

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin
I. Medizinischen Klinik und Poliklinik

Direktor: Professor Dr. med. Ansgar W. Lohse

Hepatokarzinogenese in einem Mausmodell chronisch- entzündlicher Leberschädigung

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Stefan Zander
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 4.12. 2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. A. W. Lohse

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Herkel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Priv.-Doz. Dr. med. C. Schramm

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	V
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	2
2.1. Chronische Entzündung und Karzinogenese	2
2.1.1. Allgemein	2
2.1.2. Chronische Hepatitis und Karzinogenese	4
2.2. Entzündungsmediatoren in der Karzinogenese	6
2.2.1. Allgemein	6
2.2.2. Entzündungsmediatoren in der Hepatokarzinogenese	7
2.2.3. Interferon- γ	8
a. Allgemein	8
b. IFN γ /STAT 1-Weg in der Karzinogenese	9
2.3. Molekulare Mechanismen in der Karzinogenese	12
2.3.1. Apoptose	12
a. Allgemein	12
b. Apoptose in der Karzinogenese	13
c. Die Rolle von p53 in der Apoptose	14
d. Interferon- γ in Apoptose und Regulation von p53	15
2.3.2. Mitogen-activated protein (MAP)-Kinase-Wege	16
a. Allgemein	16
b. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-Signalweg	17

c. p38-Signalweg	18
d. Extracellular-signal related kinase (ERK)-Signalweg	19
2.3.3. Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells (NFκB)	20
2.4. N-Diethylnitrosamin-induziertes Hepatozelluläres Karzinom (HCC) im Mausmodell	22
2.5. Mausmodell einer chronisch-aktiven Hepatitis	22
2.6. Fragestellung der Arbeit	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Verwendete Materialien	25
3.1.1. Laborgeräte	25
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	25
3.1.3. Chemikalien	26
3.1.4. Antikörper	28
3.1.5. Puffer und Lösungen	29
3.1.6. Software	33
3.1.7. Versuchstiere	33
3.2. Methoden	34
3.2.1. N-Diethylnitrosamin-Applikation und Leberentnahme	34
3.2.2. Anfertigung von Kryoschnitten	34
3.2.3. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL-Färbung)	35
3.2.4. Herstellung von Leberlysaten aus Kryogewebe	37
3.2.5. Proteinbestimmung nach Bradford	37

3.2.6. Western Blot	38
a. Prinzip der Methode	38
b. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
c. Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)	40
d. Immunodetektion auf der Nitrozellulosemembran	40
e. Stripping der Nitrozellulosemembran	41
4. Ergebnisse	43
4.1. Permanente Aktivierung des IFN γ /STAT 1-Signalwegs in SAP-IFN γ -Mäusen	43
4.2. Keine Inhibierung des IFN γ /STAT 1-Wegs durch SOCS 1 und SOCS 3	46
4.3. Andauernde kompensatorische Proliferation in SAP-IFN γ -Mäusen	47
4.4. Vermehrte Apoptose in IFN γ -transgenen Mäusen	50
4.5. Apoptosemarker im Western Blot	52
4.6. p53-Aktivität in IFN γ -transgenen Mäusen	55
4.7. Nuclear factor kappa B (NF κ B)-Aktivität in SAP-IFN γ -Mäusen	57
4.8. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-Aktivität in SAP-IFN γ -Mäusen	58
4.9. p38-Aktivität in IFN γ -transgenen Mäusen in SAP-IFN γ -Mäusen	61
4.10. Extracellular-signal related kinase (ERK)-Aktivität in SAP-IFN γ -Mäusen	63
5. Diskussion	65
5.1. Ausblick	74

6. Zusammenfassung	76
7. Literaturverzeichnis	77
8. Danksagung	87
9. Eidesstattliche Erklärung	88

I. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AML 12	Alpha-Mouse liver 12; Hepatozytenzelllinie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (lat. Aqua destillata)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Lymphozytenmarker (engl. Cluster of differentiation)
COX	Zyklooxygenase (engl. Cyclooxygenase)
CSF	(engl. Colony stimulating factor)
DC	Dendritische Zelle (engl. Dendritic cell)
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
DEN	N-Diethylnitrosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (chem. Ethylendiamintetraacetat)
ERK	(engl. Extracellular-signal related kinase)
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (eng. Hepatocellular carcinoma)
HCl	Salzsäure (chem. Chlorwasserstoffsäure)
HCV	Hepatitis C-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish peroxidase)
i.p.	in die Bauchhöhle (lat. intra peritoneal)
ICAD	(engl. inhibitory caspase-activating DNase)
IFNα	Interferon-alpha
IFNβ	Interferon-beta
IFNγ	Interferon-gamma
IFNγR	Interferon-γ-Rezeptor
IKK	Inhibitorischer kappa B Kinase Komplex
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
JNK	(engl. c-Jun N-terminal kinase)
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	Molarität
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (engl. Mitogen activated protein kinase)
Max.	Maximum
Mdm 2	(engl. Murine double minute 2)
Mdr 2	(engl. multi drug resistance 2)
mg	Milligramm
Min.	Minimum
miRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
ml	Milliliter

mm	Millimeter
Na₂HPO₄	di-Natriumphosphat
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	(engl. Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells)
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (eng. Phosphat buffered saline)
PCNA	(engl. Proliferating cell nuclear antigen)
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SAP	Serum Amyloid P
SDS	Natriumdodecylsulfat (eng. Sodium dodecyl sulfat)
Ser	Serin
SOCS	(engl. Suppressor of cytokine signalling)
STAT	(engl. Signal transducer and activator of transcription)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris buffered saline)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	(engl. Transforming growth factor)
TNF	(engl. Tumor necrosis factor)
TUNEL	(engl. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling)
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Chronische Entzündungen gelten als ein Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren. Das Hepatozelluläre Karzinom gilt als Paradebeispiel für Entzündungs-assoziierte Karzinogenese, da maligne Tumore der Leber nahezu ausnahmslos auf dem Boden chronisch-entzündlicher Leberschäden entstehen. Dabei sind chronische Infektionen mit dem Hepatitis B- und/oder Hepatitis C-Virus die häufigsten Auslöser der Entzündung.

Aus aktuellen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass IFN γ -transgene Mäuse trotz einer chronischen Leberentzündung und einer lebenslangen Hepatozytenschädigung eine verminderte Karzinogenese gegenüber nicht-transgenen Mäusen hatten. Es handelte sich dabei offenbar nicht um eine durch Immunmechanismen bedingte Tumorerstörung (nicht-veröffentlichte Daten). Daraus ergab sich die Frage nach dem Mechanismus für die Tumorsuppression. Diese Arbeit sollte untersuchen, ob sich in IFN γ -transgenen Mäuselebern eine Aktivierung oder verminderte Aktivität in für die Hepatokarzinogenese relevanten Signalwegen identifizieren lassen würde, die eine Erklärung für die Tumorsuppression in diesen Tieren liefern könnte. Weiter sollte untersucht werden, ob sich in den Lebern der IFN γ -transgenen Mäuse vermehrt Apoptose nachweisen lässt. Dazu sollten IFN γ -transgene und nicht-transgene Mäuse mit dem chemischen Karzinogen Diethylnitrosamin behandelt werden und deren Lebern mit den Lebern PBS-behandelter IFN γ -transgener und nicht-transgener Tiere mittels Western Blot und histologischen Methoden verglichen werden.

2. Einleitung

2.1. Chronische Entzündung und Karzinogenese

2.1.1. Allgemein

Die Entzündungsreaktion ist eine der wesentlichen Funktionen des Immunsystems, die den Organismus vor Pathogenen schützt und gleichzeitig weitere Bestandteile des Immunsystems aktiviert. Läuft die Entzündungsreaktion rasch und selbstlimitierend ab, wird dies als akute Entzündung bezeichnet. Die akute Entzündung ist gekennzeichnet durch ein streng reguliertes Zusammenspiel von Entzündungsmediatoren und Immunzellen (Hussain 2008; Coussens u. Werb 2002). Die Zellen des angeborenen Immunsystems, beispielsweise Makrophagen, Mastzellen, Dendritische Zellen oder Natürliche Killer-Zellen, initiieren die Entzündungsreaktion durch die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen, oder reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, was zur Eliminierung der Pathogene führt. Durch Ausschüttung von anti-entzündlichen Zytokinen wird die Entzündungsreaktion beendet und das Gewebe kommt zur Ausheilung (Meira 2008; Hussain u. Harris 2007). Jedoch kommt es vor, dass eine Entzündung nicht selbstlimitierend ist und dauerhaft besteht (Balkwill 2005). Durch Persistieren des Pathogens oder durch Fehler in der Regulation der Immunantwort und mit einer damit einhergehenden, dauerhaften Ausschüttung von pro-entzündlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren kann ein Mikromilieu entstehen, das die Initiation und Progression von Tumoren fördert (Hussain u. Harris 2007). Welcher immunologische Mechanismus dieser Dysregulation zugrunde liegt, ist unklar.

Das onkogene Potential chronischer Entzündungen wird auf anhaltende Induktion der Zellproliferation durch Aktivierung verschiedener pro-proliferativer Signalwege zurückgeführt (Meira 2008). Auch die in der Entzündungsreaktion entstehenden reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies können mutagene Wirkungen haben (Coussens u. Werb 2002). Sie können an der DNA direkt zu Basenoxidierungen und Deaminierungen, indirekt zu Basenalkylierungen führen (Meira 2008). In Folge dieser DNA-Schäden kann es zu genomischen Instabilitäten mit Veränderungen in den Genexpressionsprofilen, Proteinmodifikationen oder Expressionen von spezifischen miRNAs, und damit zu Tumor-fördernden Veränderungen kommen (Hussain u. Harris 2007).

Rudolf Virchow beobachtete 1863 Leukozyten in neoplastischen Geweben. Er stellte die Hypothese auf, dass „lymphoretikuläre Infiltrate“ chronischer Entzündungen als Ursprung maligner Entartung anzusehen sind (Balkwill u. Mantovani 2001). Tatsächlich finden sich bei vielen, wenn nicht sogar allen Tumoren Entzündungszellen, wie Tumor-assoziierte Makrophagen, Dendritische Zellen, T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten im Tumorgewebe und umgebenden Stroma (Balkwill u. Mantovani 2001; Coussens u. Werb 2002). Welche Rolle diese Zellen bei der Abwehr oder Promotion von Tumoren spielen, ist unklar. In einigen Tumoren korreliert die Zahl an infiltrierenden Entzündungszellen positiv mit einer besseren Prognose, in anderen Malignomen jedoch ist sie mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Budhu u. Wang 2006). Darüber hinaus finden sich in nahezu allen Tumorgeweben Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise Chemokine oder Zytokine. Auch finden sich in Tumoren Gewebeveränderungen und Angiogenese, die denen in chronisch-entzündetem Gewebe sehr ähnlich sind (Mantovani 2008).

Die Beobachtung, dass die Hemmung der *Cyclooxygenase* (COX), besonders COX-2, durch anti-entzündliche Medikamente für einige Tumore die Prognose verbessert, ist ein weiterer Hinweis für den Zusammenhang von Entzündung und Karzinogenese (Thun 2002; Dannenberg u. Subbaramaiah 2003).

Die große klinische Relevanz von Virchows Beobachtung wird durch die Erfahrung verdeutlicht, dass zwischen 15% - 25% aller Tumorerkrankung weltweit auf dem Boden von Infektionen und chronischen Entzündungen entstehen (Balkwill u. Mantovani 2001; Hussain u. Harris 2007). Dabei scheint hauptsächlich die Art der Entzündung, beziehungsweise das Profil der Entzündungsmediatoren, und weniger die auslösende Entität eine wichtige Bedeutung für den Verlauf der Krankheit zu haben. So besteht ein erhöhtes Risiko für maligne Entartungen sowohl bei bakteriellen Entzündungen (z.B. Magenkarzinom bei *Helicobacter pylori*-assoziierter Gastritis) (Yuasa 2003) und viralen Entzündungen (z.B. Hepatozelluläres Karzinom bei chronischen Hepatitis B-Virus-Infektionen) (Farazi u. DePinho 2006), als auch bei chemisch-induzierten Entzündungen (z.B. Bronchialkarzinom durch Asbest-Exposition) (Ruosaari 2008) oder in Autoimmunerkrankungen (z.B. Kolonkarzinom bei Colitis ulcerosa) (Balkwill u. Mantovani 2001). Welche Faktoren dabei jedoch genau entscheidend sind, ist nicht bekannt.

2.1.2. Chronische Hepatitis und Karzinogenese

Tumore in der Leber sind eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit und mit der dritthöchsten Mortalitätsrate aller Tumorerkrankungen verbunden (Parkin 2005). Dabei ist das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) für 85 % bis 90 %

aller Primären Lebertumore verantwortlich und somit weltweit die fünft häufigste Tumorentität (Kamangar 2006). Das HCC entsteht nahezu nie in gesunden Organen, sondern fast ausnahmslos auf dem Boden chronischer Leberschäden (El-Serag u. Rudolph 2007). Dabei stellen chronische Infektionen mit dem Hepatitis B- und Hepatitis C-Virus (HBV bzw. HCV) die mit Abstand häufigste Ursache für eine chronische Leberentzündung, und damit Gewebeschädigung dar. Zwischen 75 % und 85 % aller HCCs lassen sich auf eine chronische Hepatitis durch entweder HBV oder HCV zurückführen (Parkin 2005).

Der Pathomechanismus des HCC ist im Wesentlichen gekennzeichnet durch das Auftreten gesteigerter Zellteilung. Während sich in gesunden Erwachsenenlebern die Hepatozyten hauptsächlich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und somit Zellteilungen sehr selten sind (Taub 2004), kommt es im Verlauf einer chronischen Leberentzündung im Rahmen der Immunantwort zu anhaltenden Hepatozytenschäden, vor allem durch vermehrt ausgeschüttete Entzündungsmediatoren. Zytokin-abhängige, kompensatorische Hepatozytenproliferation wirkt dann möglicherweise im Sinne einer Tumorpromotion (Maeda 2005). In Anbetracht des Pathomechanismus ist das Hepatozelluläre Karzinoms damit ein Paradebeispiel für Entzündungs-assoziierte Karzinogenese.

Darüber hinaus wird im Rahmen HBV-induzierter Karzinogenese die Integration von Virus-DNA als ein weiterer ursächlicher Faktor für maligne Entartungen diskutiert (Saigo 2008; Murakami 2005; Wang 1990).

2.2. Entzündungsmediatoren in der Karzinogenese

2.2.1. Allgemein

Entzündungsmediatoren spielen eine elementare Rolle in der Entzündungsreaktion. Durch Einwirken von Entzündungsmediatoren wird die Entzündungsreaktion ausgelöst, reguliert und wieder beendet. Dabei haben Zytokine eine besondere Bedeutung, da sie über vielfältige Mechanismen und Signalwege Zellproliferation und -differenzierung, sowie die Aktivierung von Immunzellen regulieren. Zytokine werden als Folge verschiedener Stimuli, wie bakterieller oder viraler Infektionen, aber auch steriler Entzündungen freigesetzt. Die Funktion der Zytokine besteht zum Einen darin, weitere Immunzellen mittels Chemotaxis an den Ort der Entzündung zu lotsen, zum Anderen die Entzündungsreaktion durch Hemmung der Entzündungszellen wieder zu beenden, um so den Schaden für die Zelle und das Organ zu minimieren. Kann ein Gewebeschaden nicht behoben werden und besteht dauerhaft, wie im Fall chronischer Entzündungen, kann es zu exzessiven Immunzellinfiltrationen, und damit zu persistierender Zytokinproduktion kommen. Somit führt die Abwehrreaktion des Körpers zu einem veränderten Zytokinprofil, was verschiedene Stufen in der Karzinogenese beeinflussen kann. Dabei scheint es vom Zytokin abhängig zu sein, ob Tumorwachstum gefördert oder unterdrückt wird (Lin u. Karin 2007; Budhu u. Wang 2006).

2.2.2. Entzündungsmediatoren in der Hepatokarzinogenese

Zytokine sind für die Entwicklung der gesunden und die Regeneration der kranken Leber unabdingbar. Eine zunehmende Zahl an Arbeiten verfestigt den Verdacht, dass Zytokine in der Pathogenese von Lebererkrankungen, wie zum Beispiel der Leberfibrose und –zirrhose, aber auch beim Hepatozellulären Karzinom eine entscheidende Rolle spielen (Bortolami 2002; Budhu u. Wang 2006). In vielen epidemiologischen Studien wurden daher die Konzentrationen von verschiedenen Zytokinen im Serum und in Tumorgewebe untersucht und mit den Konzentrationen im Serum und Lebergewebe von Gesunden verglichen. Hierbei fand sich für eine Reihe von Zytokinen ein Zusammenhang zwischen Expressionsmuster und Karzinogenese (Budhu u. Wang 2006). In der Konsequenz versuchten viele Arbeiten einen molekularen Zusammenhang zwischen der Zytokinexpression und dem Einfluss auf die Karzinogenese in der Leber herzustellen. Die Mechanismen scheinen dabei so vielfältig, wie die Zytokine selbst, und konnten häufig nicht abschließend geklärt werden. Durch Beeinflussung von immunsuppressiven Mechanismen, Zellwachstum und Proliferation von entarteten Zellen, Förderung von Gewebeumbau und veränderter Angiogenese können Zytokine die Entstehung und Progression von Tumoren beeinflussen (Seruga 2008).

Gut verstanden scheint dabei der Mechanismus für Interleukin 6 (IL-6), einem typisch pro-inflammatorischen Zytokin, das für die Regeneration bei chronischer Leberschädigung unabdingbar ist (Cressman 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von HCCs im Mausmodell durch IL-6 gefördert wird, bzw. die Abwesenheit von IL-6 in Knockout-Mäusen vor Hepatokarzinogenese schützen kann (Naugler 2007). Kürzlich konnte gezeigt

werden, dass auch im benignen Hepatozellulären Adenom Veränderung in der Aktivität des IL-6-Wegs zu finden sind. Der Grund zur malignen Transformation der Hepatozyten scheint also nicht eine Veränderung in der Expression von IL-6 und des IL-6-Signalwegs alleine zu sein (Rebouissou 2009).

Interleukin 10 (IL-10), ein Zytokin, das unter anderem eine immun-suppressive Wirkung auf im Blut zirkulierende Dendritische Zellen (DC) hat, scheint ebenso die Karzinogenese in der Leber zu fördern. So wurde gezeigt, dass der Serumspiegel von IL-10 in Patienten mit einem HCC gegenüber dem von gesunden Patienten substanziell erhöht ist (Beckebaum 2004). Auch bestimmte Veränderungen im IL-10-Gen führen zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines HCCs (Shin 2003; Tseng 2006). Die molekularen Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind allerdings noch nicht vollständig verstanden.

Für den *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese und die Malignität von HCCs von der Expression von TGF- β abhängig ist (Benetti 2008).

Die Datenlage über die Rolle von Interferon- γ (IFN γ) in der Hepatokarzinogenese ist hingegen kontrovers (siehe 2.2.3.).

2.2.3. Interferon- γ

a. Allgemein

Das pleiotrope Zytokin IFN γ wird im Rahmen von Entzündungsreaktionen von verschiedenen Zellen des Immunsystems sezerniert. Es kann nahezu alle Phasen der Immun- und Entzündungsreaktion modulieren (Farrar u. Schreiber

1993). IFN γ bindet an einen an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptor (IFNGR). Die zwei Untereinheiten des Rezeptors (IFNGR1 und 2) sind mit *Janus activating kinases 1* und 2 (JAK 1 und 2) assoziiert. Durch Bindung von IFN γ am Rezeptor, in deren Folge die JAKs aktiviert werden, kommt es zur Phosphorylierung von Signalmolekülen (*Signal transducer and activator of transcription 1*; STAT 1). Die Phosphorylierungsstellen liegen bei Tyrosin 701 und Serin 727 (Townsend 2004). Phosphorylierte STAT-Moleküle bilden zügig Homodimere, die in den Zellkern translozieren und die Transkription von IFN γ -abhängigen Genen aktivieren. Darüber hinaus gibt es noch einige andere Signalwege, teilweise unabhängig von den STAT-Molekülen. Der Hauptsignalweg von IFN γ aber beinhaltet eine Aktivierung von STAT 1 (Platanias 2005; Boehm 1997).

b. IFN γ /STAT 1-Weg in der Karzinogenese

Die Rolle des IFN γ /STAT 1-Signalwegs in der Karzinogenese ist umstritten. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass IFN γ die Karzinogenese unterdrücken kann; Mäuse, die, durch das Nichtvorhandensein entweder der α -Kette des Interferon- γ -Rezeptors (IFNGR α) oder des STAT 1-Moleküls, IFN γ -insensitiv sind, zeigen eine verstärkte Anfälligkeit für sowohl chemisch-induzierte als auch spontane Karzinogenese (Kaplan 1998; Shankaran 2001; Dunn 2006; Street 2002). Der anti-karzinogene Effekt vom IFN γ wird dabei hauptsächlich auf die Entstehung und Aufrechterhaltung von Immunogenität gegenüber Tumorzellen zurückgeführt. Das Immunsystem unterdrückt in einem als „*immunosurveillance*“ bekannten Prozess die Proliferation und das Überleben

von entarteten Zellen. Dabei kann es jedoch durch Selektionsdruck dazu kommen, dass dennoch Tumore entstehen. Es kommt zum „*cancer immunoediting*“ (Dunn 2006). Mit STAT 1-defizienten Fibrosarkomzellen konnte gezeigt werden, dass durch Rekonstitution des STAT 1-Signals Tumorwachstum und Metastaseverhalten von Fibrosarkomzellen unterdrückt werden kann (Huang 2002).

