- und B-Zell-Klon einzigartig machen. Max D. Cooper und Kollegen (1965) studierten an Hühnern die Funktion des Thymus und der Bursa und charakterisierten im Zuge ihrer

Experimente zwei Linien von Lymphozyten, bei denen sie mutmaßten, dass sie zwei unterschiedliche Arme des adaptiven Immunsystems darstellten. Die T- und B-Zellen entwickeln sich aus pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark und reifen später im Thymus oder im Knochenmark heran. Diese pluripotenten Vorläuferzellen sind die Geburtszellen der hämatopoetischen Stammzellen, aus denen sich die lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln. Das klassische Model der T-Zellentwicklung besagt, dass sich aus diesen lymphoiden Vorläuferzellen die T-Zell-Vorläufer entwickeln, die das Knochenmark verlassen und in den Thymus einwandern, wo sie reifen und differenzieren. Die klonale Selektion, welche die T-Zellen im Thymus durchlaufen, ist ein Prozess, bei dem weniger als 5% der Zellen reifen und wieder in die Zirkulation gelangen (Scollay R.G. *et al.* 1980). Der T-Zell-Vorläufer exprimiert noch kein CD3 (proxy Marker für T-Zellen), CD4 (Marker für T-Helferzellen) und auch kein CD8 (Marker für zytotoxische T-Zellen). Erst während der T-Zell-Differenzierung und im Zuge des Rearrangements der V-, D- und J-Segmente zur Bildung der β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCRs) erscheinen auch die Moleküle CD4 und CD8 auf der Zelloberfläche. Im Anschluss an diese Selektion schließt sich die Formierung der V- und J-Segmente der α -Kette des TCRs an (Takahama, Y. 2006). Eine positive Selektion resultiert in der Formierung des TCRs auf der Oberfläche. Neben den T-Zellen mit einem ($\alpha\beta$) T-Zell-Rezeptor gibt es eine zweite Population an T-Zellen, die weniger häufig auftreten. Im Unterschied zu den ($\alpha\beta$) T-Zellen weisen diese T-Zellen ein anderes funktionales und phänotypisches Profil auf und unterliegen einer wenig beschriebenen Form der Selektion. Der TCR dieser Linie wird durch das Rearrangement der alternativen V-Segmente V_{μ} und V_{δ} gebildet. Der wesentliche Unterschied zu Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, besteht in der hohen Diversität, die durch die Kombination einiger genomkodierter Sequenzen zu einem individuellen Rezeptor entsteht. Der evolutionäre Vorteil klonal expandierender Zellen und individueller Rezeptoren mit einer Diversität von mehr als 10^{18} Möglichkeiten, erlaubt eine antigenspezifische Erkennung und ist Grundlage für die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses. T-Zellen stellen den Arm der zell-vermittelten adaptiven Immunantwort dar. Die zweite Linie des adaptiven Immunsystems bilden die B-Zellen. Sie sind der humorale Arm der adaptiven Immunantwort. Die Entwicklung der B-Zellen findet ausnahmslos im Knochenmark statt. Die Spezifität und Diversität der B-Zell-Antwort ist durch den B-Zell-Rezeptor (BCR) gegeben. Auch dieser Zelltyp unterliegt im Zuge seiner Reifung dem Genrearrangement und der klonalen Selektion. Wie bei der Generierung des TCRs kommt es auch beim BCR zur Rekombination der variablen (V), diversity (D) und juncional (J) Segmente. Diese V(D)J-Rekombination wird durch das recombination-activating gene 1 (RAG1) und 2 (RAG2) initiiert. Reife naive B-Zellen zirkulieren bis zum Antigenkontakt im Blut, nehmen das Antigen über Phagozytosemechanismen auf und präsentieren verdaute pathogene Peptide auf MHCII-Molekülen (Batista A. *et al.* 2009). Abhängig von der Art des Pathogens findet die Aktivierung un-

abhängig oder mit der Hilfe von T-Zellen statt. Aktivierte B-Zellen sekretieren große Mengen an Antikörpern und tragen so auf verschiedene Weise zur Immunität bei. Zum Eindringen in Zellen binden Viren und intrazelluläre Pathogene an die Zelloberfläche. Antikörper neutralisieren diesen Prozess, indem sie an die Oberfläche von Pathogenen binden. Die Neutralisierung funktioniert nicht nur auf der Ebene der Pathogene, sondern hindert auch bakterielle Toxine am Eindringen in die Zellen. In einem zweiten wichtigen Schritt können durch die Bindung von Antikörpern an Pathogene diese durch Immunzellen besser phagozytiert werden. Dies wird als Opsonisierung bezeichnet. Alternativ kann durch die Bindung von Antikörpern das Komplementsystem aktiviert werden. Das Komplementsystem ist ein Set von Plasmaproteinen und Teil des Angeborenen Immunsystems und trägt zur Lyse extrazellulärer Pathogene bei.

Das adaptive Immunsystem entwickelte sich vor rund 500 Millionen Jahren und tritt bereits in der Klasse der Agnatha, einer sehr ursprünglichen Gruppe von kieferlosen Wirbeltieren, auf. Es entwickelten sich Funktionen der adaptiven Immunzellen, die sich mit dem Angeborenen Immunsystem überlappen, es ergänzen und regulieren.

1.5.4 Die Leber als ein immunogenes Organ

Wie bereits erwähnt, wird die Leber über zwei Gefäßsysteme versorgt. Sie erhält arterielles Blut aus der systemischen Zirkulation und venöses Blut aus dem Intestinum. Da die Lebersinusoide sehr dünnwandig sind, trifft dieses Mischblut auf die in der Leber angesiedelten Kupfferzellen. Die Kupfferzellen sind eine leberspezifische Population von Makrophagen. Neben den Kupfferzellen finden sich auch natürliche Killer (NK)-Zellen und natürliche Killer-T (NKT)-Zellen in hoher Zahl in der Leber. Beide Zelltypen sind Teil des Angeborenen Immunsystems. In der Haut und den Epithelien des Körpers sind es zumeist die dendritischen Zellen, welche die Funktion der antigenpräsentierenden Zellen (APC) inne haben. In der Leber jedoch wird diese wichtige Aufgabe auch von nicht-hämatopoetischen Zellen übernommen. Dazu zählen die Leberparenchymzellen, die Sternzellen und die Epithelzellen der Sinusoide.

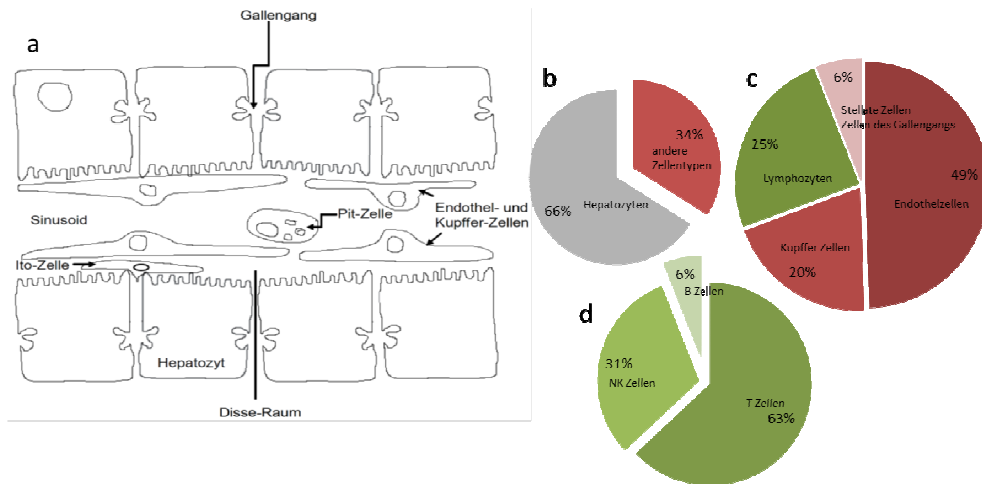


Abbildung 5: Zellulärer Aufbau der Leber: (a) zeigt einen schematischen Aufbau der Lebersinusoiden mit einigen in der Leber vorkommenden Zelltypen (in Anlehnung an das Lehrbuch Klinische Hepatologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen von H. Danczyger). (b/c/d) nennt die ungefähre Verteilung der verschiedenen in der Leber vorkommenden Zelltypen in Prozent, diese Angaben variieren zwischen der humanen und murinen Leber. (Quelle: Vito Racanelli und Barbara Rehermann, *The Liver as an Immunological Organ*, 2006)

Die Abbildung 5 zeigt den Aufbau der Lebersinusoiden. Die Sinusoiden sind das weit vernetzte System von Blutgefäßen. Sie werden von den Sinusendothelzellen ausgekleidet. Bei den Pit-Zellen handelt es sich um Leber-assoziierte Lymphozyten. Dieser Zelltyp wurde als erstes von E. Wisse 1976 beschrieben. Die Ito-Zellen (Synonym: Sternzellen/ hepatic stellate cells) spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Fibrose, also der Narbenbildung nach einer Leberverletzung.

Die Vielfalt der antigenpräsentierenden Zellen in der Leber

In der Leber der Maus lassen sich verschiedene Subtypen der dendritischen Zellen (DC) unterscheiden. Die plasmazytoide DC (pDC) und die myeloide DC (mDC) lassen sich sowohl im Menschen als auch in der Maus finden. Hier sind es vor allem die pDC, die in einer deutlich höheren Frequenz in der Leber vorkommen als in den anderen immunologischen Organen. Sie sind auch die Hauptquelle für $\text{INF-}\alpha$ in der Leber. $\text{INF-}\alpha$ wird vor allem als Reaktion einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch virale Pathogene gebildet. In der Mausleber lassen sich zwei weitere Subtypen der DC finden, die bisher im Menschen nicht nachgewiesen werden konnten. Es handelt sich um $\text{CD8}\alpha^+$ DC und die wenig beschriebenen natürlichen Killer DC (NKDC). Kupferzellen sind phagozytierende Zellen und sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche auch MHC-Moleküle und eine Vielzahl von ko-stimulatorischen Molekülen, die sie zu hervorragenden APC machen. Auch die Epithelzellen der Sinusoiden sind in der Lage Antigene zu präsentieren, da sie sowohl MHC I und MHC II als auch die

erforderlichen ko-stimulatorischen Moleküle, Cluster of Differentiation (CD), CD40, CD80 und CD86 exprimieren. Diese Klassen antigenpräsentierender Zellen können zum Beispiel auf die Aktivierung der TLR-Signalwege IL-10 und IL-18 sekretieren. Dadurch können sie direkt die Aktivierung von NK-Zellen regulieren. IL-10 inhibiert die Aktivierung von NK Zellen während IL-18 eine NK-Zellaktivierung bewirkt (Zhengkun Tu *et al.* 2008). Neben den Immunzellen können auch Hepatozyten über MHC-Moleküle Antigene präsentieren, eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen sekretieren und so nicht nur das Mikromilieu in der Leber maßgeblich regulieren, sondern auch die systemische Immunantwort beeinflussen.

1.5.5 Das Immunsystem in der Krebsentstehung

Die etwa 10^{18} Zellen des menschlichen Körpers sind permanent den destruktiven Einflüssen der Umwelt ausgesetzt. Strahlung, oxidativer Stress, aber auch die individuelle genetische Veranlagung und Vieles mehr können ursächlich für die Entstehung von Krebs sein. Betrachtet man die Vielzahl an potentiell „gefährlichen“ Mutationen, stellt sich die Frage, warum man nicht häufiger eine Tumorerkrankung hat. In der Tat leben die meisten Menschen über Jahrzehnte ein tumorfreies Leben (Folkman, J. & Kalluri, R 2004). Dennoch hat man in etwa 14% der Prostatabiopsien Tumore gefunden (Rich, A. R. 2007). Bei etwa 39% der Frauen in den Vierzigern lassen sich histologisch Tumore der Brustdrüsen nachweisen (Nielsen, M. *et al.* 1993). Solche Belege finden sich auch für den Thymus, die Lunge, den Pankreas und andere Gewebe. Eine normale Körperzelle teilt sich, aus ihr entstehen Zellverbände und Gewebe. In diesem Gewebe herrscht Reziprozität, die Zellen kommunizieren miteinander und mit der extrazellulären Matrix über Zell-Zell-Kontakte, Rezeptoren, Hormone und anderen löslichen Faktoren, ein Austausch der erst multizelluläres Leben möglich macht. Damit sich ein Tumor formieren kann, bedarf es eines „Initiators“ und mindestens eines Tumorpromotors (Slaga, T. J. 1983). Was entscheidet nun, ob eine maligne Mutation in einem Tumor gipfelt oder vom Immunsystem eliminiert wird? Verschiedene Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Umgebung, also das Gewebe, in dem sich der Tumor entwickelt, eine entscheidende Rolle spielt. In Studien an Hühnerembryonen konnte gezeigt werden, dass sich der Embryo auch unter der Anwesenheit eines aktiven Onkogens normal entwickelt. Wird der Flügel, in dem das Rous sarcoma virus (RSV) injiziert wurde, entfernt, entwickelte sich innerhalb weniger Stunden ein transformierter Phänotyp. Hier zeigt sich der wesentliche Einfluss der Tumorumgebung (Dolberg, D. S. *et al.* 1984). Peyton Rous gelang es 1911 durch die Injektion von filtriertem zellfreiem Extrakt aus Hühnertumoren in gesunde Hühner die gleichen Tumore zu induzieren. Da die Tumore aus Bindegewebe bestehen bezeichnet man sie als Sarkome. Peyton Rous wurde 1966, 55 Jahre nach seiner Entdeckung des

Rous Sarkoma Virus, der Nobelpreis für Medizin/ Physiologie für seine „Virus Theory of Cancer“ in Stockholm verliehen. Die Beobachtung von Dolberg und Kollegen legt nahe, dass die Umgebung in der Lage ist die Gewebearchitektur aufrecht zu erhalten, Zellwachstum zu inhibieren und so einen malignen Phänotyp zu unterdrücken. Allerdings können „falsche“ Signale zu einer Destabilisierung des Gewebes führen und so malignes Zellwachstum stimulieren. Das Immunsystem spielt eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Gewebemöostase. Es schützt den Organismus, indem es zum Beispiel Virusinfektionen schnell bekämpft und dadurch eine Virus-induzierte Tumorentstehung unterdrückt sowie durch die strenge Kontrolle von inflammatorischen Prozessen, damit kein inflammatorisches „pro-Tumor“-Milieu entsteht (Swann, J.B. 2007). In einer Vielzahl von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es durch den Verlust von Teilen des adaptiven und angeborenen Immunsystems zur spontanen Tumorentstehung in einer großen Zahl von Geweben kommt, wie beispielsweise Adenokarzinomen der Lunge und des Kolons sowie der Brust (Shankaran, V. *et al* 2001.). Hier konnte gezeigt werden, dass Rag2-defiziente Mäuse, denen also T- und B-Zellen fehlen, eine um circa 15% erhöhte Rate für eine spontane Krebsentstehung in der Lunge haben als vergleichbare wild-typ (wt) Mäuse. Ist zusätzlich der Signalweg für Typ I und II INF durch den Knock-out von STAT1 unterbrochen, erhöht sich die Tumorrage noch einmal um etwa 10-40% bezogen auf Adenokarzinome der Brust und des Colons. Diese Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und Tumorentstehung.

Tabelle 1: Chronische Entzündung und Krebs

- **Krebs entsteht besonders häufig an Entzündungsherden**
- **Immunzellen, die eine chronische Entzündung begünstigen, finden sich besonders häufig in der Nähe von Tumoren und fördern das Tumorstwachstum**
- **Der Tumor selbst ist in der Lage inflammatorische Mediatoren zu bilden**
- **Genetische Variationen in inflammatorischen Genen beeinflussen die Tumorentstehung und –progression**
- **Langzeitnutzung von inflammatorischen Medikamenten (Non-steroids) senkt das Risiko der Krebsentstehung**

Für viele Krankheiten konnte bereits ein direkter Zusammenhang zwischen Pathogenen, Entzündung und der Entstehung von Tumoren in den betroffenen Geweben nachgewiesen werden. So zum Beispiel bei Blasenkrebs und Schistosomiasis, einer *Helicobacter pylori*-induzierten Gastritis, dem Magenkarzinom, Inflammatory Bowl Disease (IBD) und Dickdarmkrebs, sowie einer Prostatitis und dem Prostatakarzinom.

In der Leber ist bereits bekannt, dass sich das HCC auf der Basis einer Fibrose und der damit einhergehenden chronischen Entzündung entwickeln kann (Alison, M. R. 2011). Eine Fibrose in der Leber geht Hand in Hand mit entzündlichen Reaktionen, die wiederum die Gewebemöostase entscheidend beeinflussen. Weiterhin konnte belegt werden, dass sich auf der Basis einer HBV/HCV Infektion ebenfalls ein HCC entwickeln kann (Veldt, B. J. *et al.* 2008). Eine Veröffentlichung von Schneider *et al.* (2012) weist einen Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und einer chemisch-induzierten Hepatokarzinogenese durch Diethylnitrosamin (DEN) nach. Durch den Verlust von verschiedenen Ästen des Adaptiven Immunsystems konnte die Tumorlast in den Knock-out-Mäusen gesteigert werden. Sie mutmaßten dabei, dass durch T-Zellen die initiale Tumorentstehung gemindert werden kann und dass B-Zellen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Tumorwachstums spielen. Die Vielzahl von Publikationen, die eine Beteiligung des Immunsystems bei der Tumorentstehung in so vielen Geweben belegen, verdeutlicht die Notwendigkeit die Tumorentstehung unter dem Aspekt der beteiligten Signalwege des Immunsystems zu betrachten.

1.6 Die Bedeutung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll der Fokus auf die besondere Rolle des Immunsystems in Prozessen der Leberschädigung und der Entstehung eines HCCs gerichtet werden.

Mit einem neuen Ansatz soll es gelingen, die inflammatorischen Prozesse, die zur Krebsentstehung im murinen Modell der HT-1 führen, besser zu verstehen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zwei Knock-out-Stämme benutzt. Der $Fah^{-/-}$ -Stamm erlaubt die Induktion von Leberschäden. Auf der Basis dieser Schäden kommt es zur Entstehung eines HCC. Der immunsuppressive $Fah^{-/-}$ -Stamm kann gezielt die Rolle des Immunsystems in den kanzerogenen Prozessen ansprechen.

Fragestellungen:

- Führt ein partieller Verlust des Immunsystems zur beschleunigten Krebsentstehung?
- Welche Gene werden bei der Entstehung eines HCCs in diesem Modell differenziell reguliert?
- Welche Zellen des Immunsystems sind für die Entstehung eines HCCs von Bedeutung?
- Welche Signalwege des Immunsystems werden aktiviert?

Die weltweit steigende Rate der Neuerkrankungen aller Tumorarten im Allgemeinen und im Speziellen, die sehr schlechten Prognosen, sowie die steigende Inzidenz des HCCs rechtfertigen weitere Forschungsarbeiten an dieser in der Regel tödlich verlaufenden Erkrankung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

Tabelle 2: Mausstämme

Name	Stammbezeichnung	Abkürzung
Fah	C57BL/6-Fah ^{tm1Mgo}	Fah ^{-/-}
Fah/ Rag2/ cgc (FCR)	B6;Cg-Fah ^{tm1Mgo} Rag2 ^{tm1Twa} Il2rg ^{tm1Wjl}	FCR

2.1.2 Medikamente für Mäuse

Tabelle 3: Medikamente und Diäten

Name	Hersteller
2-(2-nitro-4-trifluor-methylbenzyl)-1,3-cyklohexanedion (NTBC)	Business Office Reed College, Portland
BrdU	Sigma-Aldrich #39073
Ketamin Graub Injektionslösung	aniMedica GmbH
Rompun 2% Injektionslösung	Bayerhealthcare
Heparin-Natrium 25000-ratiopharm	Ratiopharm GmbH

2.1.3 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper für Western Blot

Name	Verdünnung	Wirtstier/ Molekulargewicht [kDa]	Eingesetzte Proteinmenge	Firma/ Bestellnummer
Aktin	1:1.000	Ziege IgG/	100 µg	Santa cruz #sc-1615
	5% Trockenmilch	43 kDa		
Akt	1:1000	Ziege IgG/	100 µg	Cell signalling #9272
	5% BSA	60 kDa		
c-jun	1:500	Kaninchen IgG/	150 µg	Cell signalling #9165
	5% BSA	43, 48 kDa		
Cyclin D1	1:500	Maus IgG _{2a} /	100 µg	BD Biosciences #sc-718
	5% Trockenmilch	36 kDa		

GAPDH	1:1.000 5% Trockenmilch	Maus IgG ₁ / 37 kDa	100 µg	Santa cruz #sc-32233
p21 (M-19)	1:500 5% Trockenmilch	Ziege IgG/ 21 kDa	100 µg	Santa cruz #sc-471
p-p38	1:1000 5% BSA	Kaninchen IgG/ 43 kDa	100 µg	Cell signalling #9215
pAkt	1:1000 5% BSA	Kaninchen IgG/ 60 kDa	100 µg	Cell signalling #4060
p-S6 Ribosomales Protein (S240/244)	1:2.000 5% BSA + 1% OVA	Kaninchen IgG/ 32 kDa	100 µg	Cell signalling #2215S
p-SAPK/JNK (Thr183/ Tyr185)	1:500 5% BSA	Kaninchen IgG/ 46, 54 kDa	150 µg	Cell signalling #9251
pSTAT3 (Y705)	1:1.000 5% BSA	Kaninchen IgG/ 76, 86 kDa	100 µg	Cell signalling #9131S
STAT3	1:1.000 5% BSA	Kaninchen IgG/ 76, 86 kDa	100 µg	Cell signalling #9132
4E-BP1	1:1000 5% BSA	Kaninchen IgG/ 15-20 kDa	100 µg	Cell signalling #9452

Tabelle 5: Primär-Antikörper für die Immunhistochemie (ICH)

Name	Verdünnung/ Puffer	Wirtstier	Gewebe Permeabilisierung	Firma/ Bestellnummer
A6	1:100 PBS	Ratte IgG _{2a}	Proteinase K Behandlung [1 µg/µl PBS]	Zur Verfügung gestellt durch V Factor (National Institute of Health)
β-catenin	1:50 3% BSA	Maus IgG _{2a}	Tris/ EDTA	BD Bioscience Pharmingen #610153
BrdU	1:200 5% Ziegenserum in PBST	Rekombinanter IgG _{2a}	Natrium Zitrat Puffer pH 6,0 [10 mM Natrium Citrat, 0,05% Tween-20]	GE Healthcare #RPN202
Ki67	1:500 oder 1,000 2% Ziegenserum in PBST	Kaninchen IgG	EDTA-Puffer pH 9,0 [1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,05% Tween-20]	Vector #VP-K451
p21 (M-19)	1:50 2% Pferdeserum in PBST	Ziege IgG	Zitrat-Puffer pH 6,0 [10 mM Zitronensäure, 0,05% Tween-20]	Santa Cruz #sc-471

Tabelle 6: Sekundär-Antikörper für die Immunhistochemie

Name	Verdünnung	Wirtstier	Firma/ Bestellnummer
Affe anti-Ziege IgG-HRP	1:2.500	Ziege IgG	Santa Cruz #sc-2020
Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP	1:2.500	Kaninchen IgG	Santa Cruz #sc-2004
Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	1:100-1:1.000	Maus IgG	Invitrogen #A11001
Ziege anti-Maus IgG-HRP	1:2.500	Maus IgG	Santa Cruz #sc-2005
Huhn anti Ratte IgG Alexa 488	1:200	Ratte IgG	Invitrogen A21470

Tabelle 7: Antikörper für die FACS Analyse

Antibody	Isotype	clon	Firma
Anti-Maus Ter119-FITC	Ratte IgG2b,k	Ter-119	eBioscience
Anti-Maus PDCA-1-PE	Ratte IgG2b	eBio129c	eBioscience
Anti-Maus NK1.1-PerCp-Cy5.5	Maus IgG2a,k	PK136	eBioscience
Anti-Maus Ly6G-PE	Ratte IgG2a,k	1A8	Biologend
Anti-Maus Ly6G (Gr1)-PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2b,k	RB6-8C5	eBioscience
Anti-Maus Ly6C-FITC	Ratte IgG2c,k	HK1.4	Biologend
Anti-Maus CD8a-FITC	Ratte IgG2a,k	53-6.7	eBioscience
Anti-Maus CD69-PE-Cy7	Armenischer Hamster IgG	H1.2F3	eBioscience
Anti-Maus CD62L-PE-Cy7	Ratte IgG2a,k	MEL-14	eBioscience
Anti-Maus CD4-APC	Ratte IgG2b,k	GK1.5	eBioscience
Anti-Maus CD45.2-FITC	Maus IgG2a,k	104	BD Bioscience
Anti-Maus CD45.1-PE	Maus IgG2a,k	A20	eBioscience
Anti-Maus CD3-PB	Ratte IgG2b,k	17A2	eBioscience
Anti-Maus CD31-FITC	Ratte IgG2a,k	390	eBioscience
Anti-Maus CD26-PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2a,k	H194-112	eBioscience
Anti-Maus CD16/CD32 Purified	Ratte IgG2a,y	93	eBioscience
Anti-Maus CD133-PE	Ratte IgG1,k	13A4	eBioscience
Anti-Maus CD11c-PE-Cy7	Armenischer Hamster IgG	N418	eBioscience
Anti-Maus CD11b-eFluor450 (PB replace)	Ratte IgG2a,k	M1/70	eBioscience
Anti-Maus CD11b-FITC	Ratte IgG2b,k	M1/70	eBioscience
Anti-Maus CD49b-FITC	Ratte IgM, k	DX5	eBioscience
Anti-Maus F4/80-APC	Ratte IgG2a, k	BM8	eBioscience
Anti-Maus CD19-APC	Maus IgA, k	MB19-1	eBioscience

2.1.4 Primer

Tabelle 8: Primersequenzen für die Genotypisierung der Mausstämme

Name	Frequenz 5'-3'	Hersteller
Fah (66)	CTA GGT CAA TGG CTG TTT GG	Eurofins MWG Operon
Fah (67)	GGA CAT ACC AAT TTG GCA AC	Eurofins MWG Operon
Fah (68)	TAA AAT GAG GAA ATT GCA TCG	Eurofins MWG Operon
Rag2 A	GGG AGG ACA CTC ACT TGC CAG TA	Eurofins MWG Operon
Rag2 B	AGT CAG GAG TCT CCA TCT CAC TGA	Eurofins MWG Operon
Rag2 neo	CGG CCG GAG AAC CTG CGT GCA A	Eurofins MWG Operon
H59	CCT TCC AGA GGT TCA GTG CTT TGT GT	Eurofins MWG Operon
C47	CAT TCC AGG AGT GCA GTC ACT ATT TG	Eurofins MWG Operon
HNA84	GTG CAA TCC ATC TTG TTC AAT GGC CG	Eurofins MWG Operon
C41	GAT TGT CTG TTG TGC CCA GTC ATA GCC	Eurofins MWG Operon

Tabelle 9: Primer für die semi-quantitative PCR

ATR for	TGC GCT CTG CTA GAG CAC GGT	Eurofins MWG Operon
ATR rev	AGT GCT GGC TGG CTG TGC TG	Eurofins MWG Operon
ATM for	GAT CTG CTC ATT TGC TGC CG	Eurofins MWG Operon
ATM rev	GTG TGG TGG CTG ATA CAT TTG AT	Eurofins MWG Operon
Chk1 for	GGA TCA CCA TCC CAG ACA TT	Eurofins MWG Operon
Chk1 rev	AGA CTC TGA CAT ACC ACC TGA TGT	Eurofins MWG Operon
Chk2 for	CTC GGC TAT GGG CTC TTC AG	Eurofins MWG Operon
Chk2 rev	CTT CTC AAC AGT GGT CCA TCG	Eurofins MWG Operon
Brcal for	TAC CGG AAC CGT GTC AGA A	Eurofins MWG Operon
Brcal rev	TGA TCT CAC GAT TCC AAG GTT	Eurofins MWG Operon
p53 for	AGA GAC CGC CGT ACA GAA GA	Eurofins MWG Operon
P53 rev	GCA TGG GCA TCC TTT AAC TC	Eurofins MWG Operon
p21 for	ATC ACC AGG ATT GGA ACA TGG	Eurofins MWG Operon
P21 rev	CGG TGT CAG AGT CTA GGG GA	Eurofins MWG Operon
Mdm2 for	TGG GCG AGC GGG AGA CCG AC	Eurofins MWG Operon
Mdm2 rev	AGA GTC TCT TGT TCC GAA GC	Eurofins MWG Operon
Noxa for	CGT CGG AAC GCG CCA GTG AAC CC	Eurofins MWG Operon
Noxa rev	TCC TTC CTG GGA GGT CCC TTC TTG C	Eurofins MWG Operon
Gadd45a for	CAG ATC CAT TTC ACC CTC ATC C	Eurofins MWG Operon
Gadd45a rev	CCA CTG ATC CAT GTA GCG ACT	Eurofins MWG Operon
Gapdh for	TGC ACC ACC AAC TGC TTA G	Eurofins MWG Operon
Gapdh rev	GGA TGC AGG GAT GAT GTT C	Eurofins MWG Operon

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 10: Chemikalien

Name	Hersteller	Artikelnummer
(+)-5-Bromo-2'-deoxyuridine [BrdU]	Sigma	B5002-5g
Cell lysis buffer	Cell signaling	9803
Collagenase	Roche	5001740
10x PBS	Gibco	14200-083
2-Methoxyethanol	Th.Geyer	8006.250
Accutase	PAA	L11-007
30% Acrylamid/ Bisacrylamid 37,5:1	Bio-rad	161-0158
AEC Chromogen	Zymed	00-2007
Agarose	Invitrogen	15510.027
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Bio-Science AG	28906837
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth	9592.3
Avidin/ Biotin blocking solution	Vector	SP-2001
Antigen unmasking solution	Vektor	H-3300
Borsäure	Sigma	B6768-1kg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma	A6003-10g
Complete (Protease Inhibitor)	Roche	04693116001
Einbettmedium mit DAPI (Vectashield)	Vektor	H-1200
Entellan	Merck	1.07961.0100
Eosin Y Solution	Sigma	HT11.0232
Ethylendiamin-tetraacetic acid	Sigma	E5134-25g
Formaldehyd-Lösung	Fisher	200-001-00-S
Gel Loading Solution	Sigma	G7654
GelStar Gelstain	Lonza	50535
Glycerol	Sigma	G8773-500ml
Glycerin	Sigma	G8898-1kg
GVA Mounting Medium	Zymed	00-8000
HCl 37%	Merck	1.09057.1000
HEPES	Sigma	H0887
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Sigma	21.676-3
Immuno-Blot PVDF-Membran	Bio-rad	162-0177
In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL)	Roche	11684795910
KCl	Roth	67813
M.O.M Immunodetection Kit	Vector	PK-2200
Magnesium Chlorid (MgCl ₂)	Sigma	M2670-500g
Natrium Acetat	KMF	08-319
NucleoSpin® RNA II (für 50 Reaktion)	Macherey-Nagel	740955.50
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas	SM0671
Peroxidase-Konjugat Plus	Zymed	50-420Z
Pferdeserum	Zymed	S-2000
Ponceau S Solution	Sigma	P7170
Protein Assay Dye Reagent Concentrat	Bio-rad	500-0006
Proteinkinase K	Merck	1.24568.0500
RT Profiler PCR Array Mouse Chemokine & Receptor	Qiagen	PAMM-022
RT Profiler PCR Array Mouse Common Cytokines	Qiagen	PAMM-021
Sodium Citrat	Sigma	S1804-500g
Sodium Chlorid (NaCl)	Fluka	71376
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma	75746
Sodiumhydroxid (NaOH)	Merck	1.06482.1000
SuperScript™ II-First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen	12574-018

TEMED	Fluka	87689
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sekura	4583
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics	#04896866N8P11
Tris UltraPure	Invitrogen	15504-020
SuperScript™ II-First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen	11904018
Tween-20	Sigma	P5927-500ml
Weigert's Eisenhämatoxylin	Merck	1.09249.2500
Westernlightning reagent	Perkin-Elmer	N101
Whatman Chromatographie Paper	Schleicher & Schuell Bioscience GmbH	3017-915
Xylol	J.T.Baker	8080
Ziegenserum	Zymed	S-1000
Zitronensäure	Merck	8.18707.1000

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Methoden sind unter Berücksichtigung der im Tierschutzgesetz verankerten Richtlinien durchgeführt. Alle Tierversuche sind durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt worden.

