Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

Untersuchung der Expression von Netrin-1 und dem Netrinrezeptor UNC5H2 in der Leber

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der hohen medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

> vorgelegt von David Lopez y Niedenhoff aus Köln

promoviert am 09. Oktober 2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

- 1. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. M. Odenthal
- 2. Bericherstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Koch

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgender Person erhalten: Frau Privatdozentin Dr. M. Odenthal

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters/einer Promotionsberaterin in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung von Frau Privatdozentin Dr. M. Odenthal von mir selbst ausgeführt worden.

Danksagung

Mein allererster Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. Margarete Odenthal für die Überlassung der Aufgabenstellung, die umfassende Betreuung und vor allem für die ständige Hilfsbereitschaft und Motivation.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Dienes danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Pathologie. Herrn Privatdozent Dr. Töx möchte ich für die Überlassung der Gewebeproben danken.

Des Weiteren danke ich den (teilweise ehemaligen) Mitarbeitern der Pathologie und der AG Odenthal für die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich Anna Brzoza, Melanie Scheffler, Stephie Schievenbusch, Ingo Strack, Andrea Noetel und Monika Kwiescinski nennen. Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

A	okürzungsverzeichnis	8
1.	Einleitung	. 11
	1.1 Chronische Lebererkrankungen und Hepatokarzinogenese	. 11
	1.1.1 Die chronische Hepatitis B und Hepatitis C	. 13
	1.1.2 Alkoholische Fettlebererkrankung (Alcoholic fatty liver disease)	. 14
	1.1.3 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	. 15
	1.2 Molekulare Grundlagen der Fibrogenese	. 17
	1.2.1 Myofibroblastische Differenzierung von Hepatischen Sternzellen	. 17
	1.2.2 Proinflammatorische und profibrotsiche Mechanismen	. 18
	1.2.3 Die Rolle der Apoptose während der Fibrogenese	. 18
	1.2.4 Neuronale Faktoren während der Fibrogenese	. 19
	1.3 Netrin-1 und UNC5H2	. 20
	1.4 Aufgabenstellung	. 23
2.	Methodik	. 25
	2.1 Patientenmaterial	. 25
	2.2 Gewinnung von RNA aus nativem Lebergewebe	. 26
	2.2.1 Lyse des nativen Lebergewebes	. 26
	2.2.2 Extraktion der RNA	. 26
	2.3 Reverse Transkription von RNA Extrakten aus nativen Leberbiopsie	. 27
	2.4 Real Time PCR	. 28
	2.4.1 Real-Time PCR mit SyBr Green	. 28
	2.4.1.1 Ansatz für die Real-Time PCR mit Sybr Green	. 29
	2.4.1.2 Durchführung der Real-Time PCR mit Sybr Green	. 30
	2.4.2 Real Time PCR mit TaqMan Sonde	. 30
	2.4.2.1 Ansatz für die Real-Time PCR mit TaqMan Sonde	. 31
	2.4.2.1 Durchführung der Real-Time PCR mit TaqMan Sonde	. 31
	2.5 Histologie	. 31
	2.6 Apoptose Assay	. 32
3.	Ergebnisse	. 33
	3.1 Expression von Netrin-1 und dem Rezeptor UNC5H2 in hepatischen Sternzell	en
		. 33

	3.2 Expression von Netrin-1 und UNC5H2 während der myofibroblastischen Differenzierung
	3.3 Expression von Netrin-1 und UNC5H2 während der Fibrogenese am Rattenmodell
	3.3.1 Induktion einer experimentellen Leberfibrose am Rattenmodell
	3.3.2 Auftreten von Apoptose nach Cholestase in gallengangsligierten Ratten 36
	3.3.3 Auftreten der Apoptose in Abhängigkeit von entzündlichen und fibrotischen Veränderungen nach Gallengangsligatur
	3.3.4 Die Expression von Netrin nach experimenteller Fibroseinduktion
	3.3.4.1 Etablierung eines Real-Time PCR Nachweises für Netrin-1
	3.3.4.2 Expression von Netrin-1 während der Fibrogenese
	3.3.5 Die Expression von UNC5H2 nach Fibrose im Gallengangsligationsmodell der Ratte
	3.3.5.1 Etablierung eines Real-Time PCR Nachweises für UNC5H2
	3.3.5.2 Expression von UNC5H2 während der Fibrogenese 45
	3.3.5.3 Die UNC5H2-Expression in Abhängigkeit der Entzündung, der Fibrose und Apoptose
	3.4 Die Expression von Netrin-1 und UNC5H2 während der hepatozellulären Karzinogenese
	3.4.1 Etablierung eines Real-Time PCR Nachweises für Netrin-1 und UNC5H2 in der humanen Leber
	3.4.2 Expression von Netrin-1 in hepatozellulären Karzinomen
	3.4.3 Expression von UNC5H2 während der Karzinogenese
4	Diskussion 54
	4.1 Die Bedeutung von Netrin-1 und UNC5H2 in der Leberfibrogenese
	4.2 Netrin-1 und UNC5H2 während der hepatozellulären Karzinogenese 57
5	Zusammenfassung 60
6	Literaturverzeichnis
7	Erklärung zur Vorabveröffentlichung von Ergebnissen67
8	Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

A2b	Adenosinrezeptor A2b
ADD	Addiction/Dependance Domain
AFLD	Alkoholische Fettlebererkrankung
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
BCLC	Barcelona ClinicLiverCancer
BHQ-1	Black Hole Quencher-1
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
C. elegans	Caenorhabditis elegans
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP2A	Cancerous Inhibitor of Phosphatase 2A
DAPK	Death-Associated Protein Kinase
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
ET-1	Endothelin-1
ETA	Endothelinrezeptor A
ETB	Endothelinrezeptor B
et al.	et altera
FAM	Carboxyfluorescein
g	Konstante der Erdbeschleunigung
h	Stunde
H2O	Wasser

HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl- Transferase
HSC	Hepatische Sternzelle
kDa	Kilo-Dalton
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Reduzierte Form des NAD
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NGF	Nerve Growth Factor
p75 NTR	Neurotrophin-Rezeptor p75
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PR65b	Regulatorische Untereinheit von PP2A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL-R2	Tumor Necrosis Factor-Related- Apoptosis-Inducing-Ligand receptor 2
TRPC1	Transient Receptor Potential Channel1
TdT	Terminale

	Desoxyribonukleotidyltransferase
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
WHO	Weltgesundheitsorganisation
hð	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Chronische Lebererkrankungen und Hepatokarzinogenese

Das Parenchym der Leber ist eines der regenerationsfähigsten Gewebe des menschlichen Körpers. Nach akuten Schädigungen, die nicht zu einer kompletten Zerstörung der Leber führen, kommt es so in den meisten Fällen nach Sistieren der Noxe zu einer kompletten Restitutio ad integrum [5].

Anders sieht es bei chronischen, persistierenden Leberschädigungen aus. Hier reagiert die Leber nach einer gewissen Zeit mit einer von der Noxe unabhängigen Reaktion, die von der Leberverfettung bis zur Fibrose und Zirrhose reicht.

Eine chronische Leberschädigung kann durch eine Vielzahl von Noxen Hierzulande die häufigsten ausgelöst werden. sind Auslöser einer Leberschädigung chronischer Alkoholabusus (alkoholische Fettlebererkrankung AFLD bzw. alkoholische Steatohepatitis = ASH), erworbene Stoffwechselstörungen im Rahmen von Fettleibigkeit oder eines Typ II Diabetes (nicht alkoholische Fettlebererkrankung =NAFLD bzw. nicht alkoholische Steatohepatitis = NASH) und chronische Virushepatitiden (insbesondere Hepatitis C).

Seltenere Ursachen sind Autoimmunerkrankungen der Leber wie z.B. die Autoimmunhepatitis, angeborene Stoffwechselstörungen wie die Hämochromatose oder der Morbus Wilson, Gallenwegserkrankungen (z.B. Stenosierungen) und vaskuläre Lebererkrankungen wie eine chronische Lebervenenstauung [5, 16].

Eine Leberverfettung liegt per Definition vor, wenn mehr als fünf Prozent der Hepatozyten in der Histologie eine sichtbare Verfettung aufweisen. Ab einer Verfettung von über 50 Prozent der Hepatozyten spricht man von einer Fettleber. Sowohl die Leberverfettung als auch die Fettleber sind reversibel. Bei weiterer Schädigung führen chronisch entzündliche Prozesse zusätzlich zu einer Bindegewebsvermehrung von Leberfibrose bis hin zur Leberzirrhose.

Nach der Akkumulation von extrazellulärer Matrix im Disséschen Raum kommt es zum erschwerten Stoffaustauschzwischen Blut und Hepatozyten, was zu einer Einschränkung der Leberfunktion führt. Dabei bleibt bei der Fibrose die Struktur der Leber zunächst erhalten. Die Leberfibrose ist durch Ausschaltung der Noxe, die zur Schädigung geführt hat, reversibel.

Endstadium der meisten chronischen Leberschädigungen ist die Leberzirrhose. Im Gegensatz zur Fibrose hält sich die Zirrhose nicht an die vorgegebene Architektur der Leber. Durch Nekrose und Regeneration des Parenchyms und durch massive bindegewebige Septenbildung kommt es zur Ausbildung sogenannter Pseudoläppchen. Die Läppchen- und die vaskuläre Struktur der Leber wird zerstört und es kommt zu einem progressiven Leberversagen.

Morphologisch kann die Zirrhose in eine mikronoduläre (kleinknotige) und eine makronoduläre (großknotige) Form eingeteilt werden. Eine Leberzirrhose galt lange Zeit als irreversibel. Aktuell gibt es aber Hinweise, dass auch zirrhotische Veränderungen reversibel sein können [5, 16].

Als Folge einer chronischen Leberschädigung kann es außerdem zu der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) kommen. Dabei ist es interessant, dass das HCC sehr eng mit chronischen Leberschäden verbunden ist und selten ohne diese entsteht [63].

Wenn bereits eine Zirrhose vorliegt, kommt es, abhängig von der Ätiologie der Zirrhose, in etwa 0,5 – 5 Prozent der Fälle pro Jahr zu der Entwicklung eines HCC [16].

Insbesondere die viralen Hepatitiden können aber auch ohne Zirrhose zu einem HCC führen. So ist das Risiko bei einer chronischen Hepatitis B ein HCC zu entwickeln etwa 200-fach erhöht [16].

Insgesamt zählt das HCC weltweit zu den fünf häufigsten Krebsarten und ist das dritthäufigste zum Tode führende Karzinom [63].

Das HCC ruft nur selten und erst in späten Stadien Symptome hervor. Allgemeinsymptome können Druckgefühl und Schmerzen im Oberbauch, Appetitlosigkeit und Müdigkeit sein. Bei Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose kann das erste Anzeichen eines HCC auch eine weitere Reduktion der Leberfunktion sein. Da dies unspezifische Symptome sind, werden HCCs häufig erst spät entdeckt [16].

Eingeteilt werden die HCCs nach dem Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) System [20]. Kurative Therapieoptionen sind nur in frühen Stadien mittels einer kompletten Resektion oder einer Lebertransplantation möglich [20]. Des Weiteren steht aber eine Vielzahl von palliativen Verfahren zur Verfügung, die das Überleben verlängern können. Dazu gehören die Radiofrequenzablation, die Chemoembolisation und mittlerweile auch eine systemische Chemotherapie mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Sorafenib[22].

1.1.1 Die chronische Hepatitis B und Hepatitis C

Die akute und chronische Hepatitis B wird durch das Hepatitis B Virus (HBV), ein Hepadnavirus, ausgelöst. Es handelt sich um ein DNA-Virus [39].

Als Hepatitis C wird die durch das Hepatitis C Virus (HCV) verursachte akute oder chronische Entzündung der Leber bezeichnet [16]. Das Hepatitis C Virus gehört zur Gattung der Hepaciviren in der Familie der Flaviviren. Sechs Genotypen sind bekannt, in Europa ist der Genotyp 1 vorherrschend [39].

Für die Entwicklung chronischer Leberschäden sind lediglich die chronischen Formen der Hepatitiden auschlaggebend. Von einer chronischen Hepatitis spricht man ab einem Virusnachweis, der länger als sechs Monate persistiert.

Weltweit sind HBV Infektionen häufiger als HCV Infektionen. HBV-Träger sind etwa sechs Prozent der Weltbevölkerung und das Virus ist für über eine Million Todesfälle pro Jahr verantwortlich [33]. Dagegen sind nach WHO-Schätzungen weltweit etwa 170 Millionen Menschen mit HCV infiziert. In Europa ist die HCV Prävalenz etwa ein Prozent. In den letzten zehn Jahren war die Inzidenz steigend [55].