Andererseits wird berichtet, dass ein Aufrechterhalten des JAK/STAT-Signals vermehrt in Tumoren der Leber gefunden wurde (Calvisi 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Verlust oder Inaktivierung von SOCS 1 (*Suppressor of Cytokine Signaling 1*), einem endogenen Inhibitor des IFN γ /STAT 1-Wegs (Krebs u. Hilton 2001), IFN γ -abhängige Karzinogenese fördert (Yoshikawa 2001; Yoshida 2004; Hanada 2006). Jedoch interagiert SOCS 1 auch mit anderen Zytokin-Signalwegen, so dass hier keine abschließende Aussage über die Rolle des IFN γ -Signals in der Hepatokarzinogenese erzielt werden kann. In einer IFN γ -Rezeptor-defizienten Maus (IFN γ R^{-/-}) wurde gezeigt, dass die Anzahl an HCCs nach chemischer Induktion mit Diethylnitrosamin (DEN; siehe 2.4.) gegenüber Wildtypmäusen erniedrigt ist. Jedoch gab es keine Unterschiede in der maximalen und der durchschnittlichen Größe oder in der Histologie der Tumore. Der vermutete Mechanismus ist hier eine verminderte Anzahl an Makrophagen, die potenziell mutagene Stickstoffspezies produzieren, in den Lebern der IFN γ R^{-/-}-Mäuse (Matsuda 2005).

Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS 3), ein Inhibitor von STAT 3, ist ein weiterer, wenn auch schwächerer Regulator des IFN γ -Signals. Das IFN γ -Signal wird zu Anteilen über STAT 3 weitergeleitet. Ein Verlust von SOCS 3

führt zu einer beschleunigten Hepatokarzinogenese nach chemischer Induktion (Riehle 2008; Ogata 2006).

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Mäuse, die leberspezifisch IFN γ überexprimieren (SAP-IFN γ -Maus; siehe auch 2.5.), eine deutlich reduzierte Inzidenz von HCCs und eine signifikant kleinere Fläche neoplastischer und prä-neoplastischer Läsionen nach Induktion mit DEN haben (Abb. 1A und B (Lilth 2007)). Die Suppression der Karzinogenese ist dabei unabhängig von „immunosurveillance“-Mechanismen, da auch Lymphozyten-defiziente IFN γ -transgene Mäuse im gleichen Maß vor Hepatokarzinogenese geschützt sind (Abb. 2A und B (Lilth 2007)). Der molekulare Mechanismus, der zum Schutz vor Karzinogenese in den IFN γ -transgenen Mäusen führt, war Gegenstand dieser Arbeit.

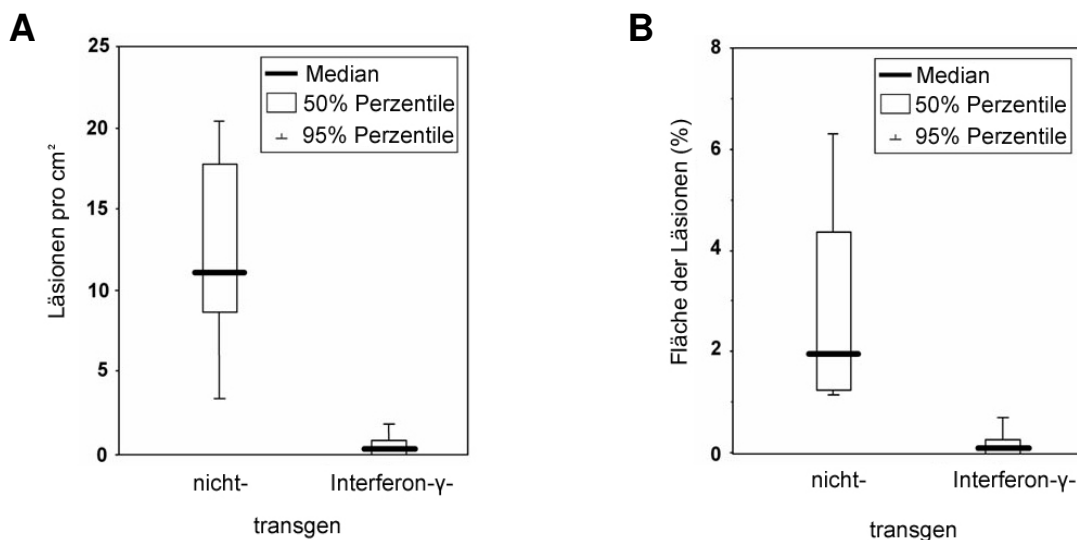


Abb. 1 IFN γ -transgene Mäuse sind vor chemisch-induzierter Hepatokarzinogenese geschützt In IFN γ -transgenen und nicht-transgenen Mäusen wurde Hepatokarzinogenese mit dem chemischen Karzinogen Diethylnitrosamin (DEN) induziert. Nach 40 Wochen wurden die Lebern dieser Tiere auf Tumorentwicklung hin histologisch untersucht. IFN γ -transgene Mäuse hatten signifikant weniger (A; $p < 0,0001$) und kleinere Läsionen (B; $p < 0,0001$) in der Leber als nicht-transgene Mäuse. (aus: Lüth 2007)

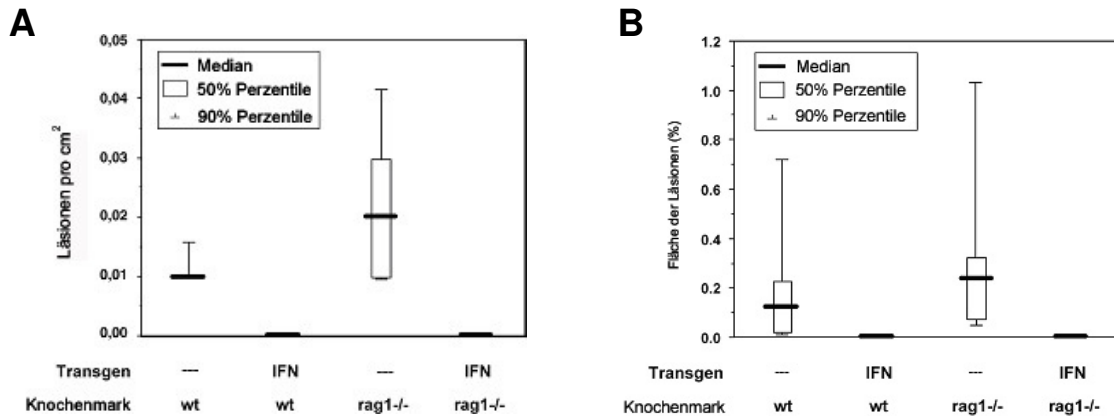


Abb. 2 Schutz vor chemisch-induzierter Hepatokarzinogenese ist unabhängig von Immunosurveillance-System IFN γ -transgene und nicht-transgene Tiere wurden vor Tumor-induktion knochenmarkrekonstituiert mit entweder Knochenmark von Wildtyp- (wt) oder von lymphozytendefizienten Mäusen (rag1^{-/-}). Lymphozytendefiziente IFN γ -transgene Mäuse waren in gleichem Maße vor Hepatokarzinogenese geschützt, wie immunkompetente IFN γ -transgene Mäuse und zeigten signifikant weniger (A; $p < 0,05$) und kleinere Läsionen (B; $p < 0,05$). (aus: Lüth 2007)

2.3. Molekulare Mechanismen in der Karzinogenese

2.3.1. Apoptose

a. Allgemein

Apoptose (griechisch von „apo“ = weg und „ptosis“ = der Fall) ist eine Form des programmierten Zelltodes (Golstein u. Kroemer 2007). Dabei ist sie definiert als Zelltod, bei dem es zur Schrumpfung der Zelle (Pyknose) und Kondensation des Chromatins, gefolgt von einer Fragmentierung der DNA (Karyorrhexis) kommt (Kroemer 2005). Für die Entwicklung in der Embryonalphase eines multizellulären Organismus ist der Zelltod essentiell. Der erwachsene Organismus macht sich diesen Mechanismus zu Nutzen um die

Zellhomöostase und damit die physiologische Funktion der Organe aufrecht zu erhalten (Danial u. Korsmeyer 2004).

Es lassen sich verschiedene molekulare Wege der Apoptoseinduktion unterscheiden, deren gemeinsame Endstrecke in der Aktivierung einer Kaskade aus Cystein-Proteasen, Caspasen, liegt. In der Zelle liegen hiervon zunächst nur die enzymatisch-inaktiven Formen, die Procaspasen, vor, die durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form gebracht werden. Diese spalten dann ihrerseits selektiv Zielproteine und führen so zu einer Veränderung in der Aktivität und Funktionalität dieser Proteine. Eines der bedeutendsten Zielproteine in der Apoptoseinduktion ist die *Caspase-activated DNase* (CAD), eine Nuklease, die die genomische DNA zwischen den Nukleosomen spaltet. CAD liegt in allen Zellen in einer inhibierten Form vor (*inhibitory CAD*; ICAD). Wird die inhibierende Untereinheit durch aktivierte Caspase 3 abgespalten, kommt es zur Freisetzung und Aktivierung von CAD und damit zur Fragmentierung der DNA der Zelle (Hengartner 2000).

b. Apoptose in der Karzinogenese

Die Apoptose dient als endogener Schutz der Zelle vor Zellschäden. Kommt es zu einem irreparablen Zellschaden, so initiiert die Zelle das Apoptoseprogramm um den Organismus zu schützen. Zellen, die diese Funktion verloren haben, können unkontrolliert proliferieren. In Tumoren wird eine verminderte bis gar keine Fähigkeit zur Apoptose beschrieben. Die Inaktivierung des Zelltodprogramms ist eine wesentliche Voraussetzung zur malignen Entartung (Brown u. Attardi 2005).

c. Die Rolle von p53 in der Apoptose

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von zahlreichen Genen für Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur kontrolliert. Besonders bedeutsam ist dieses Protein dadurch, dass in fast jedem zweiten Tumor eine Mutation im p53-Gen gefunden wird. In den meisten Fällen führt die Mutation dazu, dass p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor, und damit auch als Tumorsuppressor verliert (Aylon u. Oren 2007).

Als Antwort auf verschiedene Formen von zellulärem Stress induziert p53 die Transkription von Zielgenen (Kim u. Deppert 2003). Diese Gene kodieren für Proteine, die zu einem Wachstumsstop führen, den die Zelle für Reparaturmechanismen nutzt. Dabei aktivieren unterschiedliche Ursachen zellulären Stresses einen für die Ursache spezifischen Reparaturmechanismus. Die jeweiligen Reparaturproteine kommunizieren mit p53 in Form von Proteinmodifikationen an p53. Hierdurch werden Art und Ausmaß des Zellschadens erkannt. Sind die Schäden an der Zelle irreparabel, so wird die Transkription pro-apoptotischer Proteine initiiert und der Zelltod induziert. Woher p53 die Informationen erhält, welche Gene zu transkribieren sind, ist derzeit nicht abschließend geklärt (Laptenko u. Prives 2006). Letztendlich haben die Modifikationen zur Folge, dass die Halbwertszeit von p53 in der Zelle stark erhöht ist, und damit die Konzentration von p53 um bis zu Faktor 10 steigt. Außerdem wird die Fähigkeit zur DNA-Bindung und zur Transkriptionspromotion gesteigert. Die Erhöhung der Proteinkonzentration und die Steigerung der Transkriptionsfähigkeit zeigen per Definition die Aktivierung von p53 an (Harris u. Levine 2005).

Das aktivierte p53 bindet an spezifische DNA-Sequenzen, die als *p53-responsive elements* bezeichnet (p53RE) werden und initiiert die Transkription.

Eine Reihe von Proteinen wurde identifiziert, die als Co-Faktoren mit p53 interagieren und die Transkription von entweder pro-apoptotischen oder Zellzyklusarrest-induzierenden Proteinen beeinflussen (Aylon u. Oren 2007; Homer 2005; Das 2007; Sullivan u. Lu 2007; Tanaka 2007).

d. Interferon- γ in Apoptose und Regulation von p53

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass IFN γ in Hepatozyten einen Zyklusarrest oder Apoptose induzieren kann (Brooling 2005; Kano 1997; Detjen 2003). Widersprüchlich ist dabei die Rolle von p53. Während in der Hepatozytenlinie AML-12 ein p53-unabhängiger Mechanismus beschrieben wurde (Brooling 2005), ist in primären Mäusehepatozyten eine dosis- und zeitabhängige Induktion von p53 durch IFN γ gezeigt worden (Kano 1997). Darüber hinaus scheint aktiviertes STAT 1 in der Lage zu sein, p53 zu regulieren, indem es einen negativen Regulator von p53, das *murine double minute 2* (Mdm 2), inhibiert (Townsend 2004).

Eines der Zielgene von p53 ist *p21^{waf/cip-1}*. Das Protein p21 versetzt Zellen in einen Zellzyklusarrest und verhindert Apoptose (Gartel u. Radhakrishnan 2005). Eine Überexpression von p21 führt in Mäuselebern zu einer nahezu fehlenden Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten durch die Induktion eines Zellzyklusarrests (Wu 1996). Auch in einem Modell der chemisch-induzierten Hepatokarzinogenese (siehe 2.4.) wurde die Abhängigkeit von Tumorwachstum und p21 gezeigt: gesteigerte Expression von p21 führt zur Reduktion des Tumorwachstums (Hui 2008).

In verschiedenen HCC-Zelllinien, die sensibel für IFN γ -induzierte Apoptose sind, konnte gezeigt werden, dass die Apoptose eine Reduktion von p21 bedingt. Eine HCC-Zelllinie, die keine IFN γ -induzierte Apoptose zeigt, konnte durch Inhibierung von p21 für IFN γ -induzierte Apoptose sensibilisiert werden (Detjen 2003).

2.3.2. Mitogen-activated protein (MAP) – Kinase-Wege

a. Allgemein

MAP-Kinase-Wege sind Signaltransduktionswege, die unter anderem an der Regulation von Zellwachstum und Apoptose, sowie der Zelldifferenzierung beteiligt sind. MAP-Kinasen konvertieren extrazelluläre Signale über Zelloberflächenrezeptoren in intrazelluläre Antworten. Dabei unterscheidet man im Wesentlichen drei Untergruppen der MAP-Kinasen: die *extracellular signal-related kinases* (ERKs), die *c-Jun amino (N) -terminal kinases* (JNKs) und die p38-Proteine. Die Aktivierung und Regulierung dieser Signalwege besteht jeweils aus einem komplexen Netzwerk aus Kinasen, Kinasekinasen, Kinasekinasekinasen und Phosphatasen, dessen Zusammenhänge und Ausmaße noch nicht abschließend verstanden sind (Chang u. Karin 2001).

Aufgrund der Bedeutung der MAP-Kinasen für Zellwachstum und -regulation ist ein Zusammenhang zwischen Dysregulation in MAP-Kinase-Signalwegen und der Entstehung, sowie dem Wachstum von Tumoren nahe liegend und gut untersucht (Dhillon 2007; Downward 2003). Die einzelnen Signalwege sind im Folgenden detailliert beschrieben.

b. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-Signalweg

Der JNK-Signalweg wird primär durch zellulären Stress, wie zum Beispiel Entzündung, osmotische Veränderungen in der Umgebung oder UV-Strahlung, sowie durch Zytokine, beispielsweise *Tumor Necrosis Factor* (TNF) und Interleukin-1 (IL-1), aktiviert (Davis 2000). Die Aktivierung des Signalwegs führt zu einer Veränderung der Gentranskription.

JNK-Induktoren wie TNF oder UV-Strahlung sind pro-apoptotisch. Jedoch führt eine JNK-Aktivierung nicht zwangsläufig zur Induktion von Apoptose. Auch gibt es Arbeiten, die einen anti-apoptotischen Effekt durch JNK-Aktivierung zeigen (Nishina 1997; Potapova 1997). Mögliche Erklärung hierfür sind eine unterschiedliche Wirkung in verschiedenen Zellen, unterschiedliche Funktionen von verschiedenen Isoformen und/oder die Interaktion mit anderen Signalwegen (Ip u. Davis 1998).

Die Zielgene von JNK sind nicht abschließend geklärt. Möglicherweise hat JNK Einfluss auf die Regulation von p53, wobei einerseits gezeigt wurde, dass JNK p53 stabilisieren und damit aktivieren, andererseits aber auch destabilisieren und damit inaktivieren kann (Davis 2000).

Die Rolle von JNK in der Karzinogenese ist umstritten. Einerseits konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorzelllinien die JNK-Aktivität erhöht ist. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Veränderungen an der Phosphorylierungsstelle am *c-Jun*-Protein, einem direkten Zielprotein von JNK, oder die Ablation des *c-jun*-Gens zu einer Verkleinerung in Zahl und Größe von Tumoren führt (Nateri 2005; Weston u. Davis 2007). Andererseits konnte gezeigt werden, dass in einem Modell für Hautkrebs JNK1^{-/-}-Mäuse anfälliger für Tumorentstehung sind (She 2002). Weiter wurde gezeigt, dass JNK

essentiell ist, um funktionsfähige CD8⁺ T-Zellen zur Tumorunterdrückung im Sinne eines *cancer surveillance* zu bilden (Gao 2005).

In der Leber konnte gezeigt werden, dass JNK die Entstehung von HCCs im Mausmodell fördert (Sakurai 2006). Durch Inkubation mit einem JNK-Inhibitor wurden HCC-Zellen, nicht jedoch primäre Hepatozyten, für Apoptose sensibilisiert, was einerseits die Relevanz von JNK in der Hepatokarzinogenese unterstreicht, andererseits neuartige Therapieoptionen zur Behandlung des HCC aufzeigt (Mucha 2008).

c. p38-Signalweg

Der p38-Signalweg wird, ähnlich wie der JNK-Weg, hauptsächlich über entzündliche Zytokine (TNF und IL-1) und Stress in der zellulären Umgebung, aber auch durch Wachstumsfaktoren (z.B. *Colony stimulating factor-1*; CSF-1) aktiviert. Dabei können die gleichen Stimuli in unterschiedlichen Zellarten teilweise entgegengesetzte Wirkungen auf die Aktivierung von p38 haben. Die Regulierung erfolgt dabei durch verschiedene Co-Aktivatoren und Regulatorproteine. Aufgrund der Ähnlichkeiten in den Aktivierungskaskaden zwischen p38 und JNK kommt es häufig zu einer Co-Aktivierung beider Signalwege. Andererseits konnte gezeigt werden, dass beide Signalwege auf Zellproliferation und -zyklusarrest antagonistisch wirken, was die Komplexität dieser Systeme unterstreicht (Dhillon 2007; Zarubin u. Han 2005; Wada 2008).

Die Aktivierung von p38 hat eine besondere Bedeutung im Rahmen entzündlicher Prozesse, z.B. bei der Produktion pro-entzündlicher Zytokine (Zarubin u. Han 2005).

Durch den Einfluss auf das Zellwachstum, Apoptose, Regulation des Zellzyklus und auf die Zelldifferenzierung ist ein Mitwirken von p38 in der Karzinogenese wahrscheinlich. In Tumoren kann die Aktivität von p38 herabgesetzt sein; ein Funktionsverlust in der Signalkaskade führt zu verstärkter Zellproliferation und erhöhter Wahrscheinlichkeit für tumoröse Entartungen (Zarubin u. Han 2005).