2.2.2 Mausmodelle

Für die Tierexperimente wurden zwei verschiedene Knock-out Stämme verwendet. Beiden Stämmen ist gemeinsam, dass sie für die Fumarylazetatoacetathydrolase (Fah) defizient sind. Der Einfach-knock-out-Stamm wird in der Arbeit nur als Fah^{-/-} bezeichnet. Der zweite verwendete Stamm hat zusätzlich zur Fah-Defizienz auch einen Knock-out für die common gamma chain (c_γ) und das *Recombination activating gene 2* (Rag2). Die common gamma chain ist eine Ko-Rezeptorkette, die von vielen Interleukin-Rezeptoren genutzt wird. Rag2 ist ein essentielles Protein für das Rearrangement von Rezeptorgenen. Mäuse, in denen dieses Gen funktionsunfähig ist, können keine T- und B-Zell Rezeptoren bilden und haben daher keine Lymphozyten. Dieser Stamm wird mit der Bezeichnung FCR abgekürzt. Der Stamm ist immunsuppressiv. Neben reifen T- und B-Zellen kann dieser Stamm auch keine NK-Zellen bilden.

2.2.3 Tierhaltung

Alle Tiere wurden in den klimatisierten Räumen des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover in einem Temperaturbereich von 20-24°C und mit einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% in individuell ventilierten Käfigen (IVC) gehalten und verpaart. In den Tierlaboratorien herrschte ein 14 zu 10

Stunden Tag/ Nacht-Rhythmus. Den Haltungstieren stand Futter (Altromin Diät 1320) und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle Zuchttiere wurden zusätzlich mit einer Protein-reduzierten Diät gefüttert.

2.2.4 Behandlung der Tiere

Zur Haltung und Zucht aller $Fah^{-/-}$ -Mäuse ist die Zugabe von 2-(2-nitro-4-trifluormethyl)1,3-cyclohexanedion (NTBC) zum Trinkwasser essentiell. NTBC wurde täglich in einer Konzentration von 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trinkwasser angeboten. Diese Konzentration entspricht einer 100%igen Gabe von NTBC über das Trinkwasser. Zur Herstellung einer Stocklösung wurden 4 mg NTBC/ 0,5 % Natriumhydrogencarbonat auf 55°C erhitzt und unter Rühren gelöst. Der experimentelle Ansatz erforderte den Entzug von NTBC für einen Zeitraum von 21 Tagen und die anschließende Therapie mit 100% NTBC für weitere fünf Tage. Ein Behandlungszyklus besteht also aus zwei Phasen (21 Tage auf 0% NTBC und 5 Tage auf 100% NTBC). Dieser Behandlungszyklus wiederholte sich mehrere Male. Die Abbildung 6 zeigt die Behandlung der Tiere schematisch. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen die Versuchstiere getötet wurden. Während des ersten Zyklus wurde das NTBC über drei Tage schrittweise und schonend (50%, 25% und 0%) reduziert. Vor der Gewebeentnahme wurde den Tieren BrdU und Glukose in einer Konzentration von 0,8 mg BrdU/ ml Trinkwasser + 5% Glukose verabreicht.

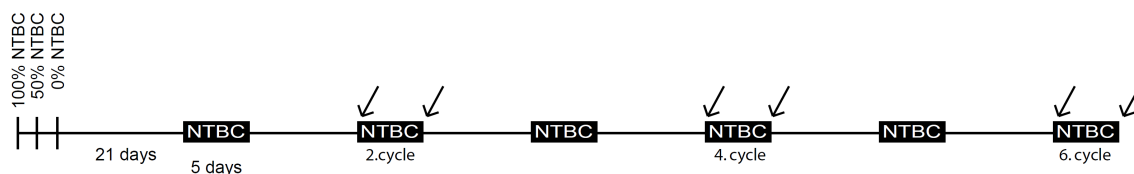


Abbildung 6: Schematische Abbildung des Behandlungsschemas von $Fah^{-/-}$ - und FCR-Mäusen: Die Probenentnahme fand zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten, jeweils vor und nach einer 100%igen NTBC-Phase, statt. Insgesamt wurden sechs Zeitpunkte betrachtet (in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet), ein früher Zeitpunkt nach zweimaligem NTBC-Entzug (2nd Cycle), ein mittlerer Zeitpunkt nach viermaligem NTBC-Entzug (4th Cycle) und ein späterer Zeitpunkt nach sechsmaligem NTBC-Entzug (6th Cycle).

In einem zweiten Versuchsaufbau ging es speziell darum einen bestimmten Zelltyp in seiner Entwicklung zu verfolgen. Mittels der Gabe von BrdU sollen proliferierende nicht-parenchymale Zellen markiert werden. Unter diesen nicht-parenchymalen Zellen sind auch sogenannte Leberstammzellen. Differenzieren diese Zellen zu Hepatozyten, sollten nach einigen Zellteilungen auch BrdU markierte Hepatozyten zu erkennen sein. Der Versuchsaufbau ist im Folgendem durch ein Schema dargestellt.

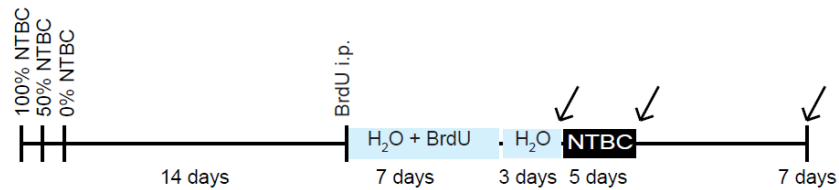


Abbildung 7: Schematische Abbildung des Behandlungsschemas von *Fah*^{-/-}-Mäusen: 14 Tage nach NTBC-Entzug erfolgte eine einmalige Injektion (i.p.) von BrdU. Im Anschluss erhielten die Tiere über sieben Tage BrdU über das Trinkwasser. Die Probenentnahme fand zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten, direkt vor und nach einer 100%igen NTBC Phase und sieben Tage nach der letzten NTBC-Behandlung statt. Insgesamt wurden drei Zeitpunkte betrachtet (in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet)

Das NTBC wurde schrittweise über drei Tage entzogen, vierzehn Tage nach NTBC-Entzug bekamen alle Versuchstiere eine einmalige intraperitoneale (i.p.) Injektion mit BrdU (0,1 mg/ g Maus). Die Tiere erhielten zusätzlich für sieben Tage über das Trinkwasser BrdU. Die Dosis im Trinkwasser betrug 0,8 mg BrdU/ ml Trinkwasser + 5% Glukose. Die Zeitpunkte der Tötung der Versuchstiere sind im Schema durch Pfeile gekennzeichnet.

2.2.5 Tötung und Entnahme von Gewebe

Die Tiere wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes nach der chemischen und mechanischen Methode getötet. Dazu wurde den Tieren intraperitoneal (i.p.) das Dissoziativanästhetikum Ketamin (Ketanest Graub Injektionslösung: 100 mg/ kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid, aniMedica GmbH) zusammen mit dem Analgetikum Rompun (Rompun 2% Injektionslösung: 4mg/ kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid, Bayer HealthCare) injiziert. Nach der Betäubung wurde der intraperitoneale Raum geöffnet. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *Vena portae* mit einer Venenverweilkanüle (24G). Über diese Kanüle wurde nach der Blutentnahme die Leber mit einer 0,9%igen Natriumchloridlösung mit 22 Units/ ml Heparin perfundiert. Durch die Perfusion wurde möglichst das gesamte Blutvolumen aus dem Leberkreislauf verdrängt. Nach der Perfusion der Leber wurde das Tier mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Leber wurde zügig entnommen. Jeder Leberlappen wurde einer anderen Bestimmung zugeführt. Die Bezeichnung der Leberlappen ist in der Abbildung 8 dargestellt. Der Leberlappen L1 wurde halbiert und beide Teile wurden separat in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ebenfalls wurden die Lappen L3 und L5-7 in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Diese Lappen wurden zur biochemischen Untersuchung, zur Isolierung von DNA, RNA und Proteinen genutzt. Der Lappen L2 wurde in 30%igem Formalin ü.N. bei 4°C fixiert, in PBS gewaschen und in Paraffin eingebettet. Der Lappen L4 wurde in Tissue Tec O.C.T. aufgenommen und bei -20°C tiefgefroren.

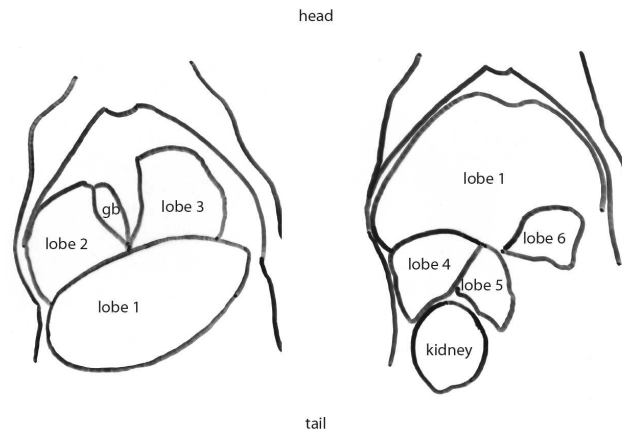


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Leberlappen in der Maus: Aufsicht. Es werden links die Leberlappen 1-3 gezeigt. Die Leberlappen 4-6 liegen unter dem Leberlappen 1 und sind in der rechten Abbildung dargestellt. (gb = Gallenblase, Lobe 1-6 = L 1-6)

2.2.6 Leberteilresektion

Für die Leberteilresektion wurden die Mäuse i.p. mit Ketamin/ Rompun betäubt. Die vollständige Analgesie ist durch ein fehlendes Schmerzempfinden beim Setzen eines Zwischenzehenreizes gekennzeichnet. Für die Leberteilresektion wurde der Intraoperitonealraum auf einer Länge von ca. 1,5 cm geöffnet. Durch diese Öffnung wurden die Leberlappen L1 bis L3 durch Abbinden mit einem Nähfaden entfernt. Die Hautschichten wurden einzeln vernäht und die Mäuse wurden bis zum vollständigen Wiedererwachen beobachtet. Die Entfernung der Leberlappen L1 bis L3 entspricht einer $\frac{2}{3}$ Leberteilresektion. Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von differenzierten Hepatozyten werden die Zeitpunkte 37 Stunden und 1 Woche nach der Leberteilresektion betrachtet. Die Kontrolle (0 h) für den basalen Wert der Proliferation in den Mäusen stellt der bei der Leberteilresektion zuerst entfernte Lappen L2 dar.

2.2.7 Isolation von Hepatozyten aus C57BL/6N-Mäusen und Transplantation in Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse

Isolation von Hepatozyten aus C57BL/6N

Die aus den C57BL/6N-Mäusen isolierten Zellen sollen in die Empfängermäuse des Genotyps Fah^{-/-} und FCR transplantiert werden. Daher war hier auf eine möglichst sterile Arbeitsweise zu achten. Die Arbeitsmaterialien wurden mit Ethanol gereinigt und das OP-Besteck autoklaviert. Der Pumpenschlauch wurde mit 70% Ethanol gespült und anschließend mit PBS gewaschen. Für eine optimale Wirkung der Enzyme wurden alle Lösungen auf 37°C erwärmt. Den narkotisierten Mäusen wurde der Intraoperitonealraum geöffnet. Die inneren Organe wurden ausgelagert und die *Vena portae* wurde mit einer Venenverweil-

kanüle (24 G) punktiert. Die Leber wurde solange mit EBSS ohne Ca_2^- - und Mg_2^- -Ionen über die Kanüle gespült, bis das Blut aus dem Leberkreislauf verdrängt war. Danach wurde das System mit einer zweiten Perfusionslösung (EBSS mit Ca_2^- - und Mg_2^- -Ionen + 10 mM HEPES, pH 7,4) ein bis zwei Minuten gespült. Die Leberstruktur wurde durch eine dritte Perfusionslösung (EBSS mit Ca_2^- - und Mg_2^- -Ionen + 10 mM HEPES, pH 7,4 + 0,04 mg/ ml Trypsininhibitor und 0,05 mg/ ml Liberase Blendzyme 3) aufgelöst. Die intrahepatische Struktur der Leber wurde durch das Enzym aufgelöst, die Leber ließ sich dennoch im Ganzen entfernen. Ohne die Gallenblase wurde die Leber in einer Petrischale mittels zweier Pinzetten mechanisch zerkleinert. Hierbei gingen die Hepatozyten in Lösung. Mittels eines 100 μm Nylonsiebes (BD) wurden Gewebereste von der Hepatozytensuspension getrennt. Die Zellen konnten bei 300 rpm für zwei Minuten pelletiert werden. Für die Transplantation wurden die Zellen in PBS aufgenommen und auf Eis gekühlt gelagert. Ein Aliquot der Zellen wurden mittels einer 1:2 Verdünnung mit Trypan-Blau-Lösung gefärbt und die Zellzahl sowie die Vitalität über die Zählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Hepatozyten wurden bei einer Vitalität von mindestens 75% transplantiert.

Transplantation der Hepatozyten in die Empfängermaus

Da die Mäuse nach der Transplantation weiter in den Räumen des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover verblieben, wurde die Transplantation der isolierten Hepatozyten in den Räumen des Tierlabors durchgeführt. Bei der anästhesierten Maus wurde ein linkslateraler subkostaler Schnitt gesetzt. Dieser Schnitt war nicht größer als ein Zentimeter und ermöglichte die Sicht auf die Milz. Die frisch isolierten Hepatozyten wurden in einem Volumen zwischen 100-150 μl direkt in die Milz injiziert. Nach der Injektion wurde die Einstichstelle abgedrückt. Die Hautschichten wurden einzeln vernäht und die Mäuse bis zum vollständigen Wiedererwachen beobachtet. Die Mäuse wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren eine Woche bzw. vier Wochen nach der Transplantation getötet und Blut sowie die Leber zur weiteren Untersuchung entnommen.

2.2.8 Transplantation von fetalen Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aus der Leber von $\text{Fah}^{-/-}$ -Mäusen in neugeborene FCR-Mäuse

Die FCR-Mäuse können keine reifen T-, B- und NK-Zellen bilden. Um das blutbildende System in diesem Stamm zu rekonstruieren, wurden fetale Hämatopoetische Stammzellen aus der Leber von $\text{Fah}^{-/-}$ -Mäusen in die FCR-Mäuse transplantiert. Die $\text{Fah}^{-/-}$ -Mäuse wurden für ein Zeitfenster von 60 Stunden verpaart. Die tragenden Weibchen wurden 14,5 Tage nach Beendigung der Paarung mittels zervikaler Dislokation getötet und die Embryonen aus der Gebärmutter entnommen. Die HSC wurden aus der Leber des 14,5 Tage alten

Embryo isoliert. Hierzu wurden die Lebern aller Embryonen gesammelt, die Zellen durch ein 100 µm Nylonsieb vereinzelt und in PBS aufgenommen. Via „Magnetic cell sorting“ (#130-090-858) konnten hochreine HSCs isoliert werden. Das Sortieren der HSC mit dem „Lineage Cell Depletion Kit“ (Miltenyi Biotec) erfolgte nach dem von der Firma angegebenen Protokoll. Diese Zellen wurden direkt perkutan in die Leber der neugeborenen Mäuse vom Stamm FCR injiziert. In einem Alter von 6 Wochen wurde den Jungtieren zum ersten Mal zwei bis drei Tropfen Blut retroorbital entnommen, um auf periphere Zellen des adaptiven Immunsystems, T-, B- und NK-Zellen, zu prüfen. Mit erfolgreich repopulierten Mäusen wurden nach dem beschriebenen System des zyklischen NTBC-Entzugs weitere Versuche durchgeführt.

2.2.9 Isolation von T-Zellen aus der Milz von $Fah^{-/-}$ -Mäusen und Transplantation in die FCR-Mäuse

Die T-Zellen wurden aus der Milz von $Fah^{-/-}$ -Mäusen isoliert. Hierzu wurde die Milz der Tiere entnommen und die Zellen wurden mechanisch vereinzelt. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen. Über das MACS System wurden alle $CD3^{+}$ Zellen separiert. Diese Zellen wurden gewaschen und über die Schwanzvene in die FCR-Mäuse injiziert.

2.2.10 Induktion der Ovalzell-Proliferation in den $Fah^{-/-}$ - und FCR-Mäusen durch die Cholin-defiziente Diät (CDE-Diät)

Ein in der wissenschaftlichen Fachwelt anerkanntes Modell zur Aktivierung von Ovalzellen ist die Fütterung von Mäusen mit einer Cholin-defizienten Diät. Die Tiere wurden für drei Wochen ausschließlich mit einer solchen Cholin-defizienten Diät gefüttert. Dem Trinkwasser wurde DL-Ethionin in einer finalen Konzentration von 0,165% beigefügt. Die Tiere wurden nach drei Wochen mittels der unter Punkt 2.2.5 beschriebenen Methode getötet und die Leber entnommen. Zum Nachweis der Ovalzellen wurde an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten eine A6-immunhistochemische Färbung angefertigt. Als quantitativer Nachweis von Ovalzellen wurden die nicht-parenchymalen Zellen aus der Leber isoliert.

2.2.11 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Aus ca. 250 mg schockgefrorenem Gewebe wurden die Proteine isoliert. Das Gewebe wurde in 350 µl 1x Lysepuffer homogenisiert. Das Lysat wurde bei 13000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Protein und wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Die Proteinkon-

zentration wurde aus Dreifachbestimmungen in einem colorimetrischem Assay gemittelt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der Proteine hergestellt, mit Protein Assay Dye reagent concentrate im Verhältnis 4:1 gemischt und bei 595 nm die Absorption am μ Quant von Bio-Tek Inc. bestimmt. Mittels einer mitgeführten Standardreihe für BSA konnte auf die Konzentration an Protein in der Probe geschlossen werden.

Tabelle 11: 5x Zelllysepuffer für die Proteinisolierung

Chemikalien	Konzentration	Menge (100ml)	Finale Konzentration
Hepes	1 M, pH 7,6	25 ml	250 mM
KCl	2 M	12,5 ml	250 mM
NaF (Natriumfluorid, Sigma, S7920)		1,05 g	250 mM
NaPPi (Sodium pyrophosphate decahydrat)		1,11 g	25 mM
EDTA	50 mM	10 ml	5 mM
EGTA		190,2 mg	5 mM
B-Glycerophosphate		0,54 g	25 mM

Tabelle 12. 1x Zelllysepuffer für die Proteinisolierung

Chemikalie	Konzentration	Menge (50ml)	Finale Konzentration
Zelllysepuffer	5 x	10 ml	1 x
DTT (Promega V315A)	100 mM	500 μ l	1 mM
Complete cocktail (Roche 11697489001)	25 x	2 ml	1 mM
NP40		500 μ l	1% (v/v)
Vanadate (Na ₃ VO ₄)	160 mM	312,5 μ l	1 mM

2.2.12 Serumanalysen

Mittels Serumanalysen konnte eine Aussage über die Funktionsfähigkeit der Leber gemacht werden. Aus dem Blutserum wurden die Parameter ALT, AST, Bilirubin und Glucose bestimmt. Zur Messung der Serumproben wurde der AU 400 von Olympus verwendet.

Tabelle 13: Parameter der Serummessung

Parameter	Unterer wert	Grenz-	Oberer wert	Grenz-	Normwerte human	Messvolumen
ALT (GPT)	3 U/ L		500 U/ L		bis 34 U/ L	10 µl
AST (GOT)	3 U/ L		1000 U/ L		bis 31 U/ L	10 µl
Glukose	0,6 mmol/ L		45 mmol/ L		4,4-6 mmol/ L	2 µl
Harnstoff (HST)	0,8 mmol/ L		50 mmol/ L		3,3-6,7 mmol/ L	2,5 µl
Kreatenin	18 µmol/ L		2200 µmol/ L		45-84 µmol/ L	10 µl
Billirubin	0 µmol/ L		513 µmol/ L		2-21 µmol/ L	6 µl

2.2.13 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Entsprechend der gesuchten Proteingröße wurde ein Gel zwischen 7,5% und 15% Acrylamid/ Bis-Acrylamid verwendet. Die Proteinproben wurden nach fünfminütiger Inkubation bei 95°C auf dem Thermomixer in einem diskontinuierlichen SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE, modifiziert nach Laemmli, in vertikalen Bio-Rad Gelkammern (Mini-Protein System) bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel aufgetrennt. Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts lief als Standard bei jedem Gel ein Molekularmarker (PAGE-Ruler™, Fermentas) mit. Mittels Western Blot wurden die Proteine anschließend auf eine Immuno-Blot PVDF-Membran (Bio-rad #162-0177) in einem vertikalen Bio-rad Tank Transfer System übertragen. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei einer angelegten Spannung von 100 V.

Laufpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1% SDS
Transferpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
1x TBST	50 mM Tris/HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,1% Tween-20

Tabelle 14: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen

	Sammelgel	7,5% Trenngel	10% Trenngel	12% Trenngel	15% Trenngel
H ₂ O	6 ml	9,8 ml	8,2 ml	6,8 ml	4,9 ml
30% Acrylamid	1,3 ml	5 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	5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
APS	100 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Die im Western Blot verwendeten Antikörper sind mit Angaben zum Hersteller und der eingesetzten Konzentration in der Tabelle 3 aufgeführt.

2.2.14 Histologische Methoden

H&E-Färbung

Die Weigert`s Eisenhämatoxylin- & Eosin- (H&E) Färbung diente der morphologischen Beurteilung der Leberpräparate. Bei dieser klassischen Färbemethode wird der Zellkern durch das Hämatoxylin blau angefärbt während das Zytoplasma durch das Eosin blassrot gefärbt wird. Die in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mit einer Schichtdicke von 2 µm geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden durch die Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt und mittels H&E gefärbt. Über eine absteigende Reihe von Xylol/ Ethanol (Xylol, 100% Ethanol, 97% Ethanol, 70% Ethanol) wurden die Schnitte deparaffiniert und anschließend in ddH₂O rehydriert. Die Schnitte wurden für 15 sec in Hämatoxylin gefärbt und für 5 min in handwarmem Wasser inkubiert. Die Schnitte wurden nochmals kurz in ddH₂O gespült und anschließend für 2 min in angesäuertem Eosin gefärbt. Die Schnitte wurden kurz in ddH₂O gespült und anschließend in einer aufsteigenden Reihe Ethanol/ Xylol (70% Ethanol, 97% Ethanol, 100% Ethanol, Xylol) wieder dehydriert. Für diese Färbung wurden die Schnitte mit einem auf Xylol basierendem Einbettmedium eingedeckelt.

Ki67-immunhistochemische Färbung

Verwendete Lösungen und Kits

- Primär-Antikörper: Kaninchen polyklonaler Antikörper Ki67 Antigen®, #VP-K451, Vector
- Sekundär-Antikörper: broad spectrum Antikörper plus (#50441Z, Zymed)
- Avidin/ Biotin Blocking: SP-2001, Vector
- HRP-Konjugat: HRP-Streptavidin Plus (#50420Z, Zymed)
- AEC-Solution: AEC (Red) Substrate Kit (#00-200Z, Zymed)
- Waschpuffer: PBST (1x PBS + 0,1% Tween-20)
- GVA Mount: #00-8000, Zymed

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden in Xylol deparaffiniert und in Ethanol/ H₂O rehydriert. Das „Antigen retrieval“ wurde mit einem EDTA-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,05% Tween-20) für 35 min bei 96°C im Wasserbad durchgeführt. Die Schnitte konnten nach dem „Antigen retrieval“ für 15 min bei RT abkühlen. Die Gewebeschnitte wurden in mehreren Schritten geblockt. Zunächst wurde die endogene Peroxidase mittels Methanol/ H₂O₂ für 10 min bei RT geblockt und die Schnitte anschließend in ddH₂O gespült. An diesen Blockschritt schloss sich ein 15-minütiger Avidin/ Biotin-Block an. Zuletzt wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5% Ziegen Serum (Goat Serum, #50-062Z, Zymed) in PBST für 1 h ebenfalls bei RT geblockt. Der Primär-Antikörper wurde in 1x PBS/ 2% Ziegen Serum 1:1.000 verdünnt und die Gewebeschnitte für 30 min bei RT inkubiert. Als Sekundär-Antikörper wurde ein „broad spectrum“ Antikörper Plus von Zymed verwendet und die Schnitte für 30 min bei RT inkubiert. Dieser Antikörper ist biotinyliert und wurde durch das HRP-Streptavidin Konjugat Plus detektiert (15 min, RT). Die Farbreaktion entwickelte sich mittels AEC (Red)-Solution. Die Schnitte wurden mit Mayer`s Hämatoxylin gegengefärbt und mit einem wasserhaltigen Medium eingedeckelt.