Die Übertragung der Hepatitis Viren B und C erfolgt parenteral. Die akute Infektion mit Hepatitis C verläuft meist unbemerkt mit milden, unspezifischen Symptomen. Eine Hepatitis B kann ebenso unbemerkt verlaufen, in etwa 25 Prozent der Fälle kommt es aber zu einer akuten Hepatitis mit Transaminasenanstieg und Gefahr des Leberversagens [33]. In den meisten Fällen (95 Prozent der Erkrankungen) heilt eine akute Hepatitis B jedoch aus.

Bei denjenigen, die nicht ausheilen, kommt es zur Viruspersistenz und damit möglicherweise auch zur chronischen Hepatitis B. Spätfolgen sind Zirrhose (20 Prozent in zehn Jahren) und hepatozelluläres Karzinom (15 Prozent in fünf Jahren) [33].

Auch bei einigen Hepatitis C-Patienten erfolgt eine spontane Ausheilung.

Bei 50 – 80 Prozent der Infizierten geht die Erkrankung jedoch in eine chronisch persistierende Infektion über [34]. Auch diese verläuft meist lange Zeit symptomlos.

Bei etwa 15 Prozent der Patienten kommt es nach etwa 20 bis 25 Jahren zur Ausbildung einer Leberzirrhose [62]. Weitere Spätfolgen der chronischen HCV-Infektion sind Leberzellkarzinom und Immunkomplexerkrankungen [39].

Zur Prophylaxe der Hepatitis B ist eine Schutzimpfung möglich. Zur Therapie der Hepatitis B stehen Interferon-α sowie diverse antivirale Substanzen zur Verfügung (z.B. Lamivudin oder Entecavir). Dadurch kann die Viruslast in bis zu 75 Prozent der Patienten unter die Nachweisgrenze gesenkt werden. Das führt zu einer deutlichen Reduktion des HCC-Risikos [33].

Therapieziel bei der Behandlung einer chronischen Hepatitis C ist neben der Verhinderung von Spätschäden der fehlende Nachweis von Hepatitis C-RNA im Serum nach sechs Monaten. Dies korreliert mit einem fehlenden Nachweis von RNA in der Leberhistologie und einem Rückgang des Fibrosegrades [16, 21].

Die Indikation zur Therapie hängt von mehreren Faktoren ab, unter anderem der Höhe der Transaminasen und dem Lebensalter und der Wahrscheinlich der Zirrhoseentwicklung.

Die Therapie besteht im Regelfall aus einer Kombination von pegyliertem Interferon-α mit Ribavirin. Je nach Genotyp ist die Behandlungsdauer unterschiedlich. Ebenso variieren die Heilungschancen je nach Genotyp zwischen 50 und 90 Prozent [33].

1.1.2 Alkoholische Fettlebererkrankung (Alcoholic fatty liver disease)

Unter Alkoholischer Fettlebererkrankung versteht man Leberschädigungen durch chronischen Alkoholabusus. Die Schwellendosis ist nicht genau definiert, aber es kann davon ausgegangen werden, dass ein Überschreiten der täglichen Trinkmenge von 60 – 80g Ethanol (Männer) bzw. 20 – 40g Ethanol (Frauen) zu chronischen Leberschäden führen kann [33].

Nicht alle Menschen sind gleichermaßen von den alkoholischen Leberschäden betroffen. Außer dem Geschlecht scheinen genetische Faktoren sowie die Ernährungsgewohnheiten eine Rolle zu spielen. Insgesamt finden sich bei 10 –

20 Prozent der chronischen Alkoholiker bei der Obduktion schwere irreversible Schäden [5].

Das Spektrum der alkoholischen Leberschädigung reicht von der alkoholischen Fettleber (AFLD) über die alkoholische Hepatitis (ASH, alcoholic steatohepatitis) bis hin zur alkoholischen Leberzirrhose.

Die Leberschädigung entsteht durch den Alkoholabbau in der Leber. Alkohol wird zum größten Teil durch die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase abgebaut. Durch Verschiebung des NAD:NADH –Verhältnisses kommt es zu einer Veränderung des Redoxstatus der Leber. Dies hat weitreichende Konsequenzen für den Glucose-, Fett- und Energiehaushalt der Leber. Des Weiteren entsteht durch den Alkoholabbau das toxische Acetaldehyd. Dieses bindet an verschiedenen Zellorganellen und an Bestandteilen des Zytoskeletts. Durch Schädigung der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien, kommt es in den Hepatozyten zu Apoptosen. Entzündung und Fibroseentstehung können die Folge sein (zusammengefasst in [5]).

Mikroskopisch ist der alkoholische Leberschaden durch das Auftreten von Mallory-Körperchen gekennzeichnet. Dies sind irreguläre Einschlusskörperchen mit filamentöser Grundstruktur, die aus Intermediärfilamenten, aber auch nichtkeratinischen Komponenten bestehen [5].

Da, wie oben erwähnt, die Leberschädigungen in präzirrhotischen Stadien bei Sistieren der Noxe voll reversibel sind, ist die Therapie der Wahl die Alkoholkarenz [33].

Wie bei Zirrhosen jeglicher Art, kann im Spätstadium eine Lebertransplantation erwogen werden. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die Transplantation nur durchgeführt werden sollte, wenn anschließend weiter Alkoholkarenz besteht.

1.1.3 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

Die Leberverfettung, die nicht durch Alkohol bedingt ist, entsteht zumeist als Folge von erhöhtem Körperfett im Rahmen von Adipositas und metabolischem Syndrom.

Die epidemiologische Bedeutung dieser Erkrankung wurde erst in den letzten Jahren klar. Die Prävalenz in entwickelten Ländern wird auf 20-30 Prozent

geschätzt. Die Prävalenz korreliert mit dem Körpergewicht. Bei Personen mit einem BMI über 35 liegt die geschätzte Prävalenz bei 85-90 Prozent [54]. Wie bei der alkoholtoxischen Leberschädigung werden auch hier die Stadien der Leberverfettung, der Steatohepatitis und der Leberfibrose bis hin zur Zirrhose durchlaufen.

Die Akkumulation von Fett in der Leber scheint hier durch eine Imbalance zwischen Aufnahme/Synthese, β-Oxidation und Abgabe von freien Fettsäuren in der Leber bedingt zu sein (zusammengefasst in [47]). Dies erklärt die Assoziation der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung mit einer erhöhten Insulinresistenz/Typ II Diabetes, Dyslipidämie und Adipositas im Rahmen eines Metabolischen Syndroms.

Für einen Progress der Leberverfettung in eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), die nicht bei allen Patienten auftritt, scheinen weitere Faktoren eine Rolle zu spielen. Dazu gehören zum Beispiel genetische Faktoren [59].

Rationale Therapie der nichtalkoholischen Leberverfettung ist eine Änderung der Diät und der Lebensgewohnheiten. Dazu gehört eine Reduktion der Zufuhr von Fett (insbesondere der gesättigten Fettsäuren) und einfachem Zucker sowie zusätzlich dreimal pro Woche sportliche Aktivität [49].

Die Compliance der Patienten ist bei einer solchen Therapie leider nicht immer gegeben. Es gibt Ansätze für eine medikamentöse Therapie, beispielsweise mit Substanzen, die die Insulinempfindlichkeit steigern und die normalerweise bei Diabetes verwendet werden [56].

1.2 Molekulare Grundlagen der Fibrogenese

1.2.1 Myofibroblastische Differenzierung von Hepatischen Sternzellen

Die hepatische Sternzelle (HSC) ist die Schlüsselzelle der Fibrogenese in der Leber. Die HSC befinden sich in der Leber perisinusidal im Disséschen Raum. HSC machen etwa 15 Prozent der Leberzellen aus. Ihre physiologische Funktion ist die Speicherung von Retinoiden.

Bei chronischen Schädigungen des Lebergewebes besitzen die HSC die Fähigkeit "aktiviert" zu werden [30]. Zahlreiche Zytokine und Hormone spielen hierbei eine Rolle. Initial werden HSC durch Nachbarzellen parakrin stimuliert. So schütten verletzte Endothelzellen eine besondere Splicevariante des Fibronectins aus, welche die Aktivierung in Gang setzt [38]. Später stimulieren sich die einmal aktivierten HSC autokrin weiter.

Aktivierte HSC proliferieren und differenzieren sich zu Myofibroblasten. Dabei ändert sich die Funktion der Zellen drastisch. Die aktivierte HSC verliert dabei ihre Fähigkeit der Retinoidspeicherung [41]. Gekennzeichnet sind sie stattdessen durch eine erhöhte Expression von α -smooth muscle actin [30], welches tatsächlich ein Markerprotein für Myofibroblasten ist. Des Weiteren sind die aktivierten HSC der Zelltyp, der in erster Linie für die gesteigerte und veränderte Matrixproduktion verantwortlich ist, der die Leberfibrose und Zirrhose kennzeichnet [45]. Zwar ist die HSC auch in der normalen Leber der Hauptproduzent von Kollagenen [27], jedoch kommt es nach Aktivierung zu einer gesteigerten Produktion. Neben der Matrixproduktion und der Expression von weiteren Zytokinen zur autokrinen Stimulation, haben die aktivierten HSC noch die Fähigkeit zu kontrahieren, was Grund für den erhöhten Portaldruck bei Leberzirrhose sein kann [57].

Ob sich einmal aktivierte HSC in ihre Grundform zurück differenzieren können ist nicht klar. Bei der Regeneration einer Leberfibrose scheint vor allem die Apoptose der aktivierten HSC eine Rolle zu spielen.

1.2.2 Proinflammatorische und profibrotsiche Mechanismen

Eine wichtige Rolle bei der Fibrogenese der Leber spielt TGF- β (Transforming Growth Factor- β). TGF- β ist der Hauptstimulus zur Matrixproduktion, insbesondere von Kollagen 1, in aktivierten HSC [26]. Quelle des TGF- β sind zum einen die Kupfferzellen [48], aber auch geschädigte Hepatozyten [60].

Sobald HSC aktiviert werden und Myofibroblasten entstehen, produzieren auch diese TGF-β und stimulieren sich autokrin [2, 4]. Somit werden noch mehr HSC aktiviert.

Wichtigster mitogener Faktor für die aktivierten HSC ist PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) [52]. Quelle hierfür sind Thrombozyten. PDGF wirkt primär auf aktivierte HSC, da diese, induziert von TGF- β , die PDGF-Rezeptoren vermehrt exprimieren [69]. PDGF wird außerdem auch von aktivierten HSC exprimiert, so dass es auch hier möglicherweise zu einem autokrinen Loop kommt [28].

Der Schlüsselmediator für die Kontraktilität der aktiven HSC ist Endothelin-1 (ET-1), welches auch zumindest zum Teil ebenfalls autokrin von den HSC selber ausgeschüttet wird [58]. Neben der Kontraktilität induziert Endothelin-1 die Zellteilung der HSC [53]. Die Endothelinrezeptoren ETA und ETB werden sowohl in der ruhenden als auch in der aktivierten HSC exprimiert [57]. Durch die Anordnung der HSC um die Endothelzellen sorgt deren Kontraktion für einen höheren Widerstand im Sinus. In der Haut dienen ähnliche Mechanismen der Wundschließung bei Verletzungen der Haut. Neben dem Endothelin-1 spielen jedoch auch andere Faktoren, wie etwa das autonome Nervensystem, bei der Modulation der Kontraktilität eine Rolle.

1.2.3 Die Rolle der Apoptose während der Fibrogenese

Die Apoptose beschreibt eine Form des organisierten Zelltodes welche zur Fragmentation der Zelle führt. Unter gewissen Voraussetzungen ist die Apoptose physiologisch [5]. Übrig bleiben sogenannte Apoptosekörper, die, von Membranen umhüllt, den Zellschrott in sich tragen. Die Apoptosekörper werden durch Phagozytose entfernt.

Apoptose wird durch eine Vielzahl von Triggern ausgelöst. Ein häufiger Mechanismus der Apoptoseauslösung sind sogenannte "Death Receptors" wie

Fas oder TNF-Rezeptor 1, die bei Aktivierung durch den Liganden die Apoptose initiieren [61].

Eine weitere Form ist die Auslösung der Apoptose durch Dependance-Rezeptoren, die die Apoptose dann auslösen, wenn sie den Liganden nicht binden [6].