Im HCC konnte eine Korrelation zwischen der Größe der Tumore und dem Aktivitätsgrad von p38 hergestellt werden: größere Tumore zeigen eine niedrigere p38-Aktivität als kleinere Tumore (Iyoda 2003). In HCC-Zelllinien konnte durch konstitutiv-aktives p38 das Zellwachstum gestoppt und die Zellen in Apoptose versetzt werden (Iyoda 2003). In Experimenten am Mausmodell wurde darüber hinaus gezeigt, dass p38 in der Lage ist, Tumorzellproliferation zu unterdrücken, indem es den JNK-Weg antagonisiert (Hui 2007).

d. Extracellular-signal related kinase (ERK)-Signalweg

ERK-Proteine sind, ebenso wie p38 und JNK, Proteinkinasen, die durch Mitogene aktiviert werden. Ebenfalls analog zu den Signalwegen von p38 und JNK besteht die Signalkaskade des ERK-Wegs aus mehreren Kinasen, die zum Teil sehr komplexe Netzwerke bilden. Viele verschiedene Stimuli aktivieren den ERK-Weg, so z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Virusinfektionen und auch Karzinogene. ERK gilt als ein Regulator für Meiose und Mitose, und hat somit Einfluss auf das Wachstum von Zellen (Johnson u. Lapadat 2002). Aktiviertes ERK kann vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren und dort zahlreiche Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, was zu einer Veränderung in der Genexpression führt (Roberts u. Der 2007).

In etwa einem Drittel aller menschlichen Tumore ist eine Dysregulation des ERK-Signalwegs nachweisbar, wobei die meisten mit Krebs assoziierten Veränderungen schon früh im Signalweg von ERK stattfinden. Die häufigsten Veränderungen finden sich in den Proteinen *Raf* und *Ras*. Durch bestimmte Mutationen in den Genen für diese Proteine kommt es zu einer andauernden Aktivierung von ERK und damit zu unkontrolliertem Wachstum (Dhillon 2007).

Erstmals wurde 1997 von ERK-Aktivierung in humanen HCCs berichtet (Schmidt 1997). Später wurde beobachtet, dass bestimmte vom Hepatitis C-Virus produzierte Proteine eine Aktivierung von ERK bewirken können (Hayashi 2000). Tatsächlich konnte eine Studie an über 200 Patienten, die an einem HCC erkrankt waren, zeigen, dass die Aktivierung des ERK-Wegs mit einer schlechteren Prognose und kürzerer Überlebenszeit einhergeht. In dieser Studie waren allerdings sowohl HCV-positive, als auch HCV-negative Patienten eingeschlossen (Schmitz 2008). Es ist also anzunehmen, dass die ERK-Aktivierung nicht ausschließlich HCV-abhängig ist.

2.3.3. Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells (NFκB)

NFκB wurde erstmals 1986 in B-Lymphozyten beschrieben und trägt daher seinen Namen. Inzwischen ist bekannt, dass es sich bei dem Protein um einen Transkriptionsfaktor handelt, der in allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert wird und in der Regel in inaktiver Form im Zytoplasma vorliegt. Es wird vor allem im Rahmen der Entzündungsreaktion und der Immunantwort, aber auch in der Gewebsregeneration oder aufgrund von Zellstress aktiviert.

Infolge dieser Stimuli kommt es zu einer Abspaltung von Inhibitorproteinen. Die aktive Form transloziert in den Nukleus, wo sie als Transkriptionsfaktor wirkt. Die Zielgene kodieren für Proteine der Akut-Phase-Reaktion, Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Adhäsionsmoleküle für die Zellregeneration, aber auch für Regulatorproteine des NFκB-Wegs (Ghosh 1998).

NFκB wird als Schlüsselprotein diskutiert, wie Entzündung und Karzinogenese auf molekularer Ebene in Verbindung stehen könnten (Karin 2006). Durch Inaktivierung des NFκB-Signalwegs mittels Deletion von IκB-Kinase β (IKKβ), einem Protein, das für die Aktivierung von NFκB benötigt wird (Li 1999), wird die Entstehung von Entzündungs-assoziierten Kolontumoren unterdrückt (Greten 2004). Andererseits führt eine Unterdrückung des NFκB-Signals in Keratinozyten der Mäusehaut zu einer spontanen Entwicklung von Hauttumoren (van Hogerlinden 1999).

Auch in der Entstehung von Tumoren der Leber scheint der NFκB-Signalweg eine wesentliche Rolle zu spielen. Durch Hepatozyten-spezifische Ablation von IKKβ kommt es im Mausmodell der chemisch-induzierten Karzinogenese (siehe auch 2.4) zu einem signifikant höheren Tumoraufkommen (Maeda 2005). In einem weiteren Mausmodell für das HCC, einer Maus ohne das *multidrug-resistance 2*-Gene (*Mdr2*^{-/-}) (Mauad 1994), führt eine Inhibition des NFκB-Wegs zu einer Abnahme der Tumorpromotion, nicht jedoch zu einer Veränderung der Tumorinitiation (Pikarsky 2004).

2.4. N-Diethylnitrosamin-induziertes Hepatozelluläres Karzinom (HCC) im Mausmodell

Um das Hepatozelluläre Karzinom zu erforschen, existieren verschiedene Tiermodelle für das HCC (Fausto 1999). In den Versuchen dieser Arbeit wurde das chemische Karzinogen N-Diethylnitrosamin (DEN) verwendet. DEN führt nach Bioaktivierung in der Leber zu Modifikationen der DNA und induziert somit Mutationen (Verna 1996). Dennoch ist DEN ein schwaches Karzinogen und es bedarf zur malignen Transformation zusätzlich einer (Tumor-)Promotion. Durch die Applikation von Phenobarbital über das Trinkwasser der Tiere kommt es über verschiedene Mechanismen letztlich zu einer Hepatozyteninitiation. Diese führt dazu, dass die Hepatozyten in den Zellzyklus eintreten und damit durch Proliferation die onkogene Mutation weitergeben (Maeda 2005).

2.5. Mausmodell einer chronisch-aktiven Hepatitis

Die Versuche dieser Arbeit fanden an einem Mausmodell einer chronisch aktiven Hepatitis statt. In diesem Modell exprimieren die Mäuse konstitutiv IFN γ Leber-spezifisch unter der Kontrolle des *Serum Amyloid P* Gen-Promoters (SAP). Die dadurch erreichten IFN γ -Spiegel liegen bei etwa 3500pg/ml, wohingegen in nicht-transgenen Wildtypmäusen kein IFN γ im Serum detektierbar ist (die beschriebene Detektionsgrenze liegt bei 125pg/ml). Die Expression von IFN γ führt zu einem Leberzellschaden, der sich durch erhöhte Plasma-transaminasen zeigt. Das histologische Bild der Leber zeigt nekrotisierende Entzündungsfelder mit portalen Lymphozyteninfiltrationen (Abb. 3). Diese

Veränderungen korrelieren positiv mit steigendem Alter und steigenden Transaminasen und sind vergleichbar mit dem morphologischen Bild einer Virus-induzierten chronischen Hepatitis im Menschen (Toyonaga 1994). IFN γ -transgene Mäuse entwickeln trotz der chronischen Hepatitis und der damit verbundenen anhaltenden Regeneration spontan keine Tumore. Erstaunlicherweise sind die Mäuse auch vor chemisch-induzierter Karzinogenese geschützt (siehe auch Abb. 1 und 2).

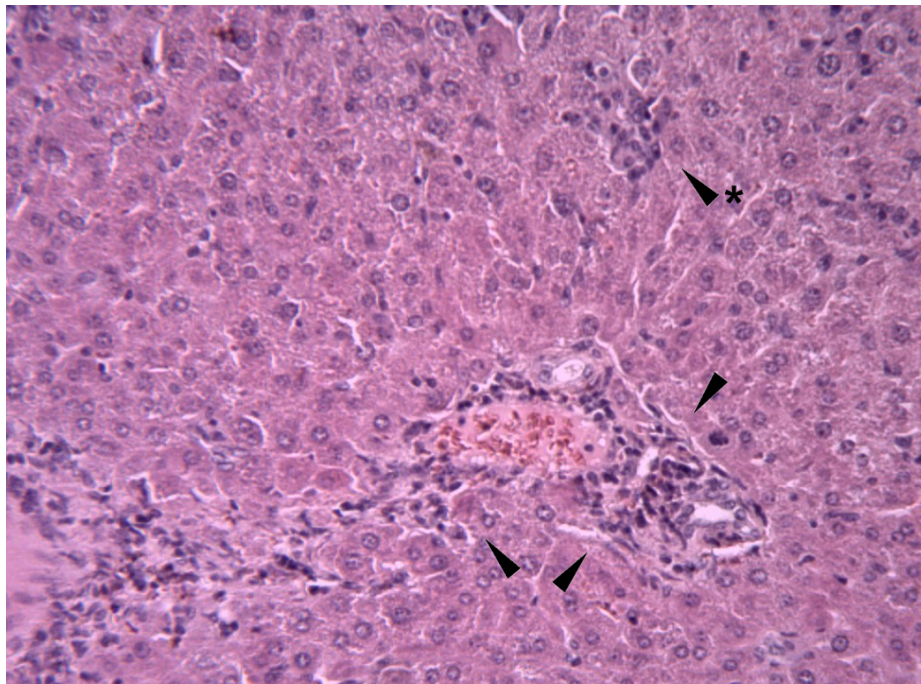


Abb. 3 Histologisches Bild der Leber einer SAP-IFN γ -Maus HE-Färbung der Leber einer 13 Wochen alten SAP-IFN γ -transgenen Maus in 20x Vergrößerung; Pfeile markieren ein portales Lymphozyteninfiltrat, der mit einem Stern (*) versehene Pfeil markiert ein nekrotisierendes Entzündungsfeld.

2.6. Fragestellung der Arbeit

SAP-IFN γ -Mäuse zeigen trotz chronisch-aktiver Hepatitis bei chemisch-induzierter Karzinogenese eine deutlich geringere Anfälligkeit für die Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms. Diese Arbeit sollte klären, ob eine dauerhafte Aktivierung des IFN γ -/STAT 1-Signalwegs zu einer veränderten Apoptoserate führt, und somit eine Erklärung für die Tumorsuppression in den IFN γ -transgenen Mäusen liefert. Weiterhin sollten verschiedene intrazelluläre Signalwege, deren Aktivitätsveränderungen mit der Entstehung von Tumoren in der Leber assoziiert werden, untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

3.1.1. Laborgeräte

Cryotom 2800 Frigocut N, REICHERT-JUNG, Depew, NY, USA

Digitalkamera PowerShot A95; CANON, Krefeld

Eppendorf BioPhotometer, EPPENDORF, Hamburg

Gelständer, BIORAD, Hercules, CA, USA

Mikroskop Axiovert 40 CFL; CARL ZEISS, Oberkochen

Mikroskop-Beleuchtungseinrichtung HBO 50; CARL ZEISS, Oberkochen

Mini-Protean Tetra Cell Gel Electrophoresis System BIORAD, Hercules, CA, USA

Pipetten (0,5µl-10µl; 10µl-100µl; 100µl-1000µl), EPPENDORF AG, Hamburg

Scanner GS-800 calibrated Densitometer, BIORAD, Hercules, CA, USA

SonoPlus Ultraschallsonifikator, BANDELIN, Berlin, Deutschland

Thermomixer comfort, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland

Ultra Freezer -85 °C, NUAIRE, Plymouth, MN, USA

Ultra Turrax T8, IKA-WERKE, Staufen, Deutschland

Vortexer VV30, VWR, Buffalo Grove, IL, USA

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

1,5ml Reaktionsgefäß, SARSTEDT, Nümbrecht

1,8ml Cryoröhrchen, NUNC, Wiesbaden

15ml-Falcon; GREINER, Frickenhausen

1ml-Spritzen, BECTON DICKENSON, Franklin Lakes, NJ, USA

50ml- Falcon; GREINER, Frickenhausen

Antifect N Liquid, SCHÜLKE & MAYR GmbH, Norderstedt

Deckgläschen, MARIENFELD SUPERIOR, Lauda-Königshofen

Faltenfilter Ø 240mm, SCHLEICHER & SCHÜLL, Bottmingen

Microlance 3 26G ½ Kanülen, BECTON DICKENSON, Franklin Lakes, NJ, USA

Microtome Blades C35 Type, FEATHER, Osaka, Japan

Objektträger Superfrost/Plus 75mmx25mm , HECHT-ASSISTANT, Sondheim

Peha-Soft Handschuhe Gr. M, HARTMANN, Heidenheim

Pipettenspitzen (10µl; 100µl; 1000µl); SARSTEDT, Nümbrecht

Präzisionswischtücher, KIMBERLY-CLARK, Roswell, CA, USA

TransBlot Transfer Medium (Nitrozellulosemembran) 0,45µm; BIORAD,

Whatman-Papier, SCHLEICHER & SCHÜLL, Bottmingen

3.1.3. Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APS), CARL ROTH, Karlsruhe

Aprotinin, SIGMA-ALDRICH, Steinheim

Benzamidine, SIGMA-ALDRICH, Steinheim

Bovines Serumalbumin (BSA), SERVA, Heidelberg

DEN (N-Nitrosodiethylamin) (N0258-1G), SIGMA-ALDRICH, Steinheim

DNAse I, EPICENTRE, Madison, WI, USA

Ethanol 99% MEK-vergällt, WALTER CMP, Kiel

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), APPLICHEM, Darmstadt

Flourescenz Mounting Medium, DAKO, Glostrup, Dänemark

Flüssigstickstoff, LINDE, München

Glycin, CARL ROTH, Karlsruhe

Hoechst 33258 (bis-benzimide), MOLECULAR PROBES, Eugen, OR, USA

In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; ROCHE, Mannheim

Leupeptin, SIGMA-ALDRICH, Steinheim

Methanol, J.T. BAKER, Deventer, Niederlande

Natriumchlorid (NaCl), J.T. BAKER, Deventer, Niederlande

Natriumfluorid (NaF), SIGMA-ALDRICH, Steinheim

Natriumhydroxid (NaOH), SIGMA-ALDRICH, Steinheim

Natriumorthovanadat (Na_3VO_4), SIGMA-ALDRICH, Steinheim

O.C.T. Compound TissueTek, SAKURA, Zoeterwoude, Niederlande

Paraformaldehyd (PFA), SIGMA-ALDRICH, Steinheim

PBS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), SIGMA-ALDRICH, Steinheim

Precision Plus Protein Dual Color Standard, BIORAD, Hercules, CA, USA

Propan-2-ol, SIGMA-ALDRICH, Steinheim

Rotiphorese Gel 30; CARL ROTH, Karlsruhe

RotiQuant (5x) Bradford-Reagenz, CARL ROTH, Karlsruhe

Salzsäure (HCl), J.T. BAKER, Deventer, Niederlande

Sodium dodecyl sulfate (SDS), SERVA, Heidelberg, Deutschland

TEMED, CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland

T-Per Lysispuffer, PIERCE, Rockford, IL, USA

tri-Natriumcitrat-Dehydrat; MERCK, Darmstadt, Deutschland

Trisbase, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland

Triton X-100, MERCK, Darmstadt, Deutschland

3.1.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Produkt-#
Actin-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	sc-1616
Anti-Mouse IgG-HRP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	7076
Anti-Rabbit IgG-HRP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	7074
Caspase-3	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9662
Cyclin D ₁	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	sc-717
IKK β	Upstate, Lake Placid, NY (USA)	05535
JNK	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9252
p21	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	sc-379
p38	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9212
p44/42 MAPK (ERK)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9102
p53	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9282
PCNA	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	sc-9857
pIKK α/β	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	2697S
p-JNK	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9251S
p-p38	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9211S

p-p44/42 MAPK (p-ERK)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	4376S
p-STAT1 (Ser)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9177S
p-STAT1 (Tyr)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9171S
p-STAT3 (Tyr)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9131S
SOCS-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	sc-7009
SOCS-3	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	sc-9023
STAT1	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9172
STAT3	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)	9132
Anti-Goat-HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark	P0449

3.1.5. Puffer und Lösungen

Permeabilisierungspuffer	0,1% TritonX-100 0,1%tri-Sodium-Dehydrat in Aqua dest.
10x PBS	80 g NaCl 11,6 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl add 1 l Aqua dest.; pH 7,0

1x PBS	2,7mM KCl 1,5mM KH_2PO_4 137mM NaCl 6,5mM Na_2HPO_4 add 1 l Aqua dest.; pH 7,4
Sammelgel-Lösung	68ml H_2O 17ml Rotiphorese Gel 30-Lösung 12,5ml 1M Tris pH 6,8 1ml 10% SDS
Trenngel-Lösung (12%)	14ml H_2O 40ml Rotiphorese Gel 30-Lösung 25ml 1,5M Tris pH 8,8 1ml 10% SDS 20ml Glyzerin
Strippingpuffer	3,5 ml β -Mercaptoethanol 10 g SDS 63 ml Tris-HCl ad 500ml Aqua dest.
10x Laufpuffer	20g SDS 288g Glycin 60,6g Trisbase ad 2L H_2O

1x Laufpuffer	100ml Laufpuffer (10x) 900ml Aqua dest.
Lysepuffer	10ml T-Per Lysispuffer 10µl Leupeptin 10µl Aprotinin 100µl Benzamidine 100µl PMSF 40µl EDTA 100µl Natriumfluorid 100µl Natriumorthovanadat
10x Blotpuffer	144g Glycin 30,3g Trisbase ad 1L Aqua dest.
1x Blotpuffer	100ml 10x Blotpuffer 200ml Methanol 700ml Aqua dest.
10x TBS	24,22g Trisbase 175,32g NaCl 2000ml Aqua dest. pH 7,6 → ca. 14,5ml 13M HCL

1x TBS	12,1 g Tris-HCl 8,8 g NaCl add 1 l Aqua dest. ; pH 7,4
Waschpuffer	1x TBS 0,05% Tween
Blockpuffer	1x TBS 0,05% Tween 5% Milchpulver
Antikörperpuffer	1x TBS 0,05% Tween 5% Milchpulver oder 5% BSA (je nach Primärantikörper)
5x Lämmli-Puffer	30ml 1M Tris-HCl pH 6.8 10g SDS 50ml Glycerol 20ml β -Mercaptoethanol 250mg Bromophenol-Blau

Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set, BIORAD, Hercules, CA, USA

3.1.6. Software

Adobe Photoshop, ADOBE, Saggart, Irland

AxioVision, CARL ZEISS, Oberkochen, Deutschland

Canon Utilities RemoteCaputre Task, CANON, Krefeld

InStat, GRAPHPAD SOFTWARE, San Diego, CA, USA

Microsoft Office, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

QuantityOne 4.3, BIORAD, Hercules, CA, USA

3.1.7. Versuchstiere

C56BL/6 -Mäuse

SAP-IFN γ -Maus (Hintergrund: C57BL/6)

Die erforderlichen Versuchstiergenehmigungen für alle Tierversuche lagen vor.

3.2. Methoden

3.2.1. N-Diethylnitrosamin-Applikation und Leberentnahme

SAP-IFN γ -Mäuse (siehe auch 2.5.) und Mäuse der Wildtyplinie C57BL/6 wurden unter Standard-Pathogen-freien Bedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Dr. rer. nat. Andreas Haemisch gezüchtet und gehalten. Für alle Tierversuche lag eine entsprechende Versuchstiergenehmigung vor. Im Alter von sechs oder 13 Wochen wurde transgenen und nicht-transgenen Tieren jeweils 150 μ l N-Diethylnitrosamin (DEN) in PBS (1 μ g/ μ l) per Intraperitonealinjektion verabreicht. Kontrolltiere beider Gruppen und gleichen Alters erhielten 150 μ l PBS. Somit konnten die Tiere der jeweiligen Altersgruppen in vier Untergruppen eingeteilt werden: ‚transgen mit DEN‘, ‚transgen ohne DEN‘, ‚wildtyp mit DEN‘ und ‚wildtyp ohne DEN‘. Sechs Tage nach Injektion wurden die Tiere getötet. Anschließend wurden die Lebern entnommen, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert.

3.2.2. Anfertigung von Kryoschnitten

Die bei -80 °C gefrorenen Leberproben wurden zunächst auf -22 °C angewärmt, bevor sie mittels TissueTek auf dem Probenträger fixiert wurden. Das Gewebe wurde mit einer Schnittdicke von 7 μ m geschnitten und auf einen Objektträger aufgenommen, anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 4%-Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert und für weitere 30 Minuten zum

Waschen in PBS gestellt. Die Schnitte wurden entweder direkt weiter verarbeitet oder zur Lagerung bei -20 °C für zwei Minuten in Absolutethanol dehydriert.

3.2.3. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL-Färbung)

Die TUNEL-Färbung dient zum Nachweis von Apoptose durch Detektion von DNA-Strangbrüchen. Dabei katalysiert eine terminale Desoxynucleotidyltransferase die Polymerisation von Fluoreszein-markierten Desoxyribonukleotiden am freien 3'-OH-Ende der DNA-Fragmente (TUNEL-Reaktion). Es wurde das *In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* von ROCHE verwendet.