Tunel-Färbung

Verwendete Lösungen und Kits

- Citratpuffer: 10 mM Zitronensäure, 0,05% Tween 20, pH 6.0 in PBS
- Proteinase K: 20 µg/ ml 1 x PBS

- 4% Paraformaldehyd in PBS
- Natriumcitratpuffer: 0,1% Natriumzitat + 0,1% Triton X in PBS
- In Situ Cell death Detection Kit: #1168475910, Roche
- DAPI-Einbettmedium Vectorshield, Vector Laboratories, CA94010
- Waschpuffer: 1 x PBS

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe und H₂O rehydriert. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde für 10 min bei RT in 3%igem H₂O₂ in Methanol geblockt und die Schnitte anschließend in ddH₂O gewaschen. Das „Antigen retrieval“ wurde mit einem 0,01 M Zitratpuffer in der Mikrowelle bei anfänglich 750 W für 3-5 min durchgeführt. Bei einer verringerten Wattzahl von 150 W wurden die Schnitte weitere 15 min inkubiert. Anschließend konnten die Gewebeschnitte bei RT für 10 min abkühlen. Das Gewebe wurde mittels einer Proteinkinase K-Lösung für 10 min bei RT permeabilisiert. Im Anschluss an die Permeabilisierung folgte eine Fixierung des Gewebes mit Paraformaldehyd für eine Stunde bei RT. Die Gewebe wurden danach mit einem 0,1%igen Natriumcitratpuffer für 30 min bei RT behandelt. Die eigentliche TUNEL-Reaktion wurde nach diesen vorbereitenden Schritten nach Herstellerangaben für 1,5 h im Dunkeln bei RT durchgeführt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem DAPI-haltigem Einbettmedium eingedeckelt.

Fah-immunhistochemische Färbung

Verwendete Lösungen und Kits

- Primär-Antikörper: Kaninchen Anti-FAH 1:1000
- Sekundär-Antikörper: biotinylierter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper 1:1000
- Peroxidaseblock: 3% H₂O₂ in 1 x PBS
- Antikörper Verdünnungslösung: 1x PBS/ 1% BSA
- Blocking Solution Antibody Diluent + 20% Ziegenserum
- Avidin/ Biotin Blocking SP-2001, Vector
- AEC-Solution: AEC (Red) Substrate Kit (#00-200Z, Zymed)

- Waschpuffer: 1 x PBS
- GVA Mount: #00-8000, Zymed
- EDTA-Puffer: 10 mM Tris/ 1 mM EDTA, pH 8,0

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe und H₂O rehydriert. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde für 10 min bei RT in 3%igem H₂O₂ in PBS geblockt und die Schnitte anschließend in ddH₂O gewaschen. Das „Antigen retrieval“ wurde mit einem EDTA-Puffer für 20 min bei 96°C im Wasserbad durchgeführt. Die Schnitte wurden im Wasserbad gekühlt und anschließend für 5 min in ddH₂O gewaschen. Die Schnitte wurden nach dem Protokoll des Avidin/ Biotin Blocking Kits behandelt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primär-Antikörper bei 4°C ü.N. inkubiert. Es wurde eine Stunde bei RT mit dem Sekundär-Antikörper und eine halbe Stunde mit dem HRP-Streptavidin-Konjugat inkubiert. Die Farbentwicklung fand mit dem AEC Kit statt. Die Schnitte wurden in Mayer's Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und anschließend mit einem wasserhaltigen Einbettmedium eingedeckelt. Um die Repopulierung der Leber quantitativ zu bestimmen, wurde die Fläche der positiven Zellen zu den negativen Zellen berechnet.

A6-immunohistochemische Färbung

Verwendete Lösungen und Kits

- Primär-Antikörper: Aufgereinigter monoklonaler Anti-Ratte A6 Antikörper (IgG2a)
- Sekundär-Antikörper: Huhn Anti-Ratte IgG2a, Alexa 488 konjugiert
- Peroxidaseblock: 0,01 M Perjodsäure in PBS,
- Natriumborohydrid: 0,1 M in PBS
- Proteinase K: 1 µg/ ml PBS
- Waschpuffer: 1x PBS
- DAPI-Eindeckmedium

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wurden in Xylol deparaffiniert und in Ethanol/ H₂O rehydriert. Die endogene Peroxidase wurde für 10 min mit Perjodsäure und anschließend für 10 min mit Natriumborohydrid bei RT geblockt. Die Schnitte wurden mit Proteinase K für 10 min bei RT vorbehandelt und wurden mit einer 1:100-Verdünnung mit dem A6-Antikörper ü.N. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem spezifischen Sekundär-Antikörper in einer 1:100-Verdünnung für 30 min bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und mit DAPI-Einbettmedium eingedeckelt.

β-Catenin-immunhistochemische Färbung

Verwendete Lösungen und Kits:

- Primär-Antikörper: monoklonaler Anti-Maus β-Catenin BD Biosciences Pharmingen (#610153) und Santa Cruz Biotechnology (sc-7963)
- Sekundär-Antikörper: Huhn Anti-Maus IgG2a, Alexa 488-konjugiert
- Antigen unmasking solution (50x Stock-Lösung für 1 Liter):
242 g Ultra Pure Tris, 18,6 g EDTA;
2 ml Stock in 100 ml Wasser, pH 9
- Blocklösung: 1 x PBS + 1% BSA
- Antikörper-Verdünnungslösung: 3% BSA, 5% normal horse serum in PBS
- Waschpuffer: PBS
- DAPI-Eindeckmedium

Die Gewebeschnitte wurden in Xylol deparaffiniert, in Ethanol rehydriert, und in ddH₂O gespült. Die Schnitte wurden für 40 min bei 96°C mit der „Antigen unmasking Solution“ vorbehandelt und anschließend bei RT für 60 min abgekühlt. Die Gewebeschnitte wurden in PBS gespült und im Anschluss für eine Stunde in PBS + 1% BSA geblockt. Die Schnitte wurden für 5 min mit der Verdünnungslösung behandelt und mit einer 1:50 Verdünnung des Primär-Antikörpers bei 4°C ü.N. inkubiert. Der Sekundär-Antikörper Anti-Maus IgG1-Alexa 488 wurde 1:100 verdünnt und die Schnitte für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit DAPI-Einbettmedium eingedeckelt.

Gespaltene Caspase-3-immunhistochemische Färbung

Verwendete Lösungen und Kits

- Primär-Antikörper: Anti-Maus-gespaltene Caspase-3-Antikörper
- Sekundär-Antikörper: Biotinylierter Ziege Anti-Kaninchen-Antikör; #B2770
- HRP-Konjugat: HRP-Streptavidin Plus (#50420Z, Zymed)

- AEC-Solution: AEC (Red) Substrate Kit (#00-200Z, Zymed)
- Waschpuffer: 1 x TBST
- Blocklösung: 5% Pferdeserum in PBST
- Citratpuffer: 10 mM Zitronensäure, 0,05% Tween
20, pH 6.0 in PBS

Die Schnitte wurden in Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe und H₂O rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in ddH₂O gewaschen. In einem Citratpuffer wurde die Schnitte bei 750 W für 5 min gekocht, anschließend wurden die Schnitte für 10 min bei 150 W weiter behandelt. Das Abkühlen der Gewebeschnitte fand bei RT für 30 min statt. Die Schnitte wurden erneut in ddH₂O gewaschen und anschließend mit 3%iger H₂O₂ für 10 min inkubiert, um die endogenen Peroxidasen zu blocken. Nach dem Waschen wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 5%igem Ziegenserum in TBST für 1 h geblockt. Die Gewebeschnitte wurden ü.N. bei 4°C mit einer 1:100 Verdünnung des Primär-Antikörpers in Blocklösung inkubiert. Es wurde jeweils eine halbe Stunde bei RT mit dem Sekundär-Antikörper und dem HRP-Streptavidin-Konjugat inkubiert. Die Farbentwicklung fand mit dem AEC Kit statt. Die Schnitte wurden mit einem wasserhaltigen Einbettmedium eingedeckelt und die Prozentzahl positiver Zellen bestimmt.

2.2.15 Isolierung, Messung, und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Isolierung von DNA aus einer Biopsie der Schwanzspitze

Verwendete Lösungen:

- Lyse-Puffer Stock-Lösung: 10 mM Tris/ HCl
400 mM NaCl
2 mM EDTA
- Master-Mix: 200 µl Lyse-Puffer Stock-Lösung
10 µl Proteinkinase K (20 U)
50 µl 10% SDS
- TE- Puffer: 10 mM Tris/ HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

Eine etwa 2-3 mm lange Biopsie der Schwanzspitze wurde den Mäusen im Alter von ca. 2-3 Wochen entnommen und zur Bestimmung des Genotyps ver-

wendet. Die Biopsie wurde in 260 µl Master-Mix aufgenommen und ü.N. bei 56°C in einem Thermomixer inkubiert. Das Lysat wurde mit 50 µl einer gesättigten NaCl-Lösung gemischt und bei 13.200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol gemischt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde in einer 1:10-Verdünnung für die PCR zur Genotypisierung eingesetzt.

Isolierung von RNA aus Lebergewebe

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels des NucleoSpin® II Kits von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG. Für die Isolierung wurde sich strikt an die Angaben des Herstellers gehalten. Die RNA wurde hierfür aus 10-20 mg gefrorenem oder frisch isoliertem Gewebe der murinen Leber isoliert.

Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Mittels einer Absorptionsmessung erfolgte die Bestimmung der Konzentration aller Nukleinsäuren bei 260 nm im Spektrometer von Eppendorf. Zur Berechnung der Konzentration wurde von folgender Beziehung ausgegangen: eine Absorption von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml.

2.2.16 cDNA Synthese und semi-quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mittels des SuperScript™ II-First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Hersteller: Invitrogen) und des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Hersteller: Roche Diagnostics) konnte sehr effizient cDNA synthetisiert werden. Als Ausgangsmaterial diente die nach Punkt 2.2.15 isolierte RNA. Diese wurde mit einer Gesamtkonzentration von 2-4 mg für die cDNA-Synthese eingesetzt. Dabei wurden die Angaben des Herstellers zur Synthese von cDNA mittels der genannten Kits als Grundlage verwendet.

2.2.17 Standard Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zum einen nach der Genotypisierung der Mausstämmen zum Auftrennen der Amplifikate nach ihrer Größe eingesetzt. Zum anderen wurde diese Methode benutzt, um die Amplifikate nach einer semiquantitativen RT-PCR sichtbar zu machen. Nach der PCR zur Genotypisierung sind die zu erwartenden Produkte relativ groß, daher wurde hier für die Auftrennung ein 1%-iges Agarosegel benutzt. Die Produkte nach der RT-PCR sind deutlich kleiner und erfordern eine höhere Agarosekonzentration zur Auf-

trennung. Die Gele hatten hierfür eine Konzentration von 3%. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte hierbei in einer Bio-rad Elektrophorese-Kammer bei konstant 5 Volt/ cm². Die Dauer des Gellaufes variierte zwischen 30 und 60 min. Die Agarose wurde in 0,5 x TBE Puffer (44,5 mM Tris/ HCl, 44,5 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3) unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit GelStar Gelstain zur Detektion der DNA versetzt. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurden die Proben mit Gel Loading Solution versetzt. Die Agarose-Gele wurden zur Archivierung des Ergebnisses mit dem Genius Bio Imaging System und der GeneSnap Software (synGene) fotografiert.

2.2.18 Mikroarray

Die differentielle Genexpression wurde mit einem GenChip MOE 430 2.0 GeneChip Array (Affymetrix) untersucht. Die RNA wurde hierfür wie unter 2.2.15 angegeben isoliert. Durchgeführt wurde der Array an der Microarray Core Facility des Helmholtzzentrums für Infektionsforschung in Braunschweig. Die Daten wurden mittels Affymetrix-Expression-Analysis Software GCOS 1.4 analysiert.

2.2.19 RT-PCR Arrays: RT Profiler PCR Array Mouse Chemokine & Receptor und Common Cytokines

Mit isolierter RNA wurden zwei Arrays von Qiagen durchgeführt. Die RNA wurde nach der beschriebenen Methode aus gefrorenem Gewebe isoliert und mit dem RT² First Strand kit von SA Bioscience/ Qiagen in cDNA umgeschrieben. Für diese Arrays wurden nur speziell abgestimmt Produkte der Firma Qiagen benutzt, da nur so ein verlässliches Ergebnis erzielt werden konnte. Die Arrays wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und mit der durch SA Bioscience online zur Verfügung gestellten Software ausgewertet

2.2.20 Isolierung, Färbung und Analyse verschiedener Zelltypen aus der murinen Leber

Zellen des Immunsystems

Wasch/ FACS-Puffer: PBS + 2% FCS + , eiskalt

Blockpuffer: PBS + 2% FCS + 1:100 CD16/32

Erythrozyten-Lysepuffer: 0,83% NH₄Cl

0,5% KHCO₃

0,5% mM EDTA

sterilfiltriert

Percoll: 40% Percoll aus Stocklösung
80% Percoll aus Stocklösung

Der betäubten Maus wurde der Intrapertonealraum geöffnet. Die *Vena portae* wurde wie bereits beschrieben punktiert und die Leber mit eiskaltem Waschpuffer perfundiert. Die Leber wurde herausgenommen und die Gallenblase entfernt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Mit dem Stempel einer 5 ml Spritze wurde die Leber vorsichtig durch ein 100 µm Nylon-sieb von BD gedrückt. Dies führte zu einer Vereinzelnung der Zellen. Das Sieb wurde mit eiskaltem Waschpuffer gespült. Die Zellen wurden in einem 50 ml Falcon-Tube in Waschpuffer aufgenommen. Alle Waschschriffe wurden mit Waschpuffer durchgeführt. Nach dem Waschen schloss sich ein Zentrifugationsschritt an. Die Zentrifugation wurde immer bei 1250 rpm für 7 min durchgeführt. Die gewonnene Zellsuspension enthält alle in der Leber vorkommenden Zelltypen. Um die Leukozyten abzutrennen, wurde ein 40%/ 80% Percollgradient bei 2000 rpm für 20 min bei RT eingestellt. Die Leukozyten konnten an der Grenzschicht zwischen der 40% und 80% Percollschicht abgenommen werden. Die Erythrozyten wurden mit Erythrozyten-Lysepuffer lysiert. Die Lyse fand für 3 min auf Eis statt. Die Zellen wurden mit einem großen Volumen an Waschpuffer gewaschen und anschließend gezählt. Für die Färbung der Immunzellen wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz eingesetzt. Alle Schritte für die Färbung der Leukozyten fanden in der 96-well Mikrotiterplatte statt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Blockpuffer 20 min abgesättigt.

Ovalzellen aus der Leber

verwendete Lösungen:

Verdauulösung 1: 2,5 mg/ ml Collagenase D (Roche) in PBS

Verdauulösung 2: Accutase, PAA, L11-007

Kulturmedium: eiskaltes DMEM-Medium + 2% FCS

Waschpuffer/ FACS-Puffer: PBS + 2% FCS

Eiskaltes PBS

Der betäubten Maus wurde der Intrapertonealraum geöffnet. Die *Vena portae* wurde wie bereits beschrieben punktiert und die Leber mit eiskaltem PBS perfundiert. Die Leber wurde aus dem Bauchraum entnommen und die Gallenblase wurde entfernt. Das Organ wurde in eiskaltem PBS gelagert. In einer 60 mm Pertrischale mit eiskaltem PBS wurde das Organ mittels zweier Pinzetten in kleinere Stücke gerissen. Die Leberstücken wurden in ein 50 ml Falcon-Tube transferiert und das Volumen auf 50 ml mit eiskaltem PBS aufgefüllt. Die Leber-

stücke wurden für 30 sec ruhen gelassen, so dass sie sich am Boden des Falcon-Tubes absetzen konnten. Der Überstand wurde abgenommen und durch ein 40 µm Nylonsieb (BD) in ein neues Tube transferiert. Dieser Überstand stellt die Fraktion 1 der nicht-parenchymalen Zellen (NPC) da. Diese Zellen wurden bei 300 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml kaltem Kulturmedium resuspendiert. Die Leberstücke wurden mit der Verdauungslösung 1 aufgenommen und für 20 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Stücke erneut mit zwei Pinzetten und durch eine 10 ml Serologische Pipette durch wiederholtes Auf- und Abpipetieren zerkleinert. Die Suspension wurde erneut durch ein 40 µm Nylonsieb in ein Falcon-Tube transferiert und das Volumen mit eiskaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Überstand bildet die Fraktion 2. Die Zellen wurden bei 300 g pelletiert und in Kulturmedium aufgenommen. Die im Nylonsieb gesammelten Reste der Leber wurden mit der Verdauungslösung 2 aufgenommen und erneut bei 37°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe einer 10 ml Serologische Pipette resuspendiert und durch ein 40 µm Nylonsieb filtriert. Der Durchfluss stellt die Fraktion 3 dar. Auch diese Fraktion wurde zentrifugiert und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen. Alle drei Fraktionen wurden vereint. Bei 50 g für zwei Minuten wurden die Hepatozyten von den NPC getrennt. Bei 300 g wurden die NPC pelletiert und anschließend für die weitere Behandlung in einem geeigneten Volumen aufgenommen.

Die NPC wurden für die Analyse am FACS (LSRII von BD) in eiskaltem PBS/ 2% FCS resuspendiert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1:100 CD16/32 geblockt. Die Zellen wurden mit folgenden Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt:

CD45-FITC

CD31-FITC

CD11b-FITC

CD26-PerCP-Cy5.5

MIC1-APC

CD133-PE

Ter119-FITC

Ovalzellen sind CD45/ CD31/ CD11b/ CD26/ Ter119 negativ MIC1/ CD133 positiv.

Nach der Färbung wurden die Ovalzellen zeitnah am FACS gemessen.

2.2.22 Statistische Auswertungen

Die Auswertung der erhobenen Daten wurde mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel (Microsoft Deutschland) durchgeführt. Die Einzeldaten der jeweiligen Versuchsgruppen wurden zusammengefasst und der Mittelwert mit Standardabweichung ($MW \pm SD$) ermittelt. Der Vergleich zweier Versuchsgruppen erfolgt mittels Student's t-Test. Als statistisch signifikant wurden die p-Werte von $< 0,05$ angenommen. Die Darstellung der Überlebenskurve erfolgte mit GraphPad Prism (GraphPad Software USA).

3 Ergebnisse

3.1 Der zyklische Entzug von NTBC führt zu einer fulminanten Hepatitis und zur beschleunigten Entstehung eines HCC

Bei humanen Lebererkrankungen wechseln sich häufig Phasen der massiven Leberschädigung mit Phasen der Regeneration ab. Dieses neue Modell der zyklischen Leberschädigung soll die im Menschen beobachtete physiologische Situation besser widerspiegeln. Unterschieden werden drei Zeitpunkte, jeweils vor und nach einer fünftägigen NTBC-Behandlung. Das Behandlungsschema ist in der Abbildung 6 im Abschnitt 2.2.4 dargestellt. Im Verlauf der Arbeit ist von folgenden Zeitpunkten die Rede. Es werden ein früher Zeitpunkt nach zweimaligem NTBC-Entzug (2nd cycle), ein mittlerer Zeitpunkt nach viermaligem NTBC-Entzug (4th cycle) und ein später Zeitpunkt nach sechsmaligem NTBC-Entzug (6th cycle) unterschieden.

In Fah-defizienten Mäusen kommt es nach vollständigem Entzug von NTBC zu einer Schädigung der Hepatozyten aufgrund des toxischen Metaboliten FAA. Dies führt zu einem akuten Leberversagen und zum Versterben der Mäuse. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass kurze Phasen der NTBC-Behandlung das Versterben der Mäuse verringern können. Circa 70% der Fah^{-/-}-Versuchstiere überleben den wiederholten Entzug von NTBC bis zum 4. Zyklus (siehe Abbildung 9). Dieser Zeitraum entspricht circa vier Monaten. Nach dem vierten Zyklus ist eine erhöhte Mortalität zu beobachten. Die Kontrolle des Körpergewichts zeigt einen Abfall um rund 30% innerhalb des zweiten Zyklus. In den folgenden Zyklen steigt das Körpergewicht der Versuchstiere an. Im Vergleich dazu nimmt auch das Gewicht der Leber innerhalb der ersten beiden Zyklen um etwa den gleichen Faktor ab. Dieser Gewichtsverlust spiegelt die Schwere der Leberschädigung wieder. Die Klassifizierung der Leberschädigung geschah durch einen Pathologen. Der wiederholte Entzug von NTBC führt in den Fah^{-/-}-Mäusen zu einer mittel- bis schwergradigen hepatischen Schädigung mit Zeichen von Regeneration. Die entzündlichen Infiltrate sind zu diesem frühen Zeitpunkt in der H&E-Färbung (siehe Abbildung 10) deutlich zu erkennen. Der zyklische Entzug von NTBC schädigt die Leber dabei deutlich schwerer, als es bisher nach chronischer Leberschädigung beobachtet wurde. Mit fortschreitender Schädigung der Hepatozyten und dem damit einhergehenden Verlust von funktionalem Leberparenchym steigen die Transaminasen im Serum deutlich an (siehe Abbildung 16).

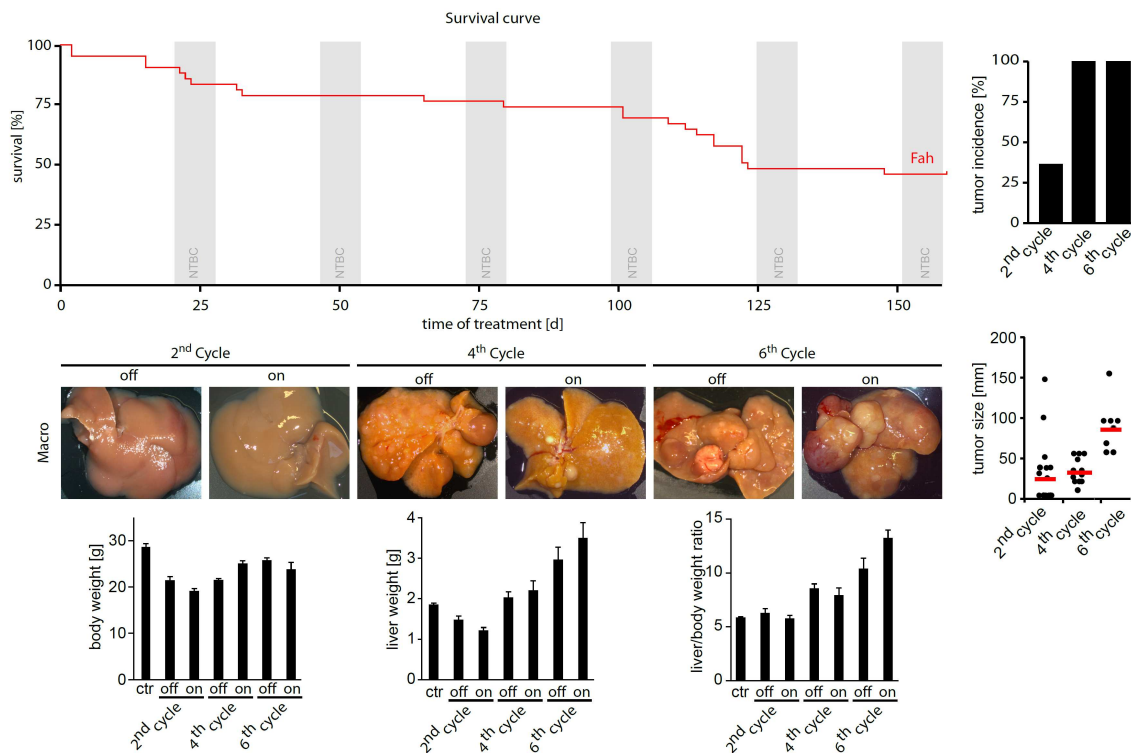


Abbildung 9: Beschleunigte Tumorentstehung in $Fah^{-/-}$ -Mäusen: Oben: Die Überlebenskurve (survival curve). Mitte: Makroskopische Aufnahmen der Leber aus $Fah^{-/-}$ -Mäusen nach zwei, vier und sechs Zyklen. Unten: Darstellung der Veränderungen im Körpergewicht (body weight), Lebergewicht (liver weight) und dem Verhältnis von Leber-/ Körpergewicht (liver/body weight ratio) der Versuchstiere über den gesamten Behandlungszeitraum. Rechts: Darstellung der Tumorzinidenz (tumor incidence) und der maximalen Tumorgöße (tumor size).

In diesem Modell kommt es zu einer beschleunigten Tumorentstehung. Nach zwei Zyklen liegt die Tumorzinidenz bereits bei über 25%. Nach sechsmaligem NTBC-Entzug haben alle Versuchstiere ein multinoduläres HCC entwickelt, mit einer mittleren maximalen Tumorgöße von etwa einem Zentimeter. Da die Tumormasse in der Leber der Versuchstiere mit der Zyklenzahl deutlich ansteigt, steigt auch das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht. Mit fortschreitender Behandlung nehmen auch die Tumorzinidenz und die maximale Tumorgöße proportional zu. Die Tumorentstehung ist in diesem Modell deutlich beschleunigt und beginnt mit circa 3 Monaten. Das Gewicht der Leber nimmt, im Vergleich zum Lebergewicht gesunder Mäuse gleichen Alters, um etwa 75% zu. In der H&E-Färbung lassen sich zahlreiche dysplastische Hepatozyten und dysplastische Knoten bis 2 mm Größe erkennen. In den $Fah^{-/-}$ -Mäusen entwickelte sich nach bereits vier Zyklen ein multinoduläres HCC Grad 1-2.

3.1.1 Mechanismen der Regeneration nach zyklischer FAA-induzierter Leberschädigung in Fah-defizienten Mäusen

Die Fah^{-/-}-Mäuse entwickeln eine schwere Hepatitis. Trotz der schweren Schädigung der Hepatozyten kann in der Tunel-Färbung keine Apoptose nachgewiesen werden. Auch konnte gespaltene Caspase-3 in der immunhistochemischen Färbung nicht nachgewiesen werden (Daten werden nicht gezeigt). Die Tunel-Färbung und gespaltene Caspase-3 sind zwei spezifische Marker für Apoptose.

In der H&E-Färbung fallen vor allem die deutlichen Veränderungen in der Größe der Hepatozyten auf. Die pleomorphen Veränderungen der Hepatozyten nach FAA-induzierter Schädigung können mittels β -Catenin-immunhistochemischer Färbung quantifiziert werden. Bei der β -Catenin-immunhistochemischen Färbung handelt es sich um eine Zellwand-assoziierte Färbung. Hierbei zeigt sich, dass es in der Leber der Fah^{-/-}-Mäuse zu großen strukturellen Veränderung mit einem Anstieg der Zellgröße und einer Abnahme der Zellzahl kommt. Während sich die mittlere Größe der Hepatozyten verdoppelt, zeigt die Quantifizierung der Zellen pro Gesichtsfeld, dass es zu einem deutlichen Verlust an Hepatozyten von circa 70% kommt. Diese Veränderung beginnt bereits zu einem frühen Zeitpunkt und setzt sich über die Behandlung fort.

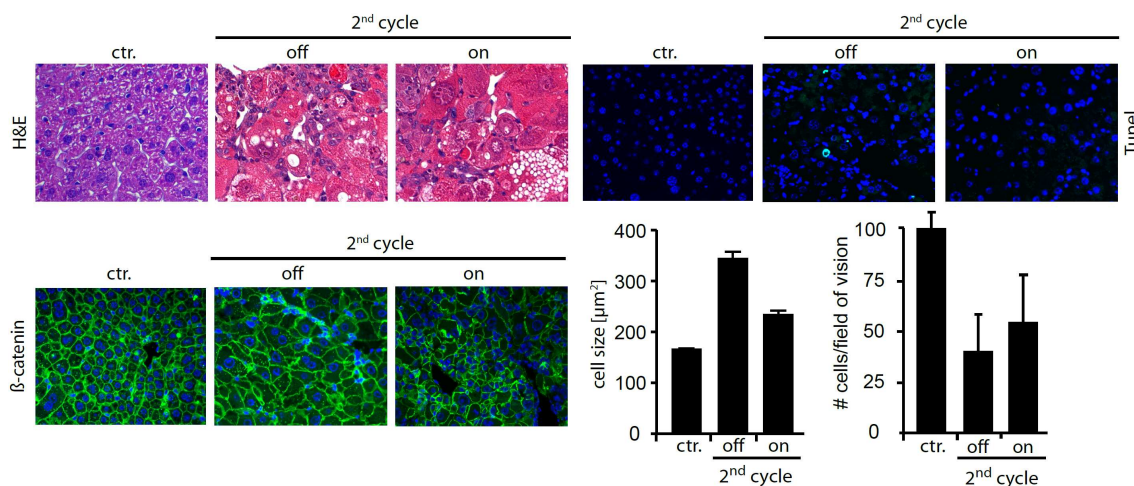


Abbildung 10: Dysplastische Hepatozyten und Infiltration von nicht-parenchymatischen Zellen nach zyklischem NTBC-Entzug: Oben links: H&E-Färbung nach zweimaligem NTBC-Entzug. Oben rechts: Tunel-Färbung ebenfalls nach zweimaligem NTBC-Entzug. Unten: eine β -Catenin-Färbung und die quantitative Auswertung der Zellgröße (cell size) und der Zellzahl/ Gesichtsfeld (cells/field of vision).