In der Fibrosebildung der Leber spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. So korreliert bei Patienten mit alkoholischer oder nichtalkoholischer Fettlebererkrankung das Ausmaß der Apoptose mit der Schwere der Erkrankung [37].

Dieser Zusammenhang erklärt sich durch eine proinflammatorische und profibrotische Wirkung der Apoptose.

Dies geschieht unter anderem durch TGF-β Produktion der phagozytierenden Zellen während der Phagozytose von Apoptosekörper [10].

Darüberhinaus kommt es bei massiver Apoptose, wenn die Phagozytose der Apoptosekörper nicht mehr ausreicht, zu spontaner Zerstörung der Apoptosekörper und unkontrollierter Freisetzung von inflammatorischen Stimuli.

Einen anderen Aspekt des Zusammenspiels zwischen Fibrose und Apoptose ist in der Apoptose von HSC zu sehen. Wie oben schon erwähnt, ist unklar, ob sich einmal aktivierte HSC in vivo in ihren nichtaktivierten Zustand zurück entwickeln können. Bisher konnte man dies nur in vitro zeigen. Aus diesem Grund scheint die Apoptose von aktivierten HSC einen wichtigen Stellenwert zur Verhinderung weiterer Fibrogenese zu haben [36].

Tatsächlich überexprimieren aktivierte HSC den Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2), einen weiteren Death Receptor [64].

Aktivierte HSC überexprimieren außerdem den NGF-Rezeptor p75 NTR (s.u.), der durch Stimulation mit NGF ebenfalls zur Apoptose führen kann.

1.2.4 Neuronale Faktoren während der Fibrogenese

Zusätzlich zu den Zytokinen spielen auch neuronale Faktoren bei der Fibrogenese der Leber eine Rolle. So etwa konnte gezeigt werden, dass sympathische Aktivität profibrotisch wirkt: HSC exprimieren die Adrenorezeptoren α 1, β 1 und β 2 und können durch α - und β -Rezeptorblocker am Wachstum gehindert werden [50]. Außerdem zeigen Dopamin-Beta-Hydroxylase (das Enzym, das die Oxidation von Dopamin zu Noradrenalin katalysiert) defiziente Mäuse eine inhibierte Fibrosebildung bei Leberschädigung [50].

Cassiman et al konnten die Expression von Neurotrophinen und Neurotrophinrezeptoren auf humanen und Ratten HSC zeigen [13, 14].

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Neuronal Growth Factor NGF und der Rezeptor p75 NTR während der Fibrogenese stark überexprimiert werden [9]. Außerdem scheinen HSC ohne den p75 NTR Rezeptor nicht zu Myofibroblasten differenzieren zu können [51].

Andererseits scheint, wie oben erwähnt, NGF via p75 Rezeptor auch die Apoptose von HSC zu induzierten [67].

Vor diesem Hintergrund wurde ein Microarray von HSC während der myofibroblastischen Differenzierung durchgeführt. In diesem waren auch der neuronale Faktor Netrin-1 und sein Rezeptor UNC5H2 während der myofibroblastischen Differenzierung hochreguliert.

1.3 Netrin-1 und UNC5H2

Netrin-1 ist ein Protein, welches ursprünglich als Wachstumsfaktor für neuronale Axone entdeckt wurde. Es gehört zu einer Familie von Proteinen, die alle etwa 60-80 kDa groß sind und gewisse Ähnlichkeit zu Lamininen aufweisen (zwei der drei Domänen von Netrin sind homolog zu den Domänen V und VI des Laminins) [46].

Das erste Protein aus der Netrinfamilie, welches gefunden wurde, ist UNC6 in C. elegans. Damals wurden Proteine gesucht, deren Deletion mit unkoordiniertem Wachstum (daher der Name UNC) einhergingen. Das unkoordinierte Wachstum ließ sich hier auf Defekte der Axonentwicklung zurückführen [31].

In Wirbeltieren konnten die Netrine Netrin-1, Netrin-3, Netrin-G1, Netrin-G2 und Netrin-4 identifiziert werden, wovon Netrin-1 das bisher am häufigsten untersuchte ist [46]. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich ebenso auf das Netrin-1.

Ähnliche Wachstumsdefekte wie UNC6 konnte in C. elegans bei Deletion von UNC40 und UNC5 beobachtet werden [31]. Diese stellten sich als Netrinrezeptoren heraus. Mehrere Rezeptoren für Netrin-1 konnten bisher identifiziert werden. Dazu gehört der DCC (deleted in colorectal cancer)-Rezeptor und die UNC5H-Rezeptorfamilie [43].

DCC ist ein orthologes Protein des UNC-40 in Wirbeltieren. Durch alternatives Splicing kodiert das DCC-Gen für mehrere Proteine, die alle Typ-1 Transmembrane Proteine sind [46]. Interessanterweise wurde das DCC-Gen schon einige Jahre vor den Netrinen als Tumorsuppressorgen entdeckt. In einer Mehrzahl der kolorektalen Karzinome liegt eine Deletion des DCC Gens vor[24]. UNC5H ist eine Familie (UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 und UNC5H4) von Typ-1 Transmembranen Proteinen in Wirbeltieren die homolog zu UNC5 in C. elegans sind [46]. Des Weiteren konnte der Adenosinrezeptor A2b als Rezeptor von Netrin-1 identifiziert werden der mit DCC interagiert und zu einer cAMP Erhöhung in der Zelle führt [18].

Sowohl DCC als auch die UNC5H-Rezeptorfamilie sind in Verbindung mit Netrin-1 an der Entwicklung des Nervensystems und insbesondere an der "Leitung" des Axonwachstums beteiligt. Während die Bindung von Netrin an DCC jedoch zu einer Hinwendung der Axone zu der Netrinquelle führt, kommt es bei Netrinbindung an UNC5H zu einer Abwendung der Axone [1].

Die molekularen Mechanismen die zu den jeweiligen Reaktionen führen, sind im Detail noch nicht genau bekannt. Im Falle von DCC scheint der ERK1/2 MAPK Weg genauso eine Rolle zu spielen, wie eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch TRPC1 Calciumkanäle und die oben angesprochene cAMP Produktion durch DCC/A2b Interaktion [25].

UNC5H hingegen scheint in Interaktion mit DCC und Robo-Rezeptoren zur Abwendung der Axone zu führen. Der gegensätzliche DCC-Effekt scheint hierbei durch Bindung der Roborezeptoren mit ihrem Liganden Slit unterbunden zu werden.

Neben der Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems scheinen die Netrine auch bei der Entwicklung von anderen Organen eine Rolle zu spielen. So konnte zum Beispiel für die Lunge gezeigt werden, dass sich die Expression von Netrin-1 und den Netrinrezeptoren DCC und UNC5H2 im Verlauf der embryonalen Entwicklung verändert und so die Verästelung des Lungenepithels steuert [19, 42]. Ähnliche Hinweise gibt es auch für die Brustdrüse, das Pankreas und das Gefäßsystem [3]. Bei der Entwicklung der Leber wurde bisher noch von keinem Einfluss des Netrinsystems berichtet.

Wie oben bereits angesprochen hat DCC zudem eine Rolle als Tumorsuppressorgen in der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms. Dies liegt daran, dass der DCC-Rezeptor ein sogenannter Dependance Rezeptor ist. Damit hat der Rezeptor die Eigenschaft, ohne Ligandenbindung die Apoptose der Zelle auszulösen. Ohne Ligandenbindung wird DCC auf der intrazellulären Seite gespalten. Durch diese Spaltung wird eine Domäne des DCC freigelegt, welche man ADD (addiction/dependance domain) genannt hat.

Diese führt wahrscheinlich via Caspase-9 Aktivierung zur Apoptose. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch UNC5H ein Dependance Rezeptor ist, der in Abwesenheit von Netrin zur Apoptose führt [43]. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf UNC5H2, welcher beim Menschen auch UNC5B heißt. Im Falle von UNC5H2 kommt es durch Abwesenheit von Netrin-1 zu Konformationsänderungen der intrazellulären Death-Domäne des UNC5H2. Diese interagiert mit der death-associated protein kinase (DAPK), welche für die UNC5H2-abhängige Apoptose notwendig ist [44].

Durch Autophosphorylation befindet sich DAPK normalerweise in einem inaktiven Zustand. Guenebeaud et al konnten zeigen dass UNC5B und DAPK in Abwesenheit von Netrin-1 mit PR65b interagieren. PR65b ist ein Bestandteil von PP2A. Sie konnten auch zeigen, dass PP2A DAPK durch Dephosphorylation aktivieren kann.

In dieses Bild passend, blockiert der DAPK-Repressor CIP2A die Apoptose durch UNC5B [29].



Abbildung 1.2: Funktion des Dependence Receptors UNC5H2: Bei Vorhandensein des Liganden überlebt die Zelle, ohne Ligandenbindung wird die Apoptose ausgelöst

1.4 Aufgabenstellung

Chronische Leberschäden können von einer Vielzahl von Erkrankungen ausgelöst werden und sind in Deutschland häufig. Die gemeinsame Endstrecke dieser Schäden ist durch eine zunehmende Vernarbung (Fibrose) der Leber gekennzeichnet, die vor allem durch myofibroblastische hepatische Sternzellen unterhalten wird.

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Odenthal ergaben sich Hinweise, dass myofibroblastische hepatische Sternzellen neuronale Mediatoren und hier im Besonderen Netrin-1 und UNC5B/UNC5H2 exprimieren.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Netrin-1 und UNC5B/UNC5H2 Expression während der myofibroblastischen Differenzierung zu untersuchen. Dabei sollten RNA-Isolate von primären hepatischen Sternzellen der Ratte, die in Kultur die myofibroblastische Differenzierung durchführen, herangezogen werden.

Ebenfalls sollte die Expression von Netrin-1 und dem UNC5B/UNC5H2 Rezeptor nach experimenteller Fibroseinduktion durch Gallengangsligatur im Rattenmodell untersucht werden.

Für die Analyse der Expression während der myofibroblastischen Differenzierung und nach Fibroseinduktion sollten Primer-Sets ausgewählt und eine Transkript-Analyse mittels Real-Time PCR durchgeführt werden. Es sollte zudem der Frage nachgegangen werden, ob die Expression mit dem Ausmaß der Fibrose korreliert.

Um die Expression nach hepatozellulärer Karzinogenese zu untersuchen, sollten aus der Kryo-Gewebebank des Institutes für Pathologie Gewebe von hepatozellulären Karzinomen (HCC) und peritumorales Gewebe zusammengestellt werden. Anschließend sollte die RNA isoliert und mittels eines humanspezifischen Primer-Sets für Netrin-1 und UNC5B die Expression studiert werden.

2. Methodik

2.1 Patientenmaterial

Das Patientenmaterial stammt aus der Gewebebank des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Köln. Es stand kryofixiertes Gewebe von 27 HCC-Patienten zur Verfügung. Von 20 Patienten lag sowohl Gewebe aus dem Tumor, als auch Gewebe des umliegenden Gewebes vor. Von sechs Patienten lag ausschließlich Tumorgewebe und von einem Patienten ausschließlich peritumorales Gewebe vor.

Das Patientenkollektiv war dabei sehr heterogen und unterschied sich sowohl in der Histologie der HCCs, als auch in der zugrunde liegenden Erkrankung und der Histologie des umliegenden, peritumoralen Lebergewebes. Die histologischen Befunde wurden im Rahmen der Routineuntersuchungen im Institut für Pathologie erstellt. Von vier Patienten lag kein histologischer Befund vor.

Von den Tumoren, von denen eine Histologie vorlag, hatten drei einen Differenzierungsgrad von I, einer lag zwischen I und II, zwölf Tumore wiesen einen Differenzierungsgrad von II auf, zwei lagen zwischen II und III und sechs Tumoren hatten Grad III.

Als ursächliche Erkrankungen hatten sechs Patienten eine chronische Hepatitis B und fünf Patienten eine chronische Hepatitis C. Zusätzlich gab es einen Patienten mit einer Hämochromatose und einen mit einem nutritiv-toxischen Leberschaden. Bei den restlichen Patienten gibt es keinen Hinweis auf die Genese.

Im Hinblick auf das umliegende Gewebe, lag bei acht Patienten eine komplette Leberzirrhose vor. Daneben hatten zehn Patienten eine Fibrose. Ein Patient hatte lediglich eine Steatose, einer eine milde Entzündung und bei einem Patient zeigte die Histologie zwar einen nodulären Umbau, aber keine Zirrhose. Bei drei weiteren Patienten fand man morphologisch unauffälliges Lebergewebe.