Für die TUNEL-Färbung wurden in 4%igem Paraformaldehyd fixierte Kryoschnitte verwendet (siehe auch 3.2.2.). Zunächst wurden die Schnitte für 15 Minuten in Permeabilisierungslösung auf Eis gestellt um die Zellmembranen für das TUNEL-Substrat permeabel zu machen. Die Zusammenstellung des TUNEL-Reaktionsgemisches aus Markierungs- und Enzymlösung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben unmittelbar vor Gebrauch und wurde stets auf Eis gelagert. Zur Herstellung einer Positivkontrolle wurde vor der Markierung zunächst eine Probe für 10 Minuten mit 1000 U/ml DNase I in PBS bei Raumtemperatur inkubiert, um DNA-Strangbrüche zu induzieren. Anschließend wurden alle Proben zunächst zweimal in PBS gewaschen und die Objektträger um die Probe herum gründlich abgetrocknet, um eine Verdünnung des Reaktionsgemisches mit auf dem Träger verbliebenen PBS zu verhindern. Für jede Probe, einschließlich der Positivkontrolle, wurden jeweils 5 µl der

Enzymlösung und 45µl der Markierungslösung zusammenpipettiert und auf den jeweiligen Objektträger gegeben. Zur Herstellung einer Negativkontrolle wurde in Doppelbestimmung lediglich 50µl der Markierungslösung ohne Enzymlösung zugegeben. Alle Proben wurden unter Lichtschutz in einer Feuchtkammer bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben dreimal in PBS gewaschen. Zur Kerngegenfärbung wurden die Proben für eine Minute in Hoechst 33258-Lösung mit PBS (1:20.000) gegeben, zweimal in PBS gewaschen und anschließend mit Eindeckelmedium eingedeckelt. Zur Auswertung der Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop von jedem Schnitt repräsentative Stellen sowohl für die TUNEL- als auch für die Hoechst-Färbung fotografiert und am Computer in Adobe Photoshop übereinandergelegt. Zellen, die in Apoptose gehen, fragmentieren die DNA, wodurch es zu einer Anfärbung der DNA-Fragmente durch die TUNEL-Reaktion kommt. Die TUNEL-positiven Zellkerne stellen sich neongrün dar, während die Kerngegenfärbung alle Zellkerne blau färbt.

Von jedem Tier wurden jeweils fünf Schnitte ausgewertet und repräsentative Stellen ausgezählt. Zur Auswertung wurden lediglich die TUNEL-positiven Zellkerne von Hepatozyten gezählt, während die (deutlich kleineren) Kerne von Entzündungszellen nicht beachtet wurden. Die Zahl der TUNEL-positiven Kerne wurde in Relation zur Nettofläche des Schnittes (ohne Entzündungsinfiltrate und Gefäße; gemessen mit dem Programm AxioVision LE Rel. 4.5 von Carl Zeiss) gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms InStat; mit dem Mann-Whitney-Test wurden die Ergebnisse einzelner Gruppen verglichen.

3.2.4. Herstellung von Leberlysaten aus Kryogewebe

Den kryokonservierten Leberproben wurden in 1,5ml Reaktionsgefäßen 750µl Lysepuffer zugegeben, während diese dabei stets auf Eis gelagert wurden. Mit einem Ultra Turrax wurden die Proben zunächst soweit zerkleinert, bis keine festen Leberbestandteile mehr sichtbar waren. Als nächstes wurde die Suspension mit Hilfe eines Sonifikators für 10 Sekunden sonifiziert, um die Kernmembran zu zerstören und somit die Proteine des Kerninneren frei zu setzen. Anschließend wurde die Suspension bei 13.000 U/min. bei +4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment verworfen. Sofern der Überstand nicht direkt verwendet wurde, wurde dieser bei -20 °C gelagert.

3.2.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Vorbereitung wurde 5x Bradford-Konzentrat (RotiQuant) gemäß der Bedienungsanleitung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5 verdünnt und das entstandene 1x Bradford-Reagenz anschließend noch durch einen Mikrofilter filtriert. Die vorher hergestellten Leberlysate (s. auch 3.2.4.) wurden mit der 1x Bradford-Lösung 1:1000 in Photometerküvetten verdünnt. In den Küvetten fand nun eine Farbreaktion statt, die anhand ihrer Extinktion bei 595nm Wellenlänge mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden konnte. Eine Eichkurve wurde mit Hilfe von standardisiertem Bovinem Serumalbumin (BSA) für Konzentrationen zwischen 0,125mg/ml und 2mg/ml erstellt. Mit Hilfe dieser Standardkurve konnte nun anhand der gemessenen Extinktion der Proteingehalt der einzelnen Proben ermittelt werden.

Um die Proben für einen Western Blot verwenden zu können, sollten alle Proben nahezu gleiche Mengen an Protein enthalten. Dafür wurden für 400µl Gesamtprobenvolumen das Äquivalent von 1200µg Leberlysat (nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford) mit Aqua dest. auf 320µl Volumen aufgefüllt und durch 80µl 5x Lämmli-Puffer vervollständigt. Somit enthielten alle Proben eine Proteinkonzentration von 3µg/µl. Weiterhin war es notwendig, die Proteine in den Proben zu denaturieren. Dies geschah, indem die Proben für 10 Minuten auf 95°C erhitzt wurden. Anschließendes sofortiges auf Eis Stellen verhinderte die Renaturierung der Proteine. Die fertigen Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.2.6. Western Blot

a. Prinzip der Methode

Als Western Blot, oder auch Immunoblot, bezeichnet man das Übertragen von Proteinen auf eine Trägermembran, auf der diese dann mit Hilfe von Antikörperreaktionen nachgewiesen werden können. Mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese können Proteingemische entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine aufgetrennt werden. Es entstehen dabei Proteinbanden im Gel, die durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen, mit Hilfe von Antikörpern und Chemolumineszenz sichtbar gemacht, und auf Fotofilm dokumentiert werden können.

b. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde ein Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel-Anteil, verwendet. Zur Herstellung des Trenngelanteils wurden 10ml 12%ige Trenngellösung frisch mit 12,5µl 10% APS und 10µl TEMED versetzt und zügig zwischen zwei Glasplatten einer Gelgießvorrichtung (Abstand d=1mm) gegossen. Zur Herstellung des Sammelgels wurden 5ml Sammelgellösung, sowie 12,5µl APS und 10µl TEMED zusammen pipettiert. Die Sammelgellösung wurde unverzüglich auf das Trenngel gegossen. Um Taschen für die Proteinproben zu erhalten, wurde in das Sammelgel ein Kamm mit entsprechenden Ausbuchtungen für die Taschen (n=10) aufgesetzt. Das Gel benötigte dann etwa 20 Minuten, bis es vollständig polymerisiert war.

Sobald das Gel polymerisiert war, wurde es in die Laufkammer eingesetzt und diese mit 1x Laufpuffer gefüllt. Nachdem der Kamm aus dem Gel herausgezogen war, wurden die Taschen mit 1x Laufpuffer ausgespült um letzte Acrylamidreste aus den Taschen zu entfernen. Jetzt konnten die Proben – jeweils 20µl (entsprechend jeweils 60µg Protein) - in die Taschen pipettiert werden. Um später den Proteinbanden ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurden 10µl eines Molekulargewichtsstandards (Kaleidoskope Prestained Standard, BIORAD) in die erste Tasche gegeben. Bei einer Spannung von 100V liefen die Proben für etwa 10 Minuten in das Gel ein. Dann wurde die Spannung für etwa 2 Stunden auf 160V erhöht, bis die Proben nahezu vollständig durch das Gel gelaufen waren.

c. Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Trägermembran übertragen. Dazu wurde der Reihe nach ein Schwamm, eine Lage Whatman-Papier, das vorher hergestellte Polyacrylamidgel (s. 3.2.6. b.), eine Nitrozellulosemembran, eine erneute Lage Whatman-Papier und ein weiterer Schwamm innerhalb der gitterförmigen Halterung der Blotkammervorrichtung luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Die Halterung wurde in die Blotkammer eingesetzt und diese mit 1x Blotpuffer aufgefüllt. Zusätzlich wurde ein gefrorenes Kühlelement mit in die Kammer gestellt, um der beim Blotvorgang entstehenden Wärme entgegen zu wirken. Für den Transfer der Proteine in Richtung Anode wurde schließlich ein elektrisches Feld von 300mA für die Dauer von 45 Minuten angelegt.

d. Immunodetektion auf der Nitrozellulosemembran

Nachdem der Blotvorgang beendet war, wurde die Membran bei Raumtemperatur für etwa 15 Minuten getrocknet. Die sichtbaren Farbbanden des Proteinstandards wurden mit Kugelschreiber dünn nachgezeichnet, um die Molekulargewichte der Proteinbanden später zuordnen zu können. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für 60 Minuten in Blockpuffer auf einem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach Fragestellung wurde die Membran mit dem geeigneten Primärantikörper (siehe 3.1.4.) in entsprechender Verdünnung in Antikörperpuffer (je nach Antikörper mit 5% Milch oder 5% BSA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am

nächsten Tag wurde die Membran zunächst viermal für jeweils fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran mit einem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000 in Antikörperpuffer mit 5 % Milch) für eine Stunde inkubiert und anschließend wiederum viermal für jeweils fünf Minuten gewaschen. Nun erfolgte die Detektion des Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers mittels Chemolumineszenz. Hierzu wurden entsprechend der Anleitung jeweils 1,5 ml beider Lösungen des Roti-Lumin-Kits im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 90 Sekunden darin inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Detektionskammer zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und somit belichtet. Die Belichtungszeit variierte je nach Primärantikörper, beziehungsweise der Konzentration des zu detektierenden Proteins zwischen Sekunden und Stunden. Der Röntgenfilm konnte nun abschließend im Röntgenfilmentwickler entwickelt werden und die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

e. 'Stripping' der Nitrozellulosemembran

Um dieselbe Membran auf ein anderes Protein hin zu untersuchen, mussten zunächst die bereits gebundenen Antikörper von der Membran gewaschen werden. Hierzu wurde die Membran für 20 Minuten in 70 °C heißen 'Stripping'-Puffer gelegt. Das Mercaptoethanol im 'Stripping-Puffer' reduziert Disulfidbrücken, das SDS linearisiert die Proteine und bricht damit ihre Tertiärstruktur auf, so dass die Antikörper das Antigen nicht mehr binden können und abgewaschen werden. Nach dem 'Stripping' war es nötig, die

Membran mindestens viermal für je fünf bis zehn Minuten in Waschpuffer zu waschen. Jetzt erfolgten die gleichen Schritte wie ab 3.2.6.d beschrieben, jedoch wurde eine bereits einmal verwendete Membran nicht noch einmal getrocknet.

4. Ergebnisse

Für die Versuche dieser Arbeit wurden IFN γ -transgene und nicht-transgene Mäuse nach intraperitonealer DEN-Applikation verwendet. Als Kontrolle erhielten transgene und nicht-transgene Tiere eine intraperitoneale PBS-Injektion. Dadurch entstanden vier Gruppen von Mäusen: ‚transgen mit DEN‘, ‚wildtyp mit DEN‘, ‚transgen ohne DEN‘ und ‚wildtyp ohne DEN‘. Darüber hinaus wurden einige Versuche sowohl an sechs Wochen alten, als auch an 13 Wochen alten Tieren durchgeführt. Die gezeigten Western Blots sind repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

4.1. Permanente Aktivierung des IFN γ /STAT 1-Signalwegs in SAP-IFN γ -Mäusen

SAP-IFN γ -Mäuse zeigen eine lebenslange Erhöhung der Serumtransaminasen, sowie das histologische Bild einer chronischen Hepatitis (Toyonaga 1994). Es ist jedoch nicht bekannt, ob der IFN γ -/STAT-Signalweg in den Hepatozyten auch permanent aktiviert ist. Daher wurde zum Nachweis der bioaktiven Wirkung von IFN γ in den Lebern sechs bzw. 13 Wochen alter IFN γ -transgener Mäuse die Aktivität des IFN γ -Signalwegs im Western Blot untersucht. Als Kontrolle dienten gleich alte nicht-transgene Tiere der Wildtyplinie C57Bl/6. Darüber hinaus sollte sichergestellt werden, dass die Applikation von DEN nicht zu einer Aktivitätsveränderung im IFN γ -/STAT-Signalwegs führte. Sowohl IFN γ -transgenen als auch nicht-transgenen Mäusen wurde daher sechs Tage vor Entnahme der Leber jeweils entweder DEN oder PBS intraperitoneal appliziert.

In nicht-transgenen Mäusen lies sich mittels Western Blot kein STAT 1 nachweisen, darüber hinaus war auch keine aktivierte, d.h. phosphorylierte Form von STAT 1 nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigten IFN γ -transgene Mäuse sowohl im Alter von sechs als auch von 13 Wochen eine deutliche STAT 1-Expression, sowie eine massive Aktivierung in Form von phosphoryliertem STAT 1. Dabei zeigte sich, dass STAT 1 sowohl an Serin727 (pSTAT 1 (Ser)) als auch an Tyrosin701 (pSTAT 1 (Tyr)) phosphoryliert wurde (Abb. 4). Die Expression von STAT 3 war in den Lebern transgener und nicht-transgener Tiere vergleichbar stark. Jedoch zeigten die Lebern der IFN γ -transgenen Tiere beider Altersgruppen eine gesteigerte Aktivität von STAT 3 (pSTAT 3) im Vergleich mit den nicht-transgenen Kontrollen. Die Applikation von DEN sechs Tage vor Leberentnahme führte zu keinem Unterschied in der Aktivität des STAT-Signals, weder für STAT 1 noch für STAT 3 (Abb. 4).

Während in den Lysaten nicht-transgener Mäuselebern keinerlei Aktivität des IFN γ -/STAT 1-Wegs messbar war, deutete die anhaltende Phosphorylierung von STAT 1 und STAT 3 zu beiden Zeitpunkten in den transgenen Mäusen darauf hin, dass der IFN γ /STAT-Signalweg in den transgenen Mäusen dauerhaft aktiviert war.

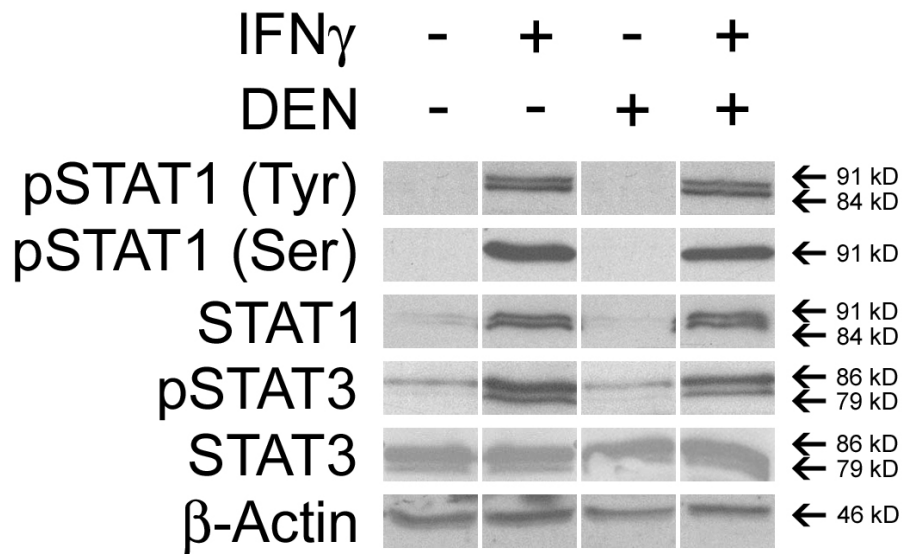
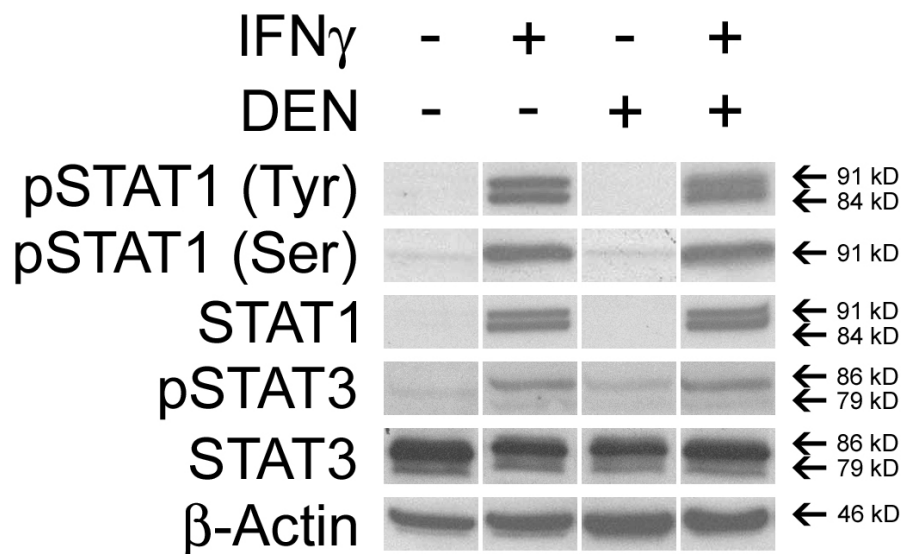
A**B**

Abb. 4 Permanente Aktivität des IFN γ -STAT-Signalwegs in Lebern IFN γ -transgener Mäuse In Leberlysaten IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse wurden die Aktivitäten der STAT 1- und STAT 3-Signalwege untersucht. Im Gegensatz zu nicht-transgenen Mäusen, zeigten sowohl sechs Wochen alte (A) als auch 13 Wochen alte (B) IFN γ -transgene Mäuse eine Aktivität der IFN γ -STAT-Signalwege. Die Applikation von DEN sechs Tage vor Leberentnahme führte zu keinem Unterschied in der Aktivität von STAT 1 und STAT 3 (A und B).

4.2. Keine Inhibierung des IFN γ -/STAT-Wegs durch SOCS 1 und SOCS 3

Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) –Proteine sind endogene Inhibitoren des IFN γ -/STAT-Wegs. SOCS 1 und SOCS 3 verhindern die Phosphorylierung von STAT 1, respektive STAT 3. Da die Expression der SOCS-Proteine unter anderem durch IFN γ induziert werden kann und so ein negativer Rückkopplungsmechanismus entsteht, wurde die Expression von SOCS 1 und SOCS 3 in den Leberlysaten mittels Western Blot untersucht. Dabei sollte ebenfalls ein Einfluss von DEN auf die Expression von SOCS 1 und SOCS 3 untersucht werden.

Bei SOCS 1 zeigte sich eine leicht geringere Proteinexpression in Lebern transgener gegenüber nicht-transgener Tiere lediglich in den 13 Wochen alten Mäusen. Die Applikation von DEN führte hierbei zu keinem Unterschied. In den Lebern sechs Wochen alter Mäuse gab es keine Unterschiede in der Expression von SOCS zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren. Auch durch die Applikation von DEN kam es zu keiner veränderten Proteinexpression. Im Gegensatz dazu war die SOCS 3-Expression in den Lebern transgener Mäuse gegenüber nicht-transgenen etwas erhöht. Die Applikation von DEN führte zu einer minimalen Erhöhung der Expression von SOCS 3, sowohl in transgenen als auch nicht-transgenen Tieren (Abb. 5).

Der negative Rückkopplungsmechanismus über SOCS 1 schien somit bei der persistierenden Expression von IFN γ in den SAP-IFN γ -Mäusen höchstens eine untergeordnete Rolle zu spielen und war ein weiterer Hinweis für eine permanente Aktivität des IFN γ -/STAT 1-Signalwegs. Die leicht erhöhte Expression von SOCS 3 in den transgenen Tieren ließ hingegen einen negativen Rückkopplungsmechanismus für das aktivierte STAT 3 vermuten.