Die Hypertrophie der Hepatozyten ist ein Mechanismus der Regeneration nach FAA-induzierter Schädigung in diesem Modell. Neben der Hypertrophie kommt es auch zur Proliferation von differenzierten Hepatozyten. Die Regenerationsfähigkeit der Leber durch bereits differenzierte Hepatozyten soll hier mittels einer immunhistochemischen Färbung für die Marker Ki67 und BrdU gezeigt werden.

Beide Färbungen sind Zellkern-assoziiert. Hier lässt sich das Verhältnis der proliferierenden Zellen zu den nicht proliferierenden Zellen mikroskopisch im Hellfeld bestimmen. Die Zellzählung ist als # positiver Zellen/ Gesichtsfeld angegeben und erlaubt eine Aussage über die Regenerationsfähigkeit nach FAA-induzierter Schädigung (siehe Abbildung 11)

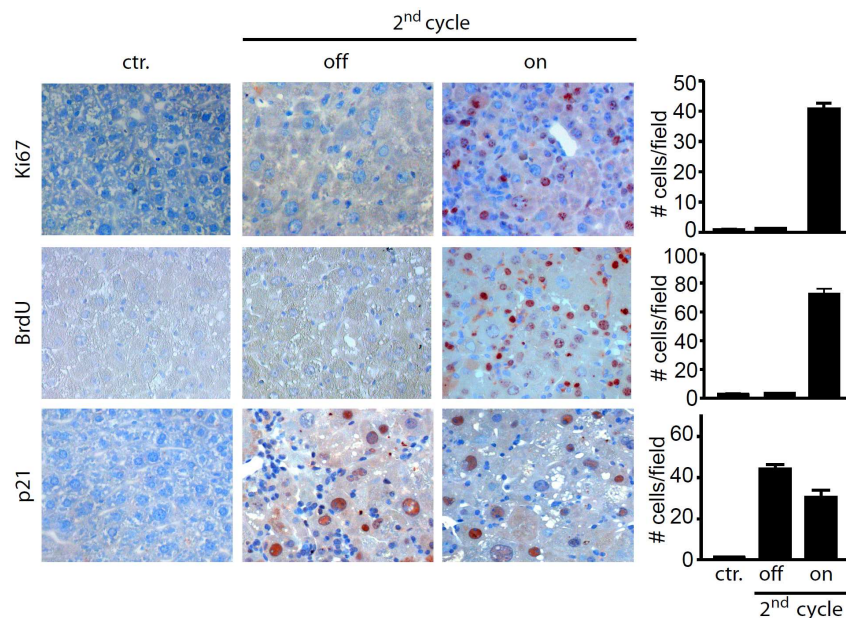


Abbildung 11: Unter NTBC-Entzug ist die Proliferation differenzierter Hepatozyten gehemmt: Die Abbildung zeigt repräsentative immunhistochemische Färbungen für die Zellzyklusmarker Ki67 (oben), BrdU (mitte) und p21(unten) und die quantitative Auswertung der positiven Zellen/ Gesichtsfeld

Die Abbildung 11 zeigt repräsentative Ausschnitte der Färbungen für Ki67 und BrdU während des zweiten Zyklus. Neben den Färbungen ist die Quantifizierung der positiven Zellen gezeigt. p21 ist ein Marker für den Zellzyklusarrest und die immunhistochemische Färbung für p21 weist auf Zellen hin, die sich momentan nicht weiter teilen. In den Kontrollgruppen (ctr.) finden sich keine positiven Zellen für Ki67, BrdU oder p21. Die Proliferationsmarker Ki67 und BrdU sind nur nach der fünftägigen Phase der NTBC-Behandlung (2xoff/on) zu erkennen. Es sind etwa doppelt so viele Zellen in der Färbung für BrdU positiv markiert als in der Färbung für Ki67. Das Antigen Ki67 wird von allen Zellen exprimiert, die sich zum Zeitpunkt der Tötung der Versuchstiere in den aktiven Phasen des Zellzyklus, also in der späten G1-Phase, der Synthesephase, der G2-Phase oder der Mitose befinden. Bromdesoxyuridin ist ein chemisches Basenanalogen des Nukleotids Thymidin bzw. Desoxyuridin und wurde den Versuchstieren für einen Zeitraum von vier Tagen über das Trinkwasser verabreicht. Alle proliferierenden Zellen bauen dieses Analogon während der Synthesephase des Zellzyklus in ihre DNA ein. Alle proliferierenden Zellen innerhalb dieser letzten vier Tage vor der Tötung der Versuchstiere sind durch das BrdU markiert. Daher zeigt die Färbung für BrdU mehr positive Zellen. Es finden sich

sowohl nach der off-Phase als auch nach der on-Phase p21-positive Zellen. Der Unterschied in den Phasen ist nicht signifikant. Der Proliferationsblock nach NTBC-Entzug ist typisch für die FAA-induzierte Schädigung. Die Proliferation von Hepatozyten ist ein zweiter Regenerationsmechanismus der Leber um auf die massive Zellschädigung zu reagieren.

Weiterhin kann an der H&E-Färbung das vermehrte Auftreten von nicht-parenchymalen Zellen beobachtet werden. Eine Klassifizierung dieser Zellen zeigt dabei, dass es zu einer Aktivierung von Leberstammzellen (Ovalzellen) kommt. MIC1 und CD133 gelten als Marker für Ovalzellen. Diese Leberstammzellen sind auch für den Marker A6 positiv und lassen sich in einer immunhistochemischen Färbung nachweisen (siehe Abbildung 12).

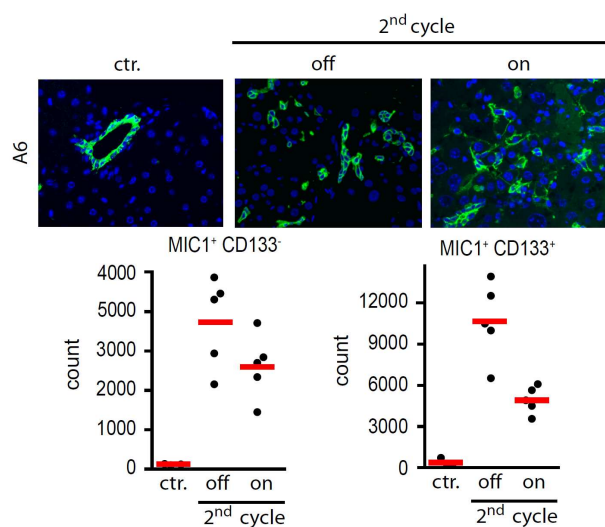


Abbildung 12: Leber-Stammzellen proliferieren und transmigrieren nach NTBC-Entzug in das Leberparenchym: A6-Färbung als Marker für Leber-Stammzellen in der Immunhistochemie und MIC1 und CD133 als Marker in der FACS-Analyse. Leber-Stammzellen wurden nach zweimaligem NTBC-Entzug vor und nach einer NTBC-Behandlung quantifiziert

Die Quantifizierung dieser Zellen zeigt deutlich den Anstieg unter zyklischem NTBC-Entzug. Um zu klären, ob die Leber-Stammzellen in Hepatozyten differenzieren und somit für die Regeneration der Leber in diesem Modell eine wichtige Rolle spielen, wurde *Fah*^{-/-}-Mäusen das NTBC für 14 Tage entzogen. Mittels BrdU- und Ki67-immunhistochemischer Färbung kann zu diesem Zeitpunkt belegt werden, dass differenzierte Hepatozyten nach NTBC-Entzug nicht mehr proliferieren. Die Tiere erhielten anschließend eine einmalige Injektion mit BrdU und für einen Zeitraum von sieben Tagen das BrdU im Trinkwasser. Nach Ende dieser sieben Tage, bekamen die Mäuse weitere drei Tage normales Trinkwasser. Da die Hepatozyten in dieser Zeit nicht mehr proliferieren, wurden nur die proliferierenden Leber-Stammzellen durch das BrdU markiert.

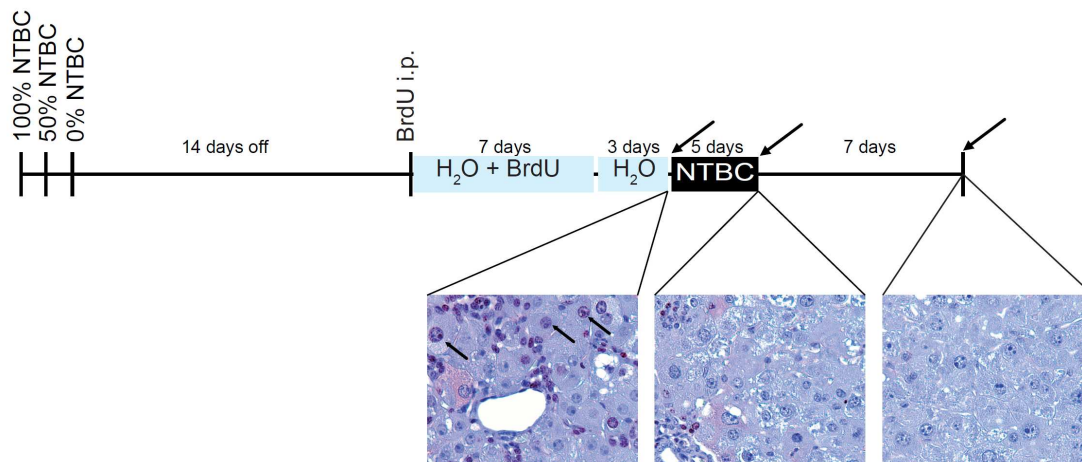


Abbildung 13: Leberhomöostase und Regeneration nach 14-tägigem NTBC-Entzug in den *Fah*^{-/-}-Mäusen: Bei *Fah*^{-/-}-Mäusen wurde das NTBC für 14 Tage vollständig entzogen. Am 14. Tag bekamen die Tiere eine Injektion mit BrdU und anschließend sieben Tage BrdU über das Trinkwasser verabreicht (siehe Schema in der Abbildung oben). Die Pfeile weisen auf die Zeitpunkte hin, zu denen die Versuchstiere getötet wurden. Unten: BrdU-Färbung, hier deuten die schwarzen Pfeile im Bild auf BrdU-positive Hepatozyten hin.

Die durch das BrdU markierten Zellen können nach der Tötung der Versuchstiere in einer BrdU-immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten in der Färbung keine BrdU-positiven Hepatozyten nachgewiesen werden. Dieses Experiment zeigt somit, dass die Leber-Stammzellen zwar unter zyklischem NTBC-Entzug aktiviert werden, aber auch, dass sich aus diesen Zellen nur wenige Hepatozyten differenzieren, die zur Regeneration der Leber beitragen.

Nach massiver Schädigung gibt es also verschiedene Möglichkeiten für eine Leberregeneration. Hier konnte gezeigt werden, dass es zum Einen zu einer Hypertrophie, also zu einer Zunahme der Zellgröße kommt, und dass zum Anderen Hepatozyten proliferieren um einen Teil der Leberschädigung zu regenerieren. Die Aktivierung von Leber-Stammzellen spielt für die Regeneration nur eine untergeordnete Rolle.

Im Verlauf der Arbeit wurde der Schwerpunkt auf den frühen Zeitpunkt nach zweimaligem NTBC-Entzug gelegt, da angenommen werden kann, dass hier die frühesten Veränderungen stattfinden und die maligne Transformation der Zellen initiiert wird.

3.3 Fah^{-/-}/ common gamma chain^{-/-}/ Rag2^{-/-}-Mäuse entwickeln unter zyklischer Schädigung der Hepatozyten kein Hepatozelluläres Karzinom

Ohne die zellulären Bestandteile des Adaptiven Immunsystems zeigen sich in Fah-defizienten Mäusen zwei wesentliche Phänotypen. Zum einen ist die Mortalität der Fah^{-/-}/ c_v^{-/-}/ Rag2^{-/-}-Mäuse (FCR-Mäuse) signifikant erhöht. Wie die Abbildung 14 zeigt, versterben mehr als die Hälfte der behandelten Mäuse innerhalb der ersten beiden Zyklen. Zweitens entwickelt dieser Stamm zu keinem Zeitpunkt ein HCC. Um eine verzögerte Tumorentstehung in diesem Stamm auszuschließen, wurde die Zahl der Zyklen auf acht erhöht. Auch zu einem so späten Zeitpunkt konnte keine Tumorentstehung beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt). Diese Beobachtung legt nahe die beiden Phänotypen zu unterscheiden und die Prozesse, die zum Einen zu einem Versterben in $\frac{2}{3}$ der Tiere führen und zum Anderen eine Tumorentstehung verhindern, getrennt zu betrachten.

Die Leber der FCR-Mäuse zeigt makroskopisch keine Veränderungen. In den FCR-Mäusen ist ebenfalls ein Abfall des Körpergewichts um etwa 30% während der ersten beiden Zyklen zu beobachten.

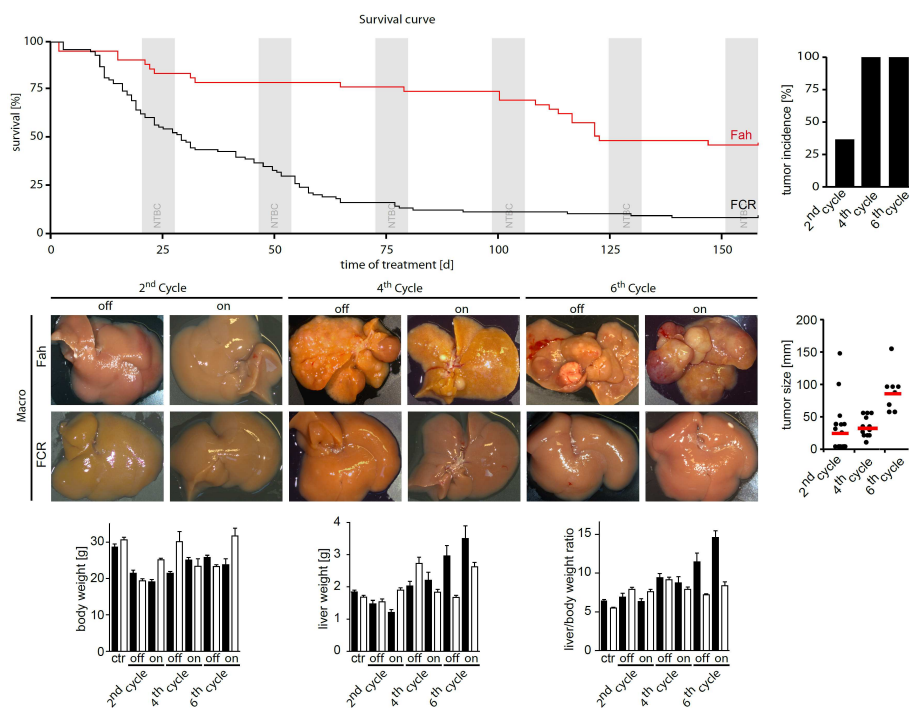


Abbildung 14: Der Verlust des Adaptiven Immunsystems führt zu einer erhöhten Mortalität nach zyklischem NTBC-Entzug und verhindert die Entstehung eines HCCs: Oben: Die Überlebenskurve (survival curve). Mitte: Makroskopische Aufnahmen der Leber von Fah-defizienten Mäusen nach zwei, vier und sechs Zyklen. Unten: Darstellung der Veränderungen im Körpergewicht (body weight), Lebergewicht (liver weight) und dem Verhältnis von Leber-/ Körpergewicht (liver/body weight ratio) der Versuchstiere über den gesamten Behandlungszeitraum. Rechts: Darstellung der Tumorinzidenz (Tumor incidence) und der maximalen Tumorgröße (tumor size).

Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht unterliegt in den überlebenden FCR-Mäusen über den gesamten Beobachtungszeitraum nur geringen Schwankungen. In den FCR-Mäusen kommt es nach NTBC-Entzug zu einer deutlich geringeren hepatischen Schädigung mit perivenulär betonten Einzelzell- und Gruppennekrosen in der H&E-Färbung. In den FCR-Mäusen finden sich, wie auch schon in den *Fah*^{-/-}-Mäusen, keine apoptotischen Zellen. Dies konnte sowohl in der Tunel-Färbung als auch in der Färbung für gespaltene Caspase-3 nachgewiesen werden. Als ein Mechanismus der Regeneration nach Leberschädigung konnte in den *Fah*^{-/-}-Mäusen eine Zunahme der Zellgröße nachgewiesen werden. Die β -Catenin-immunohistochemische Färbung lässt jedoch erkennen, dass die Zellgröße und die Zellzahl pro Gesichtsfeld in den FCR-Mäusen konstant bleiben. Darin liegt ein weiterer wesentlicher Unterschied zu den *Fah*^{-/-}-Mäusen. Die FAA-induzierte Schädigung nach NTBC-Entzug scheint in den FCR-Mäusen geringer auszufallen als in den *Fah*^{-/-}-Mäusen. Hierfür sprechen auch die niedrigeren Transaminasen im Serum der FCR-Mäuse nach NTBC-Entzug (siehe Abbildung 16).

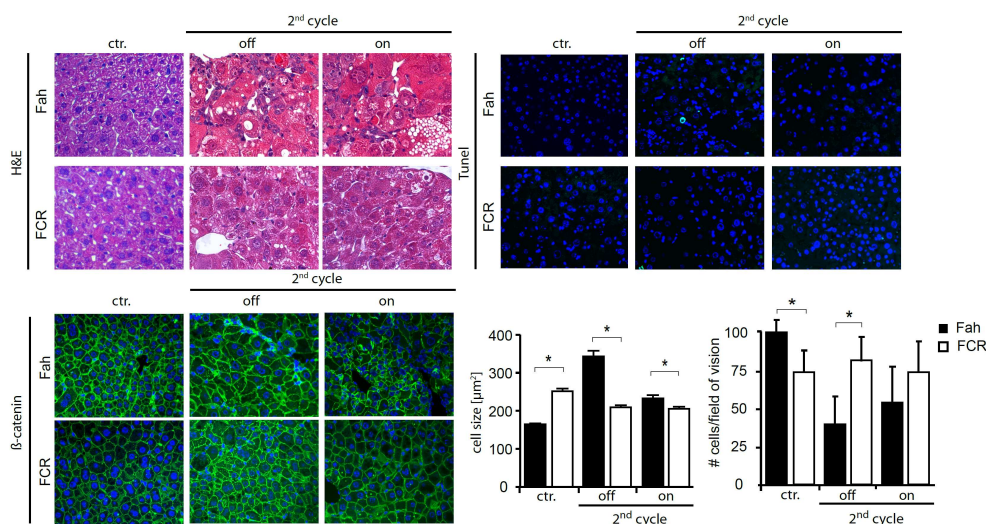


Abbildung 15: Dysplastische Hepatozyten und Infiltration von nicht-parenchymalen Zellen nach zyklischem NTBC-Entzug sind in den FCR-Mäusen deutlich reduziert: Oben links: H&E-Färbung nach zweimaligem NTBC-Entzug. Oben rechts: Tunel-Färbung ebenfalls nach zweimaligem NTBC-Entzug. Unten: eine β -Catenin-Färbung und die quantitative Auswertung der Zellgröße (cell size) und der Zellzahl/ Gesichtsfeld (cells/field of vision).

Der Entzug von NTBC induziert allerdings in beiden *Fah*-defizienten Stämmen denselben Grad an oxidativem Stress, gekennzeichnet durch einen ansteigenden Proteinlevel für die Proteine Heat Shock Protein 32 (Hsp32) und NQO1. Beide Gene sind NRF-2 Zielgene und dienen als Marker für die FAA-induzierte Leberschädigung. Die auf einer 100%-igen NTBC-Dosis gehaltenen Kontrollen zeigen die basalen Level von Hsp32 und NQO1. Der Level beider Proteine steigt in den behandelten *Fah*^{-/-}- und FCR-Tieren deutlich an. Der oxidative Stress für die Hepatozyten geht auch während der fünftägigen NTBC-Gabe in

beiden Stämmen nicht zurück. Dies zeigt sich an dem immer noch erhöhten Level beider Proteine, der nicht mehr auf den basalen Wert zurückgeht. Dies könnte auf eine Akkumulation der toxischen Metabolite in den Hepatozyten hindeuten und zeigen, dass eine fünftägige NTBC-Therapie nicht zu einer vollständigen Regeneration der Leber führt.

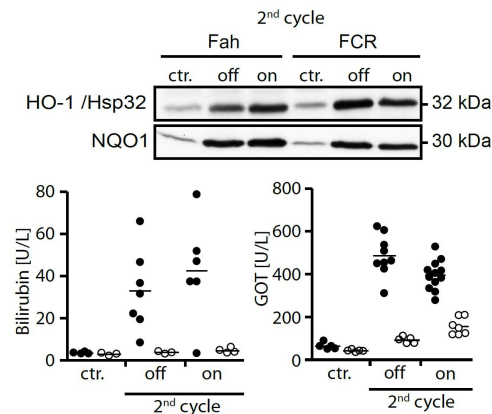


Abbildung 16: Oxidativer Stress in Fah-defizienten Mausstämmen: Die Proteinlevel der Marker HO-1 und NQO-1 wurde mittels Western Blot nach zweimaligem NTBC-Entzug für Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse bestimmt. Als Marker für die Leberschädigung gelten die Werte der Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT) und Bilirubin

Obwohl der Auslöser für eine Leberschädigung in beiden Stämmen gleich ist, führt dies in den FCR-Mäusen zu einer geringeren Schädigung und zu keiner kompensatorischen Zunahme der Zellgröße als Zeichen der Regeneration.

3.3.1 Die FCR-Mäuse haben eine geringere Proliferationsrate und zeigen eine stärkere Aktivierung von p21

Die Fah^{-/-}-Mäuse konnten auf die Leberschädigung mit der Proliferation von Hepatozyten reagieren. Die Abbildung 17 zeigt die Proliferation differenzierter Hepatozyten und vergleicht dabei die Genotypen miteinander. Der Unterschied zwischen den Genotypen ist zu den entsprechenden Zeitpunkten signifikant. Auch hier ist keine Zellteilung der Hepatozyten unter NTBC-Entzug nachzuweisen. Circa 40% der differenzierten Hepatozyten in den Fah^{-/-}-Mäusen und circa 25% in den FCR-Mäusen proliferieren unter der NTBC-Therapie. Etwa 40% der Hepatozyten in den Fah^{-/-}-Mäusen bzw. die Hälfte aller Hepatozyten in den FCR-Mäusen sind unter NTBC-Entzug positiv für den Marker p21. Dies bedeutet, dass diese Zellen sich nicht teilen und einem Zellzyklusarrest unterliegen. Nach dem Entzug von NTBC unterliegen Hepatozyten einem generellen Prolife-

rationsblock. Dass weniger Zellen nach NTBC-Gabe in den FCR-Mäusen proliferieren, kann ein Zeichen für eine generell niedrigere Regeneration in den FCR-Mäusen sein.

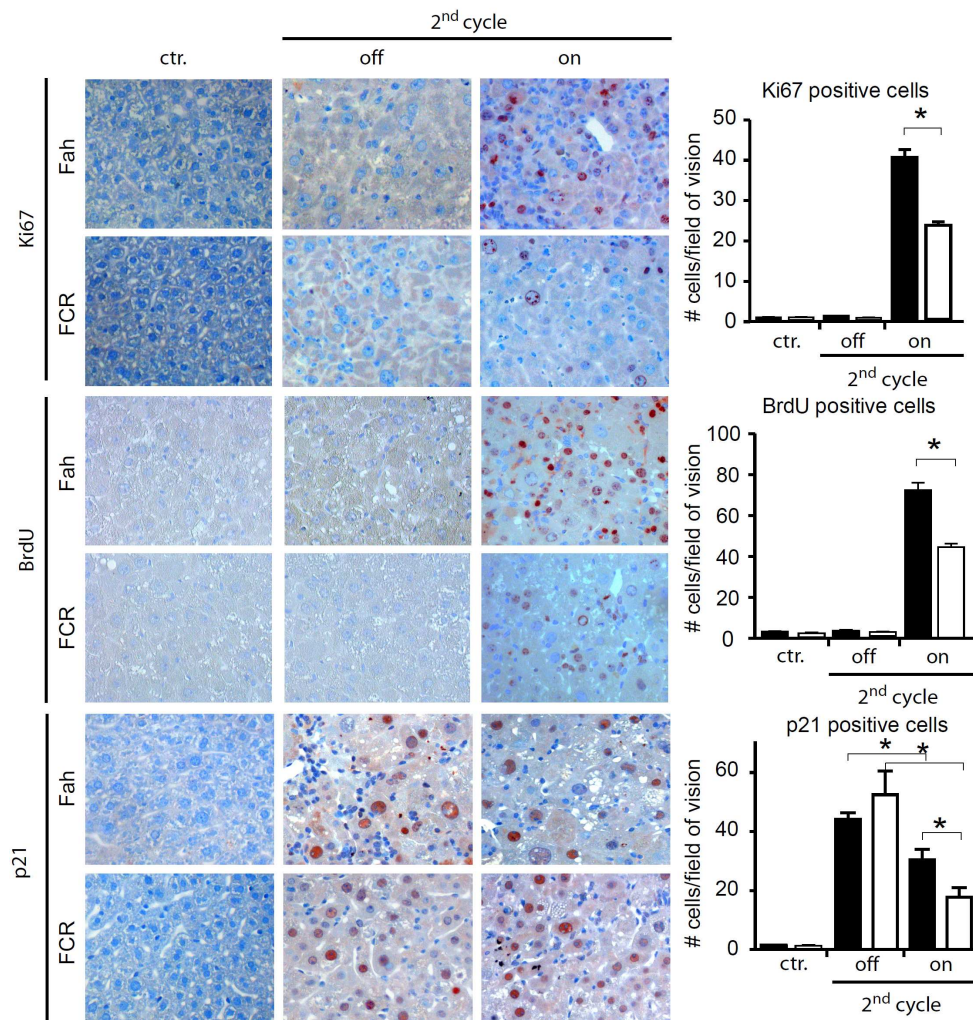


Abbildung 17: Fah/ c_{ν} / Rag2^{-/-}-Mäuse zeigen signifikant weniger Regeneration nach zyklischer Schädigung der Hepatozyten: Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen für die Zellzyklusmarker Ki67 (oben), BrdU (mitte) und p21 (unten) und die quantitative Auswertung der positiven Zellen/ Gesichtsfeld.

Konnte bei den Fah^{-/-}-Mäusen noch die deutliche Aktivierung des Stammzellkompartiments mittels FACS und A6-immunhistochemischer Färbung nachgewiesen werden, so zeigen die FCR-Mäuse keine Aktivierung der Leberstammzellen unter zyklischem NTBC-Entzug (siehe Abbildung 18).

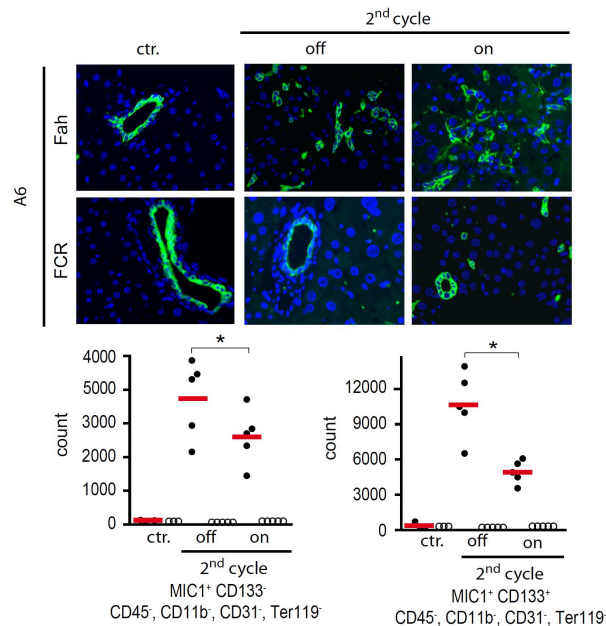


Abbildung 18: Keine Proliferation von Leber-Stammzellen in den FCR-Mäusen: A6-Färbung als Marker für Leber-Stammzellen in der Immunhistochemie und MIC1 und CD133 als Marker in der FACS-Analyse. Leber-Stammzellen wurden nach zweimaligem NTBC-Entzug vor und nach einer NTBC-Behandlung quantifiziert

Zellen, die für den Marker A6 in der immunhistochemischen Färbung positiv sind, zeigen sich bei den FCR-Mäusen nur im Bereich der gefäßauskleidenden Epithelzellen. Auch in anderen Modellen der chemischen Leberschädigung können Leberstammzellen aktiviert werden. So zum Beispiel nach Schädigung der Leber durch eine Cholin-defiziente, Ethionin-ergänzte (CDE) Diät.