2.2 Gewinnung von RNA aus nativem Lebergewebe

Zur Gewinnung von RNA aus nativem Lebergewebe wurde das NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet.

Das Kit nutzt die Bindefähigkeit von RNA an einer Silicamembran (Quarzmembran). Das Gewebe wird lysiert und gleichzeitig werden durch den Lysepuffer die RNasen deaktiviert. Das Lysat wird durch eine Säule mit einer Silicamembran zentrifugiert. Dabei binden die negativ geladenen Nukleinsäuren an dieser. Zur Aufreinigung der RNA wird dann zunächst die DNA mit einer DNase verdaut. Anschließend werden durch verschiedene Waschschritte Salze, Metaboliten und andere Zellanteile entfernt.

Zuletzt wird die reine RNA in RNase freiem Wasser aufgenommen.

2.2.1 Lyse des nativen Lebergewebes

Etwa 30 mg des nativen, gefrorenen Gewebes wurden mit 350 µl des im Kit enthaltenen RA1 Puffers, 3,5 µl Mercaptoethanol und zwei Spatelspitzen Keramikkugeln (1,4mm, peqlab, Erlangen, Deutschland) in ein Tube gegeben und im precellys24 der Firma Bertintechnologies (Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) zwei Mal für 20 Sekunden bei 6500 Umdrehungen pro Minute geschreddert. Anschließend wurde das entstandene Lysat kurz zentrifugiert.

2.2.2 Extraktion der RNA

Alle bei der Extraktion verwendeten Reagenzien und Filter sind Teil des NucleoSpin RNA II Kits (Macherey-Nagel).

Für einen ersten Filtrationsschritt zur Entfernung von nicht lysierten Geweberesten wird das Lysat in die Filter Unit überführt und bei 11.000g eine Minute zentrifugiert. Der Filter wird weggeschmissen und dem gefilterten Lysat werden 350 µl Ethanol (70 Prozent) zugesetzt. Das Lysat wird dann in eine der im Kit enthaltenen RNA II Säulen überführt und bei 8.000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen und die Säule in ein neues Tube überführt. Anschließend werden 350 µl MDB (membrane desalting buffer) auf

die Säule gegeben und bei 11.000g für eine Minute durch die Säule zentrifugiert.

Währenddessen wurde der DNase-Reaktion Mix vorbereitet. Dazu wurden 10 µl der rDNase mit 90 µl des rDNase reaction buffers in ein Tube gegeben und gemischt. 95 µl des Mix werden auf die Membran der Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wird 200 µl RA2 Puffer auf die Membran gegeben. Dieser Puffer inaktiviert die rDNAse. Dann wird für 30 Sekunden bei 8.000g zentrifugiert. Abschließend erfolgen noch zwei Waschschritte mit dem Puffer RA3.

Danach kann die RNA in RNase freiem Wasser aufgenommen werden. Dazu werden 60 µl des Wassers auf die Membran gegeben und bei 11.000g eine Minute zentrifugiert. Im Zentrifugat befindet sich dann die RNA.

2.3 Reverse Transkription von RNA Extrakten aus nativen Leberbiopsie

Zur reversen Transkription der RNA aus nativen Leberbiopsien wurde das ABI cDNA Synthese Kit (ABI Life Technologies, Foster City, USA) benutzt. Dabei wurde ein 10 µl Ansatz benutzt, um 1 µg RNA umzuschreiben. Der folgende Ansatz wurde gemäß den Herstellerangaben zusammenpipettiert:

Reverse Transkriptionsansatz: x μl 1 μg RNA 1 μl 10 x RT Puffer (ABI) 0,4 μl 25 x dNTP (ABI) ... ad 10 μl H2O Der Ansatz wurde zunächst für 10 Minuten bei 25°C und danach für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der reversen Transkription wurde davon ausgegangen, dass die RNA eins zu eins umgeschrieben worden war. Demnach war 1 µg cDNA in dem10µl Reaktionsansatz, was einer Konzentration von 100 ng/1 µl entspricht.

2.4 Real Time PCR

Die Real Time PCR (Polymerase Ketten Reaktion) ist eine Methode, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und eine Quantifizierung von genomischer DNA und cDNA Nukleinsäuren ermöglicht.

Die Amplifikation wird bei der Real Time PCR nach Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes mittels Fluoreszenzmessung verfolgt, so dass die PCR-Verläufe verschiedener Proben im linearen Amplifikationsbereich verglichen werden können. Eine quantitative Abschätzung der am Anfang der Real Time PCR vorgelegten DNA wird durch Vergleich des Fluoreszenzanstiegs der Probe mit einem vorher definierten Standard möglich. In der vorgelegten Arbeit wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, SyBr Green und 6-FAM-phosphoramidit.

2.4.1 Real-Time PCR mit SyBr Green

Das Prinzip der Real Time PCR mit SyBr Green besteht in der Bindungsfähigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes SyBr Green zu DNA. Bei der Amplifikation der DNA interkaliert das SyBr Green in die DNA. Der DNA-SyBr-Komplex emittiert bei Anregung mit blauem Licht (λ = 498 nm) grünes Licht (λ = 522 nm).

Eine Schmelzkurve am Ende der Amplifikationszyklen gibt Aufschluss, ob ein einheitliches PCR-Produkt gebildet wurde.

2.4.1.1 Ansatz für die Real-Time PCR mit Sybr Green

Die Real-Time PCR-Reagenzien wurde in einer Mikrotiter-Platte (Eppendorf; Hamburg, Deutschland) zusammenpipettiert. Ein Reaktionsansatz bestand neben 1 μ l der cDNA-Probe (100 ng/ μ l), 10 μ l des SyBr Green Master Mix der Firma ABI (Foster City, CA, USA), jeweils 0,8 μ l des Forward- und des Reverseprimers (10 μ M) sowie 7,4 μ l H2O der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland). Für den PCR-Ansatz wurden die in Tabelle 2.1 zusammengestellten Primer verwendet.

Name	Spezies	Primersequenz
Netrin-1	Mensch	F: ccctgcataaagatccctgt
		R: ttgcagtaggaatcgcagtc
UNC5B	Mensch	F: ctaagcgaccccaacagc
		R: gaagatggccaccacgag
HPRT	Mensch	F: gaccagtcaacagggacat
		R: gtgtcoattatatcttccacaatcaag
Netrin-1	Ratte	F: gccccttgcattaagattcc
		R: gccttgcagtaggagtcaca
		S: tgtagcgccacccaccactgca
UNC5H2	Ratte	F: tgcgtgctgaatcagagaac
		R:atacagcgccacgtcgcca
		S:cctaaaagccgccccctggagc
HPRT	Ratte	F: gaccggttatgtcatgtcg
		R: acctggttcatcatcactaatcac

Tabelle 2.1: Verwendete Primer und Sonden

2.4.1.2 Durchführung der Real-Time PCR mit Sybr Green

Die Mikrotiterplatten oder die Reaktionsgefäße mit den Real Time PCR-Ansätzen wurden zentrifugiert (600g) und anschließend in den Heizblock des MX3000- Real Time PCR Gerätes der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) gesetzt. Für die Amplifikation wurden die folgenden Zyklusbedingungen gewählt: Anfänglich wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach folgten 60 Zyklen in denen der Ansatz jeweils für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt und danach für 1 Minute auf 60°C abgekühlt wurde. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen.

Am Ende der Real Time PCR wurde zur Erstellung einer Schmelzkurve die Temperatur von 45°C auf 95°C erhöht und dabei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

2.4.2 Real Time PCR mit TaqMan Sonde

Bei der Real Time PCR mit TaqMan Sonde wird ein anderes Prinzip genutzt. Neben den spezifischen Primern wird hier eine spezifische Sonde in die Real Time PCR eingesetzt, die komplementär zu einem DNA-Bereich innerhalb der amplifizierten Sequenz ist.

Diese ist mit einem Reporter Fluoreszenzfarbstoff (hier: FAM) und mit einem Quencher (hier: BHQ-1 (Black Hole Quencher 1) modifiziert. Der Quencher dämpft die Emission des Reporters. Genau wie die Primer kann die Sonde sich nach der Denaturierung des Doppelstrangs an den komplementären DNA-Bereich anlegen. Bei der Synthese des Gegenstranges wird die Sonde von der TaqPolymerase abgebaut. Dieser Vorgang setzt den Reporter frei und die Fluoreszenzemission kann gemessen werden.

2.4.2.1 Ansatz für die Real-Time PCR mit TaqMan Sonde

Bei der vorliegenden Arbeit wurde für die Real Time PCR der RealMasterMix RT-PCR Probe Kit der Firma 5 Prime (Hamburg, Germany) verwendet. Der Ansatz erfolgte wiederum in einer 96-Well Platte der Firma Eppendorf.

Ansatz je Well der Platte:	- 8,0 µl	2.5x Master Mix (5Prime)
	- 0,6 µl	Primer Forward 10µM
	- 0,6 µl	Primer Reversed 10µM
	- 0,2 µl	Sonde 10 µM
	- 9,6 µl	Wasser (Roth)
	- 1,0 µl	cDNA

2.4.2.1 Durchführung der Real-Time PCR mit TaqMan Sonde

Die Mikrotiterplatten mit den Real Time PCR-Ansätzen wurden zentrifugiert (600g) und anschließend in den Heizblock des MX3000- Real Time PCR Gerätes der Firma Stratagene oder des iQ5 Real Time Detection System der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA) gesetzt. Für die Amplifikation wurden die folgenden Zyklusbedingungen gewählt: Zunächst 2 Minuten bei 95°C. Danach für 55 Zyklen jeweils 30 Sekunden 95°C und 1 Minute bei 60°C.

2.5 Histologie

Für die histologische Bestimmung des Entzündungs- und Fibrosegrades der Proben wurden Hämatoxylin-Eosin-, van Gieson-, Gomori-, Chloracetatesterase-Färbungen in der Routine des Eingangslabors des Instituts für Pathologie durchgeführt [9].

2.6 Apoptose Assay

Der Apoptose Assay wurde mit dem In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein der Firma Roche (Basel, Schweiz) durchgeführt. Dieses funktioniert mittels TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling).

In einer apoptotischen Zelle wird die DNA von Endonukleasen fragmentiert. Die TUNEL-Technologie nutzt das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) um die an den Bruchenden freiwerdenden 3'-Hydroxylgruppen mit Fluorescein-gekoppelten Nukleotiden zu markieren. Diese lassen sich im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

Für den Apoptose Assay standen kryofixierte Schnitte von Rattenlebern zur Verfügung. Da diese nativ und nicht paraffinfixiert waren, musste keine Entparaffinierung durchgeführt werden. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Netrin-1 und dem Rezeptor UNC5H2 in hepatischen Sternzellen

Frühere Studien über hepatische Sternzellen konnten zeigen, dass diese neuronale Mediatoren exprimieren. Durch Expressionsanalysen mittels Microarray ergaben sich Hinweise auf die Expression von Netrin-1 und dessen Rezeptor UNC5B2 in primären hepatischen Sternzellen der Ratte.

3.2 Expression von Netrin-1 und UNC5H2 während der myofibroblastischen Differenzierung

Da sich Netrin-1 und UNC5H2 auf den HSC zeigten, wurde in einem zweiten Schritt untersucht, ob sich die Expression während der myofibroblastischen Differenzierung dieser Zellen ändert. Hierfür wurden wiederum primäre HSC der Ratte isoliert und zu verschiedenen Zeitpunkten der myofibroblastischen Differenzierung untersucht.

Hierbei zeigte sich sowohl eine Hochregulierung des Netrin-1 als auch des UNC5H2 (Abbildung 3.1).

Auf Grundlage dieser Beobachtung wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt.





3.3 Expression von Netrin-1 und UNC5H2 während der Fibrogenese am Rattenmodell

Zur Untersuchung der Bedeutung von Netrin-1 und dem Netrinrezeptor UNC5H2 für die Leberfibrose wurde ein experimentelles Leberfibrosemodell nach Gallengangsligatur benutzt. Die durch die Gallengangsligatur induzierte Cholestase führt in der Leber zur Ausbildung einer cholangitischen Fibrose

3.3.1 Induktion einer experimentellen Leberfibrose am Rattenmodell

Männliche Wistar-Ratten wurden in drei Gruppen aufgeteilt. An der ersten Gruppe wurde eine Sham-OP durchgeführt. An der zweiten und dritten Gruppe wurde operativ der Gallengang ligiert. Eine der beiden Gruppen bekam über vier Wochen eine Behandlung mit Candesartancilexetil (5mg pro Kilogramm und Tag). Die andere Gruppe blieb unbehandelt. Die Versuche wurden von der Arbeitsgruppe PD. U. Töx (Abdominalzentrum am Universitätsklinikum Köln) durchgeführt und die Gewebe wurden mir für diese Arbeit überlassen.