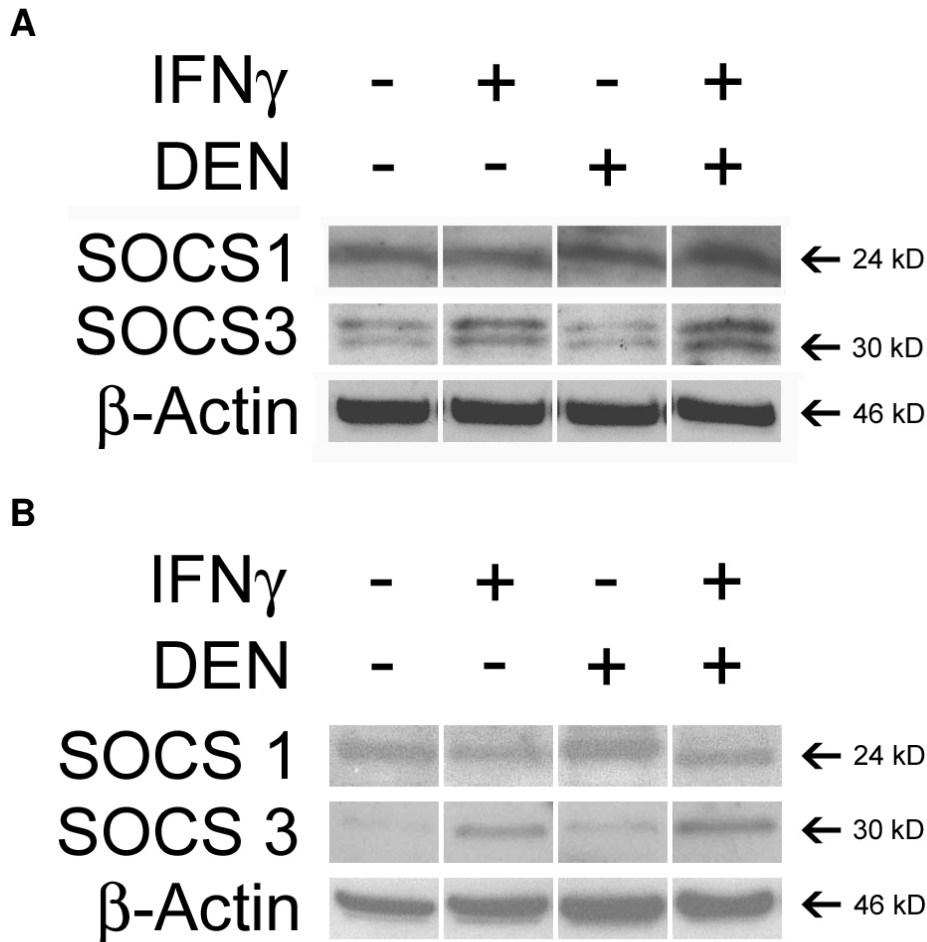


Abb. 5 Keine Inhibierung des IFN γ -Signals durch negative Rückkopplungsmechanismen

Leberlysate IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse im Alter von sechs (A) und 13 Wochen (B) wurden auf die Expression der STAT 1/STAT 3-Signal-Inhibitoren SOCS 1 und SOCS 3 untersucht. SOCS 1 ist in Lebern IFN γ -transgener Mäuse gegenüber nicht-transgenen Mäusen minimal weniger exprimiert, SOCS 3 ist in Lebern transgener Tieren leicht erhöht (A und B). DEN-Applikation führte zu keinem Unterschied in der Protein-Expression (A und B).

4.3. Andauernde kompensatorische Proliferation in SAP-IFN γ -Mäusen

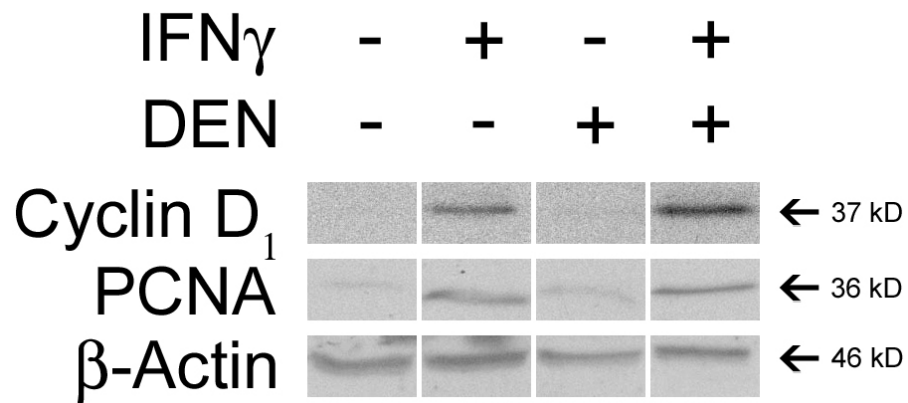
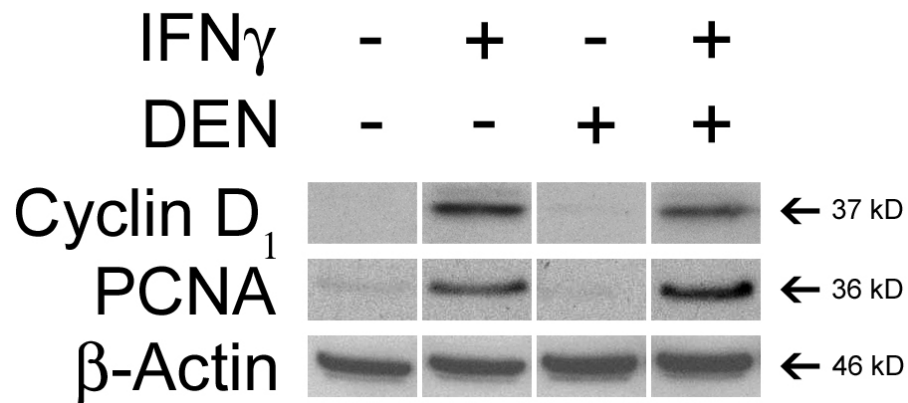
Im Anschluss an die Beobachtung, dass der IFN γ -Weg permanent aktiviert war, stellte sich die Frage, ob es durch den andauernden Hepatozytenschaden in transgenen Mäusen auch zu einer kompensatorischen Regeneration der Leber kam, was als ein Mechanismus für die Entstehung des HCC angenommen wird.

Als Marker für Proliferation bzw. als Regenerationsmarker wurden die Leberlysate auf die Zellzyklusproteine Cyclin D₁ und das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) hin im Western Blot untersucht. Ebenso sollte ein möglicher Einfluss von DEN auf die Proliferation untersucht werden.

In Lebern von sowohl sechs als auch 13 Wochen alten transgenen Tieren ließ sich eine Expression von PCNA nachweisen. Im Vergleich dazu war in Lebern nicht-transgener Kontrolltiere kein PCNA detektierbar. Die Applikation von DEN führte zu keinem Unterschied in der Expression von PCNA in transgenen und nicht-transgenen Tieren.

Cyclin D₁ war in den Leberlysaten nicht-transgener Mäuse nicht nachweisbar. In den transgenen Lebern hingegen fand sich eine deutliche Expression von Cyclin D₁ sowohl in sechs, als auch in 13 Wochen alten Mäusen. Die Applikation von DEN sechs Tage vor Leberentnahme führte weder in den jüngeren, noch in den älteren Tieren, unabhängig vom Transgenstatus, zu einem Unterschied in der Proteinexpression von Cyclin D₁ im Vergleich zu der entsprechenden PBS-behandelten Gruppe (Abb. 6).

Da sowohl bei sechs als auch bei 13 Wochen alten transgenen Mäusen beide Proliferationsmarker stark exprimiert wurden, war davon auszugehen, dass die SAP-IFN γ -Mäuse eine permanente kompensatorische Hepatozytenregeneration aufgrund der chronischen Entzündung aufwiesen.

A**B****Abb. 6 Andauernde kompensatorische Proliferation in IFN γ -transgenen Mäusen**

Leberlysate von sechs Wochen alten (A) und 13 Wochen alten (B) IFN γ -transgenen und nicht-transgenen Mäusen wurden auf die Proliferationsmarker Cyclin D₁ und PCNA untersucht. IFN γ -transgene Mäuse zeigen im Gegensatz zu nicht-transgenen Tieren sowohl bei Cyclin D₁, als auch bei PCNA eine deutliche Expression, vereinbar mit andauernder kompensatorischer Proliferation in den Lebern der IFN γ -transgenen Mäuse. Die Applikation von DEN führte zu keiner Veränderung in der Expression der Proliferationsproteine (A und B).

4.4. Vermehrte Apoptose in IFN γ -transgenen Mäusen

Um zu überprüfen, ob dem programmierten Zelltod von Hepatozyten eine entscheidende Rolle beim Schutz vor Karzinogenese zukam, wurde mittels der TUNEL-Färbung das Vorhandensein von Apoptose in Schnitten IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuselebern untersucht. Auch der Einfluss von DEN war von Interesse, so dass die Lebern nach Applikation von DEN untersucht wurden. Ermittelt wurde die Anzahl apoptotischer Hepatozyten pro Flächeneinheit, für transgene und nicht-transgene Tiere jeweils mit und ohne DEN -Vorbehandlung. Repräsentative Schnitte sind in Abb. 7A-D gezeigt.

Die Auswertung der Gruppen ergab folgende Werte (alle Werte angegeben als apoptotische Hepatozyten pro mm² Leber):

	Median	+/- 50% Box	Min	Max
Wildtyp ohne DEN (n=15)	1,21	1,19-1,25	0,00	4,89
SAP-IFN γ ohne DEN (n=15)	13,17	8,43-19,72	3,58	26,18
Wildtyp mit DEN (n=20)	5,45	3,62-6,40	1,20	8,62
SAP-IFN γ mit DEN (n=15)	36,75	34,47-71,61	17,46	105,01

IFN γ -transgene Mäuse zeigten im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen eine signifikant größere Anzahl apoptotischer Hepatozyten ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-Test). Nach DEN-Applikation zeigten die transgenen Mäuse ebenfalls signifikant mehr Apoptose als nicht-transgene Tiere nach DEN-Applikation ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-Test). Die Applikation von DEN führte sowohl bei den IFN γ -transgenen ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-Test) als auch bei den nicht-

transgenen Mäusen ($p=0,0001$; Mann-Whitney-Test) zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl apoptotischer Hepatozyten (Abb. 8).

Die Ergebnisse der TUNEL-Färbung zeigten, dass IFN γ in der Leber in der Lage zu sein schien, Apoptose zu induzieren. Die Applikation von DEN führte ebenfalls zu einer Apoptoseinduktion. Bei Kombination von IFN γ und DEN-Applikation potenzierte sich die Wirkung.

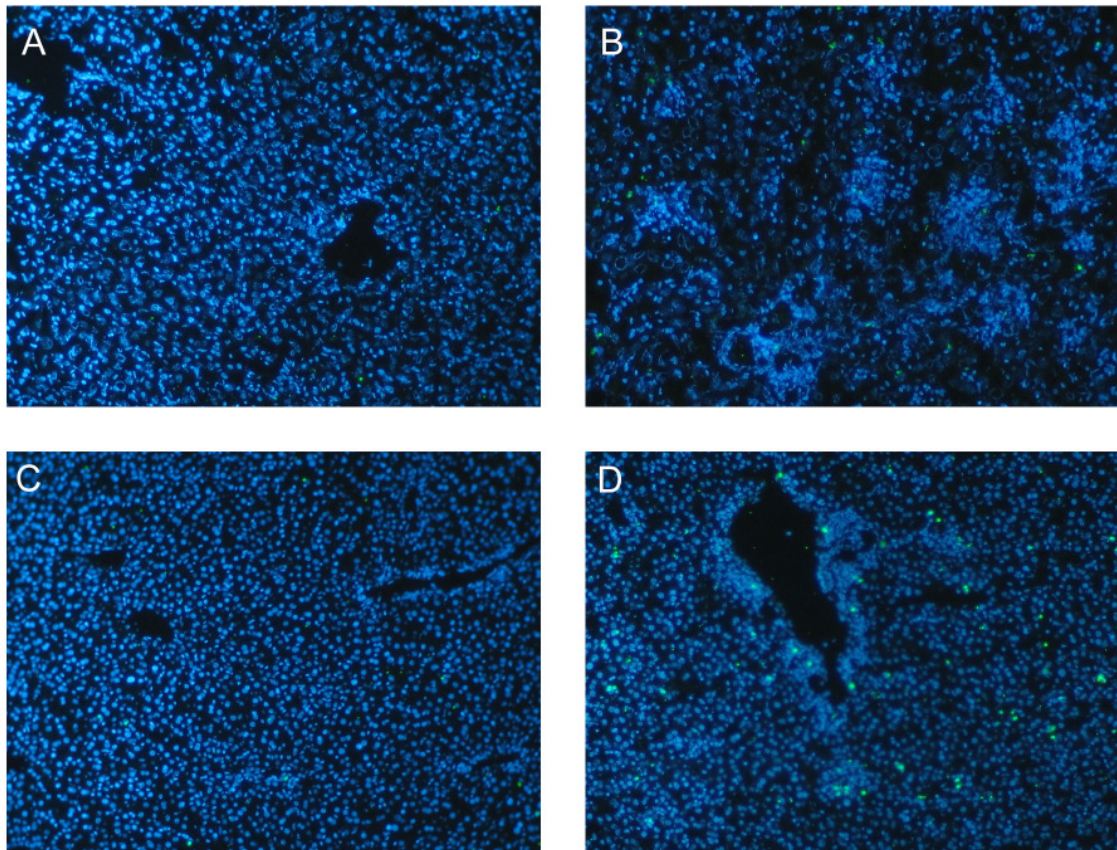


Abb. 7 DEN-Applikation in IFN γ -transgenen Mäusen führt zur Apoptose in Hepatozyten

Die TUNEL-Färbung zeigt für DEN-behandelte IFN γ -transgene Mäuse (D) eine deutliche Zunahme an apoptotischen Hepatozyten gegenüber DEN-behandelte nicht-transgene Mäuse (C), sowie gegenüber unbehandelten transgenen (B) oder unbehandelten nicht-transgenen Tieren (A). Apoptotische Hepatozyten zeigen sich durch grün angefärbte Zellkerne, alle anderen Zellkerne sind blau gefärbt.

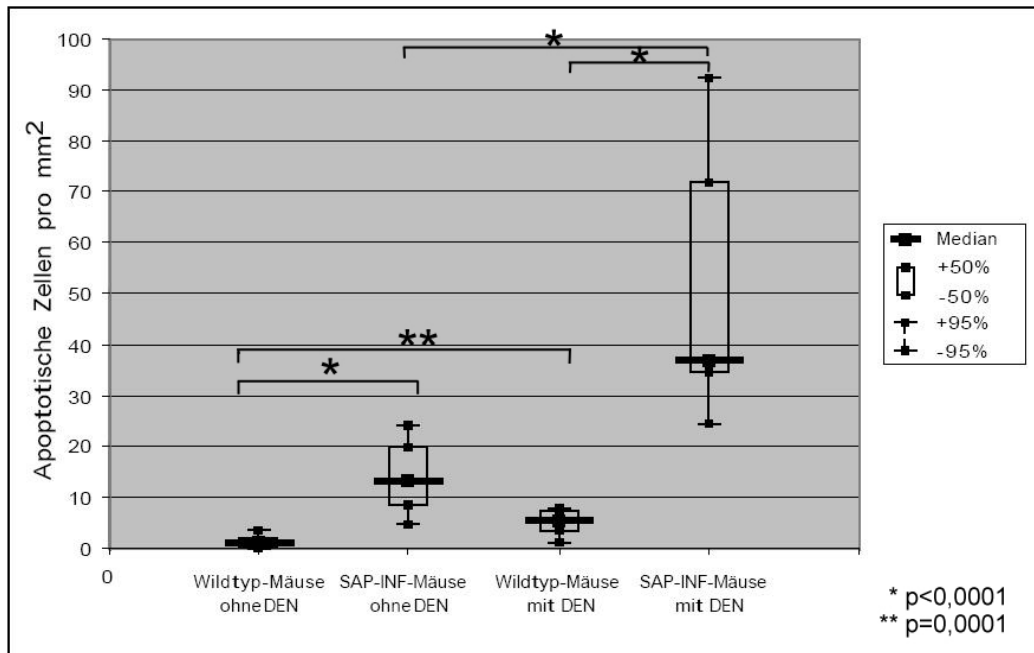


Abb. 8 Auswertung der TUNEL-Färbung von IFN γ -transgenen und nicht-transgenen Mäusen mit/ohne vorangegangener DEN-Applikation Der Boxplot veranschaulicht die Ergebnisse der TUNEL-Färbung. DEN-behandelte transgene Mäuse zeigten signifikant mehr Apoptose als nicht-behandelte transgene oder DEN-behandelte Wildtypmäuse. Unbehandelte Wildtypmäuse zeigten nahezu keine apoptotischen Hepatozyten. Klammern und Sterne markieren statistische Signifikanz. Die Angaben sind indiziert als apoptotischer Hepatozyten pro mm² Leberfläche.

4.5. Apoptosemarker im Western Blot

Zur Bestätigung des Ergebnisses der TUNEL-Färbung wurden die Leberlysate der vier Gruppen für beide Altersgruppen auf den Apoptosemarker Caspase-3 hin im Western Blot untersucht.

Die Expression der inaktiven Procaspace-3 (35kD-Bande) war bei allen Gruppen in etwa identisch. Eine Aktivierung von Caspase-3 in Form von Caspasenspaltung (19kD-Bande), als Anhalt für ablaufende Apoptose, fand

sich in den IFN γ -transgenen Lebern beider Altersgruppen deutlich sichtbar, während in den Lysaten nicht-transgener Tiere keine Caspasenspaltung detektierbar war. Die Applikation von DEN führte bei den nicht-transgenen Tieren zu keiner Caspasenspaltung, während bei IFN γ -transgenen Mäusen die DEN-Behandlung sogar noch eine Signalverstärkung gegenüber den unbehandelten transgenen Lebern hervorrief. Insgesamt zeigten sich keine Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Tieren (Abb. 9A und B).

Das Vorliegen der Caspasenspaltung bedeutete, dass in den Lebern der transgenen Tieren Apoptose stattfand. Die Anzahl an apoptotischen Hepatozyten in IFN γ -transgenen Mäusen wurde durch eine vorangegangene DEN-Applikation gesteigert. Die Ergebnisse der TUNEL-Färbung konnten damit bestätigt werden. In nicht-transgenen Mäuselebern, mit oder ohne DEN-Behandlung, kam es hiernach zu keiner im Western Blot detektierbaren Apoptoseaktivität.

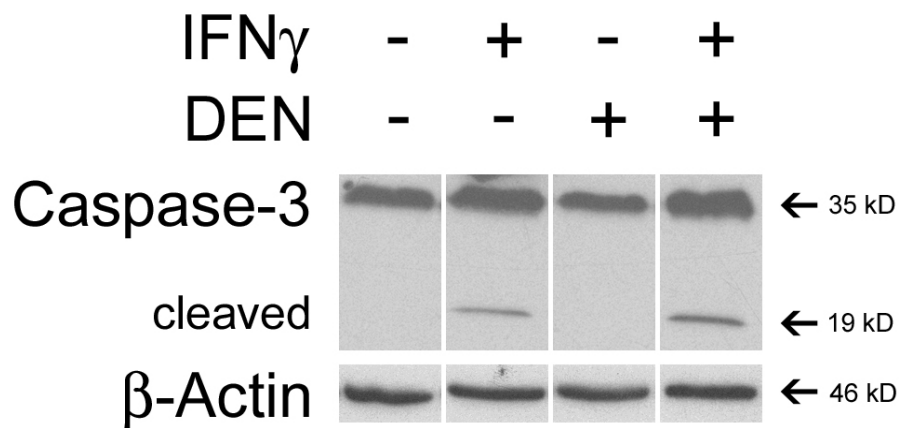
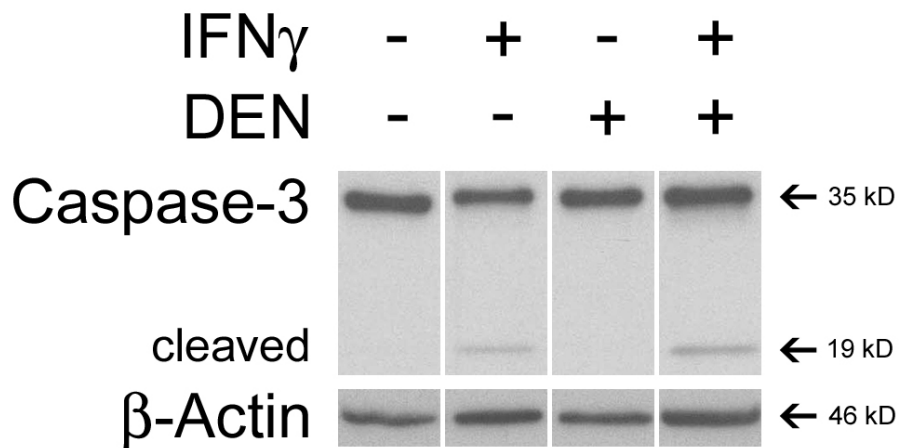
A**B**

Abb. 9 Caspase-3-Aktivität in IFN γ -transgenen Mäusen wird durch DEN-Applikation gesteigert Western Blots von Leberlysaten sechs Wochen (A) und 13 Wochen (B) alter IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse, mit vorhergehender DEN- oder PBS-Applikation. Spaltprodukte der Caspase-3 („cleaved“ Caspase-3 bei 19kD) sind ein Indikator für Apoptose. In IFN γ -transgenen Mäusen war eine Caspasenspaltung in beiden Altersgruppen sichtbar, die durch DEN-Applikation sogar leicht verstärkt wurde.