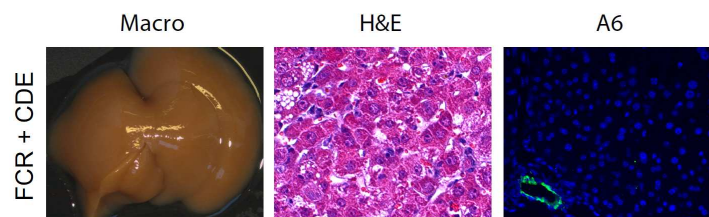


Abbildung 19: Keine Proliferation von Ovalzellen nach CDE-Diät in den FCR-Mäusen: Die Abbildung zeigt links eine makroskopische Aufnahme einer Leber nach drei-wöchiger CDE-Diät, die Morphologie der Hepatozyten in der H&E Färbung (mitte), und einen signifikanten Ausschnitt der A6-immunhistochemischen Färbung (rechts).

Fah^{-/-}-Mäuse und FCR-Mäuse wurden für drei Wochen mit einer Cholin-defizienten Diät gefüttert. Zusätzlich erhielten sie im gesamten Zeitraum DL-Ethionin über das Trinkwasser. Diese Behandlung induziert in Wildtyp-Mäusen eine starke Ovalzell-Reaktion. Auch hier ist es in den immundefizienten Fah^{-/-}-Mäusen nicht möglich Stammzellen der Leber zu aktivieren.

Die zuvor für die Fah^{-/-}-Mäuse beschriebenen Mechanismen zu Regeneration von Leberschäden sind in den FCR-Mäusen nicht oder nur teilweise nachzuweisen. Es kommt nur zu einer eingeschränkten Proliferation von Hepatozyten. Der Verlust von Hepatozyten kann auch nicht durch eine Hyperplasie oder die Aktivierung von Stammzellen ausgeglichen werden.

3.4 Regenerationsmechanismen in der murinen Leber nach partieller Hepatektomie und allogener Transplantation von Hepatozyten

Um eine generelle Regenerationshemmung auszuschließen, wurden zwei Modelle der Regeneration nach massiver Leberschädigung an den Fah- und FCR-Mäusen überprüft. Zum einen wurde eine Leberteileresektion (partielle Hepatektomie = pH) durchgeführt, zum anderen wurden Hepatozyten aus Wildtyp-Mäusen isoliert und in die Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse transplantiert. Bei der Leberteileresektion werden $\frac{2}{3}$ der Leber chirurgisch entfernt. Dies entspricht in der Maus den Leberlappen L1 und L2/3. Ein Verlust von etwa 70% der Lebermasse ist notwendig, um einen kontrollierten Eintritt aller verbleibenden Hepatozyten in den Zellzyklus und somit eine Regeneration der Leber zu induzieren. Nach der Leberteileresektion wurden die Versuchstiere für einen Zeitraum von 37 Stunden oder 7 Tagen beobachtet und anschließend getötet. Diese beiden Zeitpunkte wurden gewählt, da sowohl nach 37 Stunden die Proliferationsrate der Hepatozyten am höchsten ist und zum anderen die Leber nach 7 Tagen ihre ursprüngliche Masse wiedererlangt hat.

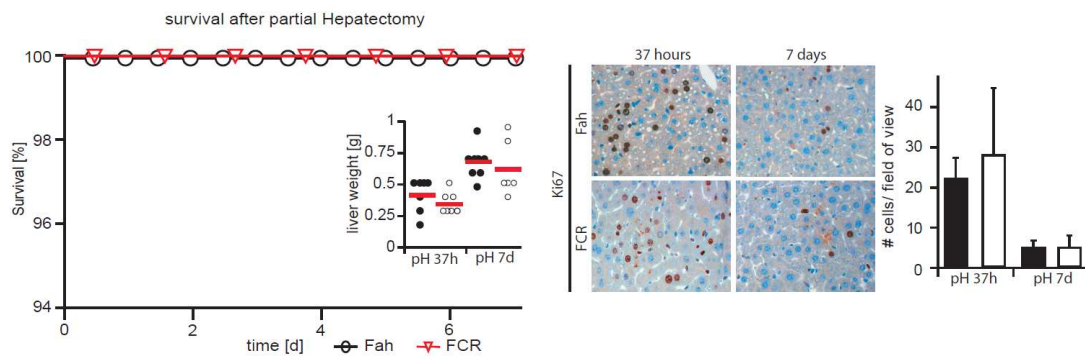


Abbildung 20: Partielle Hepatektomie: Ein Mechanismus zur Leberregeneration durch Duplikation differenzierter Hepatozyten. Eine $\frac{2}{3}$ partielle Hepatektomie wurde an acht Wochen alten unbehandelten Fah^{-/-}- und FCR-Mäusen durchgeführt. Links: Das Überleben der Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse ist in einer Überlebenskurve dargestellt, sowie das Lebergewicht beider Stämme zu dem Zeitpunkt 37 Stunden nach pH und 7 Tage nach pH. Mitte: Die Ki67-Färbung zeigt nach 37 Stunden und 7 Tage die proliferierenden Zellen in Fah^{-/-}- und FCR-Mäusen. Rechts: Das Balkendiagramm zeigt die Ki67-positiven Zellen pro Gesichtsfeld zu den Zeitpunkten 37 Stunden und 7 Tage.

Die Überlebensrate liegt in beiden Stämmen bei 100% der Versuchstiere und deutet darauf hin, dass das Überleben der Tiere nach Leberteilresektion nicht durch den Verlust der Zellen des adaptiven Immunsystems eingeschränkt ist. Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse sind in gleichem Maße fähig die Lebermasse zu regenerieren und erreichen 7 Tage nach Leberteilresektion beide dasselbe Lebergewicht. In der Ki67-immunohistochemischen Färbung konnte gezeigt werden, dass der Anteil proliferierender Hepatozyten 37 Stunden nach pH bei etwa 20% und nach 7 Tage bei etwa 5% liegt und somit in beiden Stämmen gleich ist (siehe Abbildung 21).

Im zweiten Modell wurden aus einer Donor-Maus Hepatozyten isoliert. Diese Hepatozyten sind nicht Fah-defizient und können mittels Fah-immunohistochemischer Färbung von den Hepatozyten des Empfänger-Tieres unterschieden werden.

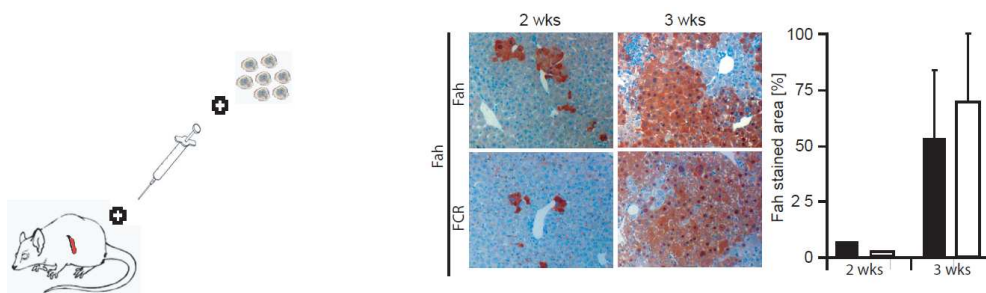


Abbildung 21: Allogene Transplantation von Hepatozyten aus C57BL/6N-Mäusen in die Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse: Die Hepatozyten wurden aus C57BL/6N-Mäusen isoliert und direkt in die Milz der sechs Wochen alten Versuchstiere injiziert. Anhand der Fah-Färbung können transplantierte Spender-Hepatozyten von den endogenen Hepatozyten des Empfänger-Tiers unterschieden werden. Die Tiere wurden an zwei Zeitpunkten (2 wks und 3 wks) nach der Transplantation getötet. Die Färbung für Fah zeigt die Repopulierung der Leber zu diesen beiden Zeitpunkten (mitte) und die quantitative Bestimmung der repopulierten zur nicht repopulierten Fläche (rechts).

Nach der Transplantation wurde das NTBC bei den Versuchstieren entzogen, dies führt zu einer Schädigung der endogenen Hepatozyten im Empfänger-Tier und löst damit den Reiz zur Proliferation der Spender-Hepatozyten und zur Repopulierung der Leber aus. Als Beobachtungszeitraum ergaben sich zwei bzw. drei Wochen nach der Transplantation. Zwei Wochen nach der Transplantation lassen sich die ersten Kluster Fah-positiver Hepatozyten in der ansonsten Fah-defizienten Leber der Empfänger-Mäuse nachweisen (siehe Abbildung 21). Eine Woche später ist die Leber der Mäuse zu etwa zwei Drittel repopuliert. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

Nach mechanischer Leberschädigung sind endogene Hepatozyten beider Stämme in der Lage die Leber zu regenerieren, dies bedeutet, dass die zelleigenen Mechanismen aktiviert werden können und zur Proliferation der Hepatozyten führen. Ausserdem konnte hier gezeigt werden, dass auch endogene

Faktoren in beiden Stämmen eine Proliferation der Hepatozyten induzieren und so die Regeneration der Leber erlauben. Dies bedeutet aber auch, dass der Grund für die geringe Regeneration der Lebern der FCR-Mäuse ein anderer ist.

3.5 Durch die Schädigung der Leber kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems

Nach dem Entzug von NTBC entwickeln die $Fah^{-/-}$ -Mäuse eine deutliche Hepatitis. Infiltrierende Zellen sind in der H&E-Färbung deutlich zu erkennen. Immunzellen können wesentlich zur Leberschädigung beitragen. Um die infiltrierenden Zellen zu charakterisieren wurden die Immunzellen nach dem unter Punkt 2.2.19 beschriebenen Protokoll isoliert und analysiert. Zunächst wurden im Forward scatter (FSC/ Größe) und Sideward scatter (SSC/ Granularität) die entsprechenden Zellpopulationen ausgewählt. Tote Zellen und Zellklumpen wurden ausgeschlossen. Exemplarisch ist in der Abbildung 14 je ein Dot plot für die entsprechenden Gruppen der Immunzellen dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil der entsprechenden Zellpopulation an allen nicht parenchymalen Zellen der Leber.

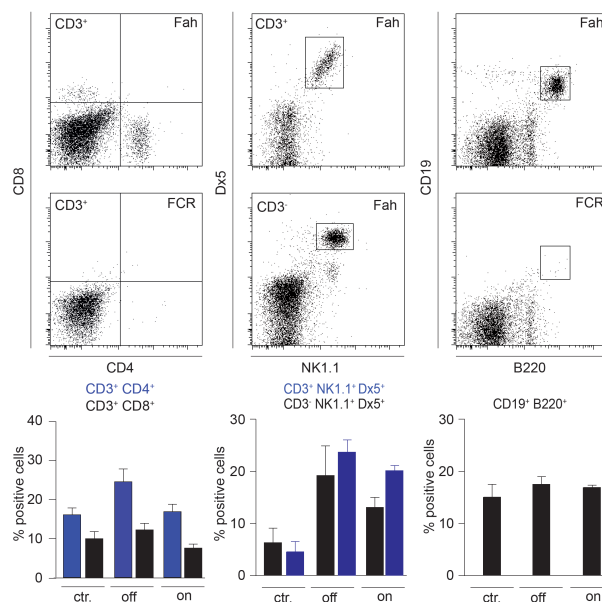


Abbildung 22: Das adaptive Immunsystem in $Fah^{-/-}$ -Mäusen: Untersucht wurden die prozentualen Veränderungen in der Verteilung der Immunzellen bei $Fah^{-/-}$ -Mäusen in den Gruppen der unbehandelten Kontrollen und zum frühen Zeitpunkt jeweils vor und nach einer NTBC-Behandlung. Links: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen (blauer Balken) und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (schwarzer Balken) Mitte: CD3⁺NK1.1⁺Dx5⁺ NKT-Zellen (blauer Balken) und CD3⁺NK1.1⁺Dx5⁺ NK-Zellen (schwarzer Balken) Rechts: CD19⁺B220⁺ B-Zellen.

Alle CD3⁺ Zellen wurden auf die Marker CD4 (T-Helferzellen) und CD8 (cytotoxische T-Zellen) hin unterschieden. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) exprimieren die Marker NK1.1 und Dx5, sind aber für CD3 negativ. Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) lassen sich daher von NK-Zellen über den Marker CD3 unterscheiden, für den sie ebenfalls positiv sind. Der Anteil der CD3⁺CD4⁺ T-Helferzellen steigt unter zyklischem NTBC-Entzug an, während sich der Anteil der cytotoxischen T-Zellen kaum verändert. Der prozentuale Anteil der CD19⁺B220⁺ B-Zellen bleibt dagegen unverändert. NK-Zellen nehmen während der off-Phase um etwa das Doppelte zu, in der anschließenden on-Phase geht der Anteil der NK-Zellen leicht zurück. Genauso kommt es zu einem Anstieg der NKT-Zellen in der Leber während der off-Phase. Dieser Anstieg geht ebenfalls nur leicht in der anschließenden on-Phase zurück.

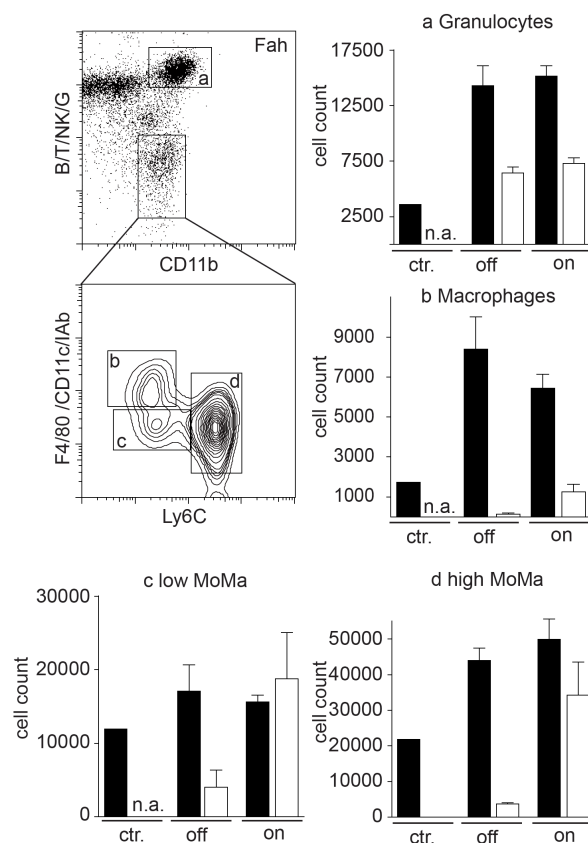


Abbildung 23: Zellen des angeborenen Immunsystems in der inflammatorischen Leber: Untersucht wurden die totalen Veränderungen in der Zahl der Immunzellen bei Fah^{-/-}- und FCR-Mäusen in den Gruppen der unbehandelten Kontrollen und zum frühen Zeitpunkt jeweils vor und nach einer NTBC-Behandlung. Links oben: Gezeigt wird ein exemplarischer Dot plot mit der „gating“- Strategie für Zellen des angeborenen Immunsystems in einer Fah^{-/-}-Maus. Gate a repräsentiert die Granulozyten, Gate b repräsentiert die Makrophagen. Das Kompartiment der Monozyten (gate c und d) wird in Monozyten, die den Marker Ly6C stark exprimieren (gate d = high MoMa) und solche die eine intermediäre Expression des Markers Ly6C (gate c = low MoMa) zeigen, unterschieden (Balkendiagramme).

Die stärksten Veränderungen zeigen sich beim angeborenen Immunsystem. Die Veränderungen in der Zusammensetzung der Immunzellen können hier nicht in Prozent angegeben werden. Da den FCR-Mäusen wesentliche Teile des Immunsystems fehlen (T-, B- und NK-Zellen) beeinflusst dies die Verhältnisse der anderen Immunzellen. Daher wird hier die absolute Zahl der Immunzellen in der quantitativen Auswertung angegeben. $Fah^{-/-}$ -Mäuse zeigen eine stärkere Aktivierung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Vor allem die Zahl der Granulozyten und der Makrophagen steigt in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen auf über das fünffache im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren an. Die Zahl der $Ly6C^{high}$ Monozyten steigt in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen auf das Doppelte, die der $Ly6C^{low}$ Monozyten um etwa den Faktor 0,5 an. Es ist ein Anstieg von $Ly6C^{low}$ Monozyten hin zu $Ly6C^{high}$ Monozyten zu beobachten. FCR-Mäuse haben nach zyklischem NTBC-Entzug nur etwa halb so viele Granulozyten und deutlich weniger Monozyten im Vergleich zu den behandelten $Fah^{-/-}$ -Mäusen. Besonders auffällig ist, dass es nur sehr wenige Makrophagen in der Leber der FCR-Mäuse gibt. Alle Zellgruppen nehmen unter zyklischem NTBC-Entzug zu, nach der on-Phase gehen die Zahlen nur gering zurück.

Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung des Immunsystems nach zyklischem NTBC-Entzug kommt und dass der Leberschaden nur in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen zu einer Aktivierung vor allem von Monozyten und Makrophagen führt.

3.6 Die Transplantation von T-Zellen und Hämatopoetischen Stammzellen stellt den inflammatorischen Phänotyp in den FCR-Mäusen wieder her

Es konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem auf der einen Seite eine wesentliche Rolle für das Überleben der Mäuse nach zyklischem NTBC-Entzug spielt, aber auf der anderen Seite die Entstehung von Tumoren begünstigt. Da die FCR-Mäuse nach einem chronischen Leberschaden kein HCC entwickeln und nach akutem Leberschaden mit Proliferation reagieren, soll durch ein Kontrollexperiment geklärt werden, ob sie auch unter zyklischem NTBC-Entzug ein HCC entwickeln können, wenn die fehlenden Komponenten des Immunsystems substituiert werden. Hierfür wurden zwei Ansätze gewählt. Zum Einen wurden T-Zellen aus der Milz von Fah -defizienten Mäusen isoliert und mittels Injektion über die Schwanzvene transplantiert. Zum Anderen wurden aus etwa 14,5 Tage alten Embryonen Hämatopoetische Stammzellen (HSC) aus der embryonalen Leber isoliert. Die lineage-depleted, CD34 positiven Hämatopoetischen Stammzellen wurden direkt perkutan in die Leber der neugeborenen Mäuse vom Stamm FCR injiziert.

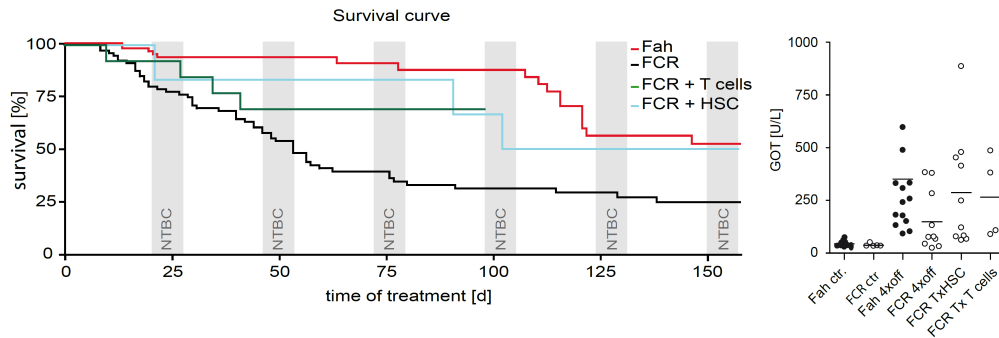


Abbildung 24: Das Überleben von FCR-Mäusen ist nach der Transplantation von HSC und T-Zellen deutlich verbessert: Links ist die Überlebenskurve für die vier Gruppen (Fah, FCR, FCR + T cells und FCR + HSC) dargestellt. Rechts sind die Werte für die Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT) als Marker für die Leberfunktion aufgetragen.

Die Abbildung 24 verdeutlicht, dass die Transplantation sowohl von T-Zellen als auch von HSCs das Überleben der FCR-Mäuse deutlich verbessert. Etwa 70% der transplantierten Versuchstiere überleben bis zu vier Zyklen. Die Transaminasen steigen in den transplantierten Tieren deutlich an. Der Unterschied zu der Gruppe Fah4xoff ist nicht signifikant. Das Verhältnis zwischen Lebergewicht und Körpergewicht der Versuchstiere ist in den vier Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 25).

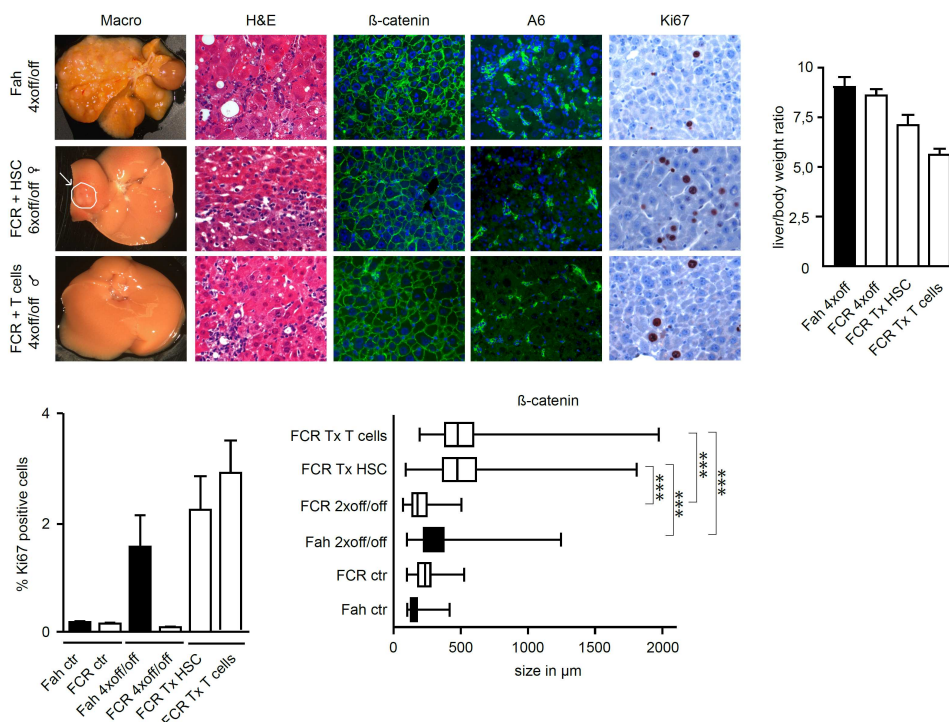


Abbildung 25: Durch die Transplantation von HSC und T-Zellen in die FCR-Mäuse wird eine Hepatitis gefördert: Das Verhältnis von Lebergewicht/ Körpergewicht steigt deutlich an (rechts). Die Leber der transplantierten FCR-Mäuse wurde immunhistochemisch untersucht, gezeigt werden eine makroskopische Aufnahme der Leber, H&E, β -Catenin, A6, und Ki67 (oben), sowie die Quantifizierung der proliferierenden Zellen in der Ki67-Färbung (unten links), und die Messung der Zellgröße anhand der β -Catenin-Färbung (unten rechts).

Durch die Substitution von Immunzellen konnte eine Hepatitis in den FCR-Mäusen induziert werden. Diese Hepatitis geht mit einer starken Infiltration von nicht-parenchymalen Zellen (H&E) und einem Anstieg der Zellgröße (siehe Abbildung 31: β -Catenin-Färbung) einher. Die Zellgröße ist in beiden transplantierten Gruppen signifikant größer als in den $Fah^{-/-}$ - bzw. FCR-Mäusen nach zweimaligem NTBC-Entzug. Sowohl durch die transplantierten T-Zellen als auch durch die HSC können nach Leberschädigung wieder Leber-Stammzellen aktiviert werden (siehe Abbildung 31: A6-Immunhistochemie). In diesen Gruppen sind signifikant mehr proliferierende Zellen in der Färbung für Ki67 nachweisbar als in der entsprechenden Gruppe der FCR 4xoff Mäuse.

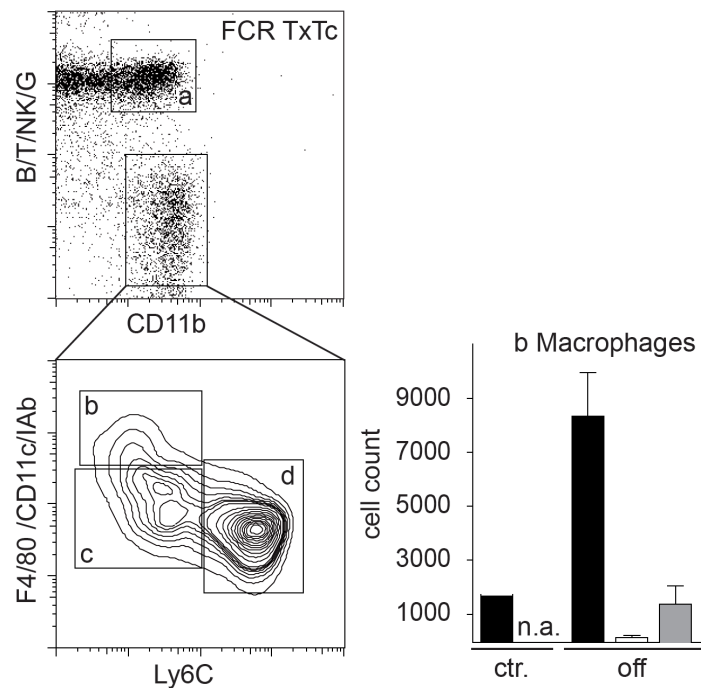


Abbildung 26: Die Zahl der Makrophagen nimmt durch die Transplantation von T-Zellen leicht zu: Links: Gezeigt wird ein exemplarischer Dot plot mit der „gating“-Strategie für Zellen des angeborenen Immunsystems in einer FCR-Maus nach der T-Zell Transplantation. Gate a repräsentiert die Granulozyten, Gate b repräsentiert die Makrophagen. Das Kompartiment der Monozyten (gate c und d) wird in Monozyten, die den Marker Ly6C stark exprimieren (gate d = high MoMa) und solche die eine intermediäre Expression des Markers Ly6C (gate c = low MoMa) zeigen, unterschieden (Balkendiagramm).

Vor allem die Makrophagen kamen in den behandelten FCR-Mäusen in sehr niedriger Zahl vor. Durch die Transplantation der T-Zellen in diesen Stamm kommt es allerdings nur zu einem geringen Anstieg der Makrophagen in der Leber. Durch den Transfer von T-Zellen in die FCR-Mäuse konnten wesentliche Merkmale der Hepatitis nach zyklischem NTBC-Entzug wieder hergestellt werden.

3.7 Aktivierung von Stress-Signalwegen in der Leber

Auf der Basis der Leberschädigung und der chronischen Entzündung ist es auch zur Entstehung eines HCCs in den *Fah*^{-/-}-Mäusen gekommen. Um die Veränderungen in wichtigen Signalwegen in den Hepatozyten zu dokumentieren, wurden Western Blot-Analysen von Totallysaten der Leber durchgeführt. Hierbei sind nur leichte Unterschiede zwischen den beiden Genotypen erkennbar. Der Zellzyklusinhibitor p21 wird sowohl von *Fah*^{-/-}- als auch von den FCR-Mäusen unter NTBC-Entzug und in der darauf folgenden Phase der NTBC-Behandlung stark exprimiert. Allerdings zeigt der *Fah*^{-/-}-Stamm eine stärkere Expression von Cyclin D1, einem Promotor des Zellzyklus, unter NTBC-Entzug.

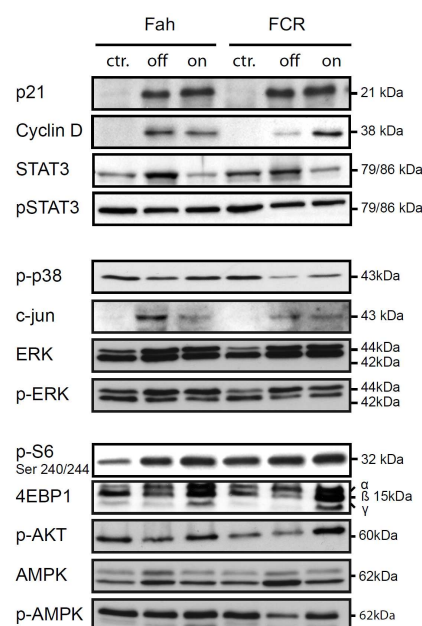


Abbildung 27: Aktivierung von Stresssignalwegen unter zyklischem NTBC-Entzug: PTEN/ PI3K/ AKT/ mTOR Signalweg (p-S6, 4EBP1, p-AKT), Zellzyklus (p21, Cyclin D1, STAT3, p-STAT3). Western Blot-Analysen wurden aus Totallysat der Leber durchgeführt. Einzelproben wurden von vier Versuchstieren gepoolt.

Der PTEN/ PI3K/ AKT/ mTOR-Signalweg ist häufig in transformierten Zellen dysreguliert. Dieser Mechanismus begünstigt das Überleben von transformierten Zellen. Targets in diesem Signalweg sind AKT, S6-Kinase und 4EBP1. pS6-Kinase ist in den *Fah*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren stärker induziert als in den FCR-Mäusen. Das Translation-Repressor-Protein 4EBP1 bindet an den Translation-Initiation-Factor eIF4E, dadurch wird eine cap-abhängige Translation inhibiert. Durch die Hyperphosphorylierung von 4EBP1 wird diese Interaktion aufgelöst, was zur Translation der Zielgene führt. In der Expression von 4EBP1 können zwischen den beiden Genotypen keine Unterschiede nachgewiesen werden. Auch in der Phosphorylierung von AKT

zeigen sich keine klaren Unterschiede. c-Jun ist eine Komponente des transcription factor activator protein-1 (AP-1). AP-1-abhängige Transkription wird durch verschiedene extrazelluläre Signale induziert. Dazu gehören zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Chemokine und Stresssignale. c-Jun ist jedoch deutlich stärker in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen unter Stress-Konditionen exprimiert.

3.8 Tumorentstehung in $Fah^{-/-}$ - und $Fah/$ common gamma chain/ $Rag2^{-/-}$ -Mäusen nach chronischer Leberschädigung

Wiederkehrende inflammatorische Prozesse haben in den immunkompetenten Fah -defizienten Mäusen zur beschleunigten Entstehung eines HCCs binnen drei bis vier Monaten geführt. Diese Entwicklung konnte bei den FCR-Mäusen nicht bestätigt werden. Neben einem geringen Grad der Hepatitis in diesem Modell konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Leber zur Regeneration in beiden Stämmen vorhanden ist. Um zu überprüfen, ob die FCR-Mäuse nach einer chronischen Hepatitis ein HCC entwickeln, wurden die Versuchstiere für einen Zeitraum von mindestens neun Monaten auf einer 2,5%-igen NTBC-Therapie gehalten.

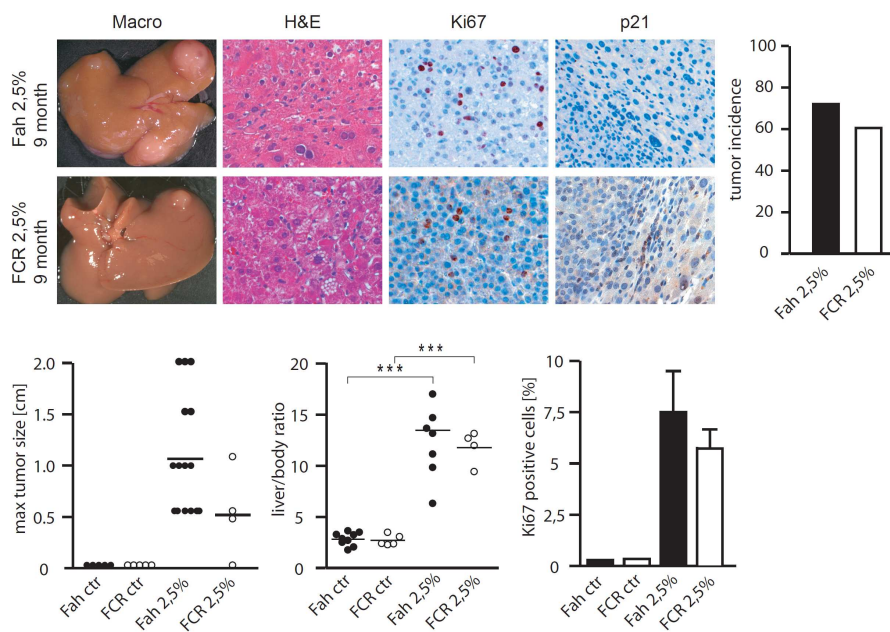


Abbildung 28: Chronischer Leberschaden und HCCs in $Fah^{-/-}$ - und FCR-Mäusen auf 2,5% NTBC: Ein chronischer Leberschaden wurde durch eine sublethale Therapie mit NTBC erzielt. Dargestellt sind tumorlastige Lebern und repräsentative Ausschnitte der H&E-Färbung, Ki67- und p21-Färbung (oben), sowie die Tumorzinzidenz in den $Fah^{-/-}$ - und FCR-Mäusen (rechts). Die maximale Tumorgröße, das Verhältnis aus Lebergewicht und Körpergewicht, sowie die quantitative Auswertung der positiven Zellen in der Ki67-Färbung sind graphisch dargestellt (unten).

Die zuvor unter zyklischem NTBC-Entzug beobachtete erhöhte Mortalität tritt bei einem chronischen Verlauf der HT-1 nicht mehr auf. Sowohl die Fah^{-/-}-Mäuse als auch die FCR-Mäuse entwickeln nach chronischer Leberschädigung und binnen neun Monaten ein HCC. Die Tumorzinzidenz sowie auch das gesteigerte Verhältnis zwischen Leber- und Körpergewicht ist in beiden Stämmen gleich. Eine erhöhte Zahl proliferierender Hepatozyten findet sich vor allem im Tumor, im Nicht-Tumorgewebe liegt der Prozentsatz proliferierender Hepatozyten zwischen 5% und 7,5% in beiden Stämmen. Die Expression des Zellzyklusinhibitors ist ausschließlich auf Nicht-Tumorgewebe begrenzt. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 28).

Durch die letzten Experimente konnte gezeigt werden, dass die FCR-Mäuse die gleichen Mechanismen aktivieren können, um auf eine Leberschädigung zu reagieren. Auch konnte gezeigt werden, dass nach chronischem Leberschaden ein HCC in diesem Stamm entsteht. Dieser Versuch zeigt deutlich, dass die Mechanismen, die zur Entstehung eines HCCs führen, nach chronischem Leberschaden und bei massiven inflammatorischen Prozessen zu unterscheiden sind.

3.9 Nach vollständigem NTBC-Entzug versterben die Mäuse an einem akuten Leberversagen

Das adaptive Immunsystem scheint in diesem Modell ebenfalls eine entscheidende Rolle für das Überleben der Mäuse nach zyklischem NTBC-Entzug zu spielen. Daher soll das Augenmerk nun auf die Prozesse gelenkt werden, die zu einem Versterben der Versuchstiere nach NTBC-Entzug führen. Moribunde Tiere wurden getötet und die Leber wurde zur weiteren histologischen Untersuchung entnommen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass zumindestens im Trend, die FCR-Mäuse früher an einem akuten Leberversagen versterben als die Fah^{-/-}-Mäuse (siehe Abbildung 29, survival curve). Etwa 95% der FCR-Mäuse verstarben innerhalb der ersten 30 Tage. Im selben Zeitraum nach NTBC-Entzug verstarben nur etwa 20% der Fah^{-/-}-Mäuse. Wie zu erwarten verstarben fast alle Fah-defizienten Mäuse innerhalb von acht bis zehn Wochen nach vollständigem NTBC-Entzug. Die Lebern der moribunden Mäuse sind kleiner als die der Kontrollgruppen.

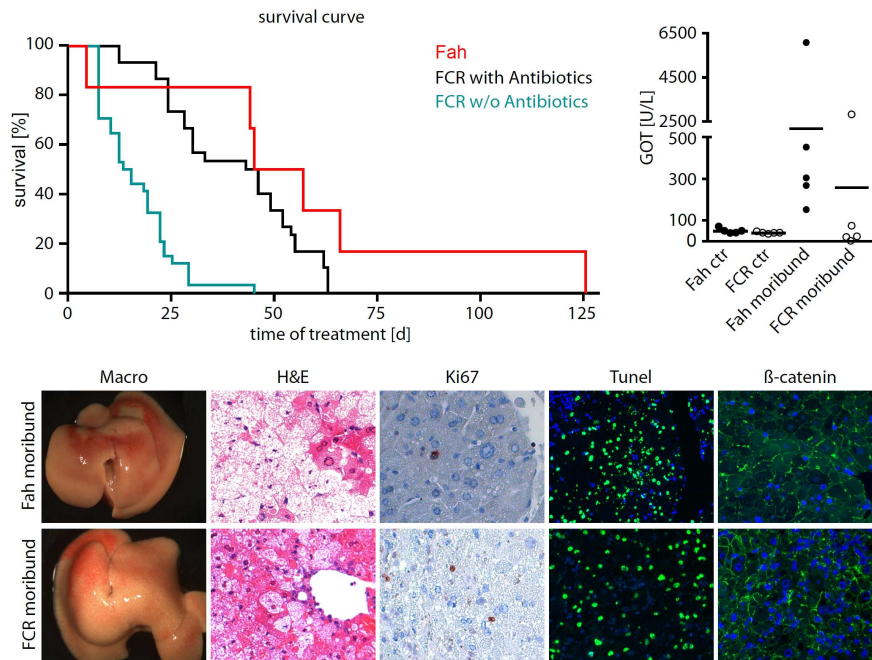


Abbildung 29: Akutes Leberversagen nach vollständigem NTBC-Entzug: Oben: Die Überlebenskurve zeigt die Sterberate der Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse (mit und ohne Antibiotikagabe). Rechts: Transaminasen (GOT) für die Kontrollgruppen und moribunden Mäuse. Unten: Makroskopische Aufnahme der Leber, sowie signifikante Ausschnitte aus der H&E-, Ki67-, TUNEL- und β-Catenin-Färbung.

Vergleicht man die Stämme jedoch miteinander wird deutlich, dass der akute Leberschaden bei beiden Stämmen dasselbe Erscheinungsbild annimmt. In der H&E-Färbung zeigen sich massive Nekrosen. Außerdem zeigt die TUNEL-Färbung einen massiven Zelltod durch den Mechanismus der Apoptose. Zu diesem Befund passen auch die gestiegenen Serum-Transaminasen in den moribunden Tieren (siehe Abbildung 29). Den Verlust an funktionalem Leberparenchym können die Versuchstiere nicht durch kompensatorische Proliferation ausgleichen. Nur wenige proliferierende Hepatozyten konnten in der Ki67-Färbung nachgewiesen werden. Das Bild dieses akuten Leberversagens gleicht dabei sehr dem durch Endotoxine induzierten Leberschaden. Dieser Verdacht wird verstärkt, da die Mortalität der FCR-Mäuse durch die Gabe eines Antibiotikums positiv beeinflusst werden kann. Des Weiteren konnte durch Expressionsanalysen ein Anstieg der Expression der mRNA für den TLR4 und CD14 nachgewiesen werden.

Die Gründe für ein Versterben der Fah^{-/-}- und FCR-Mäuse nach FAA-induzierter Schädigung sind in beiden Stämmen gleich, allerdings sind die FCR-Mäuse sensibler für eine zusätzliche akute Schädigung im Rahmen der chronischen Lebererkrankung.

3.10 Expressionsanalysen zeigen differentiell regulierte Gene unter zyklischem NTBC-Entzug

Als nächstes wurden Expressionsanalysen von über 41.000 Genen in den $Fah^{-/-}$ - und FCR-Mäusen durchgeführt. Die Analysen geben Aufschluss über die unter zyklischem NTBC-Entzug differentiell regulierten Gene.

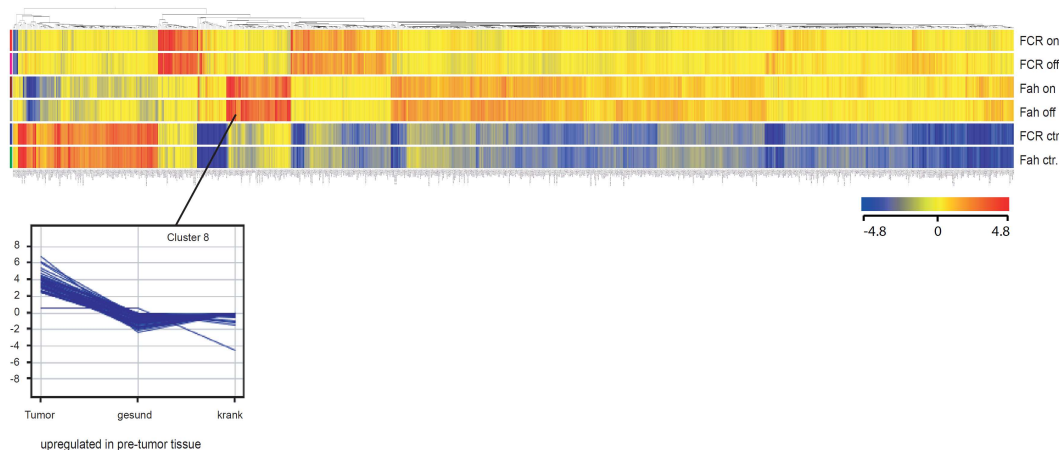


Abbildung 30: Heatmap von über 41.000 Genen in der Expressionsanalyse: Die Heatmap ist in Klustern angeordnet. Gruppirt sind die beiden Kontrollgruppen und die $Fah^{-/-}$ -Mäuse sowie die FCR-Mäuse nach der 2xoff/off und 2xoff/on. Gene, die in ihrer Expression hochreguliert sind, zeigen eine rote Bande, solche die runterreguliert sind, zeigen eine blaue Bande, gelb weist auf keine Regulation hin. Cluster 8 entspricht Genen bzw. Gengruppen, die in Prä-Tumor Gewebe mindestens zehnfach hochreguliert sind.

In der Analyse dieser Expressionsdaten wurde besonders nach Genen gesucht, deren Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe eine mindestens zehnfache Erhöhung zeigt. Solche Gene erscheinen als besonders relevant für den inflammatorischen Phänotyp und die Hepatitis sowie für die Tumorentstehung in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen. Im Cluster 8 konnten solche Gene identifiziert werden. Cluster 8 enthält etwa 200 Gene, die vorwiegend in der Zellzyklusregulation, Zell-Zell-Interaktionen und der Migration von Immunzellen aus der Peripherie in die Gewebe beteiligt sind. Diese Gene konnten verschiedenen Signalwegen zugeordnet werden. Im Anhang befindet sich eine Tabelle mit allen im Cluster 8 enthaltenen Genen (siehe Tabelle 13, Anhang).

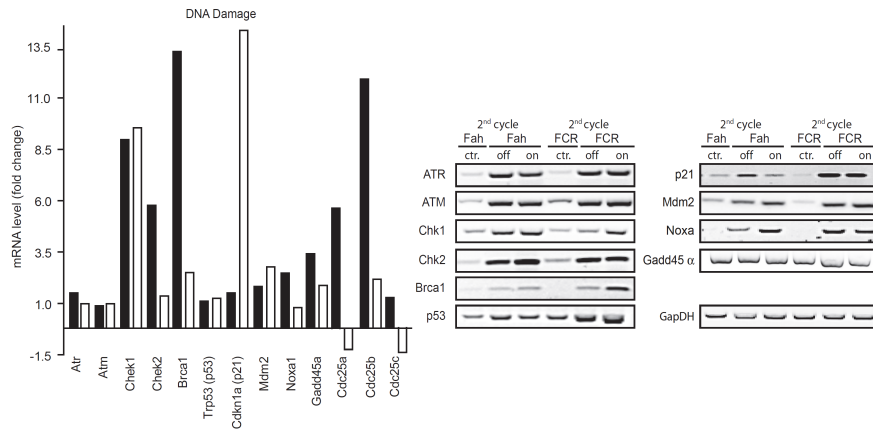


Abbildung 31: Relative Expression von Genen in den DNA-Schaden-Signalwegen: Im Expressionsarray (links) und in der semi-quantitativen RT-PCR (rechts). Auf Grund der zellschädigenden Wirkung von FAA kommt es zu oxidativem Stress, der zur Schädigung der DNA führen kann, woraufhin Signalwege zur Kontrolle von DNA-Schäden aktiviert werden. (Schwarze Balken = Fah^{-/-}; weiße Balken = FCR)

Chk1, Brca1 und Cdc25b sind besonders stark in den Fah^{-/-}-Mäusen induziert. Für die FCR-Mäuse konnte eine starke Induktion der Genexpression für Chk1 and Cdkn1a (p21) nachgewiesen werden. Eine erhöhte Proteinmenge konnte auch im Western blot für p21 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 31). Auf Grund dieser Funde wurden andere Gene, von denen bekannt ist dass sie an der Kontrolle von DNA-Schäden und der Zellzyklusregulation beteiligt sind, untersucht. Die Ergebnisse aus der Expressionsanalyse wurden mit semi-quantitativen RT-PCRs validiert. Neben Genen, die an der Wahrnehmung von DNA-Schäden beteiligt sind, wurden auch solche gefunden, die den Zellzyklus regulieren. Fah^{-/-}-Mäuse zeigen dabei eine stärkere Induktion Zellzyklus-relevanter Gene. In den FCR-Mäusen ist es der Zellzyklusinhibitor p21, der besonders stark exprimiert ist.

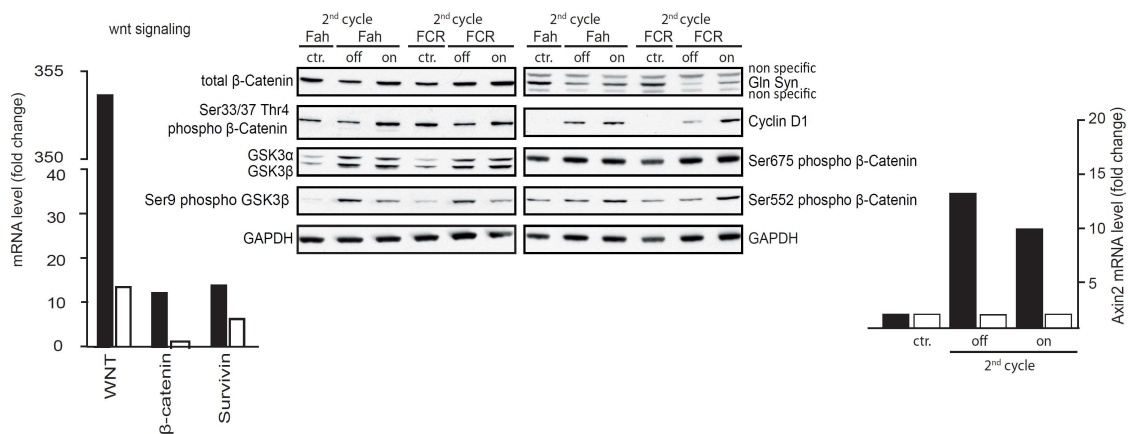


Abbildung 32: Wnt-Signalweg nach zyklischer FAA-induzierter Schädigung: Links: relative mRNA-Expression bezogen auf die entsprechenden Kontrolltiere. Mitte: Western Blots für Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Rechts: relative Expression der mRNA für Axin2.

Im Cluster 8 zeigt jedoch eine andere mRNA die stärkste Regulation. Wnt10a ist 250-fach überexprimiert. Wnt10a ist Teil des wnt-Signalweges. Weitere Proteine in diesem Signalweg sind β -Catenin und Survivin, die ebenfalls in den Fah^{-/-}-Mäusen mindestens 10-fach hochreguliert sind (siehe Abbildung 30). Wnt-Signaling ist an der frühen Embryogenese und an der Tumorentstehung beteiligt. Die Glykogen-Synthase Kinase-3 (GSK-3) ist ein Enzym das die Glykogensynthese nach einer Insulinantwort reguliert. GSK-3 ist ein downstream Target des PI3K/Akt-Signalweges und eine Komponente des Wnt-Signalweges. GSK-3 ist allerdings in beiden Stämmen unter Stressbedingungen phosphoryliert. Es gibt verschiedene Serinreste an denen β -Catenin phosphoryliert werden kann. Eine Phosphorylierung an dem Ser552-Rest führt zu einer Akkumulation von β -Catenin im Nukleus und fördert die Transkription genauso wie eine Phosphorylierung an Ser675. Die Phosphorylierung von β -Catenin entscheidet also darüber ob Gene abgelesen werden oder nicht. GSK3 β phosphoryliert β -Catenin an den Serin-Resten 33/ 37 und destabilisiert es damit. Diese Destabilisierung führt zu einer Degradation am Proteasom.

4 Diskussion

In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 500.000 Menschen neu an Krebs. Krebs ist einer Erkrankung, die aus DNA-Schäden hervorgeht und bei der es zur Fehlregulation von Signalwegen in den Zellen kommt, die zu einem Überleben transformierter Zellen führen und/ oder Apoptosemechanismen aussetzen. Das Hepatozelluläre Karzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Leber und scheint in der männlichen Bevölkerung verbreiteter zu sein. Es ist meist mit einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis C Virus oder dem Hepatitis B Virus und übermäßigem Alkoholabusus sowie einer Zirrhose assoziiert. Es gilt Außerdem als erwiesen, dass ein HCC auf der Grundlage einer Fibrose entstehen kann. Ein weiterer Grund für die Entstehung eines HCCs sind hereditäre Lebererkrankungen. Hierzu zählt die Hereditäre Tyrosinämie Typ-1 (HT-1). Bei dieser Erkrankung kommt es zur Akkumulation von kanzerogenen Metaboliten in der Leber. Dies führt zu oxidativem Stress und DNA-Schäden und letztlich zu einer hohen Inzidenz für ein HCC.

In dieser Arbeit wurde das murine Modell der hereditären Tyrosinämie Typ-1 zur Induktion eines HCCs genutzt. Um speziell die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung eines HCCs in der HT-1 zu untersuchen, wurde ein immunsuppressiver $Fah^{-/-}$ -Stamm generiert. Es gibt immer mehr Hinweise, dass es unter chronischen Entzündungen zur Krebsentstehung kommt. So zum Beispiel beim Kolorektalem Karzinom (colorectalem carcinom = CRC) wo Frank et al. (2010) in einer großen Fallkontroll-Studie erneut einen Zusammenhang zwischen SNPs in immunrelevanten Genen und CRC nachgewiesen haben. Der Immunsuppressive Stamm FCR kann auf Grund des Knockouts der common gamma chain – einer wichtigen Ko-Rezeptorkette für zahlreiche Interleukine – und des Recombination activation Gene 2 keine T-, B- und NK-Zellen bilden. Da die Leber ein immunprivilegiertes Organ ist, ist es wichtig zu klären, ob es durch den Verlust der Immunzellen schon zu einem veränderten Phänotyp in den „gesunden“ FCR-Mäusen kommt.

Durch diesen Verlust von Immunzellen entsteht den „gesunden“ FCR-Mäusen jedoch kein Nachteil. Diese Mäuse weisen dasselbe Körpergewicht und auch Lebergewicht auf wie die $Fah^{-/-}$ -Kontrollen (siehe Abbildung 16). Als Marker für einen Leberschaden wurden hier die Glutamat-Oxalazetat-Transaminase und Bilirubin gemessen. Bilirubin ist ein Indikator für eine Cholestase, also einen Rückstau von Gallensäuren und anderen Gallenbestandteilen. Aber auch die Transaminasen sind in den Kontrolltieren nicht erhöht. Als weiterer Marker wurde die Leberstruktur beurteilt. Anhand der H&E-Färbung kann man jedoch erkennen, dass es auch hier keinen Unterschied zwischen den gesunden immu-

kompetenten und immunsuppressiven $Fah^{-/-}$ -Mäusen gibt. Daher kann man sagen, dass alle Veränderungen tatsächlich auf die Behandlung zurückgehen.

Aus früheren Arbeiten ist bereits bekannt, dass die $Fah^{-/-}$ -Mäuse nach dem Entzug von NTBC innerhalb von sechs bis acht Wochen an einem akuten Lebersversagen versterben. Ein chronischer Leberschaden kann in diesem Modell durch die reduzierte Gabe von NTBC induziert werden. Hierbei kommt es in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen zu einer Hepatitis und einem HCC innerhalb von neun bis zwölf Monaten (Marhenke et al., 2008). Das Modell des akuten und chronischen Leberschadens spiegelt nicht die häufig beobachtete physiologische Situation mit wiederkehrenden Phasen der Leberschädigung wieder. Dazu wurde in dieser Arbeit ein neuer Ansatz gewählt. Durch den zyklischen Entzug von NTBC sollen hier inflammatorische Prozesse induziert werden, die zu einer stärkeren Schädigung der Leber führen.

4.1 Durch inflammatorische Prozesse kann in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen eine schwere Leberschädigung ausgelöst werden.

Es ist immer noch nicht genau geklärt, wie es durch FAA zu einem akuten Lebersversagen kommt. Das akute Lebersversagen ist sicher auf eine direkte toxische Wirkung von FAA auf die Hepatozyten zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse defizient für Fah und Hpd vor einem akuten Leberschaden geschützt sind. Das liegt daran, dass durch die Mutation in dem Gen für Hpd kein FAA gebildet wird (Vogel et al., 2004). Außerdem ist bekannt, dass in der Leber residierende Makrophagen - Kupffer-Zellen - und infiltrierende Monozyten eine Nicht-Alkoholische Steatohepatitis (NASH) auslösen und zusätzlich ihr Vorschreiten fördern. Hierbei sind es vor allem die in der frühen Phase der NASH von den Makrophagen gebildeten Zytokine $IL-1\alpha$ und $TNF\alpha$, die eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (Tosello-Tramont et al., 2012). In der Leber scheint es also verschiedene Mechanismen zu geben, die zu einer Schädigung der Hepatozyten führen. In dieser Arbeit konnte durch eine wiederkehrende Schädigung der Hepatozyten eine fulminante Hepatitis induziert werden.

Außerdem konnten drei mögliche Mechanismen als Teil der Leberregeneration nach massiver Schädigung aufgezeigt werden. Zum Einen kommt es in der kurzen Phase der Regeneration unter der NTBC-Behandlung zu einer kompensatorischen Proliferation der Hepatozyten. Diese kompensatorische Proliferation der Hepatozyten ist in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen signifikant stärker ausgeprägt als in den FCR-Mäusen. Die $Fah^{-/-}$ -Mäuse zeigen auch eine stärkere Regulation von Zellzyklusgenen (siehe Abbildung 34). Zum Anderen kommt es in den geschädigten Lebern der $Fah^{-/-}$ -Mäuse zu einem Zellverlust und zu einer kompensatorischen Zunahme der Zellgröße. Bei der Hyperplasie kommt es zu einer Größenzunahme aufgrund von vermehrter Zellteilung. Bei der Hypertrophie, als

Mechanismus zur Leberregeneration, kommt es zu einer Zunahme der Zellgröße. Dieser Mechanismus wurde bisher in alten Mäusen diskutiert. In alternen Organismen ist die Proliferationsfähigkeit aufgrund von beispielweise einer verminderten Konzentration von Wachstumsfaktoren, einer Akkumulation von DNA-Schäden und einer verringerten Möglichkeit Stammzellen in den Geweben zu aktivieren deutlich eingeschränkt. An alten und jungen tragenden Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Wechsel von einer Regeneration durch Proliferation hin zu einer Regeneration durch Hypertrophie durch den AKT/mTORC1 vermittelt wird. Als Folge dessen konnte gezeigt werden, dass wieder mehr Proliferation stattfindet, wenn der Komplex inhibiert wird (Gielchinsky, 2010). Das Akute Leberversagen (ALF) ist ein schweres klinisches Syndrom. Während eines akuten Leberversagens kommt es ebenfalls zu massivem Zelltod und zu einer stark eingeschränkten Regeneration durch Proliferation.

Ein dritter kontrovers diskutierter Mechanismus der Leberregeneration ist die Aktivierung von bipotenten Leber-Stammzellen (Ovalzellen). Ovalzellen stellen eine Möglichkeit der Leberregeneration dar wenn die Proliferation differenzierter Hepatozyten nach massiver Schädigung inhibiert ist. Die Schädigung nach NTBC-Entzug löst so einen Proliferationsblock in den Hepatozyten aus (Vogel et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von Ovalzellen unter experimentellen Bedingungen durch $\text{INF-}\gamma$ gesteigert werden kann. Im Gegensatz dazu ist die Ovalzell Antwort in $\text{INF-}\gamma^{-/-}$ -Mäusen eingeschränkt (Brooking et al., 2005). $\text{INF-}\gamma$ wird nicht nach partieller Hepatektomie – einem Modellen in dem man annimmt, dass ausschließlich differenzierte Hepatozyten proliferieren und zur Regeneration beitragen – hoch reguliert. $\text{INF-}\gamma$ ist jedoch in Modell mit Leberschaden induziert, in denen es zu einer Aktivierung von Ovalzellen kommt. In dieser Arbeit konnte ausschließlich in den $\text{Fah}^{-/-}$ -Mäusen eine starke Aktivierung von Ovalzellen unter zyklischem NTBC-Entzug nachgewiesen werden. Diese Gruppe zeigt auch eine achtfache Induktion der mRNA für $\text{INF-}\gamma$. In den FCR-Mäusen ist die Transkription der mRNA für $\text{INF-}\gamma$ um das doppelte runterreguliert. Es besteht außerdem ein Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und der Aktivierung von Ovalzellen. Fehlen zum Beispiel T-Zellen kommt es zu einer verringerten Aktivierung von Oval Zellen nach CDE-Diät induziertem Leberschaden. In alymphoiden Mäusen ($\text{Rag2}^{-/-} \text{c}\gamma^{-/-}$) kommt es zu keiner Ovalzell-Antwort und zu einer erhöhten Mortalität nach induzierter Leberschädigung (Strick-Marchand et al., 2008). Dies ist in Übereinstimmung mit den hier gefundenen Ergebnissen, dass es nach Leberschädigung unter zyklischem NTBC-Entzug zu keiner Ovalzell-Antwort und auch zu einer erhöhten Mortalität in den $\text{Fah}^{-/-} \text{Rag2}^{-/-} \text{c}\gamma^{-/-}$ -Mäusen kommt. Es konnte auch nach CDE-Diät in diesen Mäusen keine Ovalzell-Aktivierung nachgewiesen werden. Ob die Ovalzellen in Hepatozyten differenzieren ist noch nicht hinreichend geklärt. Eine Arbeit von Holger Willenbring (Malato et al., 2011) hat in verschiedenen Schädigungsmodellen den Ursprung neu gebildeter Hepatozy-

ten verfolgt und kommt zu dem Schluss, dass neu gebildete Hepatozyten in der Leberhomöostase von bereits existierenden Hepatozyten abstammen. Hier konnte gezeigt werden, dass Leberstammzellen auch nach partieller Hepatektomie oder CCl₄-Intoxikation einen kleinen Teil zur Regeneration beitragen können. In dieser Arbeit wurden proliferierende Ovalzellen mit BrdU markiert, um eine Differenzierung in Hepatozyten nachzuweisen. Hier zeigten sich allerdings nur wenige BrdU-positive – und damit von markierten Ovalzellen abstammende – Hepatozyten.

4.2 Das Immunsystem verstärkt die Leberschädigung in Fah^{-/-}-Mäusen

Obwohl in beiden Knock-out Stämmen der gleiche oxidative Stress zu einer Schädigung der Hepatozyten führt, ist in den FCR-Mäusen allgemein eine mildere Hepatitis zu beobachten. Dies wirft die Frage auf, in wie weit das Immunsystem in diesem Modell die Schädigung beschleunigt oder verstärkt. Greten et al. konnte 2004 zeigen, dass eine Aktivierung von NF-κB die Tumorentstehung in Modellen fördert, in denen Entzündungsreaktionen als Promotor für die Krebsentstehung dienen. CCl₄ induziert eine Leberfibrose und Makrophagen sind im Besonderen mit der Narbenbildung in diesem Modell assoziiert. In einem transgenen Mausmodell (CD11b-DTR) konnte gezeigt werden, dass man bei den Makrophagen funktionale Subtypen unterscheiden muss, die nebeneinander im Gewebe existieren aber verschiedene Funktionen in der Schädigungsphase und der Regeneration haben (Duffield, J. 2005). Das Immunsystem kann dabei selbst zur Schädigung beitragen. Durch freie Radikale die von Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet werden, können zusätzliche DNA-Schäden induziert werden. Unter chronischen inflammatorischen Prozessen werden Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und Matrix-Metalloproteinasen gebildet, die zur Angiogenese und zur Neubildung von Geweben führen können. Nicht zuletzt kann das angeborene Immunsystem eine anti-Tumor-Immunantwort des adaptiven Immunsystems unterdrücken.

Das Profil der Immunzellen in der entzündeten Leber der Fah^{-/-}-Mäuse zeichnet sich vor allem durch einen deutlichen Anstieg der NK- und NKT-Zellen und der Myeloiden Zellen aus. Es lässt sich ein moderater Anstieg bei den CD4⁺ T-Zellen erkennen, während es zu keiner B-Zell-Antwort kommt. Hier scheint der initiale Schaden der Hepatozyten das Immunsystem zu aktivieren, was wiederum die Leberschädigung vorantreibt. NKT-Zellen sekretieren eine große Menge an INF-γ, einem Typ-1-Zytokin und IL-4, einem Typ-2-Zytokin (Exley und Koziel, 2004). In den Fah^{-/-}-Mäusen zeigt sich in Übereinstimmung mit der Literatur eine erhöhte Expression von INF-γ (8-fach) und IL-4 (3-fach) auf mRNA-Ebene.

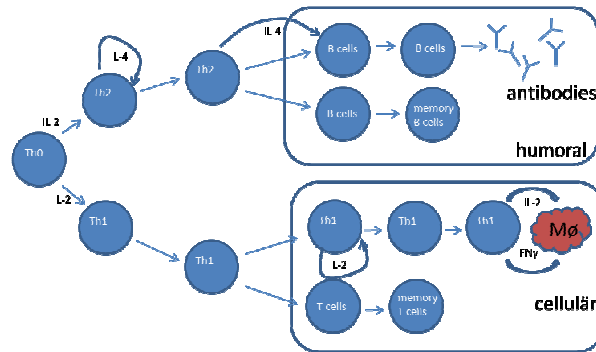


Abbildung 33: Modell zur Aktivierung von Typ-1/ Typ-2 $CD4^+$ T-Helferzellen. Hier sind zwei Typen von Th-Zellen dargestellt. Die Th2-Zellen interagieren mit B-Zellen und lösen so eine humorale Immunantwort aus während die Th1-Zellen eine zelluläre Immunantwort auslösen und zum Beispiel mit Makrophagen interagieren.

Neben $INF-\gamma$ wird auch $TGF\beta$ (14-fach erhöht) gebildet. $INF-\gamma$ wiederum induziert die Bildung von IL-12 (8-fach erhöht). Dies kann in einer Feedback-Schleife die $INF-\gamma$ Sekretion stimulieren. $CD1d$ -reaktive T-Zellen werden auch mit Modellen der Leberschädigung in Verbindung gebracht. Der Verlust von NKT-Zellen, aber auch Mäuse die für $CD1d$ defizient sind, sind unempfindlich gegenüber einem Concanavalin A (Con-A)-induziertem Leberschaden (Toyabe S, 1997 und Takeda K, 2000). $CD4^+$ Th1-Zellen lösen wiederum eine zelluläre Immunantwort aus. Ihre Gegenspieler sind Makrophagen.

Makrophagen nehmen eine Schlüsselrolle in chronischen Entzündungen ein. Es werden dabei zwei Klassen von Makrophagen unterschieden. M1-Makrophagen sind an der sogenannten Typ 1-Reaktion beteiligt. Diese Makrophagen werden klassischerweise durch mikrobielle Produkte aktiviert. Aktivierte M1 Makrophagen produzieren dann wiederum reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffintermediate. M2-Makrophagen werden über einen alternativen Weg aktiviert. Sie regulieren die Entzündungsreaktion. Sie fördern aber auch Zellwachstum und Zellteilung indem sie Wachstumsfaktoren bilden, die Angiogenese unterstützen und die Gewebestruktur verändern (Balkwill, 2005). Vor allem Monozyten und Makrophagen wandern in großer Zahl in die geschädigte Leber der $Fah^{-/-}$ -Mäuse ein während die Makrophagen in den FCR-Mäusen fast vollständig fehlen.

Der initiale Schaden ist in beiden Stämmen gleich, aber nur in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen kann das Immunsystem über NKT-Zellen und Makrophagen aktiviert werden. Dieser zusätzliche inflammatorische Schaden könnte dann zu einer Verstärkung der Hepatitis und vielleicht über reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffintermediate zu zusätzlichen DNA-Schäden in den Hepatozyten führen. Bedingt durch eine Vielzahl von gebildeten Wachstumsfaktoren kommt es in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen zu einer partiellen Regeneration und zum Überleben neoplastischer Zellen. Dies könnte letztlich zur Entstehung eines HCCs beitragen.

Die Bedeutung des Immunsystems an diesem transformierenden Phänotyp wird auch anhand der durchgeführten Transplantationsexperimente ersichtlich. Hier führt der adaptive Transfer von hämatopoetischen Stammzellen, aber auch der Transfer von T-Zellen allein, in die FCR-Mäuse zu einer verstärkten Hepatitis. Dies führt in den FCR-Mäusen nach Transplantation zu einer erhöhten Proliferation von differenzierten Hepatozyten, einer Zunahme der Zellgröße und einer Aktivierung der Leberstammzellen wie sie schon in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen unter zyklischem NTBC-Entzug beobachtet wird. Allerdings wird an diesen Experimenten auch deutlich, dass die Substitution von Immunzellen allein nicht für die Karzinogenese ausreicht. Daher können noch andere Faktoren angenommen werden, die eine Tumorentstehung in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen begünstigen. Hepatozyten können nicht nur als antigenpräsentierende Zellen dienen. Der IL-4-Rezeptor benutzt ebenfalls die common gamma chain als Ko-Rezeptorkette. Neben vielen hämatopoetischen Zellen wird der IL-4-Rezeptor auch auf endothelialen und epithelialen Zellen, Muskelzellen, Fibroblasten und auch auf Hepatozyten exprimiert (Nelms *et al.* 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Leberkrebszelllinien für IL-4 sensitiv sind. IL-4 inhibiert die Expression von Hepatitis B-Oberflächenantigenen und dem Hepatitis Be-Antigen in stabil transfizierten HepG2.2.15 Zellen (Yao 2011). Die erhöhte Expression von IL-2 und seiner drei Rezeptorketten hat einen direkten Effekt auf die Entstehung von Brustkrebs und die Malignität dieser Tumore (García-Tuñón, 2004). Ähnliche Zusammenhänge werden auch für die Rezeptoren von IL-7 und IL-15 diskutiert. Dies legt nahe, dass auch die Signalweiterleitung über die c_γ -Ko-Rezeptorkette auf transformierte Zellen eine entscheidende Rolle spielen könnte.

4.3. Tumorentstehung in $Fah^{-/-}$ -Mäusen.

Die Hepatitis führt zu einer beschleunigten Krebsentstehung in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen. Erste Tumore wurden in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen bereits nach zwei Monaten beobachtet, die Tumorzinzidenz lag nach vier Monaten bei 100%. In einem Modell der chemisch-induzierten Karzinogenese konnte an $c-Jun^{\Delta li}$ -Mäusen gezeigt werden, dass der Knock-out von c-Jun die Tumorbildung deutlich verringert. Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass c-Jun die Tumorzellen nach der Initiations-Phase vor Apoptose schützt. Für die weitere Tumorprogression ist c-Jun nicht entscheidend (Eferl *et al.* 2003). Der zyklische Entzug von NTBC führt in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen zu einem erhöhten Level von c-Jun im Vergleich zu den FCR-Mäusen. Außerdem konnte in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen keine apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Eferl konnte auch zeigen, dass c-Jun der pro-apoptotischen Wirkung von p53 entgegenwirkt. In der semiquantitativen RT-PCR konnte gezeigt werden, dass p53 stärker in den FCR-Mäusen induziert ist. Diese Mäuse entwickeln keinen Tumor und zeigen ebenfalls eine stärkere Expression von p21 auf mRNA- und Proteinebene.

Hier kann eventuell ein Initiator für die Tumorentstehung in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen liegen.

Neben Genen die ihr Rolle in der Zellzyklusregulation haben, sind in den entzündeten Lebern der $Fah^{-/-}$ -Mäuse auch Komponenten des Wnt/ β -Catenin Signalweges hochreguliert. Dieser Signalweg ist in Krebszellen vieler Gewebe, darunter auch dem HCC, fehlreguliert (Coulouarn, 2012 und Lee 2006). Nach Wnt-Ligandenbindung an Frizzled-Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung von Dishevelled. Dishevelled wiederum inaktiviert den Komplex aus GSK3 β / APC/ Axin und verhindert die Phosphorylierung von β -Catenin durch die GSK3 β . Dadurch wird β -Catenin nicht mehr degradiert und sammelt sich intrazellulär an bzw. kann in den Zellkern translozieren (Seidensticker, 2000). Zwei Mitglieder der Wnt-Familie zeigen in den $Fah^{-/-}$ -Mäusen eine deutliche differentielle Regulation. Wnt4 und Wnt10a sind zehnfach, bzw. mehr als 250-fach hochreguliert. Und lassen daher eine Fehlregulation des Wnt/ β -Catenin Signalweges vermuten. Einige Zielgene des Wnt/ β -Catenin Signalweges beeinflussen maßgeblich das Zellwachstum und den Zellzyklus, wie beispielsweise Cyclin D1, c-Jun, fra-1 und WISP-1, oder sind an einem invasiven Charakter von Tumoren beteiligt, wie etwa MMP7 und VEGF (Giles, 2003). Die Zielgene Cyclin D1 und c-Jun zeigen eine deutlich stärkere Induktion auf Proteinebene in den geschädigten $Fah^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den FCR-Mäusen. Die Expression der mRNA für verschiedene Matrix-Metalloproteinasen sind zwischen den $Fah^{-/-}$ -Mäusen und den FCR-Mäusen differenziell reguliert. Die $Fah^{-/-}$ -Mäuse zeigen eine deutlich stärkere Expression von MMP7, MMP9 und MMP12. MMP7 zum Beispiel wird auch als Zielgen für eine EpCam-vermittelte Signalweiterleitung beschrieben. EpCam ist in diesem Model auf mRNA-Ebene doppelt so stark in den geschädigten $Fah^{-/-}$ -Mäusen induziert wie in den Lebern der FCR-Mäuse. EpCam hat ebenfalls wichtige Funktionen in zellulären Prozessen wie etwa der Zelladhäsion, -migration und -proliferation. Eine Überexpression beider Gene wird mit der Tumorentstehung in verschiedenen Geweben in Verbindung gebracht (Denzel 2012).

Fazit

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die zweifache Rolle des Immunsystems im Rahmen einer chronischen Lebererkrankung gezeigt werden. Auf der einen Seite ist es für das Überleben der Mäuse und eine effiziente Leberregeneration wichtig, auf der anderen Seite trägt es entscheidend zur Leberschädigung und daher langfristig zur Tumorentwicklung bei. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht ein einzelner Zelltyp für die Leberschädigung und die Tumorentstehung verantwortlich ist, sondern dass ein Zusammenwirken von

Komponenten des Angeborenen und des Adaptiven Immunsystems notwendig ist. Ein besseres Verständnis dieser unterschiedlichen Prozesse wird in der Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten zur Verhinderung und auch Therapie von Tumorerkrankungen eröffnen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt als erstes meinem Betreuer Prof. Dr. med. Arndt Vogel für das Thema meiner Doktorarbeit und für seine liebevolle Betreuung.

Danke Arndt

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. M. P. Manns, das er mich in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule Hannover aufgenommen hat.

Natürlich möchte ich auch meine Kooperationspartner, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, an dieser Stelle dankend erwähnen.

PD Dr. Thomas Lon-
gerich
Institute of Pathology
University Hospital Im
Neuenheimer Feld
224 69120 Heidelberg

Dr. Robert Geffers
Genomanalytik
(GMAK)/ Genregula-
tion und Diffe-
renzierung (RDIF)
HCI-Helmholtz Centre
for Infection Research
Inhoffenstrasse 7
38124 Braunschweig

Udayan Apte, PhD,
DABT Assistant Pro-
fessor
Department of Phar-
macology, Toxicology
and Therapeutics
University of Kansas
Medical Center

In vielerlei Hinsicht gilt mein besonderer Dank der gesamten Arbeitsgruppe von Dr. Vogel, meinen Kolleginnen und wertvollen Freundinnen. Sie alle seien hier namentlich erwähnt. Dr. Jutta Schütt, Dr. Laura Elisa Buitrago-Molina, Dr. Silke Marhenke, Kirstin Hanak, Johanna Orlik, Dr. Martha Kirstein, Dr. Nora Schweizer und Meriam Nassiri. Sie haben mich unterstützt, mir den Rücken gestärkt und mich motiviert.

Danke Mädels!

Meinen lieben Eltern, Regine und meinem wunderbaren Mann möchte ich ebenfalls von ganzem Herzen für ihre Unterstützung danken.

Danke für die schöne Zeit

Anhang

A Expressionsanalysen

Tabelle 15: relative Expression von Genen

Sample name	name	description	Fold change Fah*	Fold change FCR**
A_51_P452876	Ak1	adenylate kinase 1	11,8	2,4
A_52_P214134	Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase	23,6	4,4
A_52_P512955	Anln	anillin, actin binding protein	32,4	5,5
A_52_P646684	Ano9	anoctamin 9	20,8	2,7
A_51_P432380	Aplp1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1	13,3	5,3
A_52_P482897	Areg	amphiregulin	47,6	5,6
A_51_P409496	Arhgap11a	Rho GTPase activating protein 11A	15,4	5,2
A_51_P422625	Arl11	ADP-ribosylation factor-like 11	12,4	4,0
A_52_P260696	Arnt2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (15,1	6,2
A_51_P217778	Aspm	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	38,2	3,9
A_51_P189121	Atp2c2	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 2	14,1	3,2
A_51_P212038	Atp6v0e2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit E2	17,3	4,6
A_51_P167410	Bglap-rs1	bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1	22,6	5,6
A_51_P230103	Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5	42,3	8,9
A_51_P475523	Brcal	breast cancer 1	11,4	2,6
A_51_P421559	Bspry	B-box and SPRY domain containing	31,3	5,7
A_51_P490509	Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	15,7	7,0
A_52_P405177	Clqtnf6	Clq and tumor necrosis factor related protein 6	11,9	5,7
A_52_P474089	Capn6	calpain 6	16,7	3,1
A_51_P455647	Car2	carbonic anhydrase 2	19,1	4,3
A_51_P317031	Ccdc109b	coiled-coil domain containing 109B	10,7	3,3
A_51_P471362	Ccdc64b	coiled-coil domain containing 64B	10,9	1,4
A_52_P145993	Ccdc74a	coiled-coil domain containing 74A	12,4	5,7
A_51_P114462	Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	17,3	2,6
A_51_P408595	Ccl20	chemokine (C-C motif) ligand 20	13,0	3,2
A_51_P464703	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	15,9	5,2
A_51_P481920	Cena2	cyclin A2	25,2	6,3
A_51_P171382	CD163l1	CD163 molecule-like 1	11,8	-1,8
A_51_P474431	Cdc25b	cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)	10,6	2,3
A_52_P211223	Cdca2	cell division cycle associated 2 Gene	12,9	2,8
A_51_P155142	Cdca8	cell division cycle associated 8	11,2	4,4
A_51_P173114	Cdhr1	cadherin-related family member 1	11,1	1,3
A_51_P275101	Chst11	carbohydrate sulfotransferase 11	19,1	4,8
A_51_P165185	Cldn7	claudin 7	58,1	4,1
A_52_P549190	Cldn8	claudin 8	11,8	4,1
A_52_P447284	Clic6	chloride intracellular channel 6 (16,5	4,8
A_52_P108845	Clip3	CAP-GLY domain containing linker protein 3	12,3	4,7
A_52_P476075	Clspn	claspin homolog (Xenopus laevis)	18,3	6,1
A_51_P514029	Cma1	chymase 1, mast cell	96,1	1,8
A_51_P145130	Cma2	chymase 2, mast cell	47,4	-1,0
A_51_P182303	Col1a2	collagen, type I, alpha 2	13,2	3,4
A_51_P214127	Cpa3	carboxypeptidase A3, mast cell	517,1	5,6
A_51_P438841	Ctnna2	catenin (cadherin associated protein), alpha 2	10,3	1,9
A_51_P180463	Cux2	cut-like homeobox 2	26,6	6,7
A_51_P140017	Cyslrl1	cysteiny1 leukotriene receptor 1	14,1	5,3
A_51_P122649	Dege2	degenerative spermatocyte homolog 2 (Drosophila), lipid desaturase	23,2	4,5
A_52_P220176	Dkk3	Mus musculus dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	10,9	8,5
A_52_P411003	Dlgap5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	16,8	3,8
A_51_P219868	Dnm1	dynamin 1	16,5	4,7
A_51_P115441	Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3	12,1	1,3
A_52_P362603	Dscc1	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)	15,5	4,6
A_51_P337655	Dsn1	MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	10,2	1,6
A_52_P14686	Dtl	denticleless homolog (Drosophila)	14,9	6,9
A_52_P609918	Ehf	ets homologous factor	28,0	5,1
A_52_P10622	Emb	embigin	21,3	5,1
A_51_P513898	Epb4.114a	erythrocyte protein band 4.1-like 4a	13,9	2,9
A_52_P447944	EpCam	Mus musculus epithelial cell adhesion molecule	19,8	9,4

A_51_P123134	Ercc6l	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 - like	12,6	8,1
A_52_P79821	Esrp1	epithelial splicing regulatory protein 1	27,7	1,4
A_52_P329207	Expi	extracellular proteinase inhibitor	20,8	5,6
A_51_P467798	Fam129a	family with sequence similarity 129, member A	20,1	5,0
A_51_P502357	Fam163a	family with sequence similarity 163, member A	22,6	3,1
A_51_P511250	Fam46b	family with sequence similarity 46, member B	13,0	3,4
A_51_P455897	Fam64a	family with sequence similarity 64, member A	20,7	2,3
A_51_P273556	Fam83d	family with sequence similarity 83, member D	24,9	6,8
A_52_P66205	Fancd2	Fanconi anemia, complementation group D2	10,9	4,4
A_51_P309370	Fblim1	filamin binding LIM protein 1	23,9	2,6
A_51_P289341	Fermt1	fermitin family homolog 1 (Drosophila)	19,8	3,8
A_51_P269404	Fmo3	flavin containing monooxygenase 3	59,9	4,5
A_51_P456870	Foxj1	forkhead box J1	43,5	3,7
A_52_P28806	Foxm1	forkhead box M1	13,57	6,8
A_51_P286748	Frzb	Mus musculus frizzled-related protein	10,8	12,7
A_51_P149422	Gng13	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13	14,8	3,3
A_51_P127695	Greb1	gene regulated by estrogen in breast cancer protein	13,2	1,2
A_52_P68221	Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	10,8	4,7
A_51_P494744	Grip1	glutamate receptor interacting protein 1	24,9	5,6
A_51_P183414	Guca2b	guanylate cyclase activator 2b (retina)	18,7	1,5
A_52_P93393	Gxylt2	glucoside xylosyltransferase 2	16,7	1,4
A_51_P159612	Hebp2	heme binding protein 2	23,6	3,4
A_51_P351970	Hells	helicase, lymphoid specific	10,2	3,6
A_52_P435080	Hgf	hepatocyte growth factor	11,7	7,0
A_52_P536796	Hpgds	hematopoietic prostaglandin D synthase	21,3	7,1
A_52_P599317	Hs6st2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	31,7	3,5
A_52_P957659	Igkv1-117	IgK processed chain	19,6	-1,2
A_52_P383114	Igl-V1	anti-deoxyribovalenol scFv lambda light chain variable region	13,8	-1,4
A_52_P443701	Igsf9	immunoglobulin superfamily, member 9	13,5	2,4
A_52_P484194	Il1rl1	interleukin 1 receptor-like 1	25,2	1,2
A_51_P228658	Isyna1	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	11,1	3,8
A_51_P103007	Itgam	integrin alpha M	12,2	5,3
A_51_P303424	Itgax	integrin alpha X	28,3	5,3
A_51_P153132	Kcne2	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 2	54,7	4,2
A_52_P319774	Kcnip4	Kv channel interacting protein 4	15,4	-1,2
A_52_P473966	Kdelr3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	25,1	7,2
A_52_P227391	Kif15	kinesin family member 15	19,9	5,8
A_52_P49378	Kif1a	kinesin family member 1A	20,2	4,9
A_51_P133138	Kif20a	mRNA for rabkinesin-6.	22,8	8,8
A_51_P493467	Kif22	kinesin family member 22	12,1	5,6
A_52_P27602	Kif23	kinesin family member 23	46,6	8,6
A_51_P135092	Kif2c	kinesin family member 2C	17,6	4,8
A_51_P254805	Kif4	kinesin family member 4	21,4	3,0
A_51_P154753	Klc3	kinesin light chain 3	13,7	7,3
A_51_P356642	Krt19	keratin 19	12,7	4,6
A_52_P331762	Lmo1	LIM domain only 1	20,8	7,0
A_51_P194306	Lrrc1	leucine rich repeat containing	12,1	3,0
A_51_P233101	Ltbp3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	11,7	3,0
A_51_P128667	Lynx1	Ly6/neurotoxin 1	12,4	3,9
A_51_P243514	Macc1	metastasis associated in colon cancer 1	35,1	3,0
A_51_P230873	Mad2l1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	11,1	3,5
A_52_P996341	Mast1	microtubule associated serine/threonine kinase-like	12,1	2,3
A_52_P254908	Mcf2l	mcf.2 transforming sequence-like	15,3	5,9
A_51_P145132	Mcpt4	mast cell protease 4	74,2	1,5
A_52_P99341	Meg3	maternally expressed 3	48,1	3,2
A_52_P706060	Mex3a	mex3 homolog A (C. elegans)	19,8	5,1
A_51_P241791	Mlf1ip	myeloid leukemia factor 1 interacting protein	10,9	4,1
A_51_P426096	Mmp7	matrix metalloproteinase 7	83,4	22,9
A_52_P507214	Mmp9	matrix metalloproteinase 9	12,6	4,8
A_51_P313674	MMP12	matrix metalloproteinase 12	45,5	9,6
A_51_P389650	Mrgprb2	MAS-related GPR, member B2	16,4	1,3
A_51_P375543	Myb	myeloblastosis oncogene	11,8	3,7
A_51_P488368	Myot	myotilin	15,8	-1,2
A_52_P613255	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1	13,3	2,0
A_52_P363039	Ncaph	non-SMC condensin I complex, subunit H	13,1	1,9
A_52_P251366	Neil3	nei like 3 (E. coli)	19,3	6,2
A_51_P232868	Neur11B	neuralized homolog 1B (Drosophila)	18,4	4,4
A_51_P339055	Nipal2	NIPA-like domain containing 2	13,3	1,0
A_52_P670978	Nkain1	Na+/K+ transporting ATPase interacting 1	10,2	1,3
A_52_P529570	Nsl1	NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	11,3	6,3
A_51_P513682	Nuf2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	23,8	7,0
A_52_P642453	Obscn	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting	19,8	2,5

		RhoGEF		
A_52_P144368	Odz4	odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)	20,1	2,4
A_51_P107326	Oxct1	3-oxoacid CoA transferase 1	11,75	2,3
A_51_P280117	Padi2	peptidyl arginine deiminase, type II	36,8	7,1
A_52_P264790	Pdgfd	platelet-derived growth factor, D polypeptide	16,3	2,3
A_51_P463428	Pik3ip1	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	26,0	3,8
A_51_P312360	Pkmyt1	MYT1 kinase	11,4	7,1
A_52_P240036	Plch1	phospholipase C, eta 1	17,4	5,9
A_51_P396570	Plod2	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	10,7	3,1
A_51_P256706	Psmc3ip	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3, interacting protein	13,6	3,6
A_51_P167360	Ptpn7	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	11,5	4,5
A_52_P149577	Rab25	RAB25, member RAS oncogene family	12,4	2,0
A_51_P243750	Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1	45,92	6,7
A_51_P148105	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	25,3	5,6
A_51_P188772	Rgnef	Rho-guanine nucleotide exchange factor	15,9	6,4
A_52_P244	Rian	RNA imprinted and accumulated in nucleus	10,1	2,1
A_51_P419226	S100a14	S100 calcium binding protein A14	18,5	2,1
A_51_P208083	S100b	S100 protein, beta polypeptide, neural	15,6	5,6
A_52_P527977	Sdk2	sidekick homolog 2 (chicken)		
A_51_P487999	Sgol1	shugoshin-like 1 (S. pombe)		
A_51_P238523	Shisa4	shisa homolog 4 (Xenopus laevis)	13,2	1,9
A_52_P105040	Slc25a4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 4	10,5	3,2
A_51_P304607	Slc5a9	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9	18,7	4,1
A_51_P110088	Slc9a7	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 7	11,0	4,5
A_51_P513530	Spag5	sperm associated antigen 5	26,6	5,9
A_51_P210510	Sparc11	SPARC-like 1	12,8	5,4
A_51_P421790	Spdef	SAM pointed domain containing ets transcription factor	10,1	2,3
A_52_P509886	Spint1	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	54,9	5,7
A_51_P123676	Synpo	synaptopodin	20,3	3,3
A_51_P220222	Tacc3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	12,5	4,2
A_51_P218335	Tbx1	T-box 1	55,9	4,4
A_51_P317640	Tgfb2	transforming growth factor, beta 2	14,2	2,4
A_51_P154379	Tmem150c	transmembrane protein 150C	10,2	-1,2
A_51_P419711	Tmsb10	thymosin, beta 10	11,9	6,5
A_51_P385099	Tnf	tumor necrosis factor	10,8	3,7
A_52_P167411	Tnk1	tyrosine kinase, non-receptor, 1	23,3	1,9
A_52_P254155	Tpsb2	tryptase beta 2	42,0	2,9
A_51_P258721	Tpsg1	tryptase gamma 1	42,7	7,5
A_51_P256246	Tspan13	tetraspanin 13	13,5	4,4
A_51_P473272	Tspan6	tetraspanin 6	10,1	3,5
A_52_P306744	Tspan8	tetraspanin 8	22,4	7,0
A_51_P491742	Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	29,0	7,8
A_51_P309234	Vgll3	vestigial like 3 (Drosophila)	15,0	3,6
A_51_P381409	Vil1	villin 1	37,8	4,8
A_51_P342773	Vipr2	vasoactive intestinal peptide receptor 2	13,0	2,0
A_51_P372456	Wdr86	WD repeat domain 86	15,9	2,0
A_51_P390804	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	11,5	4,9
A_51_P171616	Wnt10a	wingless related MMTV integration site 10a	253,7	14,37
A_51_P130475	Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4	24,6	5,8
A_51_P231958	Zwilch	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)	10,5	4,0

* relativer Anstieg der Expression in den Fah 2xoff/off bezogen auf die Fah 100% Kontrollen ** relativer Anstieg der Expression in den FCR 2xoff/off bezogen auf die FCR 100% Kontrollen

Tabelle 16: Zellzyklusregulierende Gene

Sample name	name	description	Fold change Fah*	Fold change FCR**
A_51_P262766	Ccnd1	cyclin D1	23,6	8,2
A_52_P558401	Ccnb	cyclin B1	36,8	13,7
A_52_P558401	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	2,7	22,1
A_52_P371108	Cdc6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	32,0	13,9
A_51_P450033	Cdk1	cyclin-dependent kinase 1	42,6	7,1
A_51_P312360	Myt1	MYT1 kinase	11,4	7,1
A_52_P110534	Ttk	Ttk protein kinase	35,9	8,9
A_51_P230873	Mad21l	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	9.479216	3.227611
A_51_P490509	Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta	15,7	6,9
A_51_P361022	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	37.673580	9.288904
A_51_P344566	Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	30.204220	5.339802

* relativer Anstieg der Expression in den Fah 2xoff/off bezogen auf die Fah 100% Kontrollen ** relativer Anstieg der Expression in den FCR 2xoff/off bezogen auf die FCR 100% Kontrollen

Tabelle 17: Gene in der Kontrolle von DNA-Schäden

Sample name	name	description	Fold change Fah*	Fold change FCR**
A_52_P611538	Atr	ataxia telangiectasia and Rad3 related	1,7	1,2
A_52_P400509	Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog	1,1	1,2
A_51_P326499	Chek1	checkpoint kinase 1 homolog	9,2	9,7
A_51_P137111	Chek2	CHK2 checkpoint homolog	5,9	1,6
A_51_P475523	Brca1	breast cancer 1	11,4	2,6
A_51_P363947	Cdkn1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	1,7	14,5
A_52_P469842	Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	2,0	1,0
A_52_P650259	Noxa1	NADPH oxidase activator 1	2,7	1,0
A_51_P296608	Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	3,6	2,1
A_52_P282729	Cdc25a	cell division cycle 25 homolog A	5,9	-1,0
A_51_P474431	Cdc25b	cell division cycle 25 homolog B	12,6	2,4
A_51_P279575	Cdc25c	cell division cycle 25 homolog C	1,5	-1,8

* relativer Anstieg der Expression in den Fah 2xoff/off bezogen auf die Fah 100% Kontrollen ** relativer Anstieg der Expression in den FCR 2xoff/off bezogen auf die FCR 100% Kontrollen

B Real-time RT-PCR-Analysen

Tabelle 18: Chemokine, Zytokine und deren Rezeptoren

name	Fold change Fah*	Fold change FCR**	Fold change controls***
Aimp1	2.5847	-1.5519	3.1383
Aplnr	1.7532	-4.0000	1.3947
Bdnf	1.6935	-8.8766	-1.1647
Bmp1	41.1266	-5.1124	1.3947
Bmp10	38.0546	-1.0526	-1.1647
Bmp15	1.6495	-1.5476	2.0139
Bmp2	37.2715	-1.2518	-1.6702
Bmp3	34.3443	-2.0195	-1.0353
Bmp4	27.2843	-2.9160	2.0139
Bmp5	25.2813	-1.3324	1.0644
Bmp6	23.9176	1.5011	1.1975
Bmp7	23.5883	-4.2398	7.2100
Bmp8b	22.6274	64.2667	-1.1647
Ccbp2	1.6381	-1.9319	1.1975
Ccl1	1.6155	1.3104	7.2100
Ccl11	1.5823	1.0718	-1.1647
Ccl12	1.5052	9.7136	1.3472
Ccl17	1.4763	3.4343	1.7411
Ccl19	1.4763	2.2038	-1.4540
Ccl2	1.4763	7.3107	1.8025
Ccl20	1.4661	4.3772	-1.5583
Ccl4	1.4459	4.9246	3.6553
Ccl5	1.4044	2.6759	8.0556
Ccl6	1.3851	11.5514	-1.4241
Ccl7	1.3775	13.2691	1.3195
Ccl8	1.3660	5.9794	-1.6021
Ccl9	1.3398	1.0943	2.0705
Ccr1	1.3398	12.0420	1.7777
Ccr10	-1.9159	-1.2483	-2.4453
Ccr11	1.3122	-1.7411	1.8150
Ccr2	1.3031	1.9862	-2.0994
Ccr3	1.3013	2.7321	-1.5369
Ccr4	1.2746	-1.0867	2.4623
Ccr5	1.2142	3.4343	1.5911
Ccr6	1.2075	2.0849	1.5801
Ccr7	1.1583	1.1728	-1.8404
Ccr8	1.1567	-1.0570	4.5631
Ccr9	1.0807	-3.0738	1.3104
Ccr11	1.0658	-3.3404	2.6027
Ccr12	1.0585	2.6390	1.9053
Cd40lg	2.0307	-1.7703	-4.9933
Cd70	1.9889	-1.2781	-1.5369

Cmklr1	-1.0629	2.3784	-46.2057
Cmtm2a	1.0512	-9.9177	2.2346
Cmtm3	1.0084	1.2834	1.5476
Cmtm4	-1.0267	-1.9053	2.1435
Cmtm5	-1.0353	-2.4623	1.0140
Cmtm6	-1.0497	-4.9246	2.2974
Csf1	22.0087	1.0253	1.3472
Csf1	-1.1004	-1.3472	2.3784
Csf2	20.4213	-1.3232	1.7411
Csf2	-1.1096	2.3950	1.1810
Ctfl IL6 famely memeber	19.6983	-3.3729	-1.4540
Ctf2	19.5622	-1.8712	1.8025
Cx3cl1	-1.1173	1.2311	2.4967
Cx3cr1	-1.1235	1.4641	2.3950
Cxcl1	-1.1313	-2.7321	2.1435
Cxcl10	-1.1471	2.8679	1.1487
Cxcl11	-1.1487	-2.1140	-1.5369
Cxcl12	-1.1810	-5.7358	1.1975
Cxcl13	-1.2397	-1.2483	-1.0210
Cxcl15	-1.2553	-4.0000	2.4794
Cxcl2	-1.2995	42.8137	1.7901
Cxcl5	-1.3195	21.2590	-1.0281
Cxcl9	-1.4241	-1.4241	3.2266
Cxcr1	-2.2974	4.1989	3.1383
Cxcr2	-2.2974	10.3388	3.0738
Cxcr3	-1.5136	-1.7654	1.0943
Cxcr4	-1.5562	2.5847	1.1173
Cxcr5	1.6609	-2.0279	-1.6702
Cxcr6	-1.6679	-2.4794	2.3134
Cxcr7	-1.0943	3.8106	1.8150
Fasl	18.5070	15.7360	-1.5583
Fbrs	17.7531	-6.5161	3.6553
Fgfl10	16.0000	-1.9239	8.0556
Flt3l	15.4764	-4.3289	-1.4241
Gdf1	15.0324	1.4399	1.3195
Gdf10	14.9285	1.6540	-1.6021
Gdf11	14.8254	1.1615	2.0705
Gdf15	14.5203	3.0022	1.7777
Gdf2	11.9588	-1.4990	1.8150
Gdf3	11.4716	3.1954	-2.0994
Gdf5	-1.8000	-4.0000	3.4105
Gdf9	10.0561	2.5775	1.5911
Gpr81	-2.0000	1.3472	-3.0525
Hif1a	-2.0420	2.2191	3.2043
Hprt	1.8277	1.1219	1.2483
Hsp90ab1	1.8150	-1.9643	1.4948
Ifna2	9.5798	-1.6290	1.5801
Ifna4	9.1388	2.5597	-1.8404
Ifnb1	8.9383	2.1675	4.5631
Ifng	8.6458	-1.3050	1.3104
Il10	8.5861	45.7595	2.6027
Il11	8.4679	1.8609	1.9053
Il12b	8.2249	-2.4521	2.2346
Il13	8.1229	2.6135	1.5476
Il15	7.8354	-1.1925	2.1435
Il16	6.9644	1.2193	1.0140
Il17b	6.6438	-1.1680	2.2974
Il17c	6.4980	22.4089	-46.2057
Il17f	6.0713	-1.0600	2.3784
Il18	5.7757	-6.3379	1.1810
Il19	5.7041	-1.6290	2.4967
Il1a	5.5867	1.6088	2.3950
Il1b	5.3591	5.4490	2.1435
Il1f10	5.3147	1.0541	1.1487
Il1f5	5.2054	-1.0454	-1.5369
Il1f6	4.9657	2.1525	1.1975
Il1f8	4.9588	2.0083	-1.0210
Il1f9	4.9246	20.4780	2.4794
Il1rn	4.8232	1.5977	1.7901
Il2	4.6978	-2.1495	3.6050
Il20	4.5065	-2.4351	-1.0281
Il21	4.1989	-1.7826	-1.5369
Il24	3.8637	-1.0526	3.2266
Il25	6.1988	-2.4016	1.8150
Il27	3.7895	-1.0526	1.0943
Il3	3.5064	1.1859	1.1173

Ii4	3.3450	1.8480	2.3134
Ii7	3.3219	2.9814	2.2191
Ii9	3.2310	1.4600	3.4105
Inha	3.0568	6.4800	-2.4453
Inhba	2.9938	-5.2927	-3.0525
Inhbb	-2.3457	13.6422	2.0849
Lefty1	2.9897	1.2277	3.2043
Lif	2.8521	14.0841	-1.5157
Lta	2.8128	-1.0973	2.2815
Ltb	2.8089	-1.4886	-1.5263
Ltb4r2	-2.8639	1.4845	-1.4540
Mif	2.7321	-1.6632	2.2974
Mmp2	-2.8639	4.2281	1.2397
Mstn	10.0561	-3.0610	2.4623
Pf4	-1.3177	4.2871	3.6050
Ppbb	-1.3947	-2.0562	-1.5369
Scgb3a1	2.6063	1.1219	1.9319
Tnf	2.5527	3.5950	3.0738
Tnfrsf11b	2.5001	-1.1680	2.2038
Tnfsf10	2.4829	-2.0619	2.0849
Tnfsf11	2.4116	1.3623	-1.5369
Tnfsf12	2.3983	-2.2879	-1.4540
Tnfsf13	2.3817	1.1535	1.2397
Tnfsf13b	2.2815	3.5950	-1.4142
Tnfsf14	2.2377	1.9534	1.3013
Tnfsf15	2.0591	-4.9041	8.8152
Tnfsf18	2.0591	1.1065	1.1810
Tnfsf4	2.0307	-1.7703	-1.5369
Tnfsf8	1.9752	4.1872	1.1728
Tnfsf9	1.9616	14.6822	2.6574
Txlna	1.8817	-2.4183	2.2191
Tymp	-1.7267	-5.9381	2.2191

* relativer Anstieg der Expression in den Fah 2xoff/off bezogen auf die Fah 100% Kontrollen ** relativer Anstieg der Expression in den FCR 2xoff/off bezogen auf die FCR 100% Kontrollen *** relativer Anstieg der Expression in den FCR 100% Kontrollen bezogen auf die Fah 100% Kontrollen

C Zellzyklusregulation

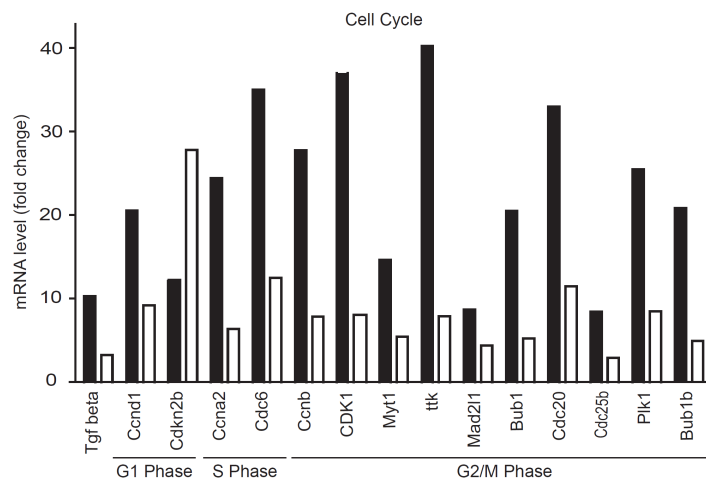


Abbildung 34: Relative Expression zellzyklusregulierender Gene in den Fah^{-/-}- und FCR-Mäusen.

Literaturverzeichnis

- Adams, J.M. and Cory, S. (2007). The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy. *Oncogene*, Vol. 26(9), pp.1324-1337.
- Alison, M. R., Nicholson, L. J. And Lin, W. R (2011). Chronic Inflammation and Hepatocellular Carcinoma. *Recent Results Cancer Res*, Vol. 185, pp. 135-148
- Balkwill, F. Charles, K. E. and Mantovani, A. (2005). Smoldering and Polarized Inflammation in the Initiation and Promotion of Malignant Disease. *Cancer Cell*, Vol. 7, pp. 211-217.
- Batista, A., Harwood, N. E. (2009). The Who, How and Where of Antigen Presentation to B Cells. *Nat Rev Immunol*, Vol. 9(1), pp. 15-27.
- Befeler, A. S., and Di Bisceglie, A. M. (2002). Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment. *Gastroenterology*, Vol. 122, pp. 1609-19.
- Brooking, J. T., Campbell, J. S., Mitchell, C., Yeoh, G. C., and Fausto, N. (2005). Differential Regulation of Rodent Hepatocytes and Oval Cell Proliferation by Interferon γ . *Hepatology*, Vol. 41, No. 4, pp. 906-915.
- Buitrago-Molina, L. E. et al. (2009). Rapamycin Delays Tumor Development in Murine Livers by Inhibiting Proliferation of Hepatocytes with DNA Damage. *Hepatology*, Vol. 50, No.2, pp. 500-509.
- Coulouarn, C. *et al.* (2012). Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinomas Exhibit Progenitor Features and Activation of Wnt and TGF β Signaling Pathways. *Carcinogenesis*, Vol. 33, pp. 1791-1796.
- Cooper, M.D., Peterson, R.D., and Good, R.A. (1965). Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid System of the Chicken. *Nature*, Vol. 205, pp. 143-146.
- Cooper, M.D. (2010). A Life of Adventure in Immunology. *Annu Rev Immunol*, Vol. 28, pp.1-19.
- Denzel, S., Mack, B., Eggert, C., Massoner, P., Stöcklein, N., Kemming, D., Harréus, U. and Gires, O. (2012). MMP7 is a target of the tumour-associated antigen EpCAM. *Int. J. of Exp. Pathology*, Vol. 93, pp. 341–353.
- Dolberg, D. S., and Bissell, M. J. (1984). Inability of Rous Sarcoma Virus to Cause Sarcoma in the Avian Embryo. *Nature*, Vol. 309, pp. 552-556

- Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, M. Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., and Iredale J. P. (2005). Selective Depletion of Macrophages Reveals Distinct, Opposing Roles During Liver Injury and Repair. *J. Clin. Invest.*, Vol. 115, pp. 56-65.
- Eferl, R., Ricci, R. Kenner, L., Zenz, R., David, J.-P., Rath, M. and Wagner, E. F. (2003). Liver Tumor Development: c-Jun Antagonizes the Proapoptotic Activity of p53. *Cell*, Vol. 112, pp. 181-192.
- El-Serag, H. B., Davila, J. A., Petersen, N. J., and McGlynn, K. A. (2003). The Continuing Increase in the Incidence of Hepatocellular Carcinoma in the United States: an Update. *Ann Intern Med* Vol. 139, pp. 817-23.
- El-Serag, H. B., and Mason, A. C. (1999). Rising Incidence of Hepatocellular Carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 340, pp. 745-50.
- Exley, M. A., and Koziel, M. J. (2004). To Be or Not to Be NKT: Natural Killer T Cells in the Liver. *Hepatology*, Vol. 40, No. 5, pp. 1033-1040.
- Folkman, J., and Kalluri, R. (2004). Cancer without Disease. *Nature*, Vol. 427, pp. 787.
- Frank, B., Hoffmeister, M., Klopp, N., Illig, T., Chang-Claude, J. and Brenner, H. (2010). Polymorphisms in the inflammatory Pathway genes and their Association with Colorectal Cancer Risk. *Int. j. Cancer*, Vol. 127, pp. 2822-2830.
- Gao, B., Jeong, W. and Tian, Z. (2008). Liver: An Organ with Predominant Innate Immunity. *Hepatology*, Vol. 47, pp. 729-736.
- García-Tuñón, I., Ricote, M., Ruiz, A., Fraile, B., Paniagua, R., and Royuela, M. (2004). Interleukin-2 and its Receptor Complex (α , β and γ chains) in in situ and infiltrative Human Breast Cancer: an Immunohistochemical Comparative Study. *Breast Cancer Research* Vol. 6, No 1, pp.R1-R7.
- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. (2001). Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 286, pp. 433-442.
- Gielchinsky, Y., Laufer, N., Weitman, E., Abramovitch, R., Granot, Z., Bergman, Y., and Pikarsky, E. (2010). Pregnancy Restores the Regenerative Capacity of the Aged Liver via Activation of an mTORC1-Controlled Hyperplasia/Hypertrophy Switch. *Genes & Development*, Vol. 24, pp. 543–548.
- Giles, R. H., van Es, J. H., Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt Storm: Wnt Signaling in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1653, pp. 1-24.

- Gjessing, L. R., Taniguchi, K. (1965). Studies on Tyrosinosis: 2, Activity of the Transaminas, Parahydroxyphenyl-pyruvat Oxidase, and Homogenic-acid Oxidase. *Brit. Med. J.* Vol., 1, pp. 968-969.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J., Li, Z., Engan, L. J., Kagnoff, M. F., Karin, M. (2004). IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell*, Vol. 118, pp. 285-296.
- Grompe, M. (2001). The Pathophysiology and Treatment of Hereditary Tyrosinemia Type 1. *Semin Liver Dis* 21, pp. 563-71.
- Grompe, M., al-Dhalimy, M., Finegold, M., Ou, C. N., Burlingame, T., Kennaway, N. G., and Soriano, P. (1993). Loss of Fumarylacetoacetate Hydrolase is Responsible for the Neonatal Hepatic Dysfunction Phenotype of Lethal Albino Mice. *Genes Dev* 7, pp. 2298-307.
- Grompe, M., Lindstedt, S., al-Dhalimy, M., Kennaway, N. G., Papaconstantinou, J., Torres-Ramos, C. A., Ou, C. N., and Finegold, M. (1995). Pharmacological Correction of Neonatal Lethal Hepatic Dysfunction in a Murine Model of Hereditary Tyrosinaemia Type I. *Nat Genet* 10, pp. 453-60.
- Halvorsen, S., Gjessing, L. R. (1964). Studies on Tyrosinosis: 1, Effect of Low-tyrosine and Low-Phenylalanine Diet. *Brit. Med. J.*, Vol. 2, pp. 1171-1173.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*, Vol. 144, pp. 646-674.
- International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (2009). Pathologic Diagnosis of Early Hepatocellular Carcinoma: A Report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology*, pp. 658-664.
- International Working Party (1995). Terminology of Nodular Hepatocellular Lesions. *Hepatology*, Vol. 22, pp. 983-993.
- Janeway, Charles A. Jr., Medzhitov, Ruslan (2002). Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, Vol.20, pp.197-216.
- Jiang, B.H., Liu, L.Z. (2009). PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* Vol 102, pp. 19-65.
- Jorquera R, Tanguay RM (2001). Fumarylacetoacetate, the Metabolite Accumulating in Hereditary Tyrosinemia, Activates the ERK Pathway and Induces Mitotic Abnormalities and Genomic Instability.

- Jolly C, Morimoto RI. (2000). Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 92, pp. 1564-1572.
- Kiessling R, Klein E, Pross H and Wigzell H (1975). "Natural" killer cells in the mouse I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* Vol.5, pp.112-117.
- Lamlé J. *et al.* (2008). Nrf2 Prevents Alcohol-Induced Fulminant Liver Injury.
- Lee, H.S., et al. (2007). Novel Candidate Targets of Wnt/ β -Catenin Signaling in Hepatoma Cells. *Life Science*, Vol. 80, pp. 690-698.
- Lindblad B., Lindstedt S., Steen G. (1977). On the Enzymatic Defects in Hereditary Tyrosinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol74, No 1, pp. 4641-4645.
- Lindstedt S., Holme E., Lock E. A., Hjalmarson O., Strandvik B. (1992). Treatment of Hereditary Tyrosinaemia type I by Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxigenase. *Lancet*, 340, pp. 813-17.
- Ljunggren HG and Kärre K (1995). In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, Vol. 11, No 7, pp. 237-244.
- Malato, Y., Naqvi, S., Schürmann, N., Ng, R., Wang, B. Zape, J. Kay, M. A., Grimm, D., and Willenbring, H. (2011). Fate Tracing of Mature Hepatocytes in Mouse Liver Homeostasis and Regeneration. *J. Clin. Invest.* Vol. 121, pp. 4850-4860.
- Marhenke et al. (2008). Activation of Nuclear Factor E2-Related Factor 2 in Hereditary Tyrosinemia Type 1 and its Role in Survival and Tumor Development. *Hepatology*, Vol. 48, No. 2, pp. 487-496.
- Medes Grace (1932). A New Error of Tyrosine Metabolism: Tyrosinosis. The Intermediary Metabolism of Tyrosine and Phenylalanine.
- Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, et al (2003). Glypican-3, Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma, Modulates FGF2 and BMP-7 Signaling. *Int J Cancer*, Vol. 103, pp. 455-465.
- Mitchell GA, Grompe M, Lambert M, Tanguay RM (2001). Hypertyrosinemia. In:

- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J., Paul, W. E. (1999). The IL-4 Receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 17, pp. 701–738
- Nielsen, M., Thomsen, J. L., Primdahl, S., Dyreborg, U., and Andersen, J. A. (1993). Breast Cancer and Atypia among Young and Middle-Aged women: a Study of 10 Medicolegal Autopsies. *Br J Cancer*, Vol. 56, pp. 814-819.
- Pancer, Z. and Cooper, M.D. (2006). The Evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol*, Vol. 24, pp. 497-252.
- Rich, A. R. (2007). On the Frequency of Occurrence of Occult Carcinoma in the Prostate. *Int. J Epidemiol*, Vol. 36, pp. 274-277.
- Racanelli, V. and Rehermann, B. (2006). The Liver as an Immunological Organ. *Hepatology*, Vol. 43, pp. 54-62.
- Schneider, C. *et al.* (2012). Adaptive Immunity Suppresses Formation and Progression of Diethylnitrosamine-Induced Liver Cancer. *Gut*, Vol. 61, pp. 1733-1743.
- Schwabe, Robert F., Seki, E., Brenner David A. (2006). Toll-Like Receptor Signaling in the Liver. *Gastroenterology*, Vol.130, pp.1886-1900.
- Scollay, R. G., Butcher, E. C., and Weissman, I.L. (1980). Thymus Cell Migration. Quantitative Aspects of Cellular Traffic from the Thymus to the Periphery in Mice. *Eur J Immunol*, Vol. 10, pp. 210-218.
- Sriver CR, ed al. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol. 2, New York: MacGraw-Hill, pp.1777–1805.
- Seidensticker, M. J. and Behrens, J. (2000). Biochemical Interactions in the Wnt Pathway. *Biochemica et Biophysica Acta* 1495, pp. 168-182.
- Shankaran, V. *et al.* (2001) IFN-gamma and Lymphocytes Prevent Primary Tumor Development and Shape Tumor Immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* Vol.10, pp.1107-1111
- Slaga, T. J. (1983). Overview of Tumor Promotion in Animals. *Environ Health Perspect.* Vol. 50, pp. 3-14.
- Swann, J. B. and Smith, M. J. (2007). Immune Surveillance of Tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 117, pp.1137-1146.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the Thymus: Stromal Guides for T-cell Development and Selection. *Nat Rev Immunol*, Vol. 6, pp. 127-135.

- Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. (2000). Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci*, Vol. 97 pp.5498 –5503.
- Thorgeirsson, S. S., and Grisham, J. W. (2002). Molecular pathogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Nat Genet* 31, pp. 339-46.
- Tosello-Tramont, A-C., Landes, S.G., Nguyen, V., Novobrantseva, T.I., and Hahn, Y.S. (2012). Kupffer Cells Trigger Nonalcoholic Steatohepatitis Development in Diet-induced Mouse Model through Tumor Necrosis Factor- α Production. *J. of Biological Chemistry*. Vol. 287, No. 48, pp. 40161- 40172.
- Toyabe S, Seki S, Iiai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, et al. (1997). Requirement of IL-4 and liver NK1⁺ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J. of Immunol.*, Vol. 159, pp. 1537–1542.
- Tu Z., Bozorgzadeh A., Pierce R. H., Kurtis J., Crispe N. I., and Orloff M. S. (2008). TLR-Dependent Cross Talk between Human Kupffer Cells and NK Cells. *JEM*, Vol. 205, No. 1, pp. 233-244.
- Veldt, B. J. *et al.* (2008). Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma Among Patients with Hepatitis C Cirrhosis and Diabetes Melitus. *Hepatology*, Vol. 47, No. 6, pp.1856-1862.
- Vogel A. *et al.* (2004). Chronic Liver Disease in Murine Hereditary Tyrosinemia Type 1 Induces Resistance to Cell Death. *Hepatology*, Vol. 39, No. 2, pp. 433-434.
- Vogel A. *et al.* (2006). Sustained Phosphorylation of Bid is a Marker for Resistance to Fas-Induced Apoptosis During Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology*, Vol. 130(1), pp. 104-119.
- Weinberg, Arthur G., Worthen, Howard G. (1976). The Occurance of Hepatoma in the Chronic form of Hereditary Tyrosinemia. *The Journal of Pediatrics*, Vol. 88, No. 3, pp. 434-438
- Wisse E., van't Noordente JM., van de Meulen J. and Deams WT (1976). The Pit Cell: Description of a New Type of Cell Occuring in the Rat Liver Sinusoids and Peripheral Blood. *Cell Rissue Res.*, Vol. 173, pp. 423-435.
- Yao, Y *et al.* (2011). Proteomic Analysis of the Interleukin-4 (IL-4) Response in Hepatitis B Virus-positive Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2.2.15. *Electrophoresis* Vol. 32, pp. 2004–2012.
- Zimmermann, H. W., Trautwein, C., Tacke, F. (2012). Functional role of Monocytes and Macrophages for the Inflammatory Response in Acute Liver Injury. *Frontiers in Physiology*, Vol. 3, pp. 1-18.

Curriculum Vitae

Jessica Endig

Adresse

Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie

Medizinische Hochschule Hannover

Carl-Neuberg-Str. 1

30625 Hannover, Deutschland

Kontakt

Tel. (0511) 532 9592

Fax (0511) 532 8392

Endig.jessica@mh-hannover.de

Studium

09/2002 - 12/2007

Justus-Liebig Universität Gießen,

Studium der Biologie

Abschluss: Diplom Biologie (Dipl.-Biol.)

Note: gut (2.1)

08/2008 – 10/2008

Diplomarbeit am Institut für Immunologie:

Thema der Diplomarbeit:

„CHARAKTERISIERUNG DER ADAPTER-
MOLEKÜLE AM REZEPTORKOMPLEX FÜR
INTERLEUKIN-33“

Seit 01/2008

Erstellung einer wissenschaftlichen Arbeit im Rahmen der Promotion zur Erlangung des Dr. rer. nat (rerum naturalium)

Veröffentlichungen

Aslan JE, You H, Williamson DM, Endig J, Youker RT, Thomas L, Shu H, Du Y, Milewski RL, Brush MH, Possemato A, Sprott K, Fu H, Greis KD, Runckel DN, Vogel A, Thomas G. AKT AND 14-3-3 CONTROL A PACS-2 HOMEOSTATIC SWITCH THAT INTEGRATES MEMBRANE TRAFFIC WITH TRAIL-INDUCED APOPTOSIS. Mol Cell. 2009 May 14;34(4):497-509

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Die Bedeutung des Immunsystems bei der Entstehung eines Hepatozellulären
Karzinoms im murinen Modell der hereditären Tyrosinämie Typ-1“

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Ort, Datum, Unterschrift

Name: Jessica Endig