Vier Wochen später erfolgte die Auswertung der entzündlichen und fibrotischen Veränderungen.

Die Auswertung der Entzündung der Rattenlebern erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ morphometrisch anhand der Anzahl von Granulozyten innerhalb der Leber. Dazu wurden histologische Schnitte mit Chloracetatesterase-Färbung behandelt. Diese stellt Granulozyten rot dar (siehe Abbildung 3.2). Schon qualitativ ist damit ein Unterschied zwischen sham-operierten und gallengangsligierten Tieren erkennbar [9].



Abbildung 3.2: Chloracetatesterasefärbung der Rattenlebern. Links bei einer sham-operierten Ratte. Hier sind keine Granulozyten erkennbar. Rechts nach Gallengangsligatur mit rot angefärbten Granulozyten(a) sowie erkennbarer Gallengangsproliferation(b). (Die Dokumentation der histologischen Schnitte wurde mir freundlicherweise von A. Brzoza überlassen)

Zur Erfassung der Fibrose wurden histologische Präparate der Lebern, die nach Gomori und van Gieson gefärbt waren, ausgewertet. (Abbildung 3.3). Unterschiede zwischen den sham-operierten und den gallengangsligierten Tieren sind deutlich erkennbar.



Abbildung 3.3: Gomori (A+B) und von Gieson (C+D) Färbung der Rattenlebern. Links jeweils nach Sham-OP, rechts nach Gallengangsligatur. Die Pfeile verweisen jeweils auf Bindegewebsablagerungen. (Die Dokumentation der histologischen Schnitte wurde mir freundlicherweise von A. Brzoza und M. Kwiescinski überlassen.)

3.3.2 Auftreten von Apoptose nach Cholestase in gallengangsligierten Ratten

Zur Analyse der Apoptose wurden kryofixierte Gewebeschnitte einiger Ratten mittels TUNEL–Assay gefärbt. Dieser färbt apoptotische Zellen. Anschließend wurden drei Gesichtsfelder ausgezählt. Dies wurde von drei Personen durchgeführt. Ergebnisse der Zählung sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Abbildung 3.4 zeigt den signifikanten Unterschied in der Anzahl der Apoptosen zwischen sham-operierten und gallengangsligierten Tieren.

Tabelle 3.1a: Anzahl der apoptotischen Zellen je Gesichtsfeld nachTUNEL-Färbung an Proben der sham-operierten Ratten

Probe	Zählung 1	Zählung 2	Zählung 3	Durchschnitt
12	13,67	26,33	34,33	24,78
42	8,00	10,00	17,00	11,67
47	7,67	9,33	12,33	9,78

Tabelle 3.1b: Anzahl der apoptotischen Zellen je Gesichtsfeld nachTUNEL-Färbung an Proben der gallengangsligierten Ratten

Probe	Zählung 1	Zählung 2	Zählung 3	Durchschnitt
8	49,67	55,00	39,33	48,00
56	132,50	128,00	199,00	155,75
70	33,00	21,33	38,33	30,89
79	73,00	26,33	47	48,78
87	40,67	35,00	44,67	40,11



Abbildung 3.4: Durchschnittliche Anzahl apoptotischer Zellen je Gesichtsfeld in Leberschnitten bei sham-operierten und gallengangsligierten Ratten (vergleiche auch Tabelle 3.1 a und 3.1b)

3.3.3 Auftreten der Apoptose in Abhängigkeit von entzündlichen und fibrotischen Veränderungen nach Gallengangsligatur

Um das Auftreten der Apoptose in der experimentellen Fibrose weiter zu charakterisieren, wurde das Ausmaß der Apoptose mit den entzündlichen und fibrotischen Veränderungen in Bezug gesetzt. Dazu wurden die quantitativen Angaben der Granulozyteninfiltration herangezogen, die in der Doktorarbeit von Anna Brzoza ermittelt wurden [9]. Für die quantitative Analyse waren die Granulozyten in fünf Portalfeldern und in fünf peripheren Bereichen ausgezählt. Die Zahl der Apoptosen pro Leberschnitt wurde mit den entzündlichen Veränderungen in Bezug gesetzt. Die Berechnung der Korrelation nach Pearson ergibt einen Korrelationskoeffizienten von 0,44 und ist damit nicht signifikant (p= 0,323).

Ebenso wurde die Zahl der Apoptosen in Abhängigkeit vom Grad der Fibrose betrachtet. Um diese zu quantifizieren, wurde die Hydroxyprolinexpression in den Leberschnitten gemessen [9]. Hier erkennt man eine signifikante Korrelation mit einem Koeffizienten von 0,978 nach Pearson(p < 0,01).



Abbildung 3.5: Korrelation der Anzahl der Apoptosen mit dem Grad der Entzündung und mit dem Hydroxyprolinlevel

3.3.4 Die Expression von Netrin nach experimenteller Fibroseinduktion

Die Expression von Netrin-1 wurde während der experimentellen Fibrose nach Gallengangsligatur durch quantitative Real Time PCR untersucht. Zunächst wurden die Bedingungen der Real Time PCR etabliert, um dann die RNA-Extrakte der gallengangsligierten Ratten zu untersuchen.

3.3.4.1 Etablierung eines Real-Time PCR Nachweises für Netrin-1

Zur Untersuchung der Expression von Netrin-1 auf Transkriptebene wurde die Real-Time PCR benutzt. Für die Real-Time PCR wurden intronüberspannende Primer gewählt um eine Kontamination amplifizierter genomischer DNA zu verhindern. Abbildung 3.6 zeigt die Lage der Primer auf dem Netrin-1 Genbereich. Die Real-Time PCR wurde teils mit TaqMan Sonde und teils mit SyBr-Green durchgeführt. Für die Durchführung mit SyBr-Green entfällt die Platzierung der Sonde.



Abbildung 3.6: Lage der Primer (gelb markiert), der Sonde (türkis markiert) und der Introns auf dem Genbereich von Netrin-1 (Ausschnitt). Erkennbar ist die intronüberspannende Lage beider Primer, die eine Amplifikation von genomischer DNA verhindern soll.

Abbildung 3.7 zeigt einen Real-Time PCR Testlauf auf Netrin-1. Proben sind verschiedene cDNA Konzentrationen von Rattenlebergewebe sowie eine Negativkontrolle mit nicht umgeschriebener RNA zum Ausschluss von Amplifikation genomischer DNA. Die RNA-Probe wurde nicht amplifiziert.

Abbildung 3.8 zeigt eine exemplarische Standardkurve und die Schmelzkurve eines SyBr-Green Laufs.



Abbildung 3.7: Testlauf mit verschiedenen Konzentrationen von Netrin-1. Die nicht umgeschriebene RNA-Probe wird nicht amplifiziert



Abbildung 3.8: Standardkurve und Schmelzkurve eines exemplarischen Real Time PCR-Laufs mit Primern für Netrin-1. Die Schmelzkurve zeigt, dass immer der gleiche cDNA-Abschnitt amplifiziert wird.

3.3.4.2 Expression von Netrin-1 während der Fibrogenese

Nachdem die Real Time PCR etabliert worden war, wurden die Gesamt-RNA-Ratten untersucht. Als Housekeeping-Gen wurde Extrakte der zur Normalisierung HPRT gewählt, da es bekanntlich von den Zellen immer gleich exprimiert wird. In allen Proben konnte Netrin-1 Expression nachgewiesen werden. Tabelle 3.2 zeigt die Expression von Netrin-1 in den drei Gruppen. Mit Ausnahme von zwei Ausreißern in der Gruppe Gallengangsligatur ohne Therapie, ist die Expression aller Tiere ohne Therapie recht homogen (Mittelwert Sham-OP: 1,09; SD: 0,29; Mittelwert Gallengangsligatur: 1,30; SD 1,41). Allerdings weist die Gruppe mit Candesartantherapie eine geringere Expression von Netrin-1 auf (Mittelwert 0,51; SD: 0,11). Ein Boxplot (Abb. 3.9) bestätigt diese Vermutung. Der Unterschied ist signifikant - und zwar sowohl gegenüber der Sham-operierten Tiere (p<0,001) als auch gegenüber der Tiere mit Gallengangsligatur und ohne Therapie (p=0,032).

Probe	Netrin-1 mRNA	HPRT mRNA	Netrin-1/HPRT
	(ng)	(ng)	
6	1,98	1,64	1,20
11	2,05	2,29	0,90
12	4,38	3,61	1,21
35	8,02	9,15	0,88
39	7,42	6,47	1,15
42	6,6	5,48	1,20
45	8,19	5,81	1,41
47	4,41	3,16	1,40
48	4,88	4,71	1,04
62	7,37	7,36	1,00
66	9,35	9,81	0,95
88	10,85	11,91	0,91
89	9,76	9,33	1,05
90	6,49	6,63	0,98

 Tabelle 3.2a: Netrinexpression in den Lebern der sham-operierten Ratten

Tabelle 3.2b: Netrinexpression in den Lebern der gallengangsligierten Ratten

Probe	Netrin-1 mRNA	HPRT mRNA	Netrin-1/HPRT
	(ng)	(ng)	
3	21,48	14,94	1,44
8	17,19	20,28	0,85
13	18,54	19,68	0,94
22	14,07	22,91	0,61
50	11,57	15,60	0,74
52	13,98	21,59	0,65
53	11,08	17,73	0,62
56	16,63	15,67	1,06
60	12,22	12,24	1,00
70	6,71	6,21	1,08

75	1,62	0,24	6,75
79	2,45	0,66	3,71
82	8,06	6,31	1,28
83	6,13	5,59	1,10
84	19,77	24,73	0,80
87	12,01	17,52	0,69
91	12,74	12,18	1,05
96	25,19	28,06	0,90
106	15,71	36,55	0,43
107	19,85	21,18	0,94
108	17,95	21,1	0,85

Tabelle	3.2c:	Netrinexpression	in	den	Lebern	der	gallengangsligierten
Ratten,	die zus	sätzlich Candesart	an	erhal	ten habe	n	

Probe	Netrin-1	mRNA	HPRT	mRNA	Netin-1/HPRT
	(ng)		(ng)		
17	8,89		17,57		0,51
30	6,83		16,15		0,42
31	9,77		25,21		0,39
33	16,69		22,73		0,73
36	5,39		12		0,45
51	6,83		20,48		0,33
59	17,65		29,07		0,61
61	10,15		20,62		0,49
72	9,32		22,44		0,42
76	7,38		15,22		0,48
78	7,14		15,57		0,46
80	12,23		17,2		0,71
86	8,27		14,86		0,56
94	11,66		24,95		0,47
104	7,92		14,08		0,56



Abbildung 3.9: Die Netrinexpression der drei Rattengruppen. Während sich die Netrinexpression nach Gallengangsligatur nicht ändert, zeigt sich eine Minderung der Expression nach Candesartantherapie

3.3.5 Die Expression von UNC5H2 nach Fibrose im Gallengangsligationsmodell der Ratte

Genau wie die Netrin-1 Expression wurde auch die Expression von UNC5H2 nach experimenteller Fibroseinduktion mittels Gallengangsligatur untersucht. Wie bei der Untersuchung des Netrin-1, wurde zunächst ein Real-Time PCR Nachweis etabliert und die Leberproben anschließend anhand dieses Protokolls untersucht.

3.3.5.1 Etablierung eines Real-Time PCR Nachweises für UNC5H2

Auch zur Untersuchung der UNC5H2 Expression wurde die Real Time genutzt. Hier wurde ähnlich wie bei Netrin-1 ein intronüberspannender Primer gewählt, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern. Auch die Sonde wurde introüberspannend designed. Abbildung 3.10 zeigt die Lage der Primer und der Sonde im UNC5H2-Gen. Auch hier entfällt bei Real-Time PCR mit SyBr Green die Sonde.



Abbildung 3.10: Lage der Primer (gelb markiert), Sonde (türkis markiert) und der Introns auf dem UNC5H2 Genbereich (Ausschnitt). Der Forward-Primer und die Sonde sind introüberspannend, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern.