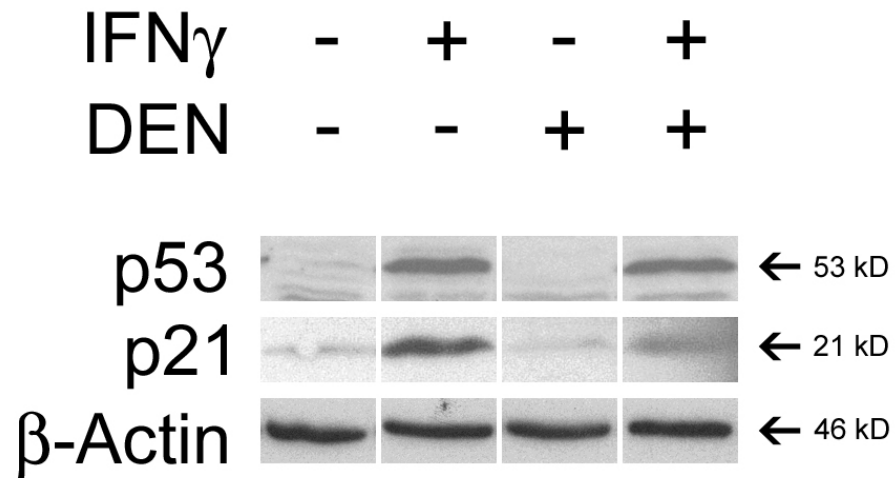
4.6. p53-Aktivität in IFN γ -transgenen Mäusen

Bei der Auslösung von Apoptose gilt das Tumorsuppressorprotein p53 als ein möglicher Protagonist, weshalb der Einfluss von p53 in diesem Modell untersucht wurde. Dazu wurden die Leberlysate auf p53-Expression hin im Western Blot untersucht. Ein Indikator für Zellzyklusarrest-induzierende Aktivität von p53 ist das p21-Protein, dessen Transkription direkt von p53 induziert wird. Die Expression von p21 wurde ebenfalls im Western Blot untersucht.

Es zeigte sich bei IFN γ -transgenen Lebern beider Altersgruppen eine deutliche Akkumulation von p53, unabhängig von einer vorhergegangenen DEN-Behandlung. In den nicht-transgenen Lebern beider Altersgruppen fanden sich höchstens Spuren von p53, ebenfalls ohne Unterschied zwischen DEN-vorbehandelten und Kontrolllebern (Abb. 10). Die Expression von p21 in den Lebern transgener Tiere war deutlich stärker als in Lebern nicht-transgener Mäuse. Die Applikation von DEN führte zu einer Abnahme der p21-Expression in Lebern transgener Mäuse (Abb. 10). In den Lebern sechs Wochen alter nicht-transgener Mäuse ließ sich ebenfalls eine Abnahme der p21-Expression nach DEN-Applikation nachweisen (Abb. 10A).

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das IFN γ -Signal in den Lebern der transgenen Tiere dazu führte, dass in den Hepatozyten das Tumorsuppressorprotein p53 akkumulierte. Durch Applikation von DEN kam es zu einer verminderten Expression von p21, was darauf hindeutete, dass die Aktivität von p53 im Sinne einer Zyklusarrestinduktion nachließ und es stattdessen zu einem vermehrten Signal in Richtung Apoptose gekommen sein konnte.

A



B

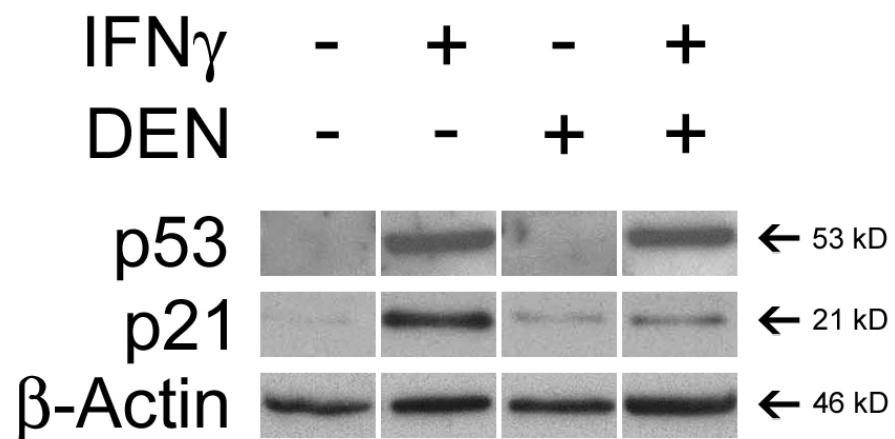


Abb. 10 Akkumulation von p53 in IFN γ -transgenen Mäusen und Expression des p53-regulierten p21-Proteins IFN γ -transgene Mäuse zeigten eine Akkumulation von p53, unabhängig von Alter (sechs Wochen (A) bzw. 13 Wochen alte Tiere (B)) und vorhergegangener DEN-Applikation (A und B). p21 war in IFN γ -transgenen Mäusen verstärkt exprimiert, die Applikation von DEN führte allerdings zu einer teilweisen Abnahme der p21-Expression (A und B).

4.7. *Nuclear factor kappa B* (NFkB)-Aktivität in SAP-IFN γ -Mäusen

Der *Nuclear factor kappa B* (NFkB) gilt als ein wichtiger Faktor in der Stressantwort der Zelle und als eine mögliche Verbindung zwischen Entzündung und Karzinogenese. Um eine Beteiligung des NFkB-Wegs bei der Tumorsuppression in 13 Wochen alten IFN γ -transgenen Mäuselebern, jeweils mit und ohne DEN-Applikation, zu beurteilen, wurde mittels Western Blot die Aktivität der I κ B-Kinase β (IKK β) untersucht. IKK β ist ein essentieller Aktivator des NFkB Proteins.

Bei allen Leberlysaten zeigte sich eine vergleichbare Ausprägung der Proteinexpression der IKK β . Es zeigte sich bei der Analyse der phosphorylierten I κ B-Kinase (pIKK β), dass lediglich in den Lebern IFN γ -transgener Tiere geringste Zeichen für IKK-Aktivierung vorlagen, die sich erst nach 18stündiger Belichtungszeit zeigten. In Lebern nicht-transgener Tiere war hingegen keinerlei Aktivierung im Western Blot messbar. Die Applikation von DEN führte zu keiner Veränderung der Aktivität von IKK β , ebenso war keine Abhängigkeit vom Alter der Tiere feststellbar (Abb. 11).

Die nur minimale Expression von pIKK β in den transgenen Mäusen deutete darauf hin, dass die Aktivität des NFkB-Weg in diesem Modell, wenn überhaupt, nur geringe Bedeutung für die Suppression der Karzinogenese hatte.

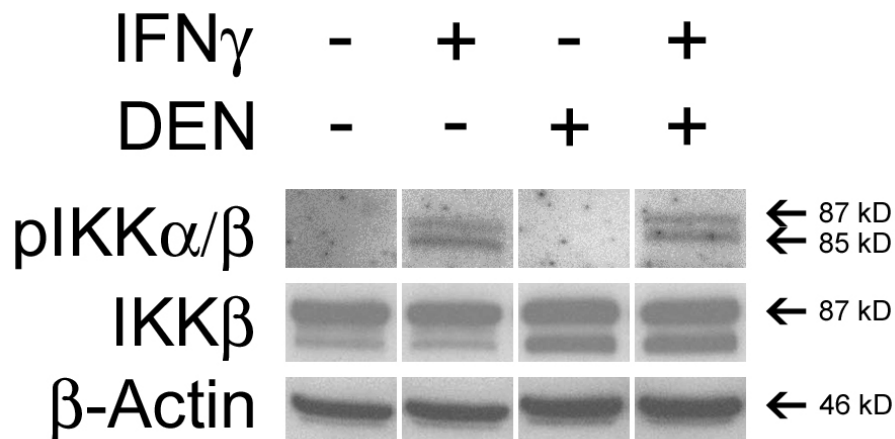


Abb. 11 NF κ B-Aktivierung in Lebern 13 Wochen alter IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse In Western Blots von Leberlysaten IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse zeigte sich kaum Aktivität des NF κ B-Wegs. Die Expression von IKK β (87kD) war in allen Gruppen vergleichbar, eine vorherige Applikation von DEN führte in keiner Gruppe zu Unterschieden in der Expression und Phosphorylierung von IKK β (87kD). 85kD entspricht pIKK α .

4.8. c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Aktivität in SAP-IFN γ -Mäusen

JNK scheint eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zu spielen, die genaue Rolle ist allerdings nicht abschließend geklärt (siehe 2.3.2.b.). Um die Aktivität des JNK-Signalwegs in den Lebern transgener und nicht-transgener Mäuse zu untersuchen, wurden die Leberlysate auf die Expression von JNK und phosphoryliertem JNK im Western Blot untersucht. Um hierbei zusätzlich die Rolle von DEN in diesem Modell zu untersuchen, wurde den IFN γ -transgenen und nicht-transgenen Mäusen sechs Tage vor Entnahme des Lebergewebes DEN bzw. PBS intraperitoneal appliziert.

In den Leberlysaten IFN γ -transgener Mäuse zeigte sich im Vergleich mit Lysaten nicht-transgener Mäuse eine deutlich vermehrte Expression von JNK1

(46kD), sowie eine dezent vermehrte Expression von JNK2 (54kD) in den sechs Wochen alten Tieren. Dies war unabhängig von einer Vorbehandlung der Tiere mit DEN (Abb. 12A). In 13 Wochen alten Tieren waren keine Unterschiede in der Expression von JNK1 oder JNK2 auszumachen (Abb. 12B). Die JNK-Aktivität wurde durch das Maß der JNK-Phosphorylierung gemessen. Es stellte sich heraus, dass JNK1-Phosphorylierung (pJNK1) in Lebern IFN γ -transgener Mäuse deutlich geringer war, als in den Lebern nicht-transgener Tiere. Allerdings war dieser Effekt in DEN-vorbehandelten Tieren nicht vorhanden (Abb. 12A und B). Phosphoryliertes JNK2 hingegen war in keiner Gruppe eindeutig nachweisbar (Abb. 12A und B).

Initial zeigten die IFN γ -transgenen Mäuse eine verstärkte Aktivität von JNK1. Allerdings machte die vergleichbar starke Aktivität von JNK1 in transgenen und nicht-transgenen Mäusen nach DEN-Applikation eine Beteiligung von JNK an der Suppression der Karzinogenese nicht sehr wahrscheinlich. Eine Beteiligung von JNK2 am Mechanismus der Suppression erschien aufgrund der fehlenden Aktivität ebenfalls äußerst unwahrscheinlich.

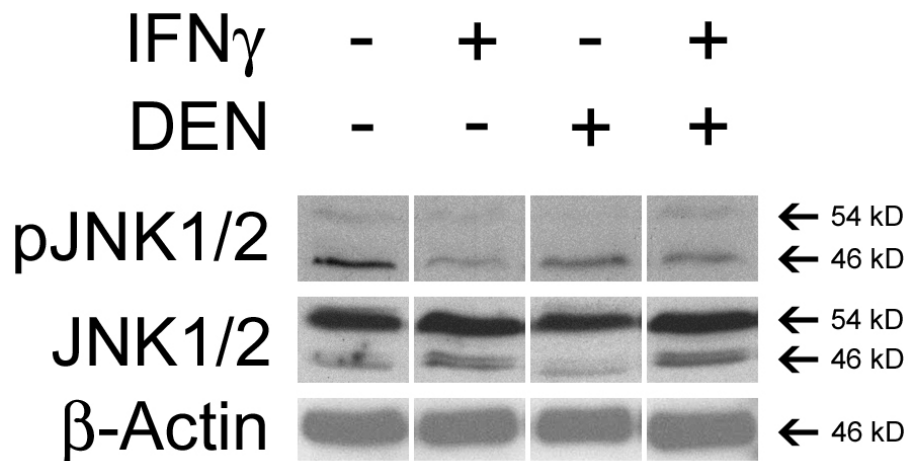
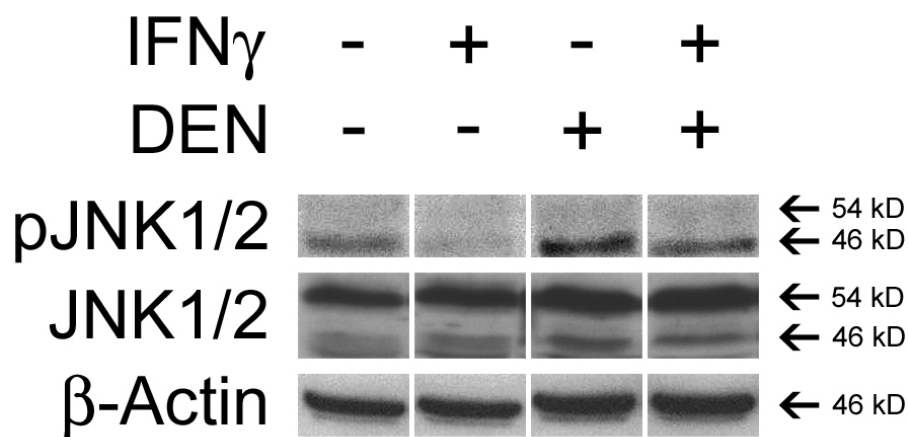
A**B**

Abb. 12 Verminderte JNK1-Aktivierung in IFN γ -transgenen Mäusen wird durch DEN aufgehoben Western Blots von Leberlysaten sechs Wochen alter (A) und 13 Wochen alter Tiere (B) zeigten eine verminderte JNK1-Aktivierung (pJNK1, 46kD Bande) in Leberlysaten IFN γ -transgener Mäuse, die jedoch durch vorhergegangene DEN-Applikation nahezu aufgehoben wurde (A und B). JNK2-Aktivierung (pJNK2, 54kD) ließ sich in keiner Gruppe detektieren (A und B).

4.9. p38-Aktivität in SAP-IFN γ -Mäusen

Eine veränderte Aktivität des p38-Wegs könnte, ebenso wie auch eine veränderte Aktivität des JNK-Signalwegs (siehe dazu 4.8.), zur Unterdrückung der Hepatokarzinogenese in IFN γ -transgenen Mäusen geführt haben. Um die Aktivität dieses Signalwegs zu untersuchen, wurden Leberlysate sechs und 13 Wochen alter IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse, jeweils mit und ohne vorangegangene DEN-Applikation, auf p38 und dessen aktivierte Form (p-p38) im Western Blot untersucht.

Die Expression von p38 war in allen Gruppen in etwa vergleichbar ausgeprägt. Die Expression des aktivierten, das heißt phosphorylierten p38 (p-p38) war in den Leberlysaten IFN γ -transgener Mäuse beider Altersgruppen gegenüber der in den jeweiligen Lebern nicht-transgener Tiere vermindert. Durch Applikation von DEN sechs Tage vor Entnahme der Leberproben konnte diese reduzierte Aktivität teilweise wieder aufgehoben werden, so dass der Unterschied zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren marginal war. In 13 Wochen alten Tieren war der Unterschied der p38-Aktivierung jedoch auch nach DEN-Applikation ausgeprägt (Abb. 13).

Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression von p38 bzw. der Aktivität des p38-Signalwegs und dem Schutz IFN γ -transgener Mäuse vor chemisch-induzierten Hepatokarzinogenese nachweisen.

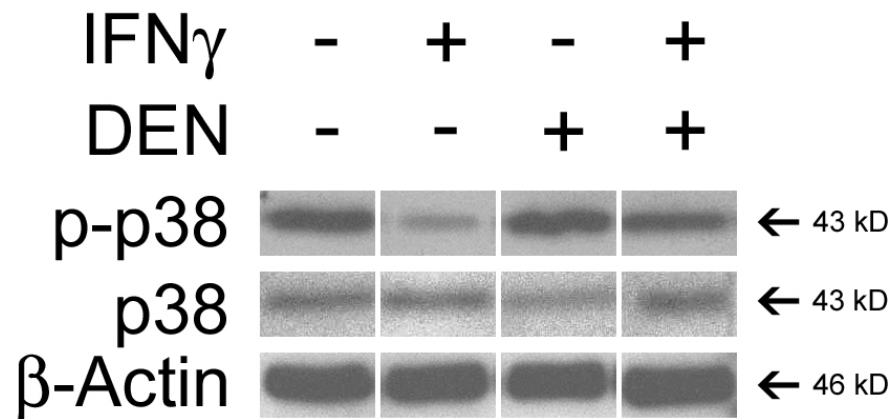
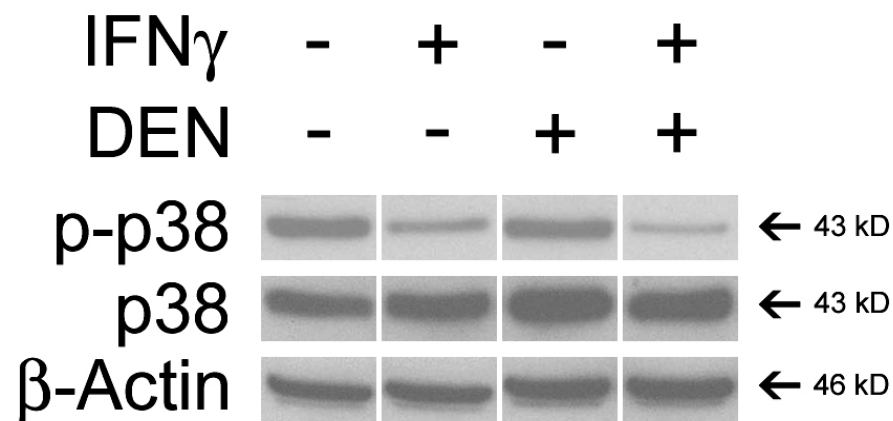
A**B**

Abb. 13 Verminderte p38-Aktivierung in Lebern IFN γ -transgener Mäuse Leberlysate von sechs Wochen alten (A) und 13 Wochen alten IFN γ -transgenen und nicht-transgenen Mäusen (B) wurden auf p38-Aktivierung hin untersucht. Die basale p38-Expression war in allen Gruppen vergleichbar stark (A und B), die Phosphorylierung (p-p38) war in IFN γ -transgenen Mäusen vermindert (A und B). Eine vorhergegangene DEN-Applikation führte in sechs Wochen alten Tieren zur Aufhebung der verminderten Expression (A), in 13 Wochen alten Tieren jedoch blieb die p38-Aktivität erniedrigt (B).

4.10. Extracellular-signal related kinase (ERK)-Aktivität in SAP-IFN γ -Mäusen

Der Aktivität der MAP-Kinase ERK1/2, auch bekannt als p44/p42, wird eine Rolle in der Entstehung von Karzinomen zugeschrieben. Daher wurden die Expression von ERK und dessen Aktivität in den Leberlysaten sechs und 13 Wochen alter transgener und nicht-transgener Mäuse im Western Blot untersucht. Zusätzlich sollte der Einfluss von vorhergegangener DEN-Injektion auf die Proteinexpression bzw. die Phosphorylierung ebenfalls im Western Blot untersucht werden.

In Leberlysaten IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse zeigte sich eine leicht unterschiedlich starke Expression der ERK-Proteine. Dabei zeigten sechs Wochen alte PBS-behandelte IFN γ -transgene Mäuse eine diskret vermehrte Expression im Vergleich zu PBS-behandelten nicht-transgenen, oder DEN-vorbehandelten transgenen oder nicht-transgenen Tieren (Abb. 14A). In 13 Wochen alte Tiere ließ sich dieser Unterschied jedoch nicht finden (Abb. 14B). Die aktivierte Form von ERK (pERK) ließ sich in den Lysaten transgener und nicht-transgener, sowohl jüngerer, als auch älterer Tiere gleichermaßen ausgeprägt nachweisen und zeigte auch nach DEN-Applikation keine Unterschiede (Abb. 14 A und B).

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine Veränderung in der Aktivität des ERK-Wegs nicht für die Suppression der Karzinogenese in IFN γ -transgenen Tieren verantwortlich zu sein schien.

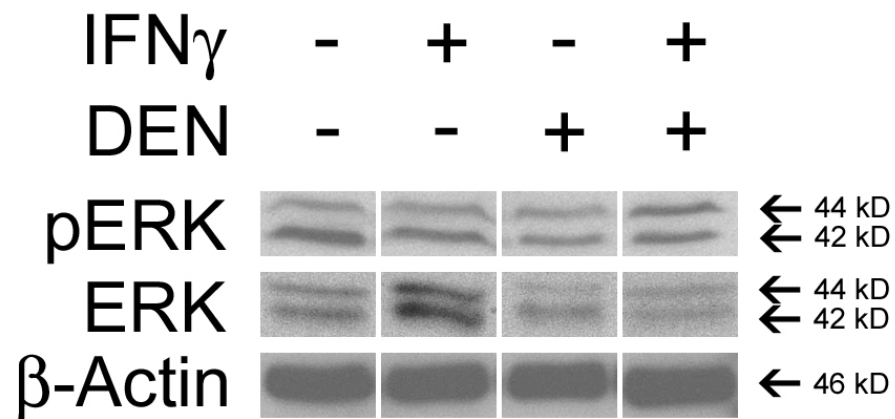
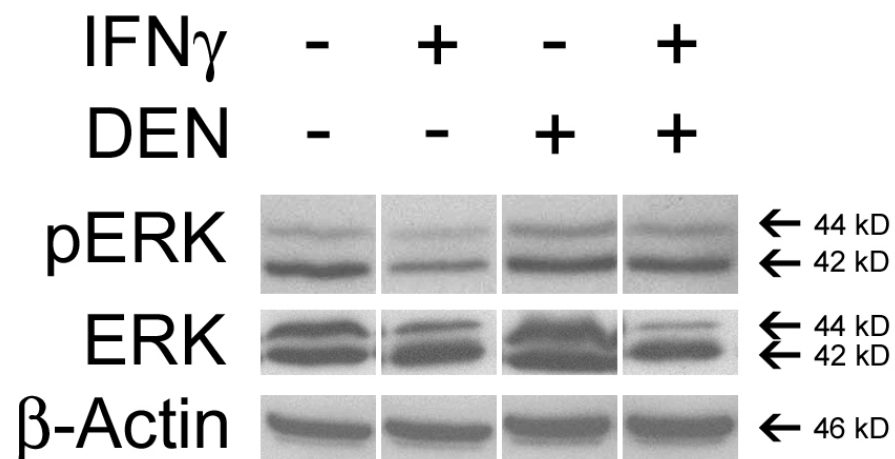
A**B**

Abb. 14 ERK-Aktivierung in IFN γ -transgenen und nicht-transgenen Mäuselebern In Leberlysaten von sechs Wochen alten (A) und 13 Wochen alten (B) IFN γ -transgenen und nicht-transgenen Mäusen zeigte sich zwar eine unterschiedlich starke ERK-Expression, die aktivierte Form (pERK) war jedoch bei transgenen und nicht-transgenen Tieren, unabhängig von einer vorangegangenen DEN-Applikation, in etwa gleichermaßen vorhanden (A und B).

5. Diskussion

Chronische Entzündungen gelten als ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung maligner Tumore (Balkwill u. Mantovani 2001; Hussain u. Harris 2007). Dies konnte bereits für eine Reihe von Tumoren gezeigt werden, unter anderem für das Magenkarzinom bei *Helicobacter pylori*-Gastritis, das Kolonkarzinom bei Colitis ulcerosa, oder das Hepatozelluläre Karzinom bei HBV- und HCV-Infektionen (Yuasa 2003; Farazi u. DePinho 2006; Balkwill u. Mantovani 2001). Dabei entsteht das Hepatozelluläre Karzinom nahezu ausnahmslos auf dem Boden chronischer Leberschäden. Hepatitis B- und Hepatitis C-Infektionen sind hierbei die häufigsten Ursachen für chronische Leberschädigungen, aber auch chronischer Alkoholkonsum, Hämochromatose oder dauerhafte Aufnahme von Aflatoxinen mit der Nahrung führen zu Leberschäden, die das Risiko zur malignen Entartung erhöhen (Parkin 2005; Farazi u. DePinho 2006).

Toyonaga et al. beschrieben, dass Interferon- γ -transgene Mäuse eine „chronisch aktive Hepatitis“ entwickeln (Toyonaga 1994). Überraschenderweise konnte in Vorarbeiten zu dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese transgenen Mäuse trotz einer chronischen Hepatitis eine wesentlich geringere Anfälligkeit für Lebertumore nach chemischer Induktion hatten als ihre nicht-transgenen Geschwistertiere (Abb. 1). Da die IFN γ -transgenen Mäuse unter dem SAP-Promoter das IFN γ -Gen konstitutiv exprimieren, stehen die Hepatozyten dieser Tiere ständig unter dem Einfluss des pro-entzündlichen Zytokins IFN γ . IFN γ ist ein Aktivator von STAT 1 (Platanias 2005), was in den Lebern dieser Tiere dazu führte, dass STAT 1 dauerhaft aktiviert war (Abb. 4). Diese Tatsache legte die Vermutung nahe, dass die Aktivität des IFN γ /STAT 1-Signalwegs zur

Suppression der Karzinogenese in der Leber der transgenen Mäuse führte. In der Tat beschrieben *Kaplan et al.* einen anti-karzinogenen Effekt von IFN γ . Dabei scheint IFN γ für die Entstehung eines „*immunosurveillance*“-Systems, bei dem das Immunsystem den Progress von transformierten Zellen hin zu einem manifesten Tumor unterdrückt, obligat zu sein (Kaplan 1998). *Shankaran et al.* und *Street et al.* konnten ähnliche Ergebnisse präsentieren (Shankaran 2001; Street 2002). Allerdings konnte in den Vorversuchen zu dieser Arbeit gezeigt werden, dass IFN γ -transgene Mäuse auch vor chemisch-induzierter Karzinogenese geschützt waren, wenn sie vor der Tumorinduktion knochenmarkdepletiert und mit Knochenmark von Lymphozyten-defizienten Mäusen (Rag1^{-/-}) rekonstituiert wurden (Abb. 2). Daraus war zu schließen, dass einem „*immunosurveillance*“ in IFN γ -transgenen Mäusen nur eine untergeordnete Rolle bei der Suppression der Karzinogenese zukam und die anti-karzinogene Wirkung von IFN γ vielmehr durch einen direkten Einfluss auf die Leberzellen zu erklären sein musste. *Matsuda et al.* zeigten jedoch, dass in IFN γ -insensitiven Mäusen (IFN γ -Rezeptor-defiziente Mäusen; IFN- γ R KO) signifikant weniger Tumore nach DEN-Behandlung entstehen, als in Wildtypmäusen. Daraus folgerten die Autoren, dass IFN γ die Hepatokarzinogenese fördere (Matsuda 2005). Diese Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu denen von Kaplan, Shankaran und Street, sowie zu den Vorarbeiten zu dieser Arbeit. Allerdings ist anzumerken, dass Matsuda et al. Mäuse mit einem anderen genetischen Hintergrund verwendeten (129SV), als in den Vorarbeiten zu dieser Arbeit (C57BL/6) verwendet wurden. Bei der Interpretation der Daten könnte dies besonders von Bedeutung sein, da Street et al. bei ihren Versuchen Hintergrund-abhängige Unterschiede in der Entität der sich entwickelnden Tumore feststellten (Street 2002). Darüber hinaus

erfolgte die Applikation von DEN in den Versuchen von Matsuda et al. oral über das Trinkwasser und nicht intraperitoneal.

Die Expression von SOCS 1 war in den IFN γ -transgenen Lebern 13 Wochen alter Mäuse etwas geringer, in sechs Wochen alten Tieren gleich stark wie in nicht-transgenen Kontrolltieren (Abb. 5). Ein negativer Rückkopplungsmechanismus, bei dem es durch IFN γ -abhängige Transkription des STAT-Inhibitors SOCS 1 zu einer Hemmung des IFN γ -/STAT 1-Signals kam, schien somit ausgeschlossen zu sein. Eine Erklärung für die verminderte Karzinogenese in den IFN γ -transgenen Mäusen konnte die Expression von SOCS 1 in diesen Tieren jedoch nicht liefern. Mehrere Autoren berichten übereinstimmend, dass der Verlust von SOCS 1 eher zu einer gesteigerten Karzinogenese führt (Yoshikawa 2001; Yoshida 2004; Hanada 2006).

Die IFN γ -transgenen Mäuse zeigten weiterhin ein dauerhaft aktiviertes STAT 3-Signal, auch nach Applikation von DEN (Abb. 4). Dies ließ sich darauf zurückführen, dass das IFN γ -Signal auch über STAT 3 weitergeleitet werden kann (Platanias 2005). Auch war es möglich, dass die die Leber infiltrierenden Entzündungszellen Zytokine produzierten, die in den Hepatozyten IFN γ -transgener Mäuse zu einer STAT 3-Aktivierung führen konnten. Jedoch wurde in *in vitro*-Versuchen anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe gezeigt, dass IFN γ auch zu einer messbaren Aktivierung von STAT 3 in primären Hepatozyten in Abwesenheit weiterer Faktoren und Zellen führte (nicht gezeigte Daten). Grundsätzlich gilt STAT 3-Aktivierung als Tumor-fördernd (Naugler 2007; Sanchez 2003; Ni 2000), die Aktivierung von STAT 3 in den IFN γ -transgenen Mäusen steht somit im Widerspruch zur verminderten Tumorsuszeptibilität dieser Tiere. Allerdings war die Expression von SOCS 3, einem endogenen Inhibitor von STAT 3, in den Lebern der IFN γ -transgenen Mäuse stärker als in

den Kontrolltieren (Abb. 5). Aktivierung von STAT 3 kann zur Transkription von SOCS 3 und damit zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus führen (Alexander u. Hilton 2004). In zwei Arbeiten von *Riehle et al.* und *Ogata et al.* wurde gezeigt, dass der Verlust von SOCS 3 zu einer gesteigerten Karzinogenese in Mäusen führt (Riehle 2008; Ogata 2006), die Expression von SOCS 3 in den Lebern IFN γ -transgener Mäuse könnte also durchaus eine protektive Wirkung hinsichtlich der Tumorentstehung gehabt haben.

Maeda et al. vermuteten, dass kompensatorische Proliferation von Hepatozyten als Folge zellulären Stresses die Entstehung von Tumoren in der Leber fördere (Maeda 2005). Die vorliegende Arbeit zeigte, dass in den Lebern IFN γ -transgener Mäuse eine stärkere Proliferation, ausgedrückt durch gesteigerte Expression von Cyclin D₁ und PCNA im Vergleich zu Kontrolltieren, vorhanden war (Abb. 6). Die Proliferation der Hepatozyten war dabei unabhängig vom Alter der Tiere und vorangegangener DEN-Applikation. Dies bedeutete, dass dieser Effekt weder wachstumsbedingt, noch Folge der DEN-Applikation war, sondern vielmehr eine Reaktion auf die chronische Entzündung darstellte. Anzumerken ist, dass es sich bei den Leberlysaten um Lysate der gesamten Leber handelte, somit also auch ein geringer Anteil proliferierender nicht-parenchymatöser Zellen darin enthalten war. Eine genaue Quantifizierung der Regeneration *in vivo* ist somit nicht abschließend möglich. Da IFN γ -transgene Mäuse trotz chronischer Hepatitis und kompensatorischer Proliferation der Hepatozyten vermindert susceptibel für chemisch-induzierte Hepatokarzinogenese waren, war es wahrscheinlich, dass es einen IFN γ -/STAT 1-abhängigen Mechanismus gab, der die Tumorsuppression erklärte.

In einem Mausmodell der chemisch-induzierten Hepatokarzinogenese wird Mäusen DEN intraperitoneal appliziert. Nach Bioaktivierung in der Leber

induziert DEN DNA-Modifikationen und -Strangbrüche in den Hepatozyten (Verna 1996). DNA-Schäden können dazu führen, dass Zellen in einen Zyklusarrest eintreten; es kommt zu einem Proliferationsstop. In dieser Phase werden notwendige Reparaturvorgänge vorgenommen und so die Zelle vor maligner Entartung bewahrt. Sind die Schäden für die Zelle jedoch irreparabel, kommt es zur Initiation des Apoptoseprogramms und zum Zelltod (Campisi u. d'Adda di Fagagna 2007). Dabei ist die Apoptoseinduktion ein potentes Mittel für Zellen, um maligner Transformation zu entgehen. *Hara et al.* konnten im DEN-Modell der Hepatokarzinogenese zeigen, dass durch Apoptoseinduktion in Hepatozyten die Entstehung von Lebertumoren reduziert werden kann (Hara 2000). IFN γ ist in der Lage, *in vitro* Apoptose zu induzieren (Kano 1997; Detjen 2003; Brooling 2005). Übereinstimmend dazu demonstrierten *Chin et al.*, dass STAT 1 einen hemmenden Effekt auf den Zellzyklus hat (Chin 1996). Es bestand somit die Möglichkeit, dass eine gesteigerte Apoptoserate in den Lebern IFN γ -transgener Mäuse zum Schutz vor Karzinogenese führt. Um eine verlässliche Aussage über die Apoptoserate treffen zu können, wurde eine TUNEL-Färbung an Leberschnitten IFN γ -transgener und nicht-transgener Mäuse angefertigt. Hiermit konnte gezeigt werden, dass in Lebern IFN γ -transgener Mäuse signifikant mehr Apoptose stattfand als in nicht-transgenen Mäuselebern. Die Applikation von DEN führte in IFN γ -transgenen Mäusen zu einem massiven Anstieg der Anzahl apoptotischer Hepatozyten im Vergleich zu PBS-behandelten transgenen Tieren (Abb. 7 und 8). Dieses Ergebnis konnte durch den Nachweis aktivierter Caspase-3 im Western Blot bestätigt werden (Abb. 9), wobei der Unterschied zwischen DEN-behandelten und PBS-behandelten transgener Mäusen nicht so deutlich erschien, wie in der TUNEL-Färbung. In Übereinstimmung mit der Literatur deuteten die Ergebnisse also

darauf hin, dass der IFN γ -/STAT 1-Weg in der Lage war, Apoptose zu induzieren. Diese Ergebnisse stellten eine plausible Erklärung dar, warum IFN γ -transgene Mäuse eine signifikant geringere Suszeptibilität gegenüber chemisch-induzierter Hepatokarzinogenese aufwiesen.

Es stellte sich in der Folge die Frage, warum die Rate an apoptotischen Hepatozyten in den Lebern DEN-behandelter IFN γ -transgener Mäuse um ein vielfaches höher war, als in unbehandelten IFN γ -transgenen oder in DEN-behandelten nicht-transgenen Tieren. Ebenfalls war unklar, über welchen Mechanismus das IFN γ -/STAT 1-Signal Apoptose induziert.

Townsend et al. haben in *in vitro* Versuchen gezeigt, dass aktiviertes STAT 1 möglicherweise zur Akkumulation des Tumorsuppressors p53 führen kann (Townsend 2004). Des Weiteren zeigten *Kano et al.* eine dosis- und zeitabhängige p53-Induktion durch IFN γ (Kano 1997). Auch IFN γ -transgene Mäuse zeigten eine deutliche Akkumulation von p53 im Western Blot, wohingegen in den Lebern von Wildtyptieren kein p53 detektierbar war (Abb. 10). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das IFN γ -/STAT 1-Signal auch *in vivo* die p53-Expression induzieren konnte. Ein molekularer Marker für die Aktivität von p53 scheint das p21-Protein zu sein. Da die Expression von p21 direkt p53-abhängig ist, kann anhand der p21-Expression die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor, und damit als Induktor von Zellzyklusarrest und Inhibitor von Apoptose, abgeschätzt werden (Gartel u. Radhakrishnan 2005). In IFN γ -transgenen Mäuselebern führte die durch das IFN γ -/STAT 1-Signal induzierte p53-Akkumulation neben der in der TUNEL-Färbung (Abb. 7) und im Caspase 3-Western Blot gezeigten Apoptose (Abb. 9) also auch zu einem Zellzyklusarrest, der durch Vorbehandlung der Mäuse mit DEN deutlich vermindert wurde (Abb. 10).

Auf der einen Seite gibt es neben p53 noch eine ganze Reihe weiterer, p53-unabhängiger Faktoren, die zu einer p21-Expression führen können, u.a. STAT 1 (Chin 1996). Andererseits konnten *Macleod et al.* zeigen, dass p21-Induktion als Antwort auf DNA-Schäden in der Regel p53-abhängig ist (Macleod 1995). Interessanterweise stellten *Detjen et al.* fest, dass HCC-Zellen durch eine Inhibierung von p21 für IFN γ -induzierte Apoptose sensibilisiert werden (Detjen 2003). Darüber hinaus konnten *Hui et al.* einen Zusammenhang zwischen p21-Expression und JNK1-Aktivität feststellen. Die Autoren fanden, dass die Hemmung von JNK1 in HCC-Zellen zu einer gesteigerten Expression von p21 und einem verminderten Tumorwachstum von subkutan-implantierten HCC-Zellen, sowie zu einem verringerten Wachstum von DEN-induzierten Tumoren führt (Hui 2008). Des Weiteren berichteten *Sakurai et al.*, dass der Verlust von JNK1 zur Abnahme der Tumorzinzidenz nach DEN-induzierter Hepatokarzinogenese führt (Sakurai 2006). Übereinstimmend dazu zeigten IFN γ -transgene Mäuselebern eine verminderte Phosphorylierung von JNK1 (Abb. 12) und eine deutlich stärkere Expression von p21 (Abb. 10) im Vergleich mit nicht-transgenen Mäusen. Die Applikation von DEN sechs Tage vor Leberentnahme führte zu einer gesteigerten JNK1-Phosphorylierung (Abb. 12), einer Reduktion der p21-Expression (Abb. 10) und einer gesteigerten Zahl an apoptotischen Hepatozyten (Abb. 7, 8 und 9) verglichen mit PBS-behandelten IFN γ -transgenen Mäusen. In einer weiteren Arbeit beschrieben *Hui et al.*, dass p38 α einen hemmenden Effekt auf die JNK-Aktivität haben könnte. Weiterhin waren p38 α -defiziente Mäuse anfälliger für chemisch-induzierte Karzinogenese, als Wildtypmäuse (Hui 2007). Allerdings fand sich in Lebern IFN γ -transgener Mäuse eine verminderte Phosphorylierung von p38, verglichen mit Leberproben nicht-transgener Tiere (Abb. 13). Ein inhibitorischer Effekt, weder von JNK auf

p38, noch von p38 auf JNK konnte in IFN γ -transgenen Tieren gefunden werden. Insofern stand die p38-Expression und –Phosphorylierung im Widerspruch zu den diskutierten Konzepten p38-abhängiger Karzinogenese. Goh *et al.* berichteten, dass IFN γ über einen STAT 1-unabhängigen Mechanismus p38 aktivieren kann (Goh 1999). Die verminderte Aktivität von p38 in IFN γ -transgenen Mauslebern konnte somit jedoch nicht erklärt werden. Da p38 für die STAT 1-Phosphorylierung an Serin727 unabdingbar ist (Goh 1999), könnte lediglich spekuliert werden, dass das reduzierte p-p38 Ausdruck eines bisher unbekannten negativen Rückkopplungsmechanismus als Folge des dauerhaften IFN γ -Stimulus war.

In etwa jedem dritten menschlichen Tumor lassen sich Veränderungen in der ERK-Signalkaskade nachweisen, die meisten davon betreffen Ras und Raf (Dhillon 2007). ERK-Phosphorylierung im HCC-Gewebe scheint ein Indikator für besonders aggressives Tumorwachstum zu sein (Schmitz 2008), Inhibierung des ERK-Wegs in HCC-Zellen führt zu einem reduzierten Wachstum der Zelle, vermittelt durch gesteigerten Zellzyklusarrest und Apoptose (Wiesenauer 2004). In Lebern IFN γ -transgener Mäuse fand sich im Vergleich mit nicht-transgenen Mäusen jedoch keine Veränderung in der ERK-Phosphorylierung (Abb. 14). Somit erschien der ERK-Weg keinen Beitrag zur Tumorsuppression in den IFN γ -transgenen Mäusen zu leisten.

Seit einigen Jahren wird der NF κ B-Signalweg als eine Möglichkeit diskutiert, wie Entzündung und Karzinogenese im Zusammenhang stehen (Karin 2006). Unklar scheint jedoch zu sein, in welcher Weise NF κ B fungiert. Einerseits führt die Deletion von IKK β dazu, dass die Entstehung von Tumoren reduziert wird (Greten 2004; Pikarsky 2004). Andererseits wird berichtet, dass die Unterdrückung des NF κ B-Wegs zu einem gesteigerten Tumorwachstum

führt (Maeda 2005; van Hogerlinden 1999). SAP-IFN γ -transgene Mäuse zeigten lediglich geringste Phosphorylierung von IKK β , während in Lebern nicht-transgener Mäuse keinerlei pIKK β nachzuweisen war (Abb. 11). Die sehr geringe Phosphorylierung von IKK β in den transgenen Mäusen warf die Frage auf, ob es sich dabei überhaupt um Hepatozyten-spezifisches pIKK β handelte. Eine weitere Quelle für das detektierte pIKK β könnten die die Leber infiltrierenden Immunzellen gewesen sein. *In vitro* Versuche von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe zeigten, dass in primären Hepatozyten nach Stimulation mit IFN γ keine NF κ B-Aktivität in Form von phosphoryliertem IKK α/β , unabhängig von Inkubation mit DEN, detektierbar war (nicht gezeigte Daten). Somit erschien eine Beteiligung von NF κ B an einem Suppressormechanismus in IFN γ -transgenen Mäusen unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten also, dass es durch die dauerhafte Expression von IFN γ und der konsekutiven Aktivierung des IFN γ -/STAT 1-Wegs zu einer p53-Akkumulation in den Hepatozyten kam. Diese Akkumulation von p53 induzierte in den Hepatozyten zunächst vermehrt Zellzyklusarrest. In Folge eines Zellschadens, in diesem Modell durch die Applikation von DEN, kam es dann vermehrt zur Induktion von Apoptose. Hierdurch wurden potentiell entartete Zellen sofort eliminiert, wodurch es in IFN γ -transgenen Mäusen kaum zu chemisch-induzierbaren Karzinomen der Leber kam. In nicht-transgenen Wildtypmäusen geschieht die Eliminierung durch den programmierten Zelltod nicht bzw. in sehr viel geringerem Maß, so dass die durch die DEN-Wirkung mutierten Zellen schließlich zur Entstehung von Tumoren in der Leber führen.

5.1. Ausblick

Im Gegensatz zu der bisher verbreiteten Annahme, chronische Entzündungen förderten die Entstehung von Tumoren, scheint die chronische Entzündung in diesem Modell einen Schutz vor Karzinogenese zu vermitteln. Da die chronische Entzündung in diesem Modell durch die Überexpression des pro-entzündlichen Zytokins IFN γ hervorgerufen wird, ist es möglich, dass nicht die Entzündung *per se*, sondern viel mehr die Zusammensetzung der Entzündungsmediatoren über den karzinogenen Effekt einer Entzündung bestimmen. Das Verständnis vom Zusammenspiel der Entzündungsmediatoren, wie Interferon- γ , sowie der intra- und interzellulären Prozesse in Entzündungen stellt eine Grundlage dafür dar, wie in Zukunft durch Modulation von Entzündungen bzw. deren zelluläre und nicht-zelluläre Komponenten neue Therapieoptionen für Entzündungs-assoziierte Tumorerkrankungen entwickelt werden können. Es ist daher notwendig, die Rolle weiterer Entzündungsmediatoren im Hinblick auf pro- oder antikarzinogene Effekte, gerade auch im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen oder Immunzellen, zu charakterisieren. Mäuse mit Überexpression und/oder Verlust bestimmter Zytokine bieten die Möglichkeit, den Zusammenhang von pro- oder anti-entzündlichen Zytokinen und Karzinogenese *in vivo* zu analysieren. Um die Auswirkungen auf die molekularen Abläufe auf der Ebene der einzelnen Zelle *in vivo* untersuchen zu können, eignen sich Mäuse mit Überexpression und/oder Verlust bestimmter Signal- oder Zellzyklusproteine. Eine p53-Knockout-Maus bietet beispielsweise eine Möglichkeit, die Rolle von Apoptose im Zusammenhang von Entzündung und Karzinogenese weitergehend zu

analysieren. Der Einsatz von Zellkulturen ermöglicht einen Einblick in die intra- und interzellulären Prozesse von Immunzellen.

Ein anderer Ansatz zur Entschlüsselung des Pathomechanismus der Entzündungs-assoziierten Hepatokarzinogenese könnte sein, vielmehr die Leberzirrhose anstatt der chronischen Entzündung als Auslöser maligner Entartungen anzusehen. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell einer chronisch-aktiven Hepatitis durch Überexpression von Interferon- γ hat gezeigt, dass eine chronische Entzündung an sich nicht zwangsläufig ein höheres Risiko zur Tumorentstehung darstellen muss, sondern offenbar einen gewissen Schutz vor Karzinomentstehung liefern kann. Allerdings entsteht in den SAP-IFN γ -Mäusen keine Leberzirrhose, was in der menschlichen Leber stets die Folge einer chronischen Entzündung ist und der Entstehung eines HCCs in der Regel voraus geht. Es ist also durchaus möglich, dass das Mikromilieu einer Leberzirrhose die Entstehung von Tumoren begünstigt oder fördert. Mit der Mdr2-Knockout-Maus steht ein Modell bereit, in dem spontan Tumore in der Leber entstehen. Dabei zeichnet sich die Maus durch eine chronische Leber- und Gallengangsentzündung und, im Gegensatz zur SAP-IFN γ -Maus, im Verlauf entstehende Leberzirrhose aus. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, in Mäusen durch eine Ligatur des Hauptgallengangs oder durch Verwendung eines speziellen Futterzusatzes (3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; DDC) experimentell eine Leberfibrose, einer Vorstufe der Leberzirrhose, auszulösen. Allerdings gehen diese Modelle ebenfalls mit einem entzündlichen Geschehen einher, so dass die größte Herausforderung sein wird, ein Modell für eine nicht-entzündliche Leberzirrhose zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

Chronische Entzündungen gelten als Risikofaktor für die Entstehung maligner Erkrankungen. Das HCC entsteht fast ausnahmslos auf dem Boden chronischer Hepatitiden und gilt somit als Paradebeispiel für Entzündungs-assoziierte Tumore. Der molekulare Zusammenhang zwischen Entzündung und Karzinogenese ist jedoch unklar. Interferon- γ ist ein pro-entzündliches Zytokin, das von Entzündungszellen sezerniert wird und dessen Rolle in der Hepatokarzinogenese kontrovers diskutiert wird. Um die Rolle des IFN γ /STAT 1-Signalwegs in der Hepatokarzinogenese zu untersuchen, wurde ein Mausmodell einer chronischen Hepatitis verwendet. Diese Mäuse exprimieren IFN γ Leberspezifisch und zeigten eine lebenslange regenerative Hepatozytenproliferation aufgrund der persistierenden Leberentzündung. Obwohl diese Konstellation als Risikofaktor für maligne Entartung eingeschätzt wird, sind die Mäuse vor chemisch-induzierter Karzinogenese geschützt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hepatozyten IFN γ -transgener Mäuse durch Akkumulation des Tumorsuppressors p53 in einen Zellzyklusarrest versetzt wurden. In Folge von DNA-Schäden durch Applikation von DEN kam es zur Induktion von Apoptose, wodurch maligne Entartungen unterdrückt wurden. Der Mechanismus, der zur Unterdrückung der Hepatokarzinogenese führte, war unabhängig vom NF κ B-Signalweg, der als mögliche Verbindung von Entzündung und Karzinogenese diskutiert wird. Auch konnten keine Veränderungen in MAP-Kinase-Wegen festgestellt werden, die eine Erklärung für den Schutzmechanismus lieferten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass chronische Leberentzündungen per se kein Risikofaktor für maligne Entartungen sein müssen, sondern, je nach Art der Entzündung, sogar einen schützenden Effekt haben könnten.

7. Literaturverzeichnis

A

Alexander WS, Hilton DJ (2004). "The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response." *Annu Rev Immunol* 22: 503-29.

Aylon Y, Oren M (2007). "Living with p53, dying of p53." *Cell* 130(4): 597-600.

B

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005). "Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease." *Cancer Cell* 7(3): 211-7.

Balkwill F, Mantovani A (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* 357(9255): 539-45.

Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G, Cicinnati VR (2004). "Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets." *Clin Cancer Res* 10(21): 7260-9.

Benetti A, Berenzi A, Gambarotti M, Garrafa E, Gelati M, Dessy E, Portolani N, Piardi T, Giulini SM, Caruso A, Invernici G, Parati EA, Nicosia R, Alessandri G (2008). "Transforming growth factor-beta1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium." *Cancer Res* 68(20): 8626-34.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." *Annu Rev Immunol* 15: 749-95.

Bortolami M, Venturi C, Giacomelli L, Scalerta R, Bacchetti S, Marino F, Floreani A, Lise M, Naccarato R, Farinati F (2002). "Cytokine, infiltrating macrophage and T cell-mediated response to development of primary and secondary human liver cancer." *Dig Liver Dis* 34(11): 794-801.

Brooling JT, Campbell JS, Mitchell C, Yeoh GC, Fausto N (2005). "Differential regulation of rodent hepatocyte and oval cell proliferation by interferon gamma." *Hepatology* 41(4): 906-15.

Brown JM, Attardi LD (2005). "The role of apoptosis in cancer development and treatment response." *Nat Rev Cancer* 5(3): 231-7.

Budhu A, Wang XW (2006). "The role of cytokines in hepatocellular carcinoma." *J Leukoc Biol* 80(6): 1197-213.

C

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM, Thorgeirsson SS (2006). "Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC." *Gastroenterology* 130(4): 1117-28.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 729-40.

Chang L, Karin M (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* 410(6824): 37-40.

Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY (1996). "Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1." *Science* 272(5262): 719-22.

Coussens LM, Werb Z (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* 420(6917): 860-7.

Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R (1996). "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice." *Science* 274(5291): 1379-83.

D

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-19.

Dannenber AJ, Subbaramaiah K (2003). "Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise." *Cancer Cell* 4(6): 431-6.

Das S, Raj L, Zhao B, Kimura Y, Bernstein A, Aaronson SA, Lee SW (2007). "Hsf1 Determines cell survival upon genotoxic stress by modulating p53 transactivation." *Cell* 130(4): 624-37.

Davis RJ (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* 103(2): 239-52.

Detjen KM, Murphy D, Welzel M, Farwig K, Wiedenmann B, Rosewicz S (2003). "Downregulation of p21(waf/cip-1) mediates apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in response to interferon-gamma." *Exp Cell Res* 282(2): 78-89.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." *Oncogene* 26(22): 3279-90.

Downward J (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 3(1): 11-22.

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." *Nat Rev Immunol* 6(11): 836-48.

E

El-Serag HB, Rudolph KL (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." *Gastroenterology* 132(7): 2557-76.

F

Farazi PA, DePinho RA (2006). "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment." *Nat Rev Cancer* 6(9): 674-87.

Farrar MA, Schreiber RD (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." *Annu Rev Immunol* 11: 571-611.

Fausto N (1999). "Mouse liver tumorigenesis: models, mechanisms, and relevance to human disease." *Semin Liver Dis* 19(3): 243-52.

G

Gao Y, Tao J, Li MO, Zhang D, Chi H, Henegariu O, Kaech SM, Davis RJ, Flavell RA, Yin Z (2005). "JNK1 is essential for CD8+ T cell-mediated tumor immune surveillance." *J Immunol* 175(9): 5783-9.

Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005). "Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences." *Cancer Res* 65(10): 3980-5.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.

Goh KC, Haque SJ, Williams BR (1999). "p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons." *EMBO J* 18(20): 5601-8.

Golstein P, Kroemer G (2007). "A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways." *EMBO Rep* 8(9): 829-33.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M (2004). "IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer." *Cell* 118(3): 285-96.

H

Hanada T, Kobayashi T, Chinen T, Saeki K, Takaki H, Koga K, Minoda Y, Sanada T, Yoshioka T, Mimata H, Kato S, Yoshimura A (2006). "IFNgamma-dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice." *J Exp Med* 203(6): 1391-7.

Hara A, Yoshimi N, Yamada Y, Matsunaga K, Kawabata K, Sugie S, Mori H (2000). "Effects of Fas-mediated liver cell apoptosis on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice." *Br J Cancer* 82(2): 467-71.

Harris SL, Levine AJ (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." *Oncogene* 24(17): 2899-908.

Hayashi J, Aoki H, Kajino K, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O (2000). "Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha." *Hepatology* 32(5): 958-61.

Hengartner MO (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-6.

Homer C, Knight DA, Hananeia L, Sheard P, Risk J, Lasham A, Royds JA, Braithwaite AW (2005). "Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function." *Oncogene* 24(56): 8314-25.

Huang S, Bucana CD, Van Arsdall M, Fidler IJ (2002). "Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells." *Oncogene* 21(16): 2504-12.

Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, Kenner L, Komnenovic V, Scheuch H, Beug H, Wagner EF (2007). "p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway." *Nat Genet* 39(6): 741-9.

Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF (2008). "Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation." *J Clin Invest* 118(12): 3943-53.

Hussain SP (2008). "Inflammation and cancer: is AID aiding?" *Gastroenterology* 135(3): 736-7.

Hussain SP, Harris CC (2007). "Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials." *Int J Cancer* 121(11): 2373-80.

I

Ip YT, Davis RJ (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 205-19.

Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N (2003). "Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma." *Cancer* 97(12): 3017-26.

J

Johnson GL, Lapadat R (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* 298(5600): 1911-2.

K

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." *J Clin Oncol* 24(14): 2137-50.

Kano A, Watanabe Y, Takeda N, Aizawa S, Akaike T (1997). "Analysis of IFN-gamma-induced cell cycle arrest and cell death in hepatocytes." *J Biochem* 121(4): 677-83.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7556-61.

Karin M (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." *Nature* 441(7092): 431-6.

Kim E, Deppert W (2003). "The complex interactions of p53 with target DNA: we learn as we go." *Biochem Cell Biol* 81(3): 141-50.

Krebs DL, Hilton DJ (2001). "SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling." *Stem Cells* 19(5): 378-87.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1463-7.

L

Laptenko O, Prives C (2006). "Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities." *Cell Death Differ* 13(6): 951-61.

Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M (1999). "The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis." *J Exp Med* 189(11): 1839-45.

Lüth S, Schrader J, Andreas J, Schumacher P, Reifenberg K, Schuchmann M, Lohse AW, Herkel J (2007). "[364] Interferon-gamma prevents chemically induced hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions in liver independent of functional T-cells." *Journal of hepatology* 46: S142.

Lin WW, Karin M (2007). "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer." *J Clin Invest* 117(5): 1175-83.

M

Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T (1995). "p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." *Genes Dev* 9(8): 935-44.

Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M (2005). "IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis." *Cell* 121(7): 977-90.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* 454(7203): 436-44.

Matsuda M, Nakamoto Y, Suzuki S, Kurata T, Kaneko S (2005). "Interferon-gamma-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine." *Lab Invest* 85(5): 655-63.

Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, van den Bergh Weerman MA, Verkruisen RP, Groen AK, Oude Elferink RP, et al. (1994). "Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis." *Am J Pathol* 145(5): 1237-45.

Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD (2008). "DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice." *J Clin Invest* 118(7): 2516-25.

Mucha SR, Rizzani A, Gerbes A, Camaj P, Thasler W, Bruns C, Eichhorst S, Gallmeier E, Kolligs F, Goke B, De Toni EN (2008). "JNK inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells but not normal hepatocytes to TNF-related apoptosis inducing ligand." *Gut*.

Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot C, Paterlini-Brechot P (2005). "Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas." *Gut* 54(8): 1162-8.

N

Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A (2005). "Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development." *Nature* 437(7056): 281-5.

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M (2007). "Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production." *Science* 317(5834): 121-4.

Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC (2000). "Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells." *Cancer Res* 60(5): 1225-8.

Nishina H, Fischer KD, Radvanyi L, Shahinian A, Hakem R, Rubie EA, Bernstein A, Mak TW, Woodgett JR, Penninger JM (1997). "Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3." *Nature* 385(6614): 350-3.

O

Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, Takaki H, Sanada T, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Maehara Y, Iida M, Yoshimura A (2006). "Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis." *Gastroenterology* 131(1): 179-93.

P

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). "Global cancer statistics, 2002." *CA Cancer J Clin* 55(2): 74-108.

Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y (2004). "NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer." *Nature* 431(7007): 461-6.

Platanias LC (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." *Nat Rev Immunol* 5(5): 375-86.

Potapova O, Haghighi A, Bost F, Liu C, Birrer MJ, Gjerset R, Mercola D (1997). "The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin." *J Biol Chem* 272(22): 14041-4.

R

Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, Poussin K, Imbeaud S, Pilati C, Izard T, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J (2009). "Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours." *Nature* 457(7226): 200-4.

Riehle KJ, Campbell JS, McMahan RS, Johnson MM, Beyer RP, Bammler TK, Fausto N (2008). "Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3." *J Exp Med* 205(1): 91-103.

Roberts PJ, Der CJ (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer." *Oncogene* 26(22): 3291-310.

Ruosaari ST, Nymark PE, Aavikko MM, Kettunen E, Knuutila S, Hollmen J, Norppa H, Anttila SL (2008). "Aberrations of chromosome 19 in asbestos-associated lung cancer and in asbestos-induced micronuclei of bronchial epithelial cells in vitro." *Carcinogenesis* 29(5): 913-7.

S

Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, Inoue I (2008). "Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma." *Hum Mutat* 29(5): 703-8.

Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M (2006). "Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(28): 10544-51.

Sanchez A, Nagy P, Thorgeirsson SS (2003). "STAT-3 activity in chemically-induced hepatocellular carcinoma." *Eur J Cancer* 39(14): 2093-8.

Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV (1997). "Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun* 236(1): 54-8.

Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, Cicinnati VR, Schmid KW, Baba HA (2008). "Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection." *J Hepatol* 48(1): 83-90.

Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF (2008). "Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer." *Nat Rev Cancer* 8(11): 887-99.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* 410(6832): 1107-11.

She QB, Chen N, Bode AM, Flavell RA, Dong Z (2002). "Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate." *Cancer Res* 62(5): 1343-8.

Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, Kim YJ, Lee HS (2003). "Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma." *Hum Mol Genet* 12(8): 901-6.

Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ (2002). "Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma." *J Exp Med* 196(1): 129-34.

Sullivan A, Lu X (2007). "ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes." *Br J Cancer* 96(2): 196-200.

T

Tanaka T, Ohkubo S, Tatsuno I, Prives C (2007). "hCAS/CSE1L associates with chromatin and regulates expression of select p53 target genes." *Cell* 130(4): 638-50.

Taub R (2004). "Liver regeneration: from myth to mechanism." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 836-47.

Thun MJ, Henley SJ, Patrono C (2002). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues." *J Natl Cancer Inst* 94(4): 252-66.

Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A (2004). "STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis." *J Biol Chem* 279(7): 5811-20.

Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Shichiri M, Yamamura K (1994). "Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 614-8.

Tseng LH, Lin MT, Shau WY, Lin WC, Chang FY, Chien KL, Hansen JA, Chen DS, Chen PJ (2006). "Correlation of interleukin-10 gene haplotype with hepatocellular carcinoma in Taiwan." *Tissue Antigens* 67(2): 127-33.

V

van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgard R (1999). "Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling." *Cancer Res* 59(14): 3299-303.

Verna L, Whysner J, Williams GM (1996). "N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation." *Pharmacol Ther* 71(1-2): 57-81.

W

Wada T, Stepniak E, Hui L, Leibbrandt A, Katada T, Nishina H, Wagner EF, Penninger JM (2008). "Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling." *Cell Death Differ* 15(1): 89-93.

Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Brechot C (1990). "Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma." *Nature* 343(6258): 555-7.

Weston CR, Davis RJ (2007). "The JNK signal transduction pathway." *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 142-9.

Wiesenauer CA, Yip-Schneider MT, Wang Y, Schmidt CM (2004). "Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma." *J Am Coll Surg* 198(3): 410-21.

Wu H, Wade M, Krall L, Grisham J, Xiong Y, Van Dyke T (1996). "Targeted in vivo expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell-cycle progression, postnatal liver development and regeneration." *Genes Dev* 10(3): 245-60.

Y

Yoshida T, Ogata H, Kamio M, Joo A, Shiraishi H, Tokunaga Y, Sata M, Nagai H, Yoshimura A (2004). "SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis." *J Exp Med* 199(12): 1701-7.

Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG (2001). "SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity." *Nat Genet* 28(1): 29-35.

Yuasa Y (2003). "Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* 3(8): 592-600.

Z

Zarubin T, Han J (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* 15(1): 11-8.

8. Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. A. W. Lohse für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Dissertationsarbeit in den Laboren der I. Medizinischen Klinik anzufertigen, ganz herzlich danken. Seine Förderung und sein Einsatz, mir die vorliegende Arbeit in dieser Form zu ermöglichen, gingen weit über meine Erwartungen hinaus.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Johannes Herkel für seine großartige Betreuung. Durch seine Ideen und Vorschläge und sein Drängen, mit dem Zusammenschreiben zu beginnen, war er stets eine große Hilfe und ein ständiger Ansprechpartner.

Dr. med. Stefan Lüth gebührt besonderer Dank für die Betreuung in den ersten Monaten und die Zusammenarbeit an weiteren Projekten.

Dr. med. Jörg Schrader danke ich besonders für die Einführung in die Kunst des Western Blots.

Alle anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich ganz herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft, technische Unterstützung und eine tolle Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders erwähnt seien an dieser Stelle Frau Dr. rer. nat. Katrin Presser, Frau Dipl. Humbiol. Dorothee Schwinge und Frau Dipl. Humbiol. Antonella Carambia. Zu ihnen entstand eine Freundschaft, die auch über die Zeit im Labor hinausgeht.

Meiner Mutter und vor allem Imke gebührt ein besonderer Dank für das Lektorieren meiner Arbeit. Und auch wenn ich es ihnen in Zeiten vermehrten Stresses und Arbeitsaufwands nicht immer ganz einfach gemacht habe, so waren sie doch stets für ein aufmunterndes Wort zu haben.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 30. Juni 2009

Stefan Zander