Abbildung 3.11 zeigt einen Testlauf auf UNC5H2, indem man erkennt, dass eine nicht umgeschriebene RNA Probe nicht amplifiziert wird, also keine Kontamination mit genomischer DNA stattfindet.

Abbildung 3.12 zeigt jeweils eine repräsentative Standard- und eine Schmelzkurve.



Abbildung 3.11: Testlauf mit verschiedenen Konzentrationen von UNC5H2. Die nicht umgeschriebene RNA-Probe wird nicht amplifiziert.



Abbildung 3.12: Standardkurve und Schmelzkurve eines exemplarischen Real Time Laufs mit Primern für UNC5H2. Die Schmelzkurve zeigt, dass immer der gleiche cDNA-Abschnitt amplifiziert wird.

3.3.5.2 Expression von UNC5H2 während der Fibrogenese

Wie bei der Expressionsbestimmung von Netrin-1 wurde auch bei UNC5H2 der Real-Time PCR Wert mit HPRT normalisiert.

Tabelle 3.3 zeigt die normalisierten Expressionswerte für alle drei Gruppen. Man erkennt einen deutlichen Unterschied zwischen den sham-operierten und den gallengangsligierten Tieren sowohl mit als auch ohne Therapie. Der Mittelwert der UNC5H2 Expression der sham-operierten Tiere liegt bei 0,15 (Standardabweichung: 0,06). Hiergegen liegt der Mittelwert der Expression bei den Tieren nach Gallengangsligatur bei 1,45 (Standardabweichung: 0,91) Der Boxplot (Abbildung 3.13) zeigt den fast 10-fachen Anstieg von UNC5H2 nach Gallengangsligatur ohne Therapie. Der Unterschied ist signifikant (p<0,001).

Abbildung 3.13 zeigt auch, dass das UNC5H2-Expressionslevel der Tiere mit Gallengangsligatur und Therapie zwischen den beiden anderen Gruppen liegt. Hier beträgt der Mittelwert 0,85 (Standardabweichung: 0,25) Es ist signifikant höher (p<0,001) als das Expressionslevel der sham-operierten Tiere und signifikant niedriger (p=0,012) als das Expressionslevel der Tiere ohne Therapie.

Probe	UNC5H2 mRNA	HPRT mRNA	UNC5H2/HPRT
	(ng)	(ng)	
6	0,49	1,64	0,30
11	0,45	2,29	0,20
12	0,66	3,61	0,18
35	0,42	9,15	0,05
39	0,71	6,47	0,11
42	0,74	5,48	0,14
45	1,17	5,81	0,20
47	0,51	3,16	0,16
48	0,33	4,71	0,07
62	1,23	7,36	0,17
66	1,16	9,81	0,12
88	1,22	11,91	0,10
89	1,57	9,33	0,17
90	1,02	6,63	0,15

Tabelle 3.3a: UNC5H2-Expression in den Lebern der sham-operierten Ratten

Tabelle 3.3b: UNC5H2-Expression in den Lebern der gallengangsligiertenRatten

Probe	UNC5H2 mRNA	HPRT mRNA	UNC5H2/HPRT
	(ng)	(ng)	
3	49,43	14,94	3,31
8	45,44	20,28	2,24
13	27,13	19,68	1,38
22	45,10	22,91	1,97
50	15,90	15,60	1,02
52	17,80	21,59	0,82
53	22,85	17,73	1,29
56	68,61	15,67	4,38
60	16,06	12,24	1,31

70	3,48	6,21	0,56
75	0,27	0,24	1,13
79	0,92	0,66	1,39
82	5,96	6,31	0,94
83	4,05	5,59	0,72
84	30,05	24,73	1,22
87	24,01	17,52	1,37
91	20,83	12,18	1,71
96	35,14	28,06	1,25
106	30,54	36,55	0,84
107	22,69	21,18	1,07
108	12,04	21,1	0,57

Tabelle 3.3c: UNC5H2-Expression in den Lebern der gallengangsligiertenRatten, die zusätzlich Candesartan erhalten haben

Probe	UNC5H2 (ng)	HPRT mRNA	UNC5H2/HPRT
		(ng)	
17	12,27	17,57	0,70
30	18,00	16,15	1,11
31	29,53	25,21	1,17
33	27,45	22,73	1,21
36	15,10	12	1,26
51	15,80	20,48	0,77
59	23,30	29,07	0,80
61	22,41	20,62	1,09
72	15,54	22,44	0,69
76	7,85	15,22	0,52
78	11,91	15,57	0,76
80	11,93	17,2	0,69
86	7,83	14,86	0,50
94	18,69	24,95	0,75
104	11,25	14,08	0,80



Abbildung 3.13: Die UNC5H2 Expression der drei Rattengruppen. Die Expression nach Gallengangsligatur ist 10-fach erhöht. Die Ratten die eine Gallengangsligatur hatten und Candesartan erhielten liegen zwischen den beiden anderen Gruppen.

3.3.5.3 Die UNC5H2-Expression in Abhängigkeit der Entzündung, der Fibrose und Apoptose

Um herauszufinden, ob es nicht nur einen gualitativen, sondern auch einen guantitativen Zusammenhang zwischen der Fibrose und der UNC5H2-Expression gibt, wurden die normalisierten **RNA-Level** gegen Hydroxyprolinlevel und Apoptose aufgetragen (Abbildung 3.14 A und B). Abbildung 3.14 A zeigt die Korrelation der UNC5H2-RNA-Level mit dem Hydroxyprolinlevel. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,670 nach Pearson besteht eine signifikante (p < 0,01) Korrelation zwischen der UNC5H2 Expression und dem Grad der Fibrose. Ebenso zeigt Abbildung 3.14 B die Korrelation zwischen UNC5H2-RNA-Level und Anzahl der Apoptosen. Auch hier erkennt man eine signifikante Korrelation (p < 0,01). Der Koeffizient nach Pearson beträgt 0,958.





Abbildung 3.14 B: Korrelation der UNC5H2 Expression gegenüber der Anzahl der apoptotischen Zellen. In beiden Fällen ist die Korrelation gut zu erkennen.

3.4 Die Expression von Netrin-1 und UNC5H2 während der hepatozellulären Karzinogenese

Zur Untersuchung der Netrin-1 und der UNC5H2 Expression während der Karzinogenese wurde ein Kollektiv von kryokonservierten OP-Resektaten von Patienten zusammengestellt und untersucht. Alle Patienten hatten ein hepatozelluläres Karzinom (HCC), allerdings unterschiedlicher Genese. Es lagen Gewebepräparate von 27 Patienten vor. Bei sechs Patienten gab es nur Material aus dem Tumor, bei einem lediglich Material aus einem Bereich ohne Tumor, von den restlichen zwanzig Patienten stand sowohl Material aus dem Tumor als auch Material aus tumorfreiem Lebergewebe zur Verfügung, so dass ein Vergleich möglich war (Tabelle 3.4).

Die histopathologische Begutachtung sowohl zur Beschaffenheit der Tumoren als auch zu den etwaigen Grunderkrankungen der Lebern wurde durch die histologischen Befunde der Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Köln und durch die klinischen Angaben der Einsendezettel erfasst. Bei vier Lebern liegt kein Befund vor (siehe Tabelle 3.4). Dabei ist zu beachten, dass die HCC eine sehr heterogene Gruppe bilden. Die Angaben der Tabelle sind vereinfacht.

Aus dem Bereich des Tumors und aus einem Bereich ohne Tumor wurde RNA extrahiert und diese per reverser Transkription und Real-Time PCR auf die Expression von Netrin-1 und UNC5H2 untersucht. Als Vergleichslebern stand Gewebe von vier zur Transplantation vorgesehenen, aber nicht transplantierten humanen Lebern zur Verfügung (NL1-4).

Nummer	Staging/Grading	Ätiologie	Peritumorales
			Gewebe
14	pT3N0Mx, GI-II	Unbekannt	Zirrhose
92	pT3NxMx, GIII	Unbekannt	Nodulärer Umbau
			ohne Zirrhose
94	pT3NxMx, GIII	HCV	Zirrhose
96	pT1NxMx, GI	HBV	Zirrhose
106	pT3NxMx, GIII	HBV	Zirrhose

Tabelle 3.4: Merkmale des HCC-Kollektivs

107	pT3NxMx, GI	Unbekannt	Normal
110	pT3NxMx, GIII	Unbekannt	Normal
127	TxNxMx, GII	HCV	Fibrose
131	pT3NxMx, GII	Nutritiv-toxisch	Fibrose
132	pT1NxMx, GIII	HBV	Fibrose
134	pT1N0Mx, GII	HBV	Normal
141	pT3NxMx, GII	Unbekannt	Fibrose
144	Kein Befund		
146	Kein Befund		
147	pT1NxMx, GII	HBV	Steatose
162	Kein Befund		
165	pT1NxMx, GII	HBV	Fibrose
166	pT2NxMx, GII-III	Unbekannt	Fibrose
172	pT3NxMx, GII-III	HCV	Zirrhose
173	pT3NxMx, GII	Hämochromatose	Fibrose
186	pT1NxMx, GI	Unbekannt	Fibrose
188	pT1N0Mx, GII	Unbekannt	Fibrose
191	pT3NxMx, GII	Unbekannt	Fibrose
207	pT1NxMx, GII	Unbekannt	Leichte
			Entzündung
211	pT1NxMx, GII	Unbekannt	Zirrhose
216	pT1NxMx, GII	HCV	Zirrhose
229	pT1N0Mx, GII	HCV	Zirrhose
235	Kein Befund		

3.4.1 Etablierung eines Real-Time PCR Nachweises für Netrin-1 und UNC5H2 in der humanen Leber

Für die Darstellung der Netrin-1 und UNC5H2 Expression am humanen Gewebematerial wurden zunächst die Primer-Sets ausgewählt und Real Time PCR-Bedingungen überprüft. Hierbei gelang es mit den geeigneten Primern jeweils eine erfolgreiche Real-Time PCR durchzuführen bei der keine RNA-Proben amplifiziert wurden und die Schmelzkurve lediglich ein Amplifikat zeigte.

Anschließend wurden dann die Expressionen von Netrin-1 und UNC5H2 in den Lebergeweben des zusammengestellten Patientenkollektivs bestimmt.

3.4.2 Expression von Netrin-1 in hepatozellulären Karzinomen

Abbildung 3.14 A zeigt das normalisierte Expressionsmuster von Netrin-1 in dem Probenkollektiv. Dabei sind die Bereiche aus den Tumoren gegen die Bereiche ohne Tumoren und die Vergleichslebern aufgetragen.

Man kann die Tendenz erkennen, dass die Netrin-1 mRNA-Level von den Normallebern über die kranken Lebern zu den Tumorbereichen weniger wird. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.



Abbildung 3.14: A: Netrinexpression in dem HCC-Kollektiv nach Gruppen. B: Einzelauflistung der Patienten mit Unterschieden der Netrinexpression zwischen Tumor und peritumoralen Gewebe. Man erkennt, dass sich in einigen Fällen innerhalb des Tumors, und in anderen Fällen peritumoral eine höhereExpression zeigt. Die Normallebern sind als Vergleich rechts dargestellt.

Abbildung 3.14 B zeigt eine Einzelauflistung der Lebern und der Netrin-1 mRNA Level. Diese lässt darauf schließen, dass nicht bei allen Tumoren das Netrin-1 mRNA weniger ist, als im peritumoralen Gewebe. Es gibt durchaus auch Tumoren bei denen das Verhältnis umgekehrt ist.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde versucht, Gemeinsamkeiten zwischen dem

Expressionsverhältnis von Netrin-1 und den histologischen Charakteristika der Tumoren zu finden. Hier lässt sich jedoch keine Aussage herauslesen.

3.4.3 Expression von UNC5H2 während der Karzinogenese

Abbildung 3.15 A zeigt die Unterschiede in der UNC5H2 Expression zwischen Tumorgewebe, dem umliegenden Gewebe derselben Lebern und der Vergleichslebern. Hier lässt sich keine Tendenz erkennen. Abbildung 3.15 B zeigt wiederum eine Einzelauflistung der Proben. Hier fallen lediglich zwei Proben auf, bei denen UNC5H2 im Tumor massiv erhöht ist (Nr. 144 und Nr.235). Bei diesen beiden Tumoren liegt jedoch kein histologischer Befund vor, sodass nicht auf eine Gemeinsamkeit zwischen diesen beiden Tumoren geschlossen werden kann.



Abbildung 3.15: A: UNC5B-Expression in dem HCC-Kollektiv nach Gruppen. B: Einzelauflistung der Patienten mit Unterschieden der UNC5B-Expression zwischen Tumor und peritumoralen Gewebe. Bis auf zwei Ausreißer lässt sich kein Unterschied zwischen der Expression im Tumor und der Expression peritumoral feststellen. Wiederum sind rechts die Normallebern dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Die Bedeutung von Netrin-1 und UNC5H2 in der Leberfibrogenese

Die Expressionsanalysen in dieser Arbeit zeigen eine zehnfach erhöhte Expression des Netrinrezeptors UNC5H2 nach experimenteller Induktion einer Leberfibrose durch Gallengangsligatur am Rattenmodell. Nicht ganz klar ist jedoch, welche Zellen diesen Expressionsanstieg bedingen. Eine Microarrayuntersuchung im Vorfeld dieser Arbeit (nicht veröffentlicht) konnte zeigen, dass zumindest primäre HSC der Ratte UNC5H2 exprimieren. In der Arbeit konnte eine guantitative PCR zur Messung der UNC5H2 Expression etabliert werden, die auch einen Anstieg der UNC5H2 Expression während der myofibroblastischen Differenzierung von primären HSC zeigt. Während der myofibroblastischen Differenzierung ist die Hochregulierung von Rezeptoren ein bekanntes Phänomen. So konnte unter anderem die Hochregulierung des PDGF-Rezeptors PDGFR-β [8] und des TRAIL-Rezeptors TRAIL-R2 [64] gezeigt werden.

Ob auch die Hepatozyten während der Fibrogenese eine erhöhte Expression von UNC5H2 zeigen, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Ebenso bleibt unklar, ob weitere, in der Leber vorkommende Zellen, wie Kupffer-Zellen oder Gallengangsepithelien UNC5H2 exprimieren oder ob sie im Falle einer Fibrosebildung die Expression steigern.

Im Falle des UNC5H2 zeigt die Arbeit eine direkte Korrelation des UNC5H2 mit der Fibrose. Ein unabhängiger Effekt der Candesartantherapie zeigt sich nicht.

Die Untersuchungen in HSC während der myofibroblastischen Differenzierung zeigen neben dem Anstieg von UNC5H2 auch einen Anstieg der Netrin-1 Expression.

Damit zeigt die vorliegende Arbeit eine weitere Expression von eigentlich neuronalen Faktoren in HSC während der myofibroblastischen Differenzierung.

So konnte bereits die Expression des NGF-Rezeptors p75 [67] und von NGF, BDNT, NT-3 und NT-4/5 auf HSC nachgewiesen werden [13].

Obwohl die HSC während der myofibroblastischen Differenzierung Netrin-1 hochregulieren, blieb in den Untersuchungen dieser Arbeit das

Expressionslevel von Netrin-1 im gesamten Leberzellverband nach der Fibroseinduktion gleich.

Aufgrund dieser Untersuchungen kann man vermuten, dass dieses ungleiche Verhalten der Expression von Netrin-1 und UNC5H2 während der Leberfibrogenese zu einem Ungleichgewicht von Ligand und Rezeptor im Sinne eines Überwiegens des Rezeptors führt.

Hier muss jedoch erwähnt werden, dass sich die Untersuchungen in dieser Arbeit lediglich auf die mRNA-Expression von Netrin-1 und UNC5H2 beschränken, so dass ein Ungleichgewicht der Proteine durch diese Arbeit nicht gezeigt wird.

Llambi et al. konnten durch Transfektion von Zellen mit UNC-exprimierenden Vektoren zeigen, dass Proteine aus der UNC-Familie genau wie DCC, ein weiterer Rezeptor für Netrin-1, die Funktion eines Dependance Receptors haben. Das heißt, dass diese Proteine in Abwesenheit des Liganden eine Apoptose auslösen können. Dieses konnten die Autoren in HEK293T, humanen embryonalen Nierenzellen sowie in immortalisierten olfaktorischen Neuroblasten zeigen [43]. Tanikawa et al. zeigten diesen Zusammenhang auch für mehrere humane Krebszelllinien aus verschiedenen Geweben [65], so dass man davon ausgehen kann, dass dieser Mechanismus der Apoptoseauslösung auch in der Leber funktioniert.

Davon ausgehend, dass es, wie durch diese Arbeit impliziert, zu irgendeinem Punkt während der Fibrogenese zu einem Ungleichgewicht zugunsten des Rezeptors kommt, würde dies bedeuten, dass dieses Ungleichgewicht auch zu einer Induktion von Apoptosen in der Leber führt.

Die Daten dieser Arbeit zeigen dazu passend eine starke Korrelation zwischen der UNC5H2 Expression und Apoptose.

Wie in der Einleitung schon erwähnt, spielt die Apoptose von Hepatozyten eine große Rolle bei der Fibrogenese in der Leber. So konnten Fadok et al. zeigen, dass Makrophagen nach Phagozytose von Apoptosekörper eine vermehrte Produktion von TGF- β zeigen [23]. TGF- β wiederum ist ein starker Induktor der Fibrogenese der Leber [7], da es die Produktion von Extrazellularmatrix in HSC fördert [32].

In der Leber werden Apoptosekörper jedoch nicht nur von Makrophagen, sondern auch von HSC phagozytiert. Canbay et al. konnten dies anhand von

LX-1 Zellen, einer immortalisierten HSC-Linie, zeigen. Diese phagozytierten die Apoptosekörper (durch UV-Strahlung in die Apoptose gebrachte Hep2-Zellen) nicht nur, sondern reagierten auch mit gesteigerter Expression von TGF- β und Kollagen 1 [12]. Als Kontrolle dienten LX-1 Zellen welche anstatt der Apoptosekörper Mikrokugeln phagozytierten. Auch die Expression von α -SMA, dem klassischen Marker der Aktivierung von HSC, nahm nach Phagozytose zu. Kupffer-Zellen exprimieren nach Phagozytose von Apoptosekörper außerdem mit dem Fas-Liganden, TRAIL und TNF- α weitere proapoptotischen Signale [10], welche dann zu weiteren Apoptosen führen können.

Diese Kaskade von Apoptosen scheint für die Fibrogenese eine bedeutende Rolle zu spielen. So konnten Canbay et al. zeigen, dass Fas-defiziente Mäuse nach Gallengangsligatur eine deutlich abgeschwächte Fibrosebildung aufweisen als Wildtypmäuse. Dies wiesen sie unter anderem anhand einer deutlich reduzierten Expression von TGF-β und Kollagen 1 in der Leber der Fas-defizienten Mäuse nach[11].

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint neben den klassischen Wegen der Apoptose mittels der Death-Rezeptoren Fas oder des TNF-α Rezeptors auch der relativ neue Weg über Dependance-Rezeptoren eine Rolle für die Fibrogenese der Leber zu spielen.

Dazu passend korreliert nach den Daten dieser Arbeit die UNC5H2 Expression auch mit der Entzündungsreaktion und der Fibrosebildung in der Leber nach Gallengangsligatur.

Das Ausmaß der Bedeutung der Hochregulation von UNC5H2 für die Fibrogenese nach Gallengangsligatur in diesem Rattenmodell wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht deutlich.

Weitere funktionelle Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen der UNC5H2-Expression und der Fibrosebildung der Leber wären hier notwendig, um zu untersuchen, ob die Expressionssteigerung von UNC5H2 wirklich zur gesteigerten Apoptose führt, oder ob die gesteigerte Expression letztlich nur eine Folge der Apoptosekaskade oder der Fibrosebildung ist.



Abbildung 4.1: Hypothese des Einflusses der gesteigerten UNC5H2-Expression auf die Fibrogenese. Durch die gesteigerte Expression von UNC5H2 kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Netrin-1 und UNC5H2 (A), vermehrte Apoptosen sind die Folge (B). Die entstandenen Apoptosekörper können durch Makrophagen phagozytierte werden, was eine Ausschüttung von TGF- β und anderen proinflamatorischen und -fibrotischen Mediatoren zur Folge hat (C). Bei Phagozytose der Apoptosekörper durch HSC, werden diese aktiviert (D).

4.2 Netrin-1 und UNC5H2 während der hepatozellulären Karzinogenese

In dieser Arbeit wurde die Expression von Netrin-1 und UNCB während der Karzinogenese der Leber untersucht.

Hintergrund der Untersuchungen ist die Bedeutung des Netrin-1 Systems während der Karzinogenese in verschiedenen Organen. Die erste Entdeckung war die Bedeutung des Netrinrezeptors DCC (deleted in colorectal cancer) als Tumorsupprossorgen in kolorektalen Karzinomen. Dies fanden Fearon et. al noch vor der Entdeckung des Netrins selber heraus [24]. Man entdeckte, dass 70 Prozent aller kolorektalen Karzinome einen loss of heterozygosity (LOH) auf dem q-Arm des Chromosom 18 zeigten und identifizierte das DCC Gen als das hierfür verantwortliche Gen. In weiteren Untersuchungen konnte DCC LOH auch in vielen weiteren Karzinomen entdeckt werden, so etwa in Karzinomen des Magens [68], der Prostata [35], der Mamma [40] und vielen weiteren. Castets et al. konnten zeigen, dass auch der Mechanismus dieses

Zusammenhangs auf der Rolle des DCCs als Dependance Receptor beruht [15].

Eine chinesische Arbeitsgruppe um Cong entdeckte DCC LOH auch in hepatozellulären Karzinomen [17]. In den Versuchen zur vorliegenden Arbeit war jedoch keine Expression von DCC in den untersuchten Zelllinien und den Lebern des Rattenmodels zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurde das DCC Gen in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Stattdessen untersuchten wir die Expression eines anderen Netrinrezeptors, des UNC5B. Thiébault et al. untersuchten 2002 erstmals die Expression der UNC5H Rezeptorfamilie (UNC5A, UNC5B und UNC5C) in verschiedenen Tumoren. Sie fanden eine verminderte Expression in Ovarial-, Mamma-, Uterus-. Kolorektal-. und Magenkarzinomen. Schilddrüsenund Prostatakarzinome waren nicht von einer Expressionsminderung betroffen. Diese Untersuchungen führten sie mittels Dot Blot Array auf mRNA Ebene durch. Hierbei wurden in der Untersuchung die Expression von UNC5A, UNC5B und UNC5C kumuliert gemessen. Als Grund für die Expressionsminderung untersuchten sie kolorektale Karzinome mit verminderter UNC5H Expression auf LOH in einem der UNC5H Gene. LOH fanden sie zwar in einigen, nicht jedoch in allen kolorektalen Karzinomen. So gehen die Autoren davon aus, dass es noch weitere Gründe für eine Expressionsminderung geben muss [66]. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels guantitativer PCR keine signifikante Änderung der UNC5B Expression zwischen Tumorgewebe, tumorfreiem

Anderung der UNC5B Expression zwischen Tumorgewebe, tumorfreiem Gewebe und gesunden Lebern festgestellt. Die Untersuchungen wurden auch auf mRNA Ebene durchgeführt. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich die Expression von UNC5B gemessen. UNC5A und UNC5C wurden im Gegensatz zu obiger Arbeit nicht betrachtet. Eine Untersuchung der Expression dieser beiden Mitglieder der UNC5H Familie wäre ein möglicher Ansatz für weitere Untersuchungen.

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen über LOH oder Mutationsanalysen durchgeführt. So sind im untersuchten Kollektiv einige Tumoren dabei, in denen die UNC5B-Expression niedriger ist als im umgebenden Gewebe, aber eben auch Tumoren, wo dies nicht der Fall ist. In der Arbeit von Thiébault et al. sind jeweils auch nicht alle Tumoren von einer verminderten UNC5B Expression betroffen. Der Grund dafür liegt in der starken genetischen Variabilität von Tumoren. So sind es nicht immer dieselben Mutationen, die zur Karzinogenese führen. Sinnvoll wäre es, in den Fällen, in denen die UNC5B Expression erniedrigt ist, nach Mutationen oder nach loss of heterezygosity zu suchen. Des Weiteren lag bei unseren Untersuchungen Material von sehr heterogenen HCCs vor, die sich sowohl vom Grading, als auch von der Genese stark unterscheiden. Um validere Aussagen zu machen, ob die UNC5B Expression in einer Untergruppe von HCC gegebenenfalls doch einen Einfluss hat, müsste eine größere Patientengruppe untersucht werden.

In der oben genannten Arbeit von Thiébault et al. wurden hepatozelluläre Karzinome nicht untersucht. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der UNC5B Expression und hepatozellulären Karzinomen gibt es lediglich im Hinblick auf die Tumorangiogenese. Zhang et al. haben einen Zusammenhang reduzierter UNC5B Expression und HCC Angiogenese gefunden. Hier wurde jedoch lediglich mittels in situ Hybridisierung die mRNA Expression von UNC5B in Endothelzellen gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass UNC5B-Expression in Endothelzellen von Tumorgewebe deutlich weniger als in gesunden Geweben oder sogar gar nicht nachweisbar war (Abstract von [70]). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit das Tumorgewebe im Ganzen lysiert und die mRNA aus allen Zellen untersucht. Somit kann in dieser Arbeit nichts über die UNC5B-Expression in den Endothelzellen gesagt werden. Zusammengefasst liefern die Daten dieser Arbeit keine signifikanten Hinweise auf die Bedeutung des Netrin-1/UNC5B-Systems auf die Kanzerogenese der Leber. Aufgrund der oben genannten Einschränkungen kann eine Bedeutung jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Chronische Schädigungen der Leber sind, unabhängig von der auslösenden Noxe, häufig durch eine zunehmende Fibrosierung der Leber gekennzeichnet, die im vollständigen zirrhotischen Umbau münden kann. Hieraus ergeben sich eine Vielzahl von klinischen Problemen und die Gefahr der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms als Spätfolge.

Der zentrale Zelltyp der Leberfibrogenese ist die hepatische Sternzelle, die sich bei Leberschädigung myofibroblastisch differenziert. Diese aktivierten hepatischen Sternzellen exprimieren jedoch nicht nur myofibroblastische Markergene, wie α-Smooth muscle actin, sondern auch zahlreiche neuronale Faktoren. Ein neuronaler Faktor, der bisher in der Leber nicht untersucht worden ist, ist das Netrin-1. Dieses wirkt mit seinen Rezeptoren, u.a. UNC5H2/UNC5B an dem korrekt ausgerichteten Wachstum von neuronalen Axonen mit. Des Weiteren ist UNC5H2/UNC5B ein sogenannter "Dependance" Rezeptor, der in Abwesenheit seines Liganden Netrin-1 zur Apoptose führt und so auch als Tumorsuppressorgen wirkt.

Ziel dieser Arbeit war deswegen die Expression des Netrin-1 und des UNC5H2 in der fibrotischen Leber und im hepatozellulären Karzinom zu untersuchen.

Nach Etablierung einer Netrin-1 und UNC5H2 spezifischen Real Time PCR konnte in den RNA-Populationen primärer hepatischer Sternzellen der Ratte gezeigt werden, dass während der in vitro-induzierten myofibroblastischen Differenzierung sowohl Netrin-1, als auch UNC5H2 vermehrt exprimiert wird.

Ebenso zeigt die vorgelegte Arbeit mittels Real-Time PCR eine starke Überexpression des UNC5H2 nach experimenteller Fibroseinduktion durch Gallengangsligatur in einem Rattenmodell, das mir freundlicherweise die Arbeitsgruppe Töx et al. (Abdominalzentrum der Universitätsklinik Köln) zur Verfügung gestellt hat. Die Expression von UNC5H2 korreliert signifikant mit dem Ausmaß der Fibrose, gemessen am Hydroxyprolinlevel (0,67 nach Pearson, p<0,01).Dagegen zeichneten sich für die Netrin-1-Expression keine Veränderungen nach fibrotischem Umbau durch die induzierte Cholestase ab. Mit dem Wissen, dass der UNC5H2/UNC5B-Rezeptor in Abwesenheit von Netrin-1 eine Apoptose auslöst, erklärt sich auch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte, signifikante Korrelation zwischen der UNC5H2 Expression und dem Auftreten von Apoptosen (0,958 nach Pearson, p<0,01). Ein Zusammenhang zwischen zunehmender Apoptose und Fibrogenese der Leber konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden. Die hier vorgelegten Ergebnisse legen nun erstmals einen Einfluss des Netrin-1/UNC5H2 Systems auf die Fibrogenese nahe, der sich über eine Steigerung der Apoptosen auswirkt. Funktionelle Experimente, um diese Hypothese weiter zu überprüfen, sind Ziel vertiefender Untersuchungen.

In einem weiteren Ansatz konnte die Expression von Netrin-1 und UNC5B erfolgreich in humanem Lebergewebe von Patienten mit einem HCC dargelegt werden. Hierbei wurde die Expression sowohl in Gewebematerial des Tumors, als auch in peritumoralem Gewebe sowie in Gewebe normaler Lebern mit quantitativer Real-Time PCR verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Netrin-1 und UNC5B zwischen der Gruppe normaler Gewebe, der Gruppe peritumoraler Gewebe und der Gruppe der hepatozellulären Karzinomgewebe festgestellt werden. Allerdings ergaben sich bei einer individuellen Betrachtung der Gewebe eines Patienten starke Unterschiede zwischen peritumoralem und tumoralem Gewebe. Diese Unterschiede waren aber weder signifikant noch waren sie einheitlich bei den Gewebeproben vertreten. Damit gibt es keinen eindeutigen Hinweis auf einen Einfluss des Netrin-1/UNC5B Systems auf die hepatische Karzinogenese, während die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in der Fibrogenese die Netrin-1/UNC5B Achse an der Induktion von Apoptose der HSC maßgeblich beteiligt ist.

6. Literaturverzeichnis

- Alcantara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C (2000). Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127: 1359-1372.
- Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM (1992). Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 89: 19-27.
- 3. Baker K, Moore S, Jarjour A, Kennedy T (2006). When a diffusible axon guidance cue stops diffusing: roles for netrins in adhesion and morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 16: 529–534.
- 4. **Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ** (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 96: 447-455.
- 5. Böcker D, Heitz (1997). Pathologie. Urban & Schwarzenberg.
- 6. **Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S** (2005). Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 12: 1031-1043.
- 7. Breitkopf K, Godoy P, Ciuclan L, Singer MV, Dooley S (2006). TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 44: 57-66.
- 8. Breitkopf K, Roeyen C, Sawitza I, Wickert L, Floege J, Gressner AM (2005). Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine* 31: 349-357.
- 9. **Brzoza A**. Untersuchungen von NGF und seinen Rezeptoren in der experimentellen Leberfibrose. Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln, 2008.
- Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ (2003). Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38: 1188-1198.
- Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ (2002). Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 123: 1323-1330.
- 12. **Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ** (2003). Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 83: 655-663.
- 13. **Cassiman D DC, Desmet VJ, Roskams T.** (2001). Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 33: 148-158.

- Cassiman D vPJ, De Vos R, Van Lommel F, Desmet V, Yap SH, Roskams T. (1999).
 Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 155: 1831-1839.
- Castets M, Broutier L, Molin Y, Brevet M, Chazot G, Gadot N, Paquet A, Mazelin L, Jarrosson-Wuilleme L, Scoazec JY, Bernet A, Mehlen P DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 482: 534-537.
- 16. Classen D, Kochsiek (2004). Innere Medizin. Urban & Fischer.
- Cong WM, Zhang SH, Xian ZH, Wu WQ, Wu MC (2005). [Study on loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 34: 71-74.
- Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moyse E, Chedotal A, Mehlen P (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 407: 747-750.
- Dalvin S, Anselmo MA, Prodhan P, Komatsuzaki K, Schnitzer JJ, Kinane TB (2003).
 Expression of Netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung. *Gene Expr Patterns* 3: 279-283.
- 20. de Lope CR, Tremosini S, Forner A, Reig M, Bruix J Management of HCC. *J Hepatol* 56 Suppl 1: S75-87.
- 21. Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten KH. Diagnostik und Therapie der akuten und chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion. In: *Konsensuskonferenz*.
- 22. Erhardt A (2011). Neue Therapiestrategien beim hepatozellulären Karzinom. *Klinische Onkologie 2011/2012*.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890-898.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247: 49-56.
- Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, Mehlen P (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417: 443-447.
- 26. **Friedman S** (2000). Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *The Journal of Biological Chemistry* 175: 2247-2250.

- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM (1985). Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8681-8685.
- 28. **Gressner A** (1998). The cell biology of liver fibrogenesis an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 292.
- 29. Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, Eisenberg-Lerner A, Shohat G, Zhang M, Laudet V, Kimchi A, Bernet A, Mehlen P The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol Cell* 40: 863-876.
- 30. **Hautekeete ML, Geerts A** (1997). The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch* 430: 195-207.
- 31. Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans. *Neuron* 4: 61-85.
- 32. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA (1999). The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 30: 77-87.
- 33. Herold G (2009). Innere Medizin.
- 34. Hoofnagle J (1997). Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26 (Suppl. 1).
- 35. **Hugel A, Wernert N** (1999). Loss of heterozygosity (LOH), malignancy grade and clonality in microdissected prostate cancer. *Br J Cancer* 79: 551-557.
- 36. **Iredale JP** (2001). Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 21: 427-436.
- Jaeschke H (2002). Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 27: 23-27.
- Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM (1994). Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. J Cell Biol 127: 2037-2048.
- 39. **Kayser B, Zinkernagel, Haller, Eckert, Deplazes** (2005). Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. Thieme.
- 40. Koren R, Dekel Y, Sherman E, Weissman Y, Dreznik Z, Klein B, Gal R (2003). The expression of DCC protein in female breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 80: 215-220.
- 41. Li D, Friedman SL (1999). Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 618-633.
- Liu Y, Stein E, Oliver T, Li Y, Brunken WJ, Koch M, Tessier-Lavigne M, Hogan BL (2004). Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. *Curr Biol* 14: 897-905.

- 43. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* 20: 2715-2722.
- Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, Kimchi A, Mehlen P (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J* 24: 1192-1201.
- 45. Maher JJ, McGuire RF (1990). Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. J Clin Invest 86: 1641-1648.
- 46. **Mehlen P, Furne C** (2005). Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci* 62: 2599-2616.
- 47. **Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S** (2002). Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 60: 289-293.
- 48. **Meyer DH, Bachem MG, Gressner AM** (1990). Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 1122-1129.
- 49. **Neuschwander-Tetri BA** (2009). Lifestyle Modification as the Primary Treatment of NASH. *Clinics in Liver Disease* 13.
- Oben JA RT, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. (2004). Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 53: 438-445.
- 51. **Passino MA AR, Sikorski SL, Akassoglou K** (2007). Regulation of Hepatic Stellate Cell Differentiation by the Neurotrophin Receptor p75NTR. *Science* 315: 1853-1856.
- 52. **Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE** (1989). Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 84: 1786-1793.
- 53. Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P (1996). Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 110: 534-548.
- 54. **Preiss S** (2008). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clinical Science* 115.
- 55. **Rantala vdL** (2008). Surveillance and Epidemiology of Hepatitis B and C in Europe A review. *Eurosurveillance* 13.
- 56. **Ratziu V** (2009). Pharmacologic Therapy of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease* 13.

- 57. **Rockey D** (1997). The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 25: 2-5.
- 58. Rockey DC, Fouassier L, Chung JJ, Carayon A, Vallee P, Rey C, Housset C (1998). Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* 27: 472-480.
- 59. **Roslyn M. London JG** (2007). Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clinics in Liver Disease* 11: 55 74.
- 60. **Roth S, Michel K, Gressner AM** (1998). (Latent) transforming growth factor beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 27: 1003-1012.
- 61. Rust C, Gores GJ (2000). Apoptosis and liver disease. Am J Med 108: 567-574.
- 62. **Seeff LB** (1997). The natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 1: 587-602.
- 63. **Serag BE** (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557-2576.
- 64. **Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ** (2003). Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 37: 87-95.
- 65. **Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H** (2003). p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5: 216-223.
- 66. Thiebault K, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly MO, Scoazec JY, Saurin JC, Romeo G, Mehlen P (2003). The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4173-4178.
- 67. **Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J** (2000). Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 156: 1235-1243.
- 68. Wang D, Fang D, Luo Y, Lu R, Liu W (1999). Study of loss of heterozygosity at DCC and APC/MCC genetic loci of gastric cancer. *Chin Med Sci J* 14: 107-111.
- 69. Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL (1994). Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest* 94: 1563-1569.
- 70. **Zhang H, Wu F, Tao YM, Yang LY** (2009). [Down-regulated expression of UNC5b related to hepatocellular carcinoma angiogenesis]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 47: 1569-1573.

7. Erklärung zur Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teile der vorgelegten Arbeit wurden als Poster auf der 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL) 2009 und auf der 44. Jahrestagung der European association for the study of the liver (EASL) 2009 präsentiert.

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlich.