

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes,
Homburg

**Einfluss der Expressionsvariation des Transforming Growth Factor beta Typ 2
Rezeptors (TGFbRII) auf phänotypische Aspekte der Leberfibrose
im Modell von extrem exprimierenden Mauslinien**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

vorgelegt von Natalie Christina Fund
geb. am 01.03.1987 in Stuttgart

Dekan: Prof. Dr. med. M.D. Menger
Erstberichterstatter: Prof. Dr. med. F. Lammert
Zweitberichterstatter:
Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Die Leberfibrose stellt eine komplexe Antwort auf eine chronische Langzeitschädigung unterschiedlicher Ätiologie dar. Der Verlauf einer Fibrose und die mögliche Progression zur Zirrhose werden durch individuelle, prädisponierende Faktoren beeinflusst. Die Prädisposition für komplexe Erkrankungen wird in der Regel durch Kombinationen zahlreicher DNA-Sequenzvarianten beeinflusst. Jedoch sind aufgrund der komplexen Regulation und biochemischer Interaktionen der Einfluss von Expressionsunterschieden auf einen Phänotyp weniger leicht zu erfassen als Unterschiede in der DNA-Sequenz. Daher bedarf es innovativer Modellsysteme, um den Einfluss der natürlichen Genexpressionsvariation auf pathogene Phänotypen *in vivo* zu charakterisieren.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses einer unterschiedlichen Expression des Transforming growth factor beta Rezeptors Typ 2 (TGF β RII) auf die Leberfibrose am Modell extrem exprimierender Mauslinien. Der TGF β RII gilt als limitierender Faktor in der Signalübertragung des zentralen profibrogenen Zytokins TGF- β . Wir wählten aus rekombinanten BXD-Inzuchtmäusen, generiert aus den Elternstämmen C57BL/6J und DBA/2J, zwei Linien mit größtmöglichem Unterschied in der basalen Leberexpression des TGF β RII aus. BXD13 repräsentierte niedrige, BXD24a hohe basale Expressionslevel des TGF β RII in unbehandelten Lebern. Zur Fibroseinduktion schädigten wir die Lebern beider Linien über einen Zeitraum von 1 und 6 Wochen mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄). Zur phänotypischen Charakterisierung der Leberschädigung und Wundheilung wurden Zellschaden, Regeneration und Fibrogenese der Leber mittels Quantifizierung von Apoptose (TUNEL), Proliferation (ki67) und Kollagengehalt (Siriusrot) ermittelt.

Die Proliferationsaktivität zeigte eine positive Korrelation mit der Expression des TGF β RII, während die Kollagenablagerung eine umgekehrte Tendenz zeigte. Hinsichtlich Apoptose konnte weder nach kurzzeitiger noch nach langzeitiger Schädigung ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mauslinien erfasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir also zeigen, dass die basale hepatische Genexpression des TGF β RII mit Unterschieden fibroserelevanter Phänotypen assoziiert ist. Das Expressionsniveau von TGF β RII spielt somit eine Rolle im Rahmen der initialen Zellschädigung und Wundheilung, allerdings zusammen mit weiteren modifizierenden Faktoren.

Weitere Studien am Modell der extrem exprimierenden Mauslinien könnten zur Klärung des Einflusses von Expressionsvariationen bei chronischer Leberschädigung beitragen. Zukünftig könnten durch die Erstellung eines individuellen genetischen Risikoprofils nicht nur das Risiko zur Progression abgeschätzt werden, sondern auch therapeutische oder präventive Strategien entwickelt werden.

Summary

Liver fibrosis is a complex wound healing response to chronic long-term damage of different etiology. Progression of fibrosis to cirrhosis is influenced by individual predisposing genetic factors. Increased susceptibility to complex disease is caused by combinations of multiple DNA sequence variants. However, due to complex regulatory and biochemical interactions, the impact of expression variation is less easy to determine than mere differences in DNA sequence. Therefore, innovative model systems are required to analyse the impact of natural gene expression variation on pathogenic phenotypes *in vivo*.

The aim of this study was to analyse the impact of hepatic expression levels of transforming growth factor beta receptor type 2 (TGFbRII) on various aspects of fibrogenesis *in vivo* using extremely high or low expressing mouse lines as a model. TGFbRII constitutes the limiting receptor in signal transduction of the central profibrogenic cytokine TGF-beta. We availed of BXD recombinant inbred mice generated from paternal strains C57BL/6J and DBA/2J and chose two lines with the greatest possible difference in the basal hepatic expression of TGFbRII. Line BXD13 displayed low, and line BXD24a high expression levels. To induce liver fibrosis, we damaged the livers of both lines with carbon tetrachloride (CCl₄) for 1 and 6 weeks, respectively. For phenotypic characterization of liver injury and wound healing, we measured cell damage, tissue repair and fibrogenesis by quantifying apoptosis (TUNEL), proliferation (ki67), and collagen deposition (Sirius Red).

Hepatocyte proliferation were positively correlated with TGFbRII expression levels, whereas collagen deposition showed a reverse trend. No differences between the two lines could be detected with regard to apoptosis after short-term or long-term injury. In this study we demarcated that different basal hepatic gene expression levels of TGFbRII are associated with subtle differences of various relevant phenotypes for tissue repair and fibrogenesis. Thus, the expression level of TGFbRII plays a role in the initial cell damage and wound healing, but in interaction with other modifying factors.

Further studies using extremely expressing mouse lines as a model will help to clarify the impact of expression variation during chronic liver damage. In the future the definition of individual genetic risk profiles might not only allow to assess the risk of progression, but also to identify new intervention targets and therapeutic strategies.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	I
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Leber	1
1.2 Leberfibrose: Epidemiologie und Klinik	3
1.3 Pathophysiologische Mechanismen der Leberfibrogenese	5
1.4 TGF- β – Funktionen und Signalübertragung	7
1.5 Funktion und Regulation des TGF β RII	9
1.6 Expressionsvariationen und deren Einfluss auf Krankheitsentwicklung	10
1.7 Mausmodell und Expressionsvariationen	12
1.7.1 Inzuchttiere	12
1.7.2 Mausmodell und Fibroseinduktion	13
1.7.3 Modell der extrem exprimierenden Mauslinien	14
1.8 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 BXD-Mäuse	17
2.1.1 Auswahl der Tiere	17
2.1.2 Tierhaltung	18
2.1.3 Fibroseinduktion durch CCl ₄	18
2.1.4 Organentnahme und Asservierung	19
2.2 Western Blot Analyse	19

2.2.1	Proteinisolierung	19
2.2.2	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	20
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.2.4	Western Blotting	22
2.2.5	Nachweis des TGFbRII durch monoklonale Antikörper	23
2.2.6	Quantifizierung der Banden	25
2.3	Färbungen	25
2.3.1	Anfertigungen der Schnitte	25
2.3.2	Silanisierung der Objektträger	25
2.3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer	26
2.3.4	Siriusrot-Färbung	27
2.3.5	Immunhistochemische Färbungen	29
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.4.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus der Leber	34
2.4.2	Synthese der cDNA	35
2.4.3	Kontrolle der cDNA-Synthese	36
2.4.4	Quantitative real-time PCR	38
2.5	Statistische Verfahren	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Expressionsanalysen	41
3.1.1	Genexpressionsanalyse des TGFbRII	41
3.1.2	Expression des TGFbRII auf Proteinebene	44
3.2	Korrelation von TGFbRII-Expression mit der Proliferationsaktivität	47
3.2.1	Etablierung von GIMP zur Quantifizierung der ki67-Färbung	47
3.2.2	Erhöhte Proliferationsaktivität bei Tieren mit hoher TGFbRII-Expression nach Kurzzeit-Schädigung durch CCl ₄	49
3.2.3	Veränderung der Proliferationsaktivität nach Langzeit-Schädigung mittels CCl ₄	51
3.3	Analyse des Kollagengehaltes nach Leberschädigung	55
3.3.1	Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung nach Kurzzeit-CCl ₄	55
3.3.2	Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung nach Langzeit-CCl ₄	56
3.4	Einfluss der Leberschädigung auf die Apoptose	59

3.4.1	Apoptose in der Leber nach Kurzzeit-CCl ₄	59
3.4.2	Apoptose in der Leber nach Langzeit-CCl ₄	62
4	Diskussion	65
4.1	Relative Genexpression des TGFbRII im Zusammenhang mit Leberfibrose . . .	66
4.2	Einfluss von TGFbRII-Genexpressionsvariationen auf phänotypische Merkmale der Leberfibrose	67
4.3	Modell der extrem exprimierenden Mauslinien	69
4.4	Ausblick	71
	Literaturverzeichnis	73
	Danksagung	87
	Lebenslauf	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
cDNA	complementary DNA
Cp	crossing point
CT	cycle threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholic acid Na-salt
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eQTL	expression quantitative locus
EZM	Extrazelluläre Matrix
GTC	Guanidinisothiocyanat
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HSC	Hepatische Sternzelle
kD	Kilodalton
mRNA	messenger Ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
rt-PCR	Real Time-PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS Buffered Saline
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethyl-Ethylendiamin
TGF-beta	Transforming growth factor beta
TGFbRII	Transforming growth factor beta receptor 2
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP- biotin nick end labeling

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Leber

Die Leber ist das größte Organ des Menschen und spielt durch ihre vielfältigen Funktionen die zentrale Rolle im Stoffwechsel. Neben der Aufgabe der Entgiftung wirkt die Leber durch ihre Synthese- und Metabolisierungsfunktion im Stoffwechsel der Proteine, Kohlenhydrate und Lipide mit und übernimmt die Synthese der primären Gallensäuren. Darüber hinaus sorgt die Leber für die Aufrechterhaltung des Hormon- und Vitaminhaushaltes und beteiligt sich an der Immunabwehr und der Säure-Basen-Regulation. Die spezifische anatomische Struktur der Leber bildet die Basis für die vielfältigen Funktionen. Die klassische anatomische Baueinheit der Leber bildet das Leberläppchen. Das polygonale Leberläppchen enthält in seinem Zentrum eine Zentralvene, die Ecken werden durch die Portalfelder gebildet, in denen Äste der V. portae, A. hepatica und des interlobulären Gallenganges (Glisson-Trias) liegen. Zudem beinhaltet das Leberläppchen die Hepatozyten, die radiär in Hepatozytenbalken angeordnet auf die Zentralvene zulaufen. Von den Portalfeldern aus erstrecken sich die Sinusoide, in denen das Blut aus der A. hepatica und V. portae in Richtung der Zentralvene fließt. Die Hepatozytenbalken werden durch die ebenfalls radiär verlaufenden Sinusoide getrennt [95]. Morphometrisch setzt sich das Leberläppchen vorwiegend aus Hepatozyten zusammen (78 %), die Nichthepatozyten nehmen einen Anteil von 6,3 % ein und der extrazelluläre Raum 16 %. Der Stoffaustausch zwischen den Hepatozyten und den Sinusoiden findet im zwischen den beiden Strukturen gelegenen Disse-Raum statt und wird durch die fehlende Basalmembran und das fenestrierte Endothel der Sinusoide erleichtert (siehe Abb. 1.1). Der Disse-Raum enthält zudem Komponenten der EZM. Die EZM setzt sich neben verschiedenen Kollagentypen zusammen aus Elastin, Glykosaminogly-

kanen (z.B. Hyaluron), Proteoglykanen und adhäsiven Glykoproteinen (z.B. Fibronectin) und übernimmt gemeinsam mit den Zellen wichtige Aufgaben zur Aufrechterhaltung der Gesamtfunktion der Leber.

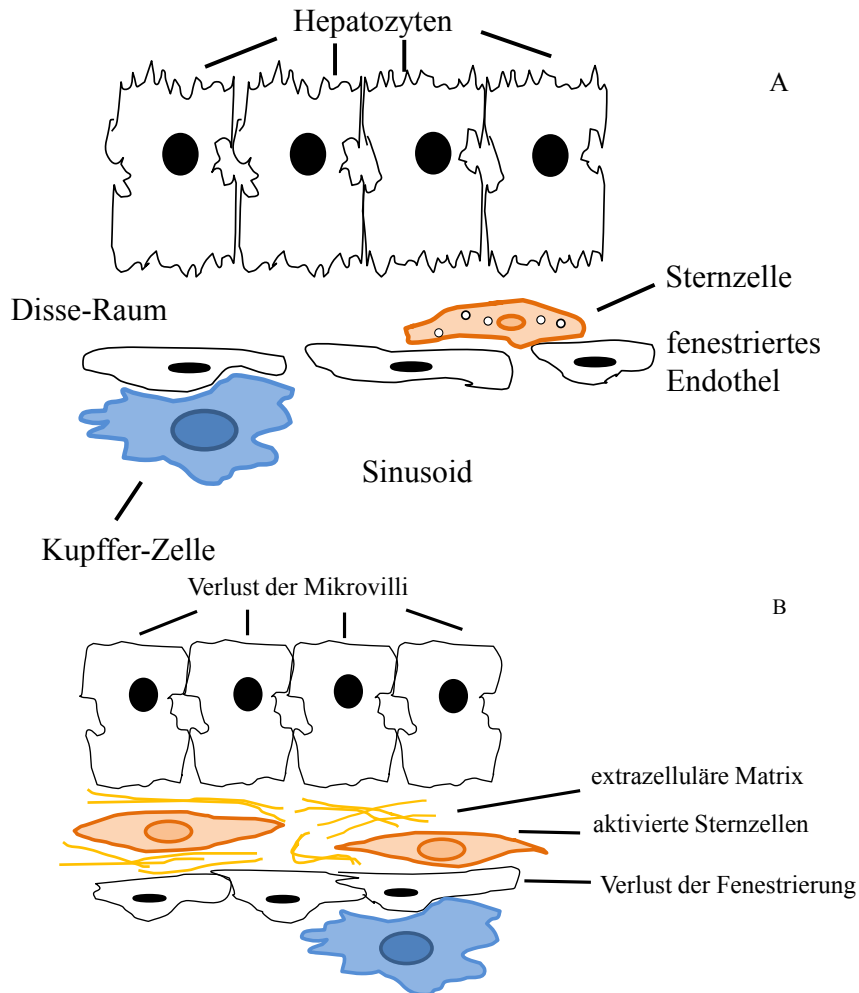


Abbildung 1.1: Pathogenese der Leberfibrose (nach Friedman [35]). Die Abbildung zeigt die Veränderungen der hepatischen Struktur einer normalen Leber (A) im Laufe einer fortschreitenden Fibrosierung (B). Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen durch chronische Schädigung der Leber führt zu Veränderungen der EZM. Der Verlust der Mikrovilli sowie die fehlende Fenestrierung bedingen eine zunehmende Verschlechterung des Stoffaustausches sowie einen portalen Druckanstieg.

Die Komponenten der EZM unterstützen die anatomische Struktur und fördern interzellulären Zusammenhalt und Kommunikation sowie die zelluläre Differenzierung [56]. Die Interaktion zwischen der EZM und der Zellen findet dabei über Integrin- und nicht-Integrin-Rezeptoren statt. Auf diesem Weg werden Adhäsion, Proliferation, Migration und das Überleben der Zellen durch die EZM beeinflusst. Andererseits kann auch die EZM durch die Zellen mittels Umbau

und Neubildung beeinflusst werden [111]. Synthetisiert wird die EZM hauptsächlich durch die ebenfalls im Disse-Raum lokalisierten Sternzellen, die zusätzlich der Speicherung von Vitamin A dienen und auch als Lipozyten oder Ito-Zellen bezeichnet werden. Ein weiterer wichtiger Zelltyp der Leber sind die Kupffer-Zellen, die sich wandständig in den Sinusoiden finden und leberspezifische Makrophagen darstellen. Zusätzlich finden sich im sinusoidalen Lumen die so genannten Pit-Zellen, leberassoziierte Lymphozyten mit Kontakt zu den Endothel- und Kupffer-Zellen, die natürlichen Killerzellen entsprechen [56].

1.2 Leberfibrose: Epidemiologie und Klinik

Fibrose ist eine Antwort der Leber auf chronische Schädigung und stellt einen dynamischen Prozess dar, bei dem es zu einer vermehrten Ablagerung von in ihrer Zusammensetzung veränderter extrazellulärer Matrix (EZM), mit starker Zunahme der Kollagen-Typen I und III kommt [95]. Die Läppchenstruktur der Leber sowie die Gefäßversorgung bleiben dabei erhalten. Die Leberfibrose kann in eine irreversible Leberzirrhose übergehen, allerdings ist der Übergang nicht obligat. Im Stadium der Leberzirrhose werden zusätzlich zur diffusen Vernarbung die Läppchenstruktur der Leber und die Gefäßversorgung zerstört, und es kommt zur Ausbildung von Leberzellnekrosen und Regeneratknoten unterschiedlicher Größe. Die Regeneratknoten können dabei morphologisch mikronodulär (< 3 mm), makronodulär (3 mm – 3 cm) oder in einer gemischtknotigen Form vorliegen. Die Hauptursachen für Leberfibrose und Leberzirrhose in den Industrieländern sind Alkoholabusus und chronische Infektionen der Leber, v.a. durch das Hepatitis C-Virus. Als weitere Ursachen kommen Autoimmunhepatitis, chronische Cholestase bei primärer biliärer Zirrhose und primär sklerosierender Cholangitis, medikamenteninduzierte Leberschäden, sowie genetische Stoffwechselerkrankungen wie Hämochromatose, Morbus Wilson, α 1-Antitrypsinmangel und Mukoviszidose infrage [11]. In letzter Zeit rückt die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) als eine zunehmende Ursache für Leberfibrose und -zirrhose in den Vordergrund. NASH stellt die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms, bestehend aus Adipositas, Glukosetoleranzstörung, arterieller Hypertonie und Hyperlipidämie, dar und wird vermutlich aufgrund der steigenden Prävalenz der Adipositas weiter zunehmen [10, 19].

Klinisch kann sich eine Leberzirrhose durch uncharakteristische Allgemeinbeschwerden wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit, aber auch durch hormonelle Störungen und Zeichen der Dekompensation bei zunehmender Leberinsuffizienz äußern. Eine Dekompensation der Leber tritt

ein, wenn im Rahmen der fortschreitenden Zirrhose die Aufgaben der Leber hinsichtlich Syntheseleistung, Entgiftung und Exkretionsfunktion nicht mehr ausreichend bewerkstelligt werden können. Die Komplikationen als Zeichen der Dekompensation umfassen Aszites, Niereninsuffizienz, hepatische Enzephalopathie, Varizenblutung, Malnutrition und Ikterus. Zudem stellt die Leberzirrhose einen Risikofaktor für die Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms dar. Die Inzidenz zur Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms auf dem Boden einer Leberzirrhose beträgt 1 % – 6 % pro Jahr [62, 110].

Die Inzidenz der Leberzirrhose liegt in Europa und den USA bei 250/100 000 Einwohner/Jahr. Bei Männern kommt die Leberzirrhose doppelt so häufig vor wie bei Frauen. Zur Inzidenz und Prävalenz der Leberfibrose liegen keine Daten vor, da diese klinisch meist inapparent verläuft und damit häufig erst bei Erreichen der Leberzirrhose mit Auftreten klinischer Komplikationen diagnostiziert wird. Da jedoch auch eine Leberzirrhose im kompensierten Stadium unentdeckt bleiben kann, gehen Schätzungen davon aus, dass bei mehr als 1 % der Bevölkerung auf histologischer Ebene eine Leberzirrhose nachweisbar ist [91]. Die Leberzirrhose geht in den meisten Fällen mit einer geringen Lebenserwartung einher und stellt eine der Haupttodesursachen dar. In den USA steht die Leberzirrhose an 12. Stelle der Todesursachen (9,5/100 000 Personen) [44]. Im Jahre 2011 starben in Deutschland 15 174 Menschen an den Folgen von Erkrankungen der Leber, darunter 8459 Menschen aufgrund einer alkoholischen Leberkrankheit und 5614 Menschen durch Fibrose bzw. Zirrhose. Bei Männern im Alter zwischen 40–50 Jahren stellt die alkoholische Leberkrankheit sogar die zweithäufigste krankheitsbedingte Todesursache dar [1]. Insgesamt muss jedoch von einer höheren Anzahl an Todesfällen durch chronische Lebererkrankungen wie der Leberzirrhose ausgegangen werden, da viele Patienten häufig nicht an der Leberzirrhose an sich versterben, sondern an den resultierenden Komplikationen und daher nicht in der Statistik für chronische Lebererkrankungen aufgeführt werden [2].

Eine Progression zur Leberzirrhose tritt bei den meisten Patienten nach einer Zeitspanne von 15–20 Jahren auf [10]. Dabei kann der Verlauf der Leberfibrose zwischen Individuen stark variieren, was neben exogenen Einflüssen (Alkoholabusus, Viruslast), Alter und Geschlecht auch genetischen Risikofaktoren zugeschrieben wird [49]. Die Leberfibrose gilt als multifaktorielle Erkrankung, die in ihrem Verlauf und Ausmaß durch die Interaktion zahlreicher Gene und exogener Faktoren bestimmt wird. In den letzten Jahren konnten durch Assoziationsstudien zahlreiche Genpolymorphismen und Kandidatengene identifiziert werden, die zur Fibroseprogression beitragen. Dabei zeigten sich vor allem Polymorphismen von Genen der Immunregulation, der proinflammatorischen Zytokine und fibrogenen Faktoren für die Auswirkung auf den

Krankheitsverlauf verantwortlich [12]. Dabei konnte unter anderem ein Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) und Angiotensinogen und der Fibroseentwicklung bei Patienten mit chronischer Hepatitis C gefunden werden [43, 77, 114]. Ein weiteres Kandidatengen, das Einfluss auf die Progression einer Leberfibrose nimmt, stellt das Gen für den Komplementfaktor 5 (C5) dar [50]. Als Bestandteil des Immunsystems greift C5 über Rezeptoren in die Zellreaktionen der Sternzelle im Rahmen der Entzündungsreaktion ein und regt auf diesem Weg die Sternzellen zur Produktion von extrazellulärer Matrix an.

1.3 Pathophysiologische Mechanismen der Leberfibrogenese

Die Leberfibrose kann als reversible Wundheilungsreaktion der Leber auf chronische Schädigung verstanden werden, die mit einem fortschreitenden Ersatz des Leberparenchyms durch bindegewebiges Narbengewebe einhergeht. Die Schädigung der Hepatozyten führt über Mobilisierung von Entzündungszellen und Ausschüttung zahlreicher Mediatoren zur Aktivierung der hepatischen Sternzellen (HSC), den Effektorzellen der Fibrogenese, und damit zur überschießenden Produktion und Ablagerung von EZM. Die EZM unterliegt dabei sowohl quantitativen als auch qualitativen Veränderungen. In fortgeschrittenen Stadien der Fibrose kann die Menge der EZM auf das 6-fache einer normalen Leber ansteigen [13]. Die qualitativen Veränderungen der EZM im Disse-Raum umfassen in den frühen Stadien der Erkrankung eine Anhäufung der Kollagene Typ III und V sowie des Glykoproteins Fibronectin [21]. Im weiteren Verlauf findet sich neben der deutlichen Zunahme von Kollagen Typ I und IV eine vermehrte Ablagerung von Undulin, Elastin, Laminin und Hyaluron [45, 90]. Insgesamt resultiert die exzessive Zunahme der EZM jedoch nicht nur aus einer übermäßigen Produktion, sondern ebenfalls aus einem verminderten Abbau in Folge der Induktion von Inhibitoren der Matrix-abbauenden Proteine [6]. Im Rahmen der Umbauvorgänge der EZM im Disse-Raum kommt es zudem zum Verlust der Fenestrierung der Endothelzellen der Sinusoide („Kapillarisation“). Diese Veränderungen sind verantwortlich für eine zunehmende Störung des Stoffaustausches der Leber sowie für einen portalen Druckanstieg.

Als Schlüsselereignis im Rahmen der Leberfibrogenese gilt die Aktivierung der hepatischen Sternzellen, die sich zu Myofibroblasten umwandeln und EZM-Komponenten synthetisieren [10]. Die Aktivierung der HSC erfolgt durch zahlreiche parakrine und autokrine Faktoren und kann in die Phasen der Initiation und der Perpetuierung eingeteilt werden (Abb. 1.2). An der

Initiation sind geschädigte benachbarte Zellen wie Hepatozyten und Endothelzellen, aber auch infiltrierende Lymphozyten, Kupffer-Zellen und die in ihrer Zusammensetzung veränderte EZM beteiligt, die über parakrine Stimulation eine Größenzunahme der Sternzellen sowie eine erhöhte Expression von Oberflächenrezeptoren für Zytokine und andere Wachstumsfaktoren bewirken. Eine besondere parakrine Wirkung auf ruhende Sternzellen geht dabei von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus, die vorwiegend durch Hepatozyten und Kupffer-Zellen gebildet werden [96, 109]. Neben der Förderung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine tragen ROS ebenfalls zur Entzündungsreaktion bei [82].

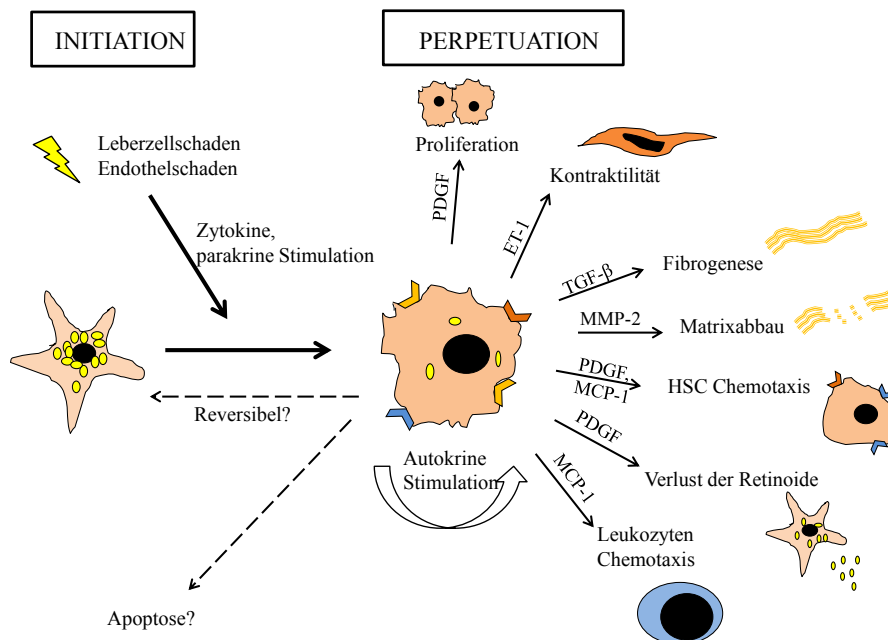


Abbildung 1.2: Phänotypische Eigenschaften der Sternzellaktivierung (nach Friedman [35]). Die chronische Schädigung der Leber führt über parakrine Stimulation zur Transformation der ruhenden, Vitamin A speichernden Sternzellen zu proliferativen, fibrogenen und kontraktiven Myofibroblasten. Die resultierenden Phänotyp-Veränderungen umfassen neben der Fibrogenese eine erhöhte Proliferation, Kontraktilität, Chemotaxis, Matrixdegradation sowie den Verlust der Retinoide. Die Aktivierung der Sternzellen wird ausgelöst und unterhalten durch ein komplexes Zusammenspiel von zahlreichen Zytokinen (PDGF = Plättchen-Wachstumsfaktor; ET-1 = Endothelin-1; TGF- β = transformierender Wachstumsfaktor; MMP-2 = Matrix-Metalloproteinase-2; MCP-1 = Monozyten chemotaktisches Protein) und Zellen (Hepatozyten, Endothelzellen, Kupffer-Zellen, Lymphozyten, HSC). Das Schicksal der HSC bleibt unklar, sie könnte der Apoptose unterliegen und/oder in ihren ursprünglich ruhenden Zustand zurückkehren.

In der Phase der Perpetuierung steht die Stimulation der HSC auf autokrinem Wege im Vordergrund. Auf diesem Weg werden weitere ruhende Sternzellen, die sich in der Nähe befinden, rekrutiert und somit der Prozess der Fibrogenese weiter gefördert. Die phänotypischen Eigenschaften, die eine aktivierte Sternzelle im Laufe ihrer Aktivierung erwirbt umfassen den Verlust der Retinoid-haltigen Vakuolen, Proliferation, Chemotaxis, Matrixdegradation, Fibrogenese und Kontraktilität [35]. Zu den wichtigsten Zytokinen, die an der Sternzellaktivierung beteiligt sind, gehören Transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$), Tumornekrosefaktor-alpha ($TNF-\alpha$), Platelet derived growth factor (PDGF) und Endothelin-1 sowie Insulin like growth factor-1 (IGF-1) [82]. $TGF-\beta$ gilt unter den Zytokinen als stärkstes profibrogenes Zytokin, das neben der Hochregulierung von Kollagen Typ I, II und IV, Fibronectin und Laminin die Transformation der Sternzelle zum Myofibroblasten bedingt [7]. Neben den zahlreichen Zytokinen, die zur Aktivierung der Sternzellen und damit zur Fibrogenese beitragen, existieren parallel dazu inhibitorische Zytokine mit antifibrotischen Wirkungen. Dazu gehören u.a. Interferone und Interleukine (IL-1 und IL-10), die inhibitorischen Einfluss auf die Matrixsynthese ausüben [82] sowie die von HSC sezernierten Matrix-Metalloproteasen (MMP-2 und MMP-9), die den Kollagenabbau fördern [36].

Obwohl die pathophysiologischen Vorgänge während der Leberfibrose mittlerweile gut verstanden werden, bleibt bis heute das Schicksal der aktivierten Sternzellen im Falle einer Leberregeneration weiter unklar. Die aktivierten Sternzellen könnten zum einen der Apoptose unterliegen oder in ihren ursprünglichen, ruhenden Zustand zurückkehren [34].

1.4 $TGF-\beta$ – Funktionen und Signalübertragung

Transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$) ist ein multifunktionales Zytokin, das einer großen Familie von mehr als 30 Proteinen angehört. Diese Familie beinhaltet neben den drei Isoformen von $TGF-\beta$ ($TGF-\beta_1$, $-\beta_2$, $-\beta_3$), Aktivine und knochenmorphogenetische Proteine (Bone morphogenetic proteins, BMP). Die Bedeutung dieser Zytokine spiegelt sich in der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wider, die Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Apoptose und Produktion von EZM umfassen [16, 18]. Im Verlauf der Karzinogenese kann $TGF-\beta$ nicht nur als Tumorsuppressor sondern auch als Tumorpromotor wirken, abhängig vom Zelltyp und vom Stadium der Karzinogenese [15]. Im Rahmen der Wundheilungsreaktion der Leber als Folge chronischer Schädigung nimmt $TGF-\beta$ eine zentrale Rolle als profibrogenes Zytokin ein [46], was sowohl in experimentellen [57] als auch in klinischen Studien [22] nach-

gewiesen werden konnte. Insbesondere konnte die zentrale Rolle von TGF- β in Experimenten mit transgenen Mäusen belegt werden. Die Überexpression des TGF- β 1 führte in diesen Tieren zu einer pathologischen Matrixakkumulation mit Entwicklung einer Fibrose der Leber, Niere und des Fettgewebes [26].

Die Signalübermittlung von TGF- β erfolgt über zwei transmembranäre Serin/Threonin-Kinasen, Rezeptor Typ I (TGFbRI, 50–55 kD) und Rezeptor Typ II (TGFbRII, 65–75 kD), die beide als Homodimere an der Zelloberfläche vorliegen. Neben dem TGFbRI und TGFbRII existiert ein weiterer Rezeptor, Typ III, dessen Funktion in der Bindung und der Präsentation des Liganden bestehen und der nicht direkt an der Signalübermittlung teilnimmt [85].

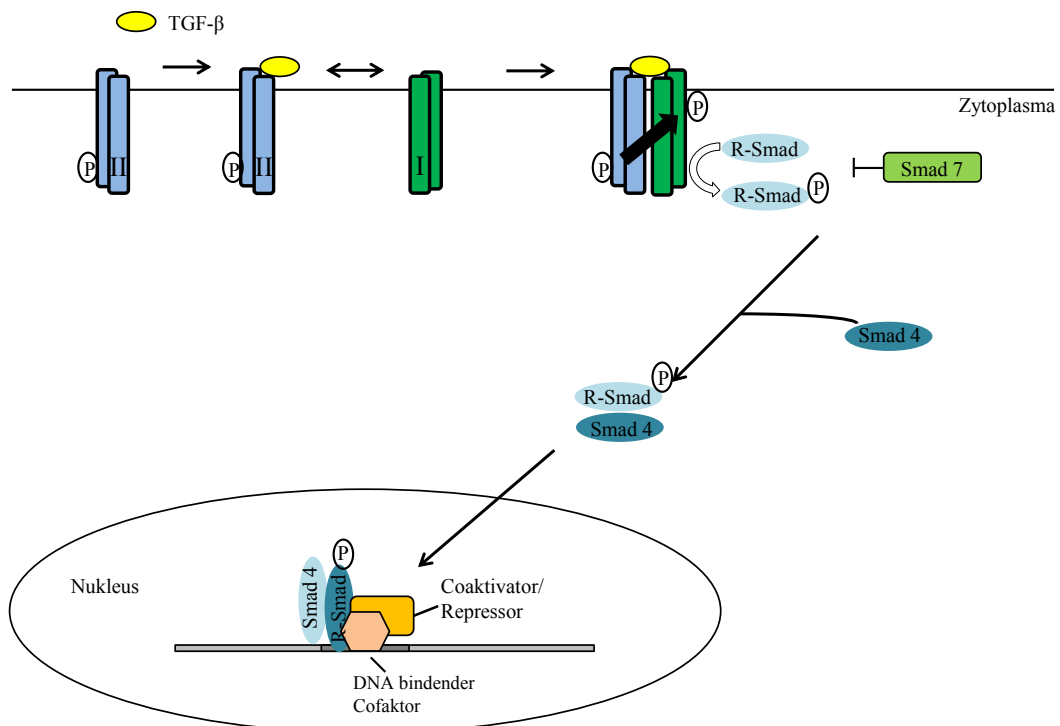


Abbildung 1.3: Signalübertragung von TGF- β (modifiziert nach [31, 112]). Nach Bindung von TGF- β an den TGFbRII an der Zelloberfläche kommt es zur Rekrutierung des TGFbRI und dessen Aktivierung durch Phosphorylierung der GS-Domäne durch die Serin/Threonin-Kinase des TGFbRII. Dadurch wird TGFbRI die Phosphorylierung der Signal-übertragenden R-Smad-Proteine ermöglicht, die nach Komplexbildung mit Smad 4 in den Nukleus translozieren und die Transkription der Zielgene, mit Hilfe von DNA bindenden Cofaktoren sowie Coaktivatoren bzw. Repressoren regulieren. Die Aktivierung der R-Smads durch den TGFbRI wird durch Smad 7 inhibiert.

Die Bindung von TGF- β an den extrazellulären Teils des TGFbRII führt über Aktivierung einer Serin/Threonin-Kinase zur Rekrutierung und Aktivierung des TGFbRI über Phosphorylie-

rung seiner GS-Domäne. Die GS-Domäne stellt eine Region der Typ I Rezeptoren dar, welche reich an Glycin- und Serin-Resten ist. Der TGFbRI leitet das Signal über Phosphorylierung von Smad-Proteinen (R-Smads) weiter, die nach Komplexbildung mit einem weiteren Smad-Protein (Smad 4) in den Zellkern translozieren, um dort die zelluläre Funktion über Transkription der Zielgene zu regulieren [93]. Für die Regulierung der Transkription der Zielgene sind zusätzlich DNA-bindende Cofaktoren und Coaktivatoren bzw. Repressoren notwendig. Zudem führt die TGF- β Signalgebung zur vermehrten Expression eines weiteren Smad-Proteins, Smad 7, das zu den inhibitorischen Smad-Proteinen zählt und über Interaktion mit dem TGFbRI zur Inhibierung der Phosphorylierung weiterer R-Smads führt, wodurch eine überschießende Reaktion von TGF- β im Sinne einer negativen Rückkopplung verhindert wird [18] (Abbildung 1.3).

Die durch TGF- β beeinflussten zellulären Prozesse sind abhängig von Zelltyp und Gewebe sowie dem Differenzierungsgrad und Rezeptorstatus der Zelle [69]. Diese vielfältigen, teilweise gegensätzlichen Signale werden durch die Interaktion zwischen den verschiedenen Typ I- und Typ II-Rezeptoren und Smad-Proteinen ermöglicht, zudem sorgen sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren für eine Kontext-abhängige Regulation der Transkription der Zielgene [31, 67]. Nach Rojas et al. [83] stellt die Regulation der Expressionslevel von TGFbRII einen zusätzlichen Mechanismus dar, der zur spezifischen Wirkung von TGF- β auf Zellen beiträgt. Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Signalgebung könnte in der Änderung des Verhältnisses zwischen TGFbRI und TGFbRII liegen [85].

1.5 Funktion und Regulation des TGFbRII

Der TGFbRII gilt als limitierender Faktor der TGF- β Signalübertragung und besitzt eine zentrale Bedeutung im Rahmen des pathologischen Prozesses der Fibrosierung [37]. Die Bindung eines Liganden mit nachfolgender Signalübertragung ist ohne Anwesenheit des TGFbRII nicht möglich. Dennoch sind für die Signalübertragung beide Komponenten des Komplexes aus TGFbRI und TGFbRII notwendig [59, 112]. In einigen Arbeiten konnte bisher gezeigt werden, dass der TGFbRII im Rahmen chronischer Leberschädigungen Änderungen in seiner Expression aufweist. Die Studie von Roulot et al. [85] zeigte eine Abnahme der Expression des TGFbRII sowohl bei Patienten mit chronischer Hepatitis C als auch in einem Tiermodell der hepatischen Fibrosierung, die gleichzeitig mit einer Zunahme der Expression des TGFbRI einherging. Die reduzierte Expression des TGFbRII führte zu einer Abschwächung der antiproliferativen Wirkung von TGF- β , während die profibrogene Wirkung durch die Abnahme der Expression nicht

beeinflusst wurde. Daten von Chen et al. [25] zeigten hingegen eine Zunahme der Expression des TGFbRII in HSC durch Acetaldehyd, den Hauptmetaboliten von Alkohol. Durch gezielte Genmodifikation mit Knockdown der TGFbRII-Expression in kultivierten Sternzellen konnte *in vitro* eine Inhibition sowohl der Aktivierung als auch der Proliferation der HSC erreicht werden. Zusätzlich zeigte sich dabei eine Abnahme der Synthese fibrogener Komponenten der EZM (Kollagen Typ I, III und IV, Hyaluronsäure) [37]. Die Hemmung der TGFbRII-Funktion durch dominant-negative TGFbRII [79] oder lösliche TGF- β -Rezeptoren [42] führte in weiteren Studien zu einer verminderten Fibroseprogression.

1.6 Expressionsvariationen und deren Einfluss auf Krankheitsentwicklung

Genexpression stellt die dynamische Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp dar und ist ein wichtiger Grund für die erhebliche Vielfalt individueller Phänotypen, bedingt durch die natürliche Variation innerhalb der DNA-Sequenz. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms durch das Humangenomprojekt führte zu der Erkenntnis, dass die Anzahl der kodierenden Gene weitaus geringer ist als früher angenommen wurde, während erhebliche Variationen in der Genexpression innerhalb und zwischen verschiedenen Spezies bestehen [107]. Für die Regulation der Genexpression existieren regulatorische Sequenzen, die das Gen flankieren und ebenfalls einer Variation unterliegen. Diese funktionellen Varianten können Zell-spezifisch der Genexpression zugrunde liegen. Die Komplexität dieser Zell-spezifischen Regulation der Transkription spielt dabei hinsichtlich der Komplexität und Variabilität biologischer Systeme eine wichtige Rolle [32]. Genetische Variationen und die resultierenden Unterschiede in der Transkription der Gene werden als zentraler Motor für Entwicklung und Individualität angesehen, spielen aber auch als Ursache für Krankheiten bzw. für deren Prädisposition eine große Rolle. Änderungen der Regulation der Expression von TGF- β -Rezeptoren können weitreichende Konsequenzen mit sich bringen. Die allelspezifische Expression eines Allels des TGFbRI resultiert in einem geringeren Expressionslevel des Gens mit einer entsprechend reduzierten TGF- β -Signalübertragung. Diese Reduktion des Expressionslevel konnte mit einem erhöhten Risiko für ein kolorektales Karzinom assoziiert werden [106].

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Fortschritte bezüglich der Identifizierung genetischer Variationen, die Einfluss auf die Entstehung oder Progression von multifaktoriellen Krankheiten

haben, erzielt werden. Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) ist es möglich geworden, Assoziationen zwischen genetischen Variationen und komplexen Erkrankungen zu finden. Die Genotypisierung mehrerer 100 000 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im gesamten Genom von Patienten und gesunden Individuen und der Vergleich der Häufigkeiten der Genotypen zwischen den Gruppen dient der Identifizierung von genetischen Risikofaktoren [58]. Dadurch konnten bisher genetische Varianten mit verschiedenen Lebererkrankungen in Verbindung gebracht werden, darunter NASH [84], Leberfibrose [53] und Gallensteinleiden [20].

Polymorphismen der DNA-Sequenz können vielfältige Auswirkungen auf die Entstehung multifaktorieller Erkrankungen haben. Die Änderung der Proteinfunktion kann dabei eine wichtige Rolle spielen, wie beispielsweise durch Nachweis von PNPLA3-Mutationen im Rahmen der Fettlebererkrankung gezeigt wurde [99]. Zudem können Polymorphismen der DNA-Sequenz zu Modifikationen regulatorischer Elemente führen, die mit einer Änderung der Genexpression einhergehen. Die Assoziation von Phänotypen mit Variationen des Expressionslevel von Genen konnte bisher in humanen Zelllinien [29] und in experimentellen Populationen nachgewiesen werden [9]. Zwischen den DNA-Sequenzvariationen und der Ausprägung des Phänotyps [74] kann die Genexpression als intermediärer Phänotyp angesehen werden. In eQTL (expression quantitative trait locus)-Studien werden die Genexpressionslevel als quantitative Merkmale bezeichnet und durch gleichzeitige Genotypisierung und Messung der globalen Genexpression Genloci identifiziert, die zur Variation der Genexpressionslevel beitragen [88]. Die resultierenden eQTL-Kartierungen dienen der Identifizierung von SNPs, deren Effekt auf die Genexpression an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt ist. Sobald durch GWAS der Nachweis einer Assoziation zwischen genetischen Markern und Krankheiten erbracht wird, kann im nächsten Schritt mit Daten von genomweiten eQTL-Kartierungen überprüft werden, ob dieselben genetischen Marker mit der Expression von Genen assoziiert sind.

Im Hinblick auf die Grenzen der GWAS und eQTL-Kartierungen ist es notwendig, alternative Methoden zu finden, die Auswirkungen der Genexpression auf die Pathogenese von Krankheiten *in vivo* untersuchen und zu einem verbesserten Verständnis von Krankheiten beitragen können [74]. Als Grundlage hierfür steht die Datenbank *GeneNetwork* (www.genenetwork.org) zur Verfügung, die der Verknüpfung von Datensätzen zur Analyse von komplexen Netzwerken von Genen, Molekülen, Genfunktionen und Phänotypen dient. Von Gatti et al. [39] findet man dort die Expressionsdaten von mehreren Tausend Transkripten der Leber aus 37 rekombinanten Inzuchtmauslinien. Diese können genutzt werden, Linien mit Unterschieden im mRNA-Level in einem bestimmten Gen aufzufinden und diese Tiere hinsichtlich eines phänotypischen Merk-

mals zu untersuchen, um die Rolle dieses Gens hinsichtlich des untersuchten Phänotyps zu analysieren.

1.7 Mausmodell und Expressionsvariationen

1.7.1 Inzuchttiere

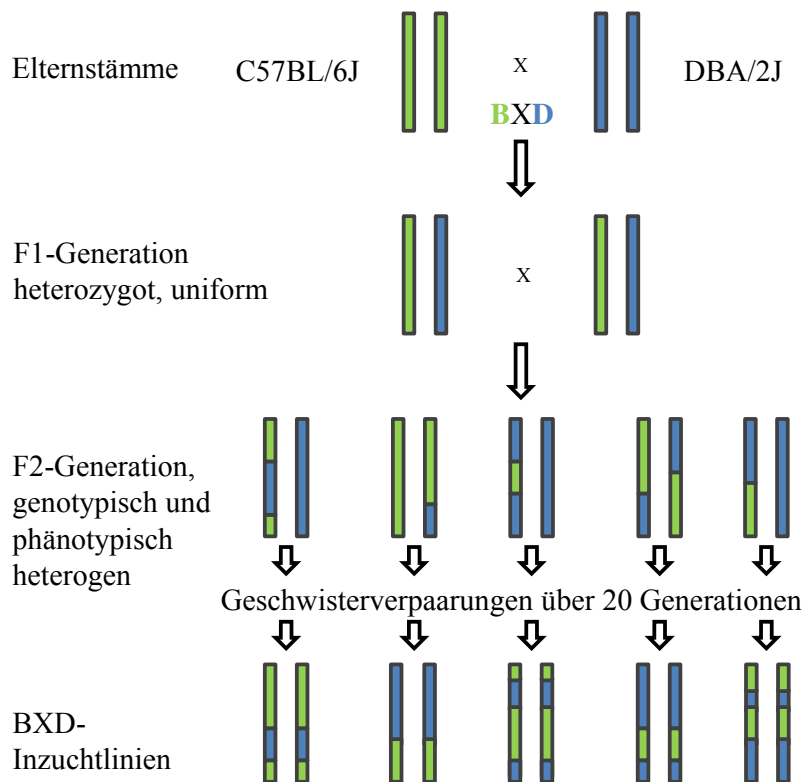


Abbildung 1.4: Kreuzungsschema der BXD-Mäuse.

Die Elternstämme C57BL/6J und DBA/2J sind für jedes Allel homozygot, d.h. beide Allele eines bestimmten Merkmals sind identisch. Die Nachkommen aus der F1-Generation sind heterozygot, da sie von einem Gen jeweils ein maternales und ein paternales Allel tragen. In der F2-Generation sind die Nachkommen sowohl genotypisch als auch phänotypisch heterogen. Nach weiteren 20 Geschwisterverpaarungen der F2-Generation entsteht die genetische Referenzpopulation der rekombinanten Inzuchtstämme, die an allen Stellen des Genoms homozygot sind.

Inzuchtmauslinien entstehen durch die Paarung zweier Elternstämme, die sich durch vorausgegangene Inzucht in allen Allelen homozygot darstellen. Im Fall der BXD-Tiere werden die beiden Elternstämme C57BL/6J (B) und DBA/2J (D) miteinander gepaart. Die daraus entstehende F1-Generation ist für alle Allele entsprechend dem ersten Mendelschen Gesetz heterozygot

und uniform. Unterschiede zwischen den Allelen der Elternstämme kommen hier noch nicht zum Tragen. Durch weitere Kreuzungen der Geschwistertiere aus der F1-Generation entsteht nun in der F2-Generation durch Rekombinationen in der Meiose eine Vielzahl an heterogenen Tieren, die sich sowohl phänotypisch als auch genotypisch voneinander unterscheiden. Die Geschwister der F2-Generationen werden nun über weitere 20 Generationen untereinander gepaart, so dass die einzelnen Linien der rekombinanten BXD-Inzuchtmäuse aus ihnen entstehen und die Mosaikverteilung genetisch fixiert wird. Die einzelnen BXD-Linien sind in annähernd allen Stellen des Genoms homozygot und tragen in homozygoter Ausprägung unterschiedliche Chromosomenabschnitte der beiden Elternstämme (Abb. 1.4) [30, 39]. Durch die zufällige Neuverteilung aller Genabschnitte und die daraus resultierende zufällige Kombination genregulierender Elemente und ihrer genetischen Varianten ergibt sich die in der Regel beobachtete Normalverteilung der Expressionswerte komplex regulierter Gene.

1.7.2 Mausmodell und Fibroseinduktion

Eine Möglichkeit zur Analyse des Einflusses von Expressionsvariationen auf die Entstehung oder Progression von Erkrankungen stellt das Modell der extrem exprimierenden Mauslinien dar. Zahlreiche Erkenntnisse hinsichtlich der genetischen, molekularen und pathophysiologischen Aspekte der Leberfibrose konnten in Mausmodellen gewonnen werden [48, 49]. Für die Fibroseinduktion bei der Maus stehen heute zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung [104]. Dabei ist vor allem die Fibroseinduktion durch CCl_4 weit verbreitet und gilt bezüglich der histologischen, biochemischen, zellulären sowie molekularen Veränderungen, die mit der Entwicklung der Fibrose einhergehen als das am besten charakterisierte Modell der Fibroseinduktion. Die Verabreichung von CCl_4 erfolgt üblicherweise intraperitoneal, kann aber auch auf inhalativem oder oralem Weg erfolgen [28].

In Studien der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass CCl_4 induzierte Leberschädigung in verschiedenen Inzuchtmausstämmen, die denselben Umweltbedingungen unterliegen, zu Unterschieden im Ausmaß der Entwicklung der Leberfibrose führt [49, 94].

CCl_4 ist ein Halogenmethan mit hepatotoxischer Wirkung, das bereits in vielen Arbeiten zur Induktion von Fibrose und Karzinogenese verwendet wurde [38, 108]. Die hepatotoxische Wirkung ist auf die Dehalogenierung von CCl_4 durch Metabolismus im Cytochrom-P450-System im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Leber zurückzuführen. Dieser Metabolismus ruft über die Bildung von Trichlormethylradikal (CCl_3) eine Kaskade sekundärer Mechanismen her-

vor mit oxidativer Zerstörung von Lipidmembranen und einem deutlichen Anstieg der Calcium-Konzentration in der Zelle, die letztendlich zum Zelltod führen [81]. Zudem kommt es, vermutlich über den Anstieg des Calciums in der Zelle, zur Aktivierung von Kupffer-Zellen [64]. Durch Ausschüttung von Zytokinen, wie TGF-beta, IL-10, TNF-alpha und Eikosanoiden werden pro-inflammatorische und fibrotische Schädigungen ausgelöst, die durch eingewanderte Neutrophile Granulozyten verstärkt werden [33].

1.7.3 Modell der extrem exprimierenden Mauslinien

Durch Anwendung des Modells der extrem exprimierenden Mauslinien ist es möglich, die Auswirkungen von Expressionsvariationen von in Studien ermittelten Kandidatengenen auf Krankheiten zu analysieren. Dieses Modell ermöglicht es, unter Berücksichtigung der natürlichen Vielfalt der Genregulation die Assoziation von Expression und phänotypischen Veränderungen in einer *in vivo* Situation zu untersuchen. Damit unterscheidet sich das Modell von Knockout- oder transgenen Mausmodellen. Diese Modelle dienen traditionell als Krankheitsmodelle, die zur Aufklärung von Genfunktionen dienen, in dem durch genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen, die in die Keimbahn eingeschleust werden, Gene gezielt inaktiviert oder überexprimiert werden. Damit wird *in vivo* ein Einblick in die Rolle der untersuchten Gene im Hinblick auf den Ablauf von pathologischen Prozessen ermöglicht. In der genetischen Manipulation liegen allerdings auch die Nachteile dieser Modelle, da sie einen tiefgreifenden Eingriff in die zelluläre Regulation darstellen. Somit können diese Modelle dem Einfluss einer subtilen Regulation, wie sie in der normalen Zelle vorliegt, nicht gerecht werden. Demgegenüber stellt das Modell der extrem exprimierenden Mauslinien ein physiologischeres Modell der Genfunktion dar, wenngleich es dadurch auch mit einer höheren Komplexität verbunden ist.

Für das Modell der extrem exprimierenden Mauslinien kommen Inzuchtmausstämme zum Einsatz. Diese Tiere bieten den Vorteil, in nahezu allen Abschnitten des Genoms homozygot zu sein, wodurch ihr Genotyp reproduzierbar ist und die individuelle genetische Variation minimiert wird [30]. Die zufällige Neuverteilung aller Genabschnitte, insbesondere der genregulierenden Elemente, bedingt eine Normalverteilung der Expressionswerte von Genen. Diese natürlichen Variationen der Regulation in den BXD-Mäusen sind gut überlebensfähig und zeigen unter Normalbedingungen keine wesentlichen phänotypischen Unterschiede, vergleichbar mit unterschiedlich regulierten Genen bei gesunden Menschen. Auch die Expressionslevel von menschlichen Genen unterliegen gewöhnlich einer Normalverteilung [71, 101], wobei beide

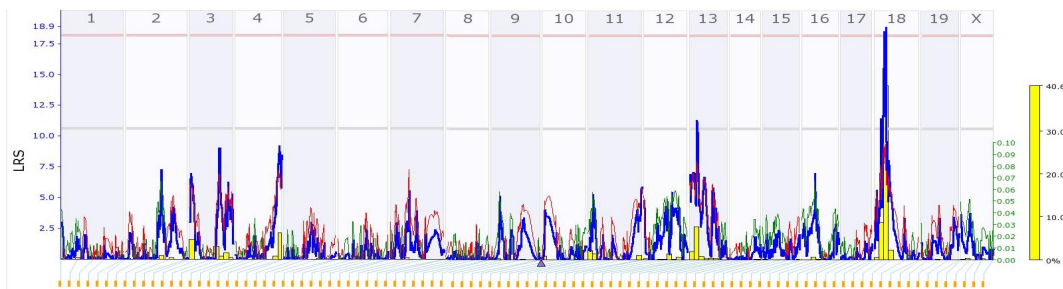


Abbildung 1.5: Kopplungsanalyse der Expression von TGFbRII in der Leber von normalen Mäusen (www.genenetwork.org). Die x-Achse zeigt das komplette Mausgenom, sortiert nach Chromosomen (Chromosom 1-19 und X-Chromosom), die y-Achse den LRS (likelihood ratio statistics), ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter genetischer Marker für den Unterschied im untersuchten Phänotyp verantwortlich ist. Der graue Pfeil markiert die genetische Lokalisation des TGFbRII auf Chromosom 9. Der hohe LRS auf Chromosom 18 signalisiert eine Kontrolle der Genexpression des TGFbRII durch einen Genlokus auf Chromosom 18.

extremen Enden potenziell relevante Faktoren hinsichtlich der Ausprägung bestimmter Phänotypen darstellen können. Inwieweit diese extremen Genexpressionen Auswirkungen auf die Entstehung oder Progression von Krankheiten haben, soll mit dem Modell der extrem exprimierenden Mauslinien untersucht werden. Dabei werden Mauslinien, die einen größtmöglichen Unterschied in der Expression eines Gens aufweisen, hinsichtlich der Auswirkung auf einen bestimmten Phänotyp verglichen. Die Kombination der Daten, die durch dieses Modell gewonnen werden können, mit Daten aus eQTL-Studien kann genutzt werden, um ein besseres Verständnis der Zusammenhänge von Genotypen und Phänotypen bei Krankheiten zu erhalten.

Der TGFbRII ist ein Beispiel für ein Gen mit unterschiedlicher Expression in Lebern von BXD-Mäusen. Das Gen ist lokalisiert auf dem Chromosom 9 und in einer Expressionsstudie von Gatti et al [39] an BXD-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression von TGFbRII von einem Loki auf Chromosom 18 kontrolliert wird (Abb. 1.5). Für die unterschiedliche Expression des TGFbRII könnte dementsprechend auch eine Variante auf Chromosom 18 verantwortlich sein.

1.8 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit analysiert Expressionsvariationen des TGFbRII im Modell extrem exprimierender Mauslinien *in vivo*. Hierfür wurden Inzuchtmausstämme der BXD-Linien verwendet, die unterschiedliche Mengen des TGFbRII in der Leber exprimieren. TGFbRII gilt als limitierender Faktor der Signaltransduktion von TGF- β , dem stärksten profibrogenen Zytokin der Leber, und könnte daher die Empfindlichkeit gegenüber Leberschäden modulieren. Das Ziel

der Arbeit war es daher, anhand von Mäusen, die unterschiedliche Expressionslevel dieses Rezeptors aufweisen, den Einfluss von Expressionsvariationen des TGFbRII auf die Leberfibrose zu untersuchen. Zudem sollte die Arbeit zur Klärung der Frage dienen, ob sich das Modell der extrem exprimierenden Mauslinien zur Analyse der Auswirkungen von Expressionsvariation eignet oder ob die Einflüsse der beobachteten Variationen zu gering sind, um zu detektierbaren Abweichungen der Phänotypen zu führen. Dazu mussten zwei BXD-Mauslinien ausgewählt werden, die einen größtmöglichen Unterschied in der Expression des TGFbRII aufweisen. Die TGFbRII-Expression war sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene zu analysieren. Die phänotypischen Unterschiede der Leberschädigung und Fibrosierung sollten dann nach Schädigung der Tiere mittels CCl_4 durch Quantifizierung von Kollagengehalt, Proliferation und Apoptose ermittelt werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 BXD-Mäuse

2.1.1 Auswahl der Tiere

Zur Analyse des Einflusses von Expressionsvariationen auf die Entwicklung der Leberfibrose wählten wir zwei verschiedene BXD-Mauslinien aus, die einen größtmöglichen Unterschied in der Expression des TGFbRII aufweisen. Die Daten, auf denen unsere Untersuchung beruht, bezogen wir aus der Datenbank der Homepage www.genenetwork.org, in der Daten von über 30 000 Genen zu finden sind und die auf einer Arbeit von Gatti et al [39] beruht.

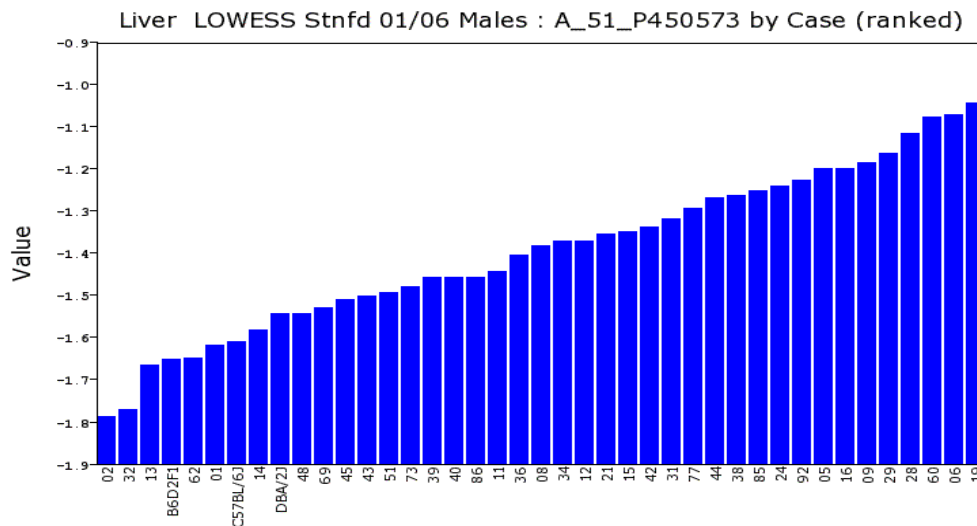


Abbildung 2.1: Expressionswerte der männlichen BXD-Mäuse sowie der Elternstämme C57BL6J und DBA/2J für den TGFbRII [genenetwork.org]. Die Expressionswerte für den TGFbRII zeigen unter den BXD-Linien eine Normalverteilung. Die Linie BXD 13 weist gegenüber der Linie BXD 24a eine geringere Expression des TGFbRII auf.

Aufgrund der Expressionsdaten des TGFbRII entschieden wir uns für männliche Tiere der BXD-Linien 13 und 24a. Hierbei zeigen die Männchen der BXD-Linie 13 eine geringe Expression und in der BXD-Linie 24a eine deutlich höhere Expression (Abb. 2.1), so dass die Tiere einen größtmöglichen Unterschied in der Expression aufweisen. Für die Weibchen zeigen die Tiere der BXD-Linie 13 ebenfalls eine geringe Expression, BXD 24a-Weibchen sind in der Datenbank nicht repräsentiert.

2.1.2 Tierhaltung

Die Tiere dieser Arbeit bezogen wir aus der Zucht des Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Sowohl die Tierhaltung als auch die Tierversuche wurden durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes sowie durch das zuständige Landesveterinäramt bewilligt. Die Haltung der Tiere erfolgte in artgerechten Käfigen und bei konstanter Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$). Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Des Weiteren wurde ein zwölfständiger Tag-Nacht-Zyklus eingehalten.

2.1.3 Fibroseinduktion durch CCl_4

Um den Einfluss der Expression des TGFbRII auf die Leberfibrose zu untersuchen, induzierten wir eine Fibrose durch die Gabe von Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4). Insgesamt wurden 22 Tiere mit CCl_4 behandelt, darunter 12 Männchen und 10 Weibchen. Die Injektion von CCl_4 erfolgte intraperitoneal und gewichtsabhängig nach dem aufgeführten Schema (Tab. 2.1). Mit den CCl_4 -Injektionen wurde ab einem Alter von 6–8 Wochen begonnen. Zum Vergleich einer Kurzzeit- und einer Langzeitschädigung wurden einem Teil der Tiere die Injektionen über 6 Wochen zwei Mal wöchentlich ($0,7\text{ mg CCl}_4/\text{kg Körpergewicht}$) verabreicht. Die Tiere aus der Gruppe der Kurzzeitschädigung erhielten insgesamt drei CCl_4 -Injektionen im Abstand von jeweils 72 Stunden. Alle Tiere tolerierten die CCl_4 -Injektionen über die gesamte Behandlungsdauer (1/6 Wochen) und zeigten keine äußerlich sichtbaren Zeichen von Stress oder körperlichem Unwohlsein.

Tabelle 2.1: Spritzschema in Abhängigkeit der Gewichtsklasse der Mäuse. Von dem Gemisch aus CCl_4 und Mineralöl wurden gewichtsadaptiert 50 μl intraperitoneal injiziert.

Gewicht [g]	CCl_4 -Menge [μl]	Mineralöl [μl]
16,0–17,9	112	388
18,0–23,9	140	360
24,0–27,9	175	325
28,0–34,0	210	290

2.1.4 Organentnahme und Asservierung

Die Organentnahme fand bei allen behandelten Tieren vormittags und 48 Stunden nach der letzten CCl_4 -Injektion statt. Die Tötung der Tiere erfolgte, nach vorausgegangener Betäubung mit Isofluran in einem geschlossenen Gefäß, durch Genickbruch. Nach Desinfektion des Abdomens wurde die Bauchhöhle über eine mediane Laparotomie eröffnet. Es erfolgte zunächst eine venöse Blutentnahme aus der V. cava inferior. Das Blut wurde anschließend in ein Serumröhrchen überführt und zentrifugiert (4°C, 4300 U/min, 20 Minuten). Das Serum wurde in frische Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Die Darstellung der Leber und ihrer einzelnen Lappen erfolgte nach Orientierung am Leberhilus und an der Gallenblase. Die Leberlappen wurden nach einem definierten Schema entnommen. Dabei wurde der linke Leberlappen sowie eine der Nieren in Tubes mit 4 % Formaldehyd konserviert und die Hälfte des rechten Leberlappens zur späteren Anfertigung von Gefrierschnitten in Tissue-Tek O.C.T. asserviert. Die restliche Leber wurde in kleinen Stücken in jeweils zwei Eppendorf-Röhrchen pro Maus asserviert und in flüssigem Stickstoff überführt. Die Organe wurden bei -80 °C aufbewahrt. Das Gewicht der Mäuse sowie der Lebern wurde in einer Tabelle festgehalten.

2.2 Western Blot Analyse

2.2.1 Proteinisolierung

Zur Isolierung der Proteine aus den Lebern der Tiere wurde der Tissue Lyser (Qiagen) verwendet. Mit Hilfe des Tissue Lysers werden Gewebe unterschiedlicher Art unter Verwendung von Stahlkugeln, die zur Zerstörung und Homogenisierung der Gewebe beitragen, homogeni-

siert. Die Proteine wurden sowohl aus nativer Leber als auch aus der durch CCl_4 geschädigten Leber isoliert. Dafür wurde jeweils ein Teil der bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Leber entnommen und gemeinsam mit $300\text{ }\mu\text{l}$ RIPA (siehe Tab. 2.2), welcher als Lysepuffer diente, mit Zusatz von einer Tablette Protease-Inhibitor (Roche) und $50\text{ }\mu\text{l}$ Phosphatase Inhibitor (Sigma) und einer Stahlkugel in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Dieses wurde nun in den Tissue Lyser überführt und homogenisiert (2 min , 50 Hz). Im Anschluss daran wurden die Proben zentrifugiert ($4\text{ }^\circ\text{C}$, $10\text{ }000\text{ U/min}$, 10 Minuten). Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Röhrchen transferiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Tabelle 2.2: Bestandteile RIPA.

RIPA (200 ml):

50 mM Tris

250 mM NaCl

2 % Nonidet P40

2,5 mM EDTA-Na

0,1 % SDS

0,5 % Natriumdeoxycholat

Auffüllen mit Aqua dest. und pH-Einstellung auf 7,2

Aufbewahrung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$

2.2.2 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Quantifizierung der isolierten Proteine der Leber erfolgte photometrisch nach der Methode von Lowry [63]. Nach dieser Methode werden durch die vorhandenen Proteine Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert (Biuret-Reaktion), welche zu einem Farbumschlag im verwendeten Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz führen. Die Intensität der Färbung wird anschließend photometrisch ermittelt. Für die Lowry-Konzentrationsbestimmung verwendeten wir das Biorad Dc Protein Assay (Biorad Laboratories, # 500-0113/0114).

Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer Eichgerade ermittelt, die auf einer Verdünnungsreihe mit BSA (Bovine Serum Albumin)-Lösungen in Konzentrationen von 0 bis 20 mg/ml basiert. Die Verdünnungsreihe wurde mit BSA-Serum und RIPA hergestellt. Anschließend wur-

den jeweils 2 µl der Proben und der Verdünnungsreihe in eine 96-well Platte pipettiert und zu jedem Messpunkt 20 µl der Lösung A + S, sowie 200 µl der Lösung B des Protein Assays zugegeben. Nach Vermischung der Lösungen und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptions-Messung bei einer Wellenlänge von 700 nm. Durch Auftragung der Absorption gegen die Konzentration wurde eine Eichgerade ermittelt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen berechnet werden konnten (Abb. 2.2). Jede Konzentrationsbestimmung erfolgte in einem Dreifachansatz.

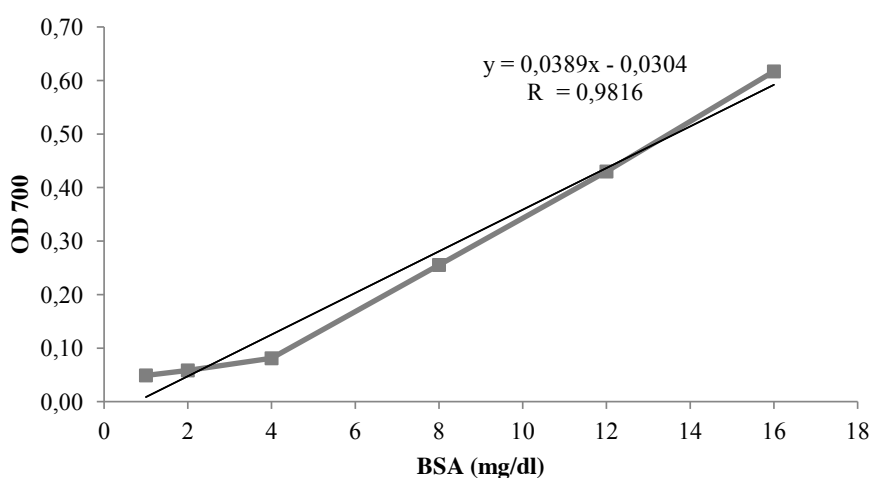


Abbildung 2.2: Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Auftragung der Extinktion bei 700 nm gegen die Konzentration. Über die Steigung der Eichgeraden kann die jeweilige Konzentration einer unbekannt Probe bestimmt werden.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Rahmen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine entsprechend ihrer Größen aufgetrennt. Durch Bindung von SDS (Natriumdodecylsulfat) an hydrophobe Regionen der Aminosäure-Ketten wird die Eigenladung der Proteine aufgehoben, insgesamt erhalten die Proteine eine negative Ladung durch das negativ geladene SDS. Dadurch wandern die Proteine nach Anlegen einer Spannung in eine gemeinsame Richtung. Die Proteine können somit unabhängig von ihrer Eigenladung entsprechend der Molekülgröße aufgetrennt werden [65]. Dabei wandern kleinere Moleküle im Trenngel schneller, da die größeren Moleküle durch die Poren im Trenngel eher zurückgehalten werden. Wir verwendeten für unsere SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein 10 %-iges Trenngel und ein 5 %-iges Sammelgel. Die Gele wurden entsprechend der aufgeführten Tabellen angesetzt (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Gele.

Gelbestandteile	Trenngel	Sammelgel
	10 %	5 %
Aqua dest.	7,9 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid-Mischung	6,7 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5 ml	-
1,0 M Tris pH 6,8	-	0,63 ml
10 %-ige SDS-Lösung	200 µl	50 µl
10 %-ige Ammoniumpersulfatlösung	200 µl	50 µl
TEMED	20 µl	5 µl

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dies mit Isopropanol überschichtet, um auf diese Weise eine gleichmäßige Oberfläche zu schaffen. Sobald eine vollständige Polymerisation des Gels vorlag, konnte Isopropanol wieder entfernt werden und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden. Unmittelbar nach Gießen des Sammelgels wurde ein Probenkamm in das Gel eingebracht, um das Gel mit den Proben beladen zu können. Das Gel konnte im Anschluss mit jeweils 50 µg Protein aus jeder Probe beladen werden. Diese wurden zuvor mit 5 µl Ladepuffer (Roti®-Load 1, Roth, Karlsruhe, # K929.1) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C in einem Blockthermostat zur Denaturierung der Proteine inkubiert. Zur Kontrolle der Molekülgrößen wurden zusätzlich 3 µl Proteinmarker (Roti®-Mark Bicolor, Roth, Karlsruhe, #2806.2) in eine der randständigen Taschen des Sammelgels pipettiert. Das Gel wurde anschließend in eine mit 10 × SDS Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer (Biometra) eingebracht, die Separation der Proteine erfolgte bei 100 V für 2 Stunden.

2.2.4 Western Blotting

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Hybond™-ECL™Nitrocellulose-Membran, GE Healthcare Europe GmbH, München). Dafür wurden Filterpapier und die Nitrozellulosemembran entsprechend der Gelgröße zugeschnitten, gewässert und für 10 Minuten in Blotting Puffer mit 4 % Methanol gelegt.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Blotting Puffers.

Blotting Puffer

39 ml 1 M Glycin

48 ml 1 M Tris pH 8,3

3,7 ml 10 % SDS

200 ml 20 % Methanol

mit Aqua dest. ad 1000 ml

Auf zwei Lagen von Filterpapier wurden zunächst die Membran und, nach Abtrennung des Sammelgels, das Trenngel gelegt, darauf folgten zwei weitere Lagen in Blotting Puffer getränktes Filterpapier. Es wurde darauf geachtet, dass Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen eliminiert wurden. Anschließend wurde die Anordnung in die Blotapparatur (Trans Blot®SD, Semi-DM Transfer Cell, BioRad) gelegt. Das Blotting erfolgte bei 400 mA und 20 V für eine Stunde.

2.2.5 Nachweis des TGFbRII durch monoklonale Antikörper

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese mit Ponceau-Rot (1:20, Fa. Sigma, #P-7767) gefärbt, um den Erfolg des Blottings und die Gleichmäßigkeit der Proteinbanden zu kontrollieren. Anschließend wurde die Membran mit Aqua dest. gewaschen, getrocknet und zur Dokumentation fotografiert. Mithilfe des Markerproteins konnte die Position der jeweiligen Banden mit entsprechender Molekulargröße identifiziert und markiert werden. Wir durchtrennten unsere Membranen an der Grenze von 50 kD. Die Membrananteile oberhalb dieser Grenze dienten dem Nachweis des TGFbRII, der ein Molekulargewicht von 70 kD aufweist. Unterhalb der Grenze dienten die Membrananteile der Ladungskontrolle mittels β -Actin bei einem erwarteten Molekulargewicht von 43 kD. Vor der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Membranen für 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer 5 % Milchpulver/TBST-Lösung geblockt, um die unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren.

Die primären Antikörper (anti-rabbit IgG, Santa Cruz) wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:500 mit 5 % Milchpulver/TBST angesetzt. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit dem primären Antikörper inkubiert.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des TBST-Puffers.

TBST-Puffer (Tris buffered saline + Tween 20)

1,21 g (10 mM) Tris-Base pH 7,4

8,16 g (150 mM) NaCl

0,5 ml (0,005 %) Tween 20

mit Aqua dest. ad 1000 ml

Am nächsten Morgen wurden die Membranen mehrmals mit TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit IgG, Santa Cruz), der in einer Verdünnung von 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBST verwendet wurde. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler bei Raumtemperatur für eine Stunde. Vor der Immundetektion der Proteine mit Hilfe des ECL (enhanced chemiluminescence)-Verfahrens wurden die Membranen erneut mit TBST gewaschen. Die ECL-Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 angesetzt.

Tabelle 2.6: ECL-Lösungen.

Lösung 1

5 ml 0,1 M TRIS Puffer pH 8,5

50 µl 250 mM Luminol (Sigma-Aldrich, Lagerung bei -20 °C)

22 µl 90 mM p-Cumarsäure (Sigma-Aldrich, Lagerung bei -20 °C)

Lösung 2

5 ml 0,1 M TRIS Puffer pH 8,5

3 µl Hydrogen Peroxide 30 % in H₂O

Wir inkubierten die Membranen für eine Minute mit dem ECL-Reaktionsgemisch, die benetzten Membranen wurden anschließend in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Belichtungskassette (Hypercassette™, Amersham pharmacia biotech, RPN 11642) gelegt. Ein spezieller Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ECL, GE Healthcare Europe GmbH, München, # 28-9068-40)

wurde in der Dunkelkammer aufgelegt und nach einer Expositionszeit von 3 bis 10 Minuten, je nach Signalstärke, entwickelt.

2.2.6 Quantifizierung der Banden

Zur Quantifizierung der Proteinmenge des TGF β RII wurden die entwickelten Filme eingescannt und mit Hilfe des ImageQuant TL Programmes ausgewertet. Dabei legten wir die zu analysierenden Banden fest, von denen durch das Programm die Pixelintensität ermittelt werden sollte. Als Ladungskontrolle verwendeten wir das Housekeeping-Gen β -Actin. Im Anschluss an die Ermittlung der Dichte der Proteinbanden erfolgte der Actin-Abgleich durch Bildung des Verhältnisses der Dichte der TGF β RII- und der Dichte der β -Actin-Banden.

2.3 Färbungen

2.3.1 Anfertigungen der Schnitte

Die Schnitte der Lebern für histologische und immunhistochemische Untersuchungen der behandelten Tiere wurden aus den in 4 %-igem Formaldehyd fixierten Leberteilen hergestellt und erfolgten einen Monat nach der Organentnahme. Nach Zuschnitt und Einbringen der fixierten Präparate in Einbettkästen mit erneuter Fixierung für eine Stunde bei 4°C erfolgte eine Wässerung der Präparate mit anschließendem Einlegen der Einbettkästen in die Einbettmaschine. In dieser wird den Präparaten unter Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 60 %, 70 %, jeweils 1 h 35 min; 80 %, 96 %, 2 \times 100 %, jeweils 1 h) das Wasser entzogen. Nach Einbringen in Xylol (1 h, 2 \times 30 min) wurden sie in Paraffin überführt (3 \times 1 h). Bis zur weiteren Verwendung verblieben die Präparate anschließend in Paraffin und wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Aus den Paraffinblöcken wurden im nächsten Schritt mit Hilfe eines Mikrotoms jeweils etwa 1–3 μ m dicke Schnitte geschnitten und nach Glättung im Wasserbad bei 45 °C auf Objektträger gebracht. Die Objektträger wurden schließlich bei einer Temperatur von 50 °C im Brutschrank über Nacht getrocknet.

2.3.2 Silanisierung der Objektträger

Für immunhistochemische Untersuchungen der Schnitte wurden silanisierte Objektträger verwendet. Die Silanisierung der Objektträger bewirkt eine verbesserte Haftung der Gewebeschnit-

te. Dafür wurden zunächst die Objektträger in Aceton fettfrei gemacht und anschließend bei 50 °C getrocknet. Nachdem die Objektträger nach der Trocknung wieder auf Raumtemperatur gebracht wurden, wurden diese für fünf Minuten in frischer Silanisierungslösung (10 % 3-C-Triethoxysilylpropylamin in Aceton) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang zunächst in Aceton und folgend in Aqua dest. Nach den Waschvorgängen wurden die Objektträger bei 42 °C über Nacht getrocknet. Die Schnitte für die Siriusrot und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden auf unbeschichteten Objektträger hergestellt.

2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) nach Mayer ist eine Routinefärbung, die vorwiegend der Übersicht eines histologischen Präparates dient. Die verwendeten Farbstoffe sind dabei Hämatoxylin und Eosin.

Zur Herstellung der 0,2 %-igen Eosin-Lösung wurden 0,2 g Eosin G (MERCK, Darmstadt, #115935) in 100 ml Aqua dest. gelöst. Pro 100 ml hergestellter Lösung wurde ein Tropfen konzentrierte Essigsäure (100 %) hinzugefügt. Das Hämatoxylin wurde als fertige Lösung von der Firma AppliChem (Hämatoxylin-Monohydrat, #3865.0100) bezogen. Die Schnitte wurden im Rahmen des Färbeprozesses in einen Färbeeinsatz (Rotilabo®-Objektträgerhalter, HA49.1) eingebracht, der mittels Glasbügel der Reihe nach in Färbekammern mit den unten aufgeführten Lösungen und Einwirkzeiten getaucht wurde.

Tabelle 2.7: Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer.

Entparaffinierung:	Xylol	2 × 3 min
	Isopropanol 100 %	2 min
	Isopropanol 96 %	2 min
	Isopropanol 70 %	2 min
Färbung:	Hämatoxylin nach Mayer	3 min
	Aqua dest. HCl-Alkohol	2 × 10 s
	Aqua dest. Bläuen in Leitungswasser	5 min
	Aqua dest. 0,2 % Eosin	2 min

Aqua dest.	10 s
Isopropanol 70 %	10 s
Isopropanol 96 %	2 min
Isopropanol 100 %	2 × 2 min
Xylol	2 × 3 min

Nach der Färbung erfolgte das Aufbringen und Fixieren der Deckgläser (Langenbrinck) mittels DPX-Eindeckmittel (MERCK, #1.01979.0500), anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

2.3.4 Siriusrot-Färbung

Die Siriusrot-Färbung dient der selektiven Anfärbung von Kollagenfasern (Kollagen I und III) [102]. Siriusrot stellt einen anionischen Farbstoff dar, dessen Sulfonsäuregruppen mit den basischen Gruppen des Kollagenmoleküls reagieren, wodurch eine verstärkte Doppelbrechung unter dem Lichtmikroskop hervorgerufen wird [55].

Vor Beginn der Färbung wurde die Weigert-Gebrauchslösung frisch angesetzt. Die Weigert-Stammlösung wurde aus 10 g Hämatoxylin und 100 ml absolutem Isopropanol hergestellt und mindestens 48 h vor Gebrauch angefertigt. Für die Weigert-Lösung A wurden 15 ml der Weigert Stammlösung mit 135 ml absolutem Isopropanol angesetzt. Die Weigert-Lösung B setzte sich zusammen aus 11,6 g Eisen-III-Chloridlösung mit 10 ml 25 %-iger HCl und wurde auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt. Für die endgültige Weigert-Gebrauchslösung wurden zwei Teile der Lösung A mit einem Teil der Lösung B gemischt. Der Ansatz der Pikrin-Siriusrot-Lösung bestand aus 50 ml 0,1 %-iger Siriusrot-Lösung (Siriusrot F3BA, Typ 1A280, Chroma-Gesellschaft, Münster) und 450 ml Pikrinsäure und wurde mindestens 24 h vor Gebrauch der Lösung hergestellt. Die Schnitte wurden im Rahmen des Färbeprozesses in einen Färbepinzetteneinsatz eingebracht, der mittels Glasbügel der Reihe nach in Färbekammern mit den unten aufgeführten Lösungen und Einwirkzeiten getaucht wurde.

Nach der Färbung erfolgte das Aufbringen und Fixieren der Deckgläser mittels DPX-Eindeckmittel, anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

Tabelle 2.8: Färbeprotokoll Siriusrot-Färbung.

Entparaffinierung:	Xylol	2 × 3 min
	Isopropanol 100 %	2 min
	Isopropanol 96 %	2 min
	Isopropanol 70 %	2 min
Färbung:	Weigert Gebrauchslösung	3 min
	Aqua dest.	2 ×
	HCl-Alkohol	10 × langsames Eintauchen
	Aqua dest.	
	Bläuen in Leitungswasser	5 min
	Pikrin-Siriusrot	30 min
	Isopropanol 100 %	2 × 2 min
	Xylol	2 × 3 min

2.3.4.1 Quantitative Auswertung des Kollagengehaltes

Die Auswertung der Kollagenfärbung und die Quantifizierung der durch Siriusrot angefärbten Fläche des jeweiligen Präparates erfolgten am Lichtmikroskop (Leica) unter Nutzung des Programmes Leica Application Suite. Nach Festlegung der Kameraeinstellungen wurden von jedem Präparat insgesamt zehn repräsentative Bilder in einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen. Im Anschluss daran wurde durch das Programm eine Auswertung der rot gefärbten Flächenanteile in Prozent des Gesamtbildes der einzelnen Bilder vorgenommen. Zur Fehlervermeidung wurde dafür zunächst ein Binärbild editiert, und einzelne, nicht aufgrund von Kollagen rötlich gefärbte Bereiche, z.B. Erythrozyten, wurden gelöscht. Für jedes Tier wurde aus den zehn Werten der Mittelwert berechnet.

2.3.5 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen beruhen auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei der indirekten Methode wird zunächst ein primärer Antikörper, der spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, aufgetragen und anschließend ein sekundärer Antikörper eingesetzt, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper wird dabei an ein Enzym gekoppelt, das durch Umsetzung eines Substrates eine Farbreaktion hervorruft und auf diese Weise die Darstellung molekularer Strukturen in Gewebeschnitten ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) eingesetzt, die 1981 durch Hsu et al. [51] etabliert wurde. Avidin ist ein Glykoprotein, das in Hühnereiweiß entdeckt wurde [70] und eine starke Affinität zu dem Vitamin Biotin aufweist. Bei der ABC-Methode wird ein mit Biotin gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt, so dass Biotin an den zugegebenen ABC-Komplex binden kann. Der ABC-Komplex enthält zudem noch das Enzym Peroxidase. Durch Zugabe eines Chromogens, welches durch die Peroxidase in ein farbiges Reagenz umgesetzt wird, kann das gesuchte Antigen sichtbar gemacht werden (Abb. 2.3) [17]. Als Chromogen verwendeten wir 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC), das sich als rotbraunes Farbprodukt niederschlägt.

2.3.5.1 ki67-Färbung

Die Proliferationsaktivität in der geschädigten Leber wurde durch eine immunhistochemische ki67-Färbung untersucht. ki67 ist ein Protein, das als Proliferationsmarker eingesetzt wird und sich dadurch auszeichnet, dass es in allen aktiven Phasen des Zellzyklus auf der Oberfläche der Chromosomen exprimiert wird, nicht jedoch in der Ruhephase der Zelle [89].

Zu Beginn der Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung in Xylol und dann in einer absteigenden Alkoholreihe. Die Inkubation im frisch angesetzten Methanol/H₂O₂ diente hierbei der Hemmung der endogenen Peroxidase.

Tabelle 2.9: Inkubation.

Xylol	2 × 5 min
Ethanol 100 %	5 min
Methanol/H ₂ O ₂	20 min

Ethanol 96 %	5 min
Ethanol 70 %	5 min
Aqua dest.	5 min

Anschließend wurden die Objektträger in Citratpuffer (pH 6,0) für 25 Minuten bei 600 W in der Mikrowelle erhitzt.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des Citratpuffers.

Citratpuffer	
Lösung A	21,01 g Citronensäure / 1000 ml Aqua dest.
Lösung B	29,41 g Na-Citrat-Dihydrat / 1000 ml Aqua dest.
Puffer	9 ml Lösung A + 41 ml Lösung B + 500 ml Aqua dest.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung PBS.

10 × PBS	
	50 Tabletten (Sigma, # P4417)
	+ 1 l Aqua dest.
	1 × PBS: 100 ml 10 × PBS + 900 ml Aqua dest.

Nach 10-minütigem Abkühlen des Puffers erfolgte ein Waschvorgang mit PBS für 5 Minuten. Im Anschluss daran wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und mit Normalserum (Rabbit Serum, DAKO, X0902) in einer Verdünnung von 1:10 in 2 % Milchpulver/PBS (siehe Tab. 2.11) für 15 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden jeweils 100 µl des primären Antikörpers (Monoclonal Rat Anti Mouse ki67 Antigen, DAKO, M7249) in einer Verdünnung von 1:100, gelöst in Milchpulver/PBS, auf die Präparate gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte nach einem Waschvorgang (1×5 min) mit Milchpulver in PBS die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunglobulins/Biotinylated, DAKO, E0468) in einer Verdünnung von ebenfalls 1:100 gelöst in Milchpulver/PBS. Die Inkubation des sekundären Antikörpers fand ebenfalls in der

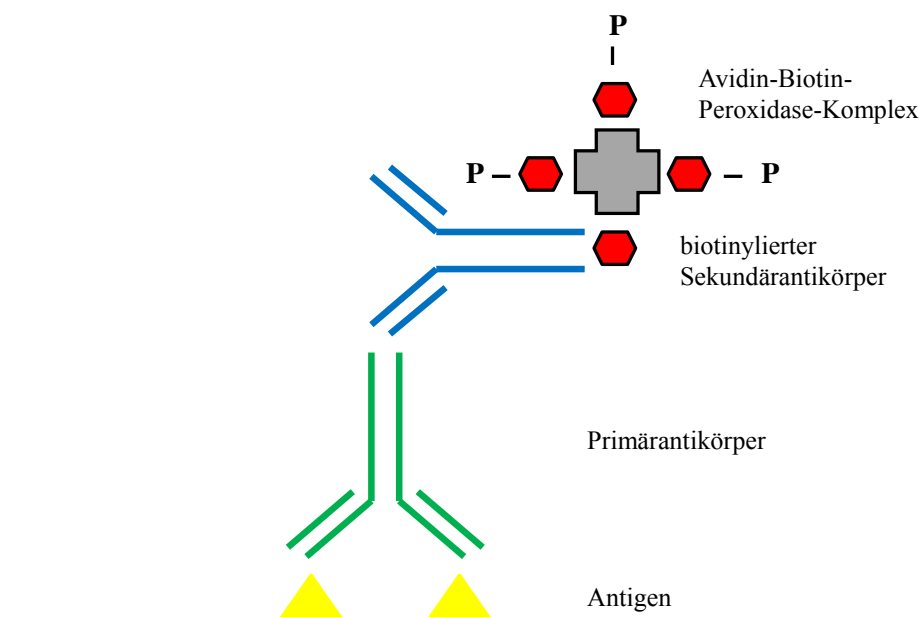


Abbildung 2.3: Avidin-Biotin-Komplex-Methode modifiziert nach Boenisch et al. [17]. Der Primärantikörper bindet sich an das gesuchte Antigen. Der biotinylierte Sekundärantikörper richtet sich gegen den Primärantikörper. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, so dass der Sekundärantikörper über das Biotin an den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex gebunden wird. Die im Komplex enthaltene Peroxidase führt über Umsetzung eines Chromogens zu einer Farbreaktion.

feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten statt. Schließlich wurden nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS jeweils 100 µl des ABC-Komplexes (ABC-Kit, Vector Laboratories, USA) auf die Präparate aufgebracht und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt mit PBS (1×5 min) erfolgte die AEC-Färbung (DAKO, DAKO, Hamburg # K3464), wodurch es zu einer rotbraunen Färbung der ki67-positiven Zellen kam. Die AEC-Färbung erfolgte für 20 bis 30 Minuten unter lichtmikroskopischer Kontrolle, bis eine ausreichende Farbintensität erreicht wurde. Als Positiv-Kontrolle diente hierbei ein auf gleiche Weise gefärbtes Präparat eines Hodens. Abschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gewaschen (3×1 min, 5 min) und für eine Minute mit Hämatoxylin gegengefärbt, 5 Minuten mit Leitungswasser gebläut und mit Aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Mikroskopische Auswertung Von jedem Tier wurden insgesamt drei Schnitte der ki67-Färbung unterzogen, um die Proliferationsaktivität nach CCl₄-Schädigung zu untersuchen. Die Auswertung der ki67-gefärbten Präparate erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten.

Quantifizierung mittels Leica Application Suite Die Schnittpräparate wurden verblindet bezüglich der BXD-Linien am Lichtmikroskop (Leica) ausgewertet. Dafür wurden von jedem Schnitt fünf repräsentative Bilder in einer 400-fachen Vergrößerung angefertigt. Da von jedem Tier drei Schnitte angefärbt wurden, erhielten wir für jedes Tier 15 Auswertungen. Auf diesen wurden der relative Anteil der braunrot gefärbten, ki67-positiven Zellen aus allen Zellen per Hand ausgezählt.

Quantifizierung mit GIMP Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der ki67-gefärbten Zellen besteht in der Anwendung des Bildbearbeitungsprogrammes GIMP, das unter *gimp.org* kostenfrei zur Verfügung steht. Die angefertigten Bilder in 100- bzw. 400-facher Vergrößerung wurden hierfür im Programm GIMP geöffnet und posterisiert. Durch das Posterisieren wird die Farbanzahl reduziert. Anschließend wurde die Farbe ausgewählt, die am ehesten ki67-Positivität reflektiert. Durch Aufrufen der Funktion „Histogramm“, das eine Aussage über die Grauwerte des Bildes erlaubt, wurden die Pixelwerte des gewählten Farbbereichs ermittelt. Aus allen ermittelten Werten des jeweiligen Tieres wurde der Mittelwert berechnet (Abb. 2.4).

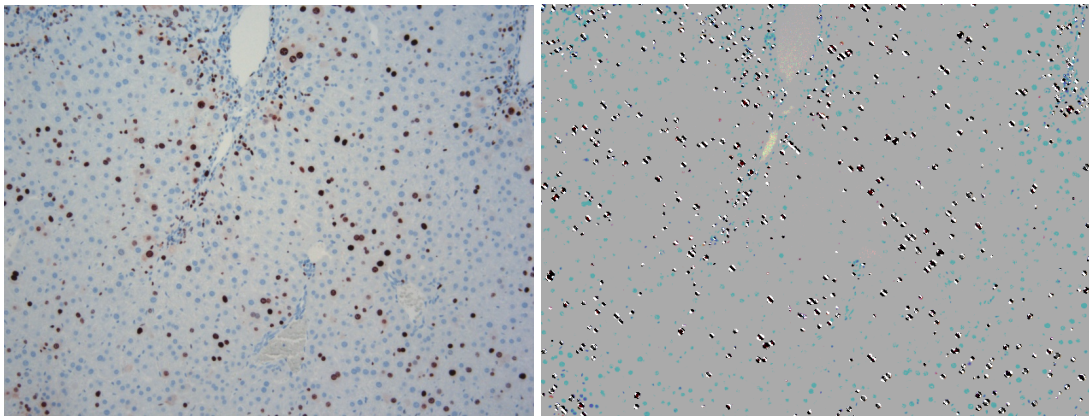


Abbildung 2.4: Exemplarischer Ausschnitt eines Leberpräparates nach ki67-Färbung in 100-facher Vergrößerung. Die ki67 positiven Zellen stellen sich braunrot dar. Auf der rechten Abbildung ist die Quantifizierung der positiven Zellen durch GIMP dargestellt nach Posterisieren und Auswahl der Farbe. Die dunklen Pixel werden pro Bild ermittelt, und daraus, wird der Mittelwert berechnet.

2.3.5.2 TUNEL-Assay

Mithilfe der TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung kann das Ausmaß der Apoptose bestimmt werden. Im Rahmen der Apoptose führen aktive Endonukleasen zur Fragmentierung der DNA des Zellkernes [5]. Die dabei entste-

henden Strangbrüche können mittels der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) markiert werden. Durch TdT werden Digoxigenin-markierte Nukleotide an freie Hydroxygruppen gebunden [24, 40]. An die Digoxigenin-Nukleotide der DNA-Fragmente kann nun ein Anti-Digoxigenin Antikörper gebunden werden, der wiederum an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Durch Zugabe eines Chromogens und dessen enzymatische Umsetzung mittels Peroxidase kommt es zu einer Braunfärbung der Zellkerne apoptotischer Zellen, die dadurch lichtmikroskopisch sichtbar werden.

Für die TUNEL-Färbung verwendeten wir das ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon #S7100). Nach Entparaffinierung in Xylol und absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte zunächst für 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in Proteinase K inkubiert (400 µl Proteinase K auf 200 ml H₂O). Durch die Proteinase K werden die Zellproteine angedaut, um eine verbesserte Zugänglichkeit der DNA-Strangbrüche für die nachfolgenden Reagenzien und Bindungsreaktionen zu bewirken. Nach zweimaligem Waschen in H₂O erfolgte eine Inkubation der Schnitte in H₂O₂ für 5 Minuten zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase. Nach Waschen mit PBS wurden um die Schnitte auf den Objektträgern Fettkreise gezogen und der Äquilibrierungspuffer (Millipore, #90416) aufgetragen. Die Schnitte wurden nun in eine feuchte Kammer überführt und mit dem Reaktionsgemisch aus dem Enzym TdT und den Nukleotiden für eine Stunde im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten eine Inkubation der Schnitte in Stop/Wash Buffer (Millipore, PSO1736474) und erneutes Waschen in PBS. Nun wurden der primäre Antikörper gegen Digoxigenin, gekoppelt mit Peroxidase (Anti-Digoxigenin conjugate Peroxidase, #90420), aufgetragen und die Schnitte erneut in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden nun nochmals in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte mit AEC gefärbt (vgl. 2.3.5). Zur besseren Beurteilung der Präparate wurden diese nach erneuten Waschvorgängen in H₂O in Hämatoxylin nach Mayer für eine Minute gegengefärbt. Nach Bläuen in Leitungswasser wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck Millipore, #108562) eingedeckt.

Mikroskopische Auswertung der Apoptose Um das Ausmaß der Apoptose mittels TUNEL-Färbung beurteilen zu können, wurden von jedem Tier insgesamt drei Schnitte angefärbt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop (Leica) mit Hilfe der Leica Application Suite. Dafür wurden von jedem Schnitt fünf repräsentative Bilder in einer 400-fachen Vergrößerung angefertigt. Da von jedem Tier drei Schnitte angefärbt wurden, erhielten wir für jedes Tier 15 Auswertungen. Auf jedem Bild wurden die braun gefärbten apoptotischen Zellen per Hand ausgezählt

und notiert. Am Ende wurden 15 Bilder gewählt, auf denen alle Zellen gezählt und ausgewertet wurden. Zusätzlich wurde der Apoptoseindex für jedes Tier berechnet. Hierfür wurden die positiv gefärbten Zellkerne der analysierten Bilder ($n=15/\text{Tier}$) addiert und durch die Gesamtzahl der Zellkerne aus 15 Bildern dividiert.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, das der Amplifikation von durch Primer festgelegten DNA-Sequenzen dient. Nach Denaturierung der DNA und Trennung in die Einzelstränge erfolgt die sequenzspezifische Bindung der Primer an die DNA-Matrize mit nachfolgender Kopie der Einzelstränge durch eine hitzestabile Polymerase (Taq-polymerase) [86]. Durch mehrfache Wiederholung des Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Polymerisation wird eine exponentielle Vervielfältigung der DNA-Sequenz erreicht.

2.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus der Leber

Zur Analyse der Genexpression des TGF β RII isolierten wir die Gesamt-RNA aus den Lebern mit Hilfe des RNeasy mini Kits (Qiagen, #74106). Durch diese Methode ist es möglich, bis zu 100 μg RNA mit einer Länge von mehr als 200 Basen aus Gewebe oder Zellen zu extrahieren [3]. Dafür wird zunächst das Gewebe mittels Guanidinisothiocyanat (GTC) enthaltendem Puffer lysiert. Die RNA der Probe wird anschließend in Säulchen an eine Silica-Membran gebunden und in mehreren Waschschritten von Kontaminationen, wie DNA, getrennt.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der RNA gegenüber äußeren Einflüssen wurde auf die Verwendung RNase-freier Lösungen und Reaktionsgefäße geachtet. Von jeder Leber wurden 30 mg abgewogen, in kleine Stücke zerteilt und in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. Zur Lyse und Homogenisierung des Gewebes wurden jeweils 600 μl RLT-Lyse-Puffer, versetzt mit β -Mercaptoethanol (10 μl β -Mercaptoethanol/ml RLT-Puffer), sowie eine Stahlkugel hinzugefügt und anschließend im Tissue Lyser lysiert (1 min, 50 Hz). Nach Lyse und Zentrifugation (3 min, 13 000 U/min) wurde der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Zum homogenisierten Lysat wurden nun jeweils 550 μl Ethanol (50 %) hinzugefügt, um geeignete Bindungseigenschaften der RNA an die Silica-Membran der RNeasy-Säulen zu erreichen. Die Säulen wurden anschließend mit maximal 700 μl des Reaktionsgemisches beladen und für 20 s bei 10 000 U/min zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Eluat verworfen. Nach einem Waschvorgang mit RW1-Puffer (700 μl , 15 s, 10 000 U/min) und zweimaligem

Waschen mit RPE-Puffer (500 μ l, 15-60 s 10 000 U/min) wurden die Säulen in ein neues Reaktionsgefäß (2,0 ml) platziert und zum Trocknen der Silica-Membran für zwei Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert. Zur Elution wurden die Säulen wiederum auf ein neues Röhrchen (1,5 ml) gesetzt, 30 μ l DEPC-Wasser (RNase-freies Wasser) zentral auf die Membran pipettiert und erneut für eine Minute bei 10 000 U/min zentrifugiert. Nach Wiederholung des Elutions-schrittes mit 30 μ l DEPC-Wasser wurde das gesamte Eluat in Proben-Röhrchen überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm mittels Spektralphotometer (NanoDrop®, Peqlab) gemessen. Hierfür wurden jeweils 1,5 μ l der Probe auf die Probenhalterung aufgetragen und gegen einen Leerwert (1,5 μ l H₂O) gemessen.

2.4.2 Synthese der cDNA

Durch das Enzym Reverse Transkriptase ist es möglich, cDNA aus der isolierten RNA zu synthetisieren, die zur Durchführung der PCR notwendig ist. Dabei dient die einzelsträngige RNA als Matrize für die Synthese der komplementären DNA (cDNA). Um eventuell vorhandene DNA-Kontaminationen zu beseitigen, führten wir vor der reversen Transkription (RT) ein DNase-Verdau durch. Durch das Enzym DNase I wird sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA abgebaut, ohne den Aufbau der RNA zu beeinträchtigen. Hierzu wurden jeweils 1 μ g der RNA mit DEPC-Wasser auf 8 μ l aufgefüllt und anschließend mit jeweils 1 μ l DNase I Puffer sowie 1 μ l DNase I (Invitrogen, #18068-015) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden 1 μ l EDTA (25 mM) hinzu pipettiert und das Reaktionsgemisch für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Durch die Zugabe von EDTA wurde die DNase I inaktiviert.

Für die Durchführung der reversen Transkription verwendeten wir das high capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems, #4368814). Die Proben wurden jeweils mit 10 μ l des Reaktionsansatzes versetzt. Der Reaktionsansatz kann Tabelle 2.12 entnommen werden. Anschließend wurden die Proben in einem Thermocycler für 10 Minuten bei 25 °C, dann für 120 Minuten bei 37 °C und für fünf Sekunden bei 85 °C inkubiert und letztendlich auf 4 °C gekühlt. Nach Verdünnung der cDNA mit H₂O wurde die cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.12: Mastermix pro Probe.

Mastermix pro Probe	
2 μ l	Puffer (10 \times)
2 μ l	Primer (10 \times)
0,8 μ l	dNTPs (100 mM)
1 μ l	Reverse Transkriptase
1 μ l	RNase Out (Invitrogen)
3,2 μ l	DEPC-H ₂ O

2.4.3 Kontrolle der cDNA-Synthese

Im Anschluss an die cDNA-Synthese führten wir eine β -Actin-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durch, um zu kontrollieren, ob in jeder Probe gleichviel cDNA vorhanden ist. Der Reaktionsansatz dieser PCR kann Tabelle 2.13 entnommen werden. Von jeder Probe wurden 2 μ l der entsprechenden cDNA in eine 96-well-Multititerplatte pipettiert und anschließend jeweils 23 μ l des Reaktionsansatzes hinzugegeben. Nach der Denaturierung der DNA bei 94 °C über 2 Minuten wurde folgender PCR-Zyklus insgesamt 25 mal durchlaufen: 94 °C für 30 s; 59 °C für 30 s; 72 °C für 50 s. Abschließend erfolgte ein Zyklus von 5 min bei 72 °C mit nachfolgender Abkühlung der Proben auf 4 °C.

Tabelle 2.13: Reaktionsansatz für die β -Actin-PCR.

Mastermix (23 μ l):	
17,7 μ l	H ₂ O Merck
2,5 μ l	10 \times PCR Buffer (Invitrogen)
1 μ l	MgCl ₂ 50 mM
0,5 μ l	dNTPs 10 mM
0,5 μ l	Primer bActf 10 μ M
0,5 μ l	Primer bActr 10 μ M
0,3 μ l	Taq Polymerase

Tabelle 2.14: Primer für die β -Actin-PCR.

Primer (Thermo Scientific)	
bAct forward	CCA TCC TGC GTC TGG ACC TG
bAct reverse	GTA ACA GTC CGC CTA GAA GC

Nach Beendigung der β -Actin-PCR wurde ein 2 %iges Agarose-Gel mit 1x TAE-Puffer (Tab. 2.15) und Ethidiumbromid mit den PCR-Produkten beladen. Durch die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ist es möglich, eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente zu erreichen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches in Nukleinsäuren interkaliert und damit eine Zunahme der Fluoreszenz bewirkt, können die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Jede Probe wurde im Verhältnis 9:1 mit 10 \times Ladepuffer (TAE, H₂O, Glycerin, Farbstoff Xylen- cyanol) versetzt, daraufhin wurden die Proben in die vorgesehenen Taschen des Gels pipettiert. Als Marker zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Leiter (Thermo Scientific, #SM0403) in die erste Tasche pipettiert, anschließend wurde das beladene Gel in die Laufkammer gelegt. Nach einer 40-minütigen Laufzeit bei 90 V konnten die Banden auf einem UV-Schirm (Fluor-S MultiImager, BioRad, USA) analysiert und dokumentiert werden.

Tabelle 2.15: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

TAE-Puffer (50 x)
242 g (2 M) Tris
57,1 ml (1 M) Eisessig
50 mM EDTA
mit Aqua dest. ad 1000 ml

2.4.4 Quantitative real-time PCR

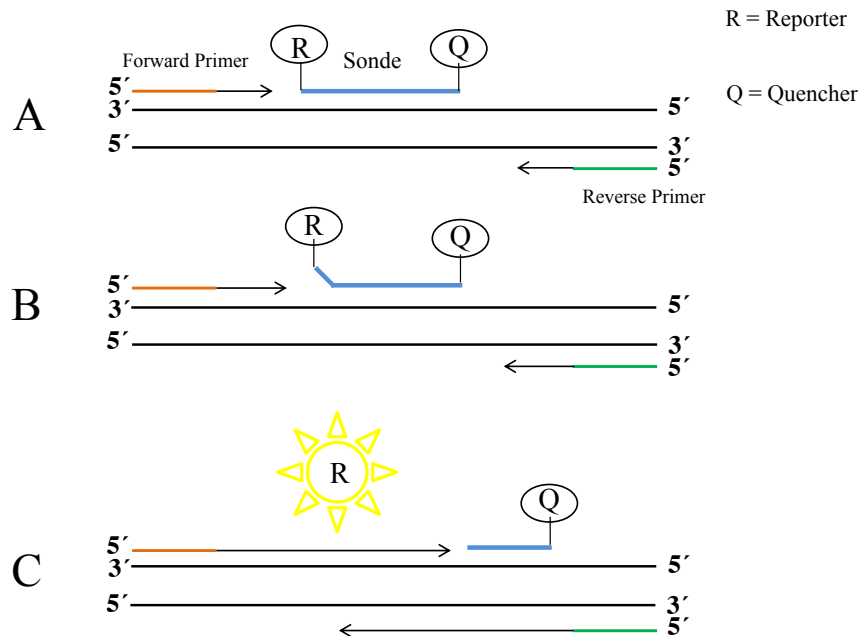


Abbildung 2.5: Funktionsprinzip der TaqMan-Sonde (modifiziert nach Morris et al. [72])

(A) Bindung der Primer und der TaqMan-Sonde an die zu amplifizierende cDNA-Sequenz. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und am 3'-Ende mit dem Quencher markiert. Durch den Quencher wird bei intakter Sonde die Emission des Reporters unterdrückt. (B) Durch die fortschreitende Polymerisation wird der Reporter zunehmend verdrängt. (C) Im Rahmen der Synthese wird der Reporter durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taqman-Polymerase von der Sonde abgespalten. Dadurch findet keine weitere Beeinflussung des Reporters durch den Quencher mehr statt, und eine Zunahme der Fluoreszenz wird beobachtet..

Zur Bestätigung der verwendeten Daten zur Genexpression führten wir eine real time-PCR (RT-PCR) durch. Die real time quantitative PCR (qPCR) ermöglicht, im Gegensatz zur klassischen PCR, eine zusätzliche Quantifizierung der amplifizierten DNA-Abschnitte während der PCR. Die Quantifizierung in Echtzeit wird durch die Verwendung von Fluoreszenz-markierten Sonden oder interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffen ermöglicht. In dieser Arbeit wurde die Taqman®-Technologie verwendet. Dabei kommen Taqman-Sonden zum Einsatz, die am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und einen am 3'-Ende lokalisierten Quencher enthalten. Solange die Sonde intakt ist, wird die Emission des Reporters durch den Quencher ausgelöscht. Durch die 5'-3'-Endonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase wird der Reporter während der PCR von der Sonde abgespalten, und er unterliegt somit nicht mehr dem Signal

des Quenchers [72]. Die dadurch erreichte Zunahme der Intensität des fluoreszierenden Signals wird quantifiziert (Abb. 2.5).

Die Proben (TGFbRII als Zielgen und 18 sRNA als Referenz) wurden im Doppelansatz untersucht. Von jeder Probe wurde 1 µl der entsprechenden cDNA in eine 96-well-Multititerplatte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 19 µl des Reaktionsansatzes für 18 sRNA oder TGFbRII (Tabellen 2.16 und 2.17) hinzugegeben. Die real-time PCR erfolgte im Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. Nach einer initialen Denaturierung der DNA bei 95°C über 20 s wurde im Folgenden 39 mal der Zyklus aus Denaturierung bei 95°C über 3 s und Annealing und Elongation bei 60°C über 30 s durchlaufen.

Tabelle 2.16: Mastermix für 18 sRNA.

Mastermix für 18 sRNA (19 µl):		
10 µl	2 × Mastermix (Invitrogen)	
0,1 µl	Primer F 10 µM	} TaqMan®Ribosomal RNA Control Reagents, Applied Biosystems, #4308329
0,1 µl	Primer R 10 µM	
0,1 µl	Sonde VIC 40 µM	
8,7 µl	RNase-freies Wasser (Merck)	

Tabelle 2.17: Mastermix für TGFbRII.

Mastermix für TGFbRII (19 µl):	
10 µl	2 × Mastermix (Invitrogen)
1 µl	Assay Mix TGFbRII (Applied Biosystems, Mm 00436977_m1, #4453320)
8 µl	RNase-freies Wasser (Merck)

2.4.4.1 Relative Quantifizierung

Für die Quantifizierung der Startmenge wird ein Schwellenwert festgelegt, der CT (cycle threshold)-Wert. An diesem Punkt überschreitet die Fluoreszenz der Proben die festgelegte Hintergrundfluoreszenz. Je mehr Kopien der Zielsequenz zu Beginn in der Probe vorhanden sind, desto

weniger Zyklen sind notwendig, um den CT-Wert zu überschreiten. Der CT-Wert korreliert dementsprechend umgekehrt proportional mit der Startmenge der Zielsequenz [14].

Um die relative Genexpression des Zielgens zu bestimmen, wird dessen Expression auf ein Housekeeping-Gen bezogen. Housekeeping-Gene kodieren für Proteine, die in allen kernhaltigen Zellen relativ konstant exprimiert werden, da sie für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion essentiell sind [103]. Als Housekeeping-Gen verwendeten wir 18 sRNA.

Für die Berechnung des Expressionsunterschiedes wurde die $\Delta\Delta$ CT-Methode [61] angewandt. Dabei wird zunächst von jeder Probe der CT-Wert des Zielgens vom CT-Wert des Housekeeping-Gens subtrahiert (Δ CT), um die Proben zu normieren. Im Anschluss daran wird der Mittelwert der zuvor ermittelten Δ CT-Werte der Kontrollgruppe von den jeweiligen Δ CT-Werten der behandelten Tiere subtrahiert. Zur Ermittlung des relativen Expressionsunterschiedes wird dieser $\Delta\Delta$ CT-Wert nun in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ eingesetzt. Der $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ Wert gibt die n-fache Genexpression der behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen an.

$$\Delta \text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Housekeeping-Gen}}$$

$$\Delta\Delta \text{CT} = \Delta \text{CT}_{\text{Behandlung}} - \overline{\Delta\text{CT}}_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

2.5 Statistische Verfahren

Die Berechnung der Werte für den Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler erfolgte mit Hilfe von Excel 2003. Für die Auswertung der histologischen Ergebnisse verwendeten wir das Statistik- und Analyse-Programm SPSS Statistics 20. Dabei führten wir den Mann-Whitney-U-Test durch, ein Test, der für ordinale und kontinuierliche Daten geeignet ist, ohne dabei eine Normalverteilung vorauszusetzen [78]. Das Signifikanzniveau wurde bei allen Tests auf $p < 0,05$ festgelegt. Für die Darstellung von Ergebnissen in Boxplots verwendeten wir das Programm Datadesk.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen

3.1.1 Genexpressionsanalyse des TGF β RII

3.1.1.1 Kontrolle der cDNA mittels β -Actin-PCR

Nach Isolierung der RNA aus den Lebern der unbehandelten Kontrolltiere und der Tiere nach CCl₄-Injektionen über 1 Woche wurde diese in einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.2). Um den Erfolg der RT-Reaktion nachzuweisen, erfolgte eine PCR für β -Actin. Die amplifizierten Produkte der β -Actin-PCR wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei zeigte sich in allen untersuchten Proben eine gleichmäßige Bande für β -Actin (Abb. 3.1).

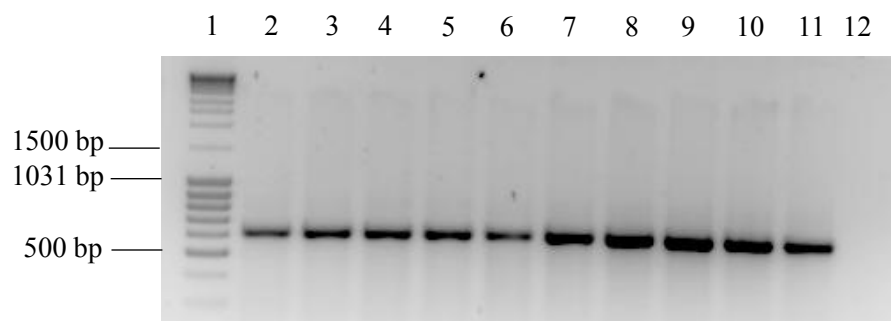


Abbildung 3.1: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach β -Actin-PCR. Spur 1: DNA-Leiter, Spur 2-11: β -Actin-spezifische PCR-Produkte, Spur 12: Negativkontrolle.

3.1.1.2 Relative Genexpression des TGFbRII

Zur Bestimmung der Konzentration der TGFbRII-mRNA und damit indirekt der Genexpression führten wir eine quantitative real-time PCR durch. Als Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen 18sRNA mit gemessen, wodurch eine Normalisierung der Werte mit anschließender relativer Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ermöglicht wurde. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung sind in der Tabelle 3.1 aufgeführt.

Die Ergebnisse der relativen Genexpression zeigten im Vergleich zwischen den Männchen tendenziell eine erhöhte Expression des TGFbRII innerhalb der Linie BXD 24a, obgleich die Ergebnisse des Assays keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Linien ergaben (siehe Abb. 3.2). Eine signifikante ($p < 0,0001$) Zunahme der Genexpression des TGFbRII innerhalb beider Linien zeigte sich nach CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von einer Woche, wobei sich weiterhin keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien darstellen ließen.

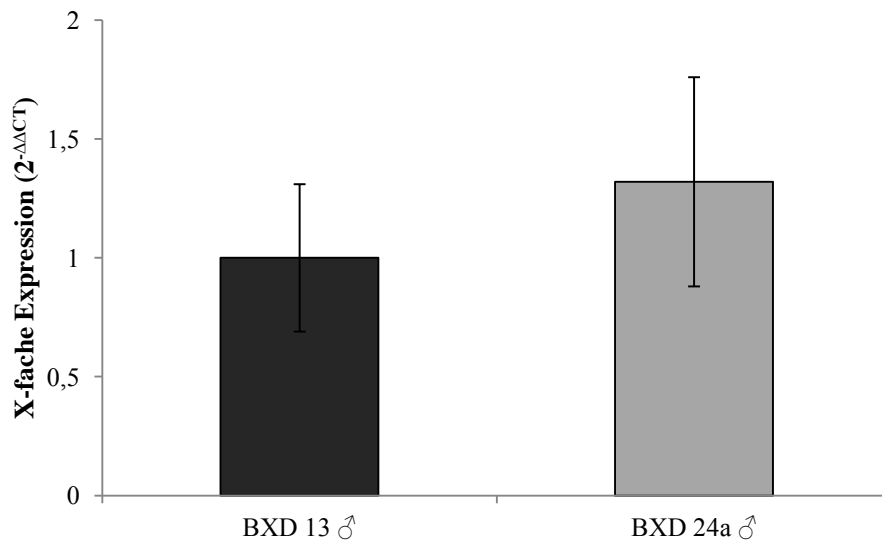


Abbildung 3.2: Relative Expressionsunterschiede des TGFbRII in unbehandelten männlichen Tieren der Linien BXD 13 und BXD 24a, standardisiert auf männliche BXD 13. MW \pm SD.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der relativen Quantifizierung des TGFbRII nach der $\Delta\Delta$ -Methode.

Linie	TGFbRII CT	18sRNA CT	Δ CT (MW TGFbRII CT - MW 18sRNA CT)	$\Delta\Delta$ CT (MW Δ CT - MW Δ CT Kontrollen)	Normalisierung TGFbRII auf unbehandelte Kontrollen ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
<i>Unbehandelte Kontrollen</i>					
BXD 13	27,89	11,60	16,29		
	27,37	11,13	16,23		
	28,44	12,01	16,43		
	27,94	11,83	16,05		
	27,40	11,88	15,52		
MW	27,81 \pm 0,44	11,69 \pm 0,35	16,11 \pm 0,35	0 \pm 0,56	1 (0,68-1,48)
BXD 24a	27,45	11,74	15,70		
	28,55	13,05	15,51		
	27,86	11,49	16,37		
	27,94	10,63	17,31		
	28,52	12,30	16,21		
	29,10	12,53	16,57		
MW	28,24 \pm 0,60	11,96 \pm 0,86	16,28 \pm 0,65	0 \pm 1,04	1 (0,49-2,06)
<i>Kurzzeit-CCl₄</i>					
BXD 13	26,72	12,73	13,99		
	27,31	12,98	14,33		
	27,71	13,67	14,03		
	27,45	12,67	14,78		
	27,94	12,73	15,20		
	27,41	13,16	14,25		
MW	27,42 \pm 0,41	12,99 \pm 0,38	14,43 \pm 0,47	-1,67 \pm 0,56	3,18 (2,15-4,71)
BXD 24a	27,76	13,63	14,13		
	26,92	12,31	14,61		
	27,07	12,86	14,21		
	27,41	12,88	14,53		
MW	27,29 \pm 0,38	12,92 \pm 0,54	14,37 \pm 0,23	-1,91 \pm 0,66	3,76 (2,38-5,93)

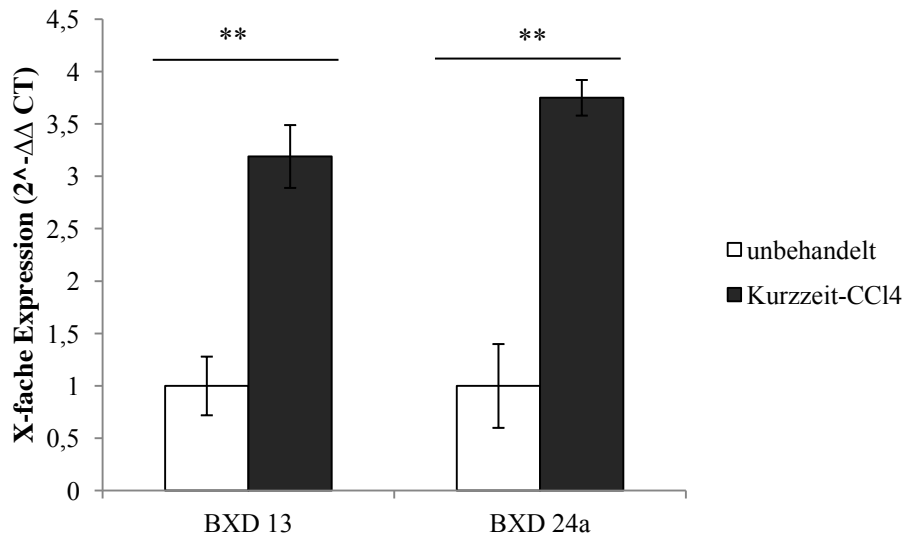


Abbildung 3.3: Relative Genexpression des TGFbRII der Linien BXD 13 und BXD 24a bei unbehandelten Kontrolltieren und Tieren nach einwöchiger CCl₄-Injektionsbehandlung. MW ± SE, ** p < 0,0001.

3.1.2 Expression des TGFbRII auf Proteinebene

Als Grundlage dieser Arbeit dienten die Daten der basalen Genexpression des TGFbRII der Linien BXD 13 und BXD 24a. Um zu klären, ob der Unterschied der Genexpression sich ebenfalls auf Proteinebene darstellen lässt, führten wir einen Western-Blot durch.

Der Western-Blot zeigte im Bereich von 70 kD zwei nahe aneinander liegende Banden, die als TGFbRII identifiziert wurden. Für die Quantifizierung mit anschließendem β -Actin-Abgleich wurden beide Banden berücksichtigt. Zur Kontrolle des Western-Blots wurde die Proteinexpression des Housekeeping-Gens β -Actin nachgewiesen. In allen Proben zeigte sich eine gleichmäßige Bande für β -Actin in Höhe von 43 kD. Dadurch konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Proben detektierbares Protein vorhanden war und eine gleichmäßige Ladung der Kammern erfolgte. In der Western-Blot-Analyse der Lebern von unbehandelten Kontrolltieren konnte eine Differenz auf Proteinebene gezeigt werden. Die Linie BXD 24a wies eine höhere Proteinkonzentration der Leber auf als die Linie BXD 13 ($2,55 \pm 0,74$ vs $1,45 \pm 0,32$, p = 0,03; Abb. 3.4).

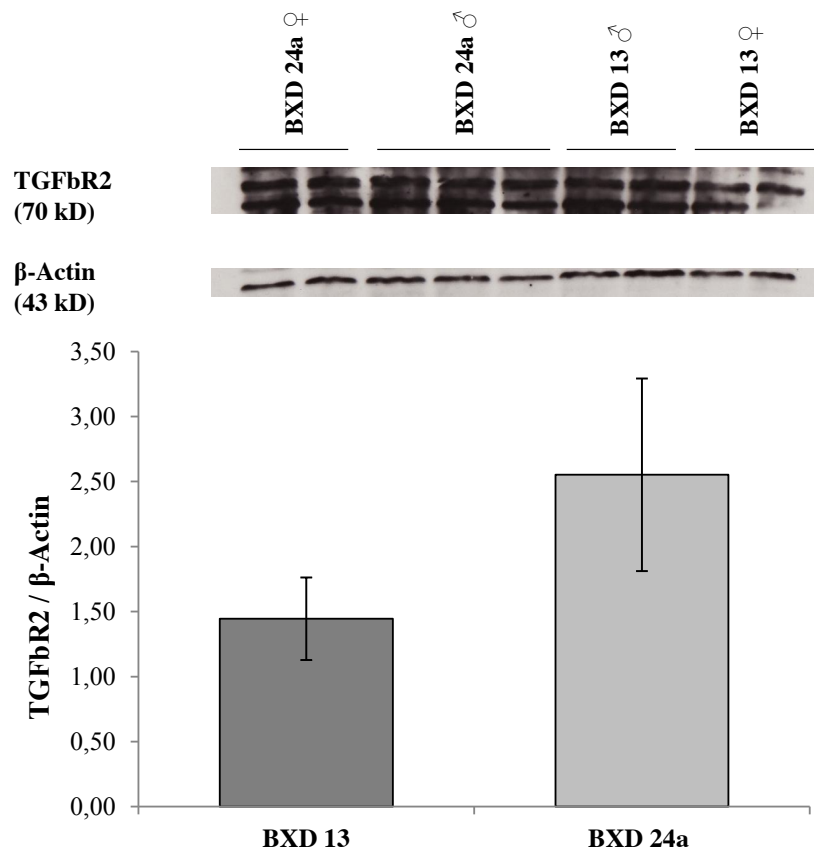


Abbildung 3.4: Western-Blot-Analyse des TGFbR2 der Linien BXD 13 und BXD 24a. Leberproben von unbehandelten Kontrolltieren wurden hinsichtlich ihrer Proteinexpression des TGFbR2 verglichen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot. Angabe der Proteingröße der sichtbaren Banden in Kilodalton (kD). Quantifizierung des Western Blots mit Normierung auf β -Actin als Ladungskontrolle. Die Linie BXD 24a (n=5) zeigt gegenüber der Linie BXD 13 (n=4) eine höhere Proteinexpression des TGFbR2. MW \pm SD.

Der Unterschied der TGFbR2-Expression auf Proteinebene war dabei zwischen den männlichen Tieren der Linien BXD 13 und BXD 24a deutlich höher als der Unterschied zwischen den weiblichen Tieren (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Ergebnisse des β -Actin-Abgleich zwischen den Linien BXD 13 und BXD 24a, aufgeteilt nach Geschlecht.

Linie	n	MW	SD	SE
BXD 13 männl.	2	1,35	0,27	0,19
BXD 13 weibl.	2	1,54	0,43	0,30
BXD 24a männl.	3	2,86	0,82	0,48
BXD 24a weibl.	2	2,09	0,34	0,24

Nach Behandlung der Tiere mittels CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von 1 Woche konnte ebenfalls ein Unterschied in der Proteinexpression des TGF β RII verifiziert werden. In dieser Western-Blot-Analyse zeigte sich in Höhe von 70 kD vor allem bei der Linie BXD 24a die bereits bei der Analyse der unbehandelten Kontrolltiere aufgefallenen zwei nahe aneinander liegenden Banden; bei der Linie BXD 13 hingegen war die obere Bande nur sehr schwach angefärbt. Insgesamt zeigte sich in dieser Analyse ebenfalls eine höhere Proteinkonzentration in den Lebern der Linie BXD 24a als in der Linie BXD 13 ($0,52 \pm 0,12$ vs $0,31 \pm 0,08$, $p=0,03$). Die Bande von β -Actin in Höhe von 43 kD zeigte in allen Proben eine vergleichbare Intensität.

Innerhalb der Linien BXD 13 und BXD 24a zeigten sich keine deutlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede (Tab 3.3).

Tabelle 3.3: Ergebnisse des β -Actin-Abgleich nach CCl_4 -Injektionen über 1 Woche zwischen den Linien BXD 13 und BXD 24a, aufgeteilt nach Geschlecht.

Linie	n	MW	SD	SE
BXD 13 männl.	2	0,34	0,13	0,09
BXD 13 weibl.	2	0,29	0,02	0,01
BXD 24a männl.	2	0,51	0,03	0,02
BXD 24a weibl.	2	0,54	0,21	0,15

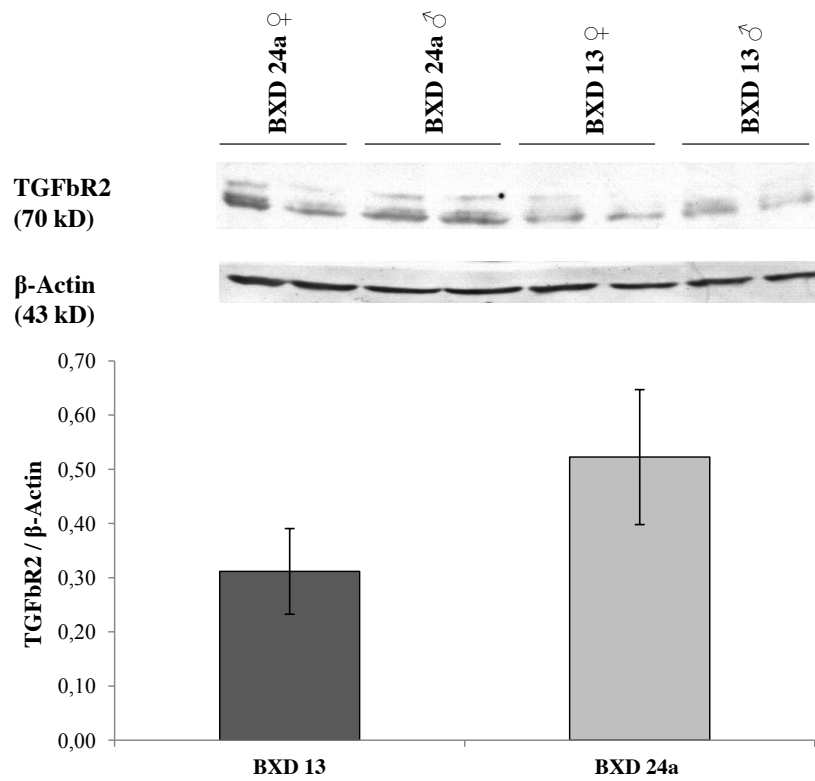


Abbildung 3.5: Western-Blot-Analyse des TGFbR2 der Linien BXD 13 und BXD 24a. Leberproben von Mäusen nach CCl₄-Injektionen über einen Behandlungszeitraum von 1 Woche wurden hinsichtlich ihrer Proteinexpression des TGFbR2 verglichen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot. Angabe der Proteingröße der sichtbaren Banden in Kilodalton (kD). Quantifizierung des Western Blots mit Normierung auf β-Actin als Ladungskontrolle. Die Linie BXD 24a (n=4) zeigt gegenüber der Linie BXD 13 (n=4) eine höhere Proteinexpression des TGFbR2. MW ± SD.

3.2 Korrelation von TGFbR2-Expression mit der Proliferationsaktivität

3.2.1 Etablierung von GIMP zur Quantifizierung der ki67-Färbung

Zur Auswertung unserer ki67-Färbung wendeten wir im Rahmen dieser Arbeit erstmals das Programm GIMP an. Durch dieses Programm ist es möglich, histologische Schnittpräparate mit einer höheren Effizienz bei gleichzeitiger Beurteilung eines größeren Bereiches des Schnittpräparates auszuwerten. Die Auswertung mittels GIMP wurde in Abschnitt 2.3.5.1 ausführlich beschrieben.

Zur Etablierung dieses Verfahrens werteten wir zunächst die lichtmikroskopischen Bilder in der 400-fachen Vergrößerung (n=5/Objekträger) aus, die wir für die konventionelle Auswer-

tung der ki67-Färbung aufgenommen hatten. Dabei wurden die ki67-positiven Zellen per Hand ausgezählt und anschließend mit allen Zellen eines Bildes in Relation gesetzt. Nach Auswertung der Bilder in 400-facher Vergrößerung der ki67-Färbung per Hand und mittels GIMP zeigten die ermittelten Werte dieselbe Tendenz.

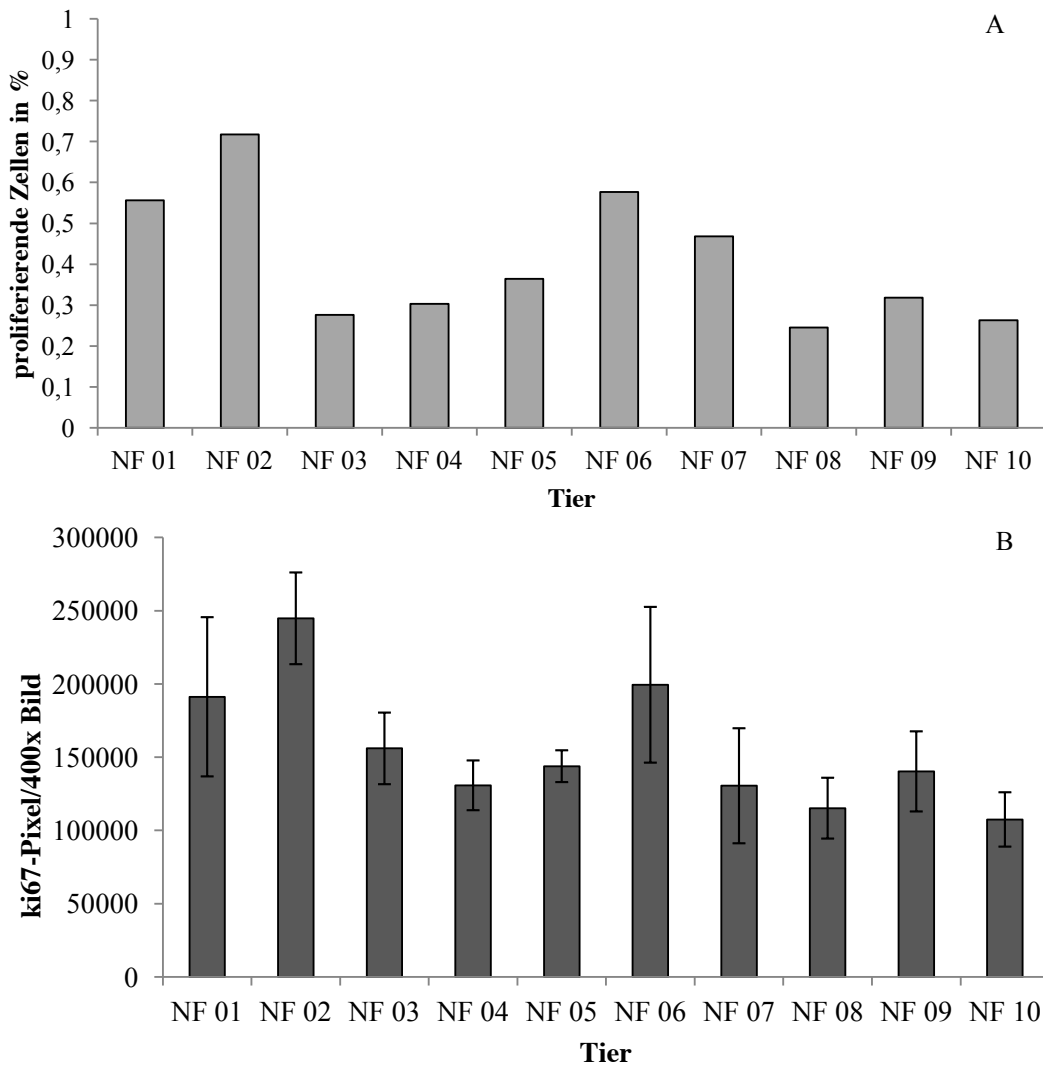


Abbildung 3.6: Quantifizierung der ki67-Färbung. Für die Quantifizierung wurden lichtmikroskopische Bilder in einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen und anschließend per Hand (Abb. 3.6A) und mittels GIMP (Abb. 3.6B) ausgewertet. MW \pm SD.

Um herauszufinden, ob durch einen größeren Bildausschnitt eine bessere Repräsentation der Objekte gegeben ist, wurde anschließend eine weitere Auswertung mit GIMP vorgenommen. Dafür fertigten wir repräsentative Bilder in einer 100-fachen Vergrößerung (n=3/Objekträger) an. Durch Aufnahmen der Bilder in einer 100-fachen Vergrößerung kann ein deutlich größerer

Teil der Leberfläche analysiert werden. Wir fertigten pro Tier neun Bilder in 100-facher Vergrößerung an. Verglichen mit den 15 Bildern pro Tier in 400-facher Vergrößerung kann dadurch ein 9 x größerer Flächenanteil des Leberpräparates untersucht werden. Nach Quantifizierung der positiven Zellen mit GIMP zeigte sich erneut dieselbe Tendenz zu den bereits ermittelten Werten (Abb. 3.7).

Die Stärke des beobachteten Zusammenhangs zwischen den ermittelten Werten wurde durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ($r=0,87$) bestätigt. Das Verfahren mittels GIMP stellte sich somit als deutlich effektiver dar und bietet zugleich die Möglichkeit einer großflächigeren und damit repräsentativeren Auswertung der Färbungen.

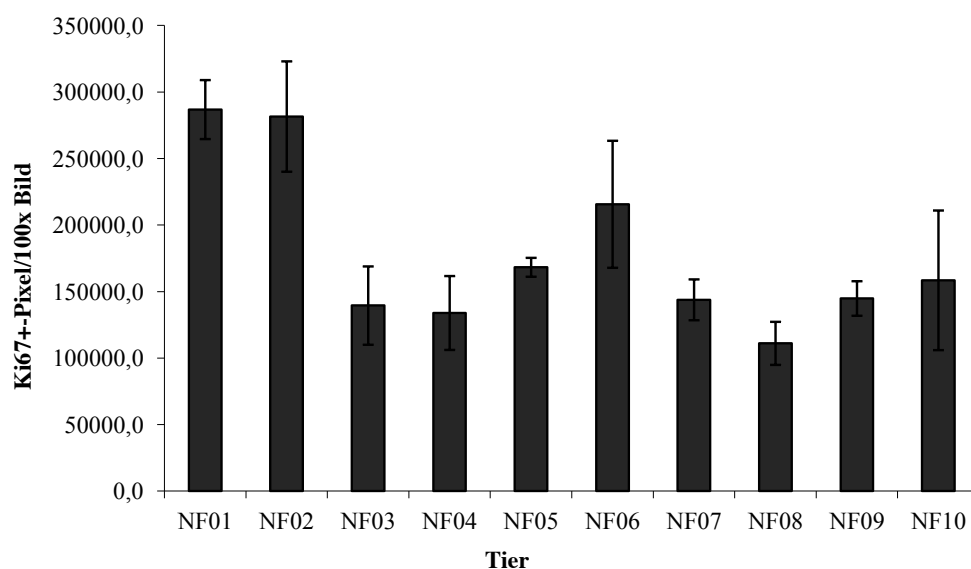


Abbildung 3.7: Quantifizierung der ki67-Pixel mittels GIMP. Die Auswertung der ki67-positiven Pixel erfolgte an Bildern in 100-facher Vergrößerung. MW \pm SD.

3.2.2 Erhöhte Proliferationsaktivität bei Tieren mit hoher TGF β RII-Expression nach Kurzzeit-Schädigung durch CCl $_4$

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wurden die Paraffin-Schnitte der CCl $_4$ -geschädigten Lebern immunhistochemisch mit ki-67 gefärbt. Durch die ki67-Färbung lassen sich die proliferierenden Zellkerne braunrot darstellen. Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch zwei Leberhistologien der Linien BXD 13 und BXD 24a nach Kurzzeit-Behandlung mit CCl $_4$ über 1 Woche. Von jedem Tier ($n=10$) wurden drei Schnitte der ki67-Färbung unterzogen und für die anschließende Quantifizierung pro Schnitt drei repräsentative Bilder in einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen.

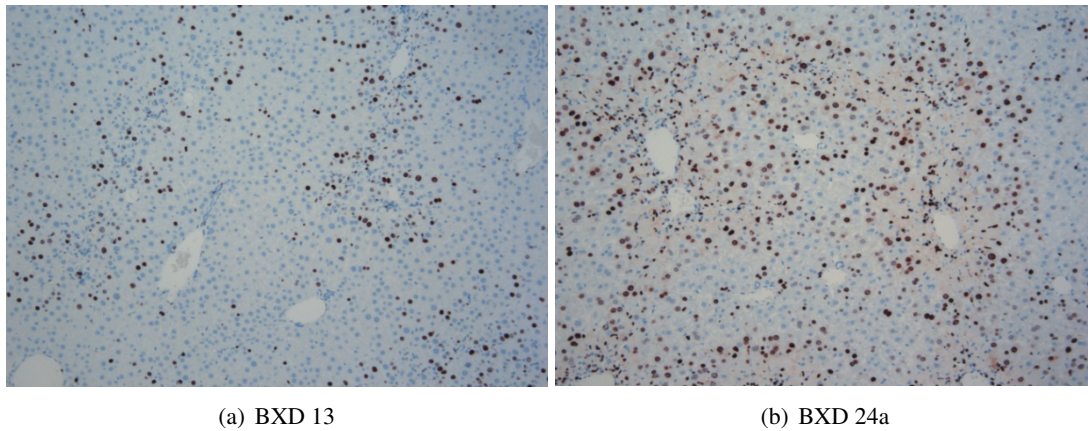


Abbildung 3.8: Exemplarische Darstellung zweier ki67-gefärbter Schnitte der untersuchten Linien BXD 13 und BXD 24a. Durch die ki67-Färbung werden proliferierende Zellkerne rotbraun dargestellt. Nach einem Behandlungszeitraum von 1 Woche mit CCl_4 zeigt die Linie BXD 24a eine deutlich höhere Proliferation in der Leberhistologie als die Linie BXD 13. Vergrößerung 100-fach.

Die angefertigten Bilder wurden verblindet mittels GIMP ausgewertet, indem die Pixelwerte der ki67-positiven Zellen erfasst wurden. Zwischen den einzelnen Tieren waren zum Teil deutliche Unterschiede in der Höhe der Proliferationsaktivität festzustellen.

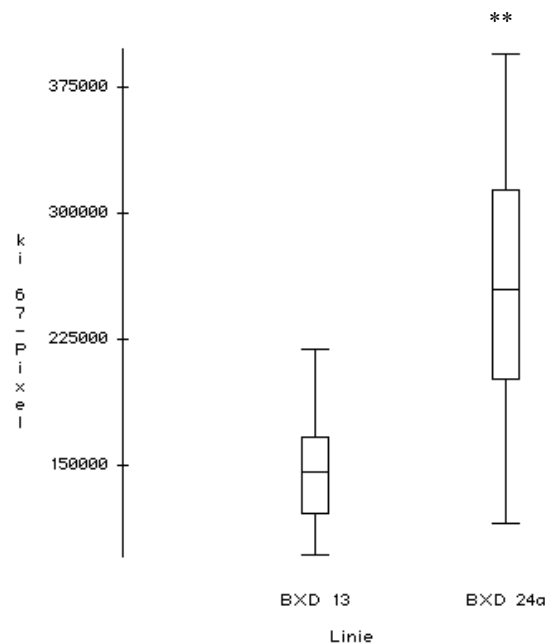


Abbildung 3.9: Hepatische Proliferationsaktivität (ki67-Pixel) nach CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von einer Woche. Die Tiere der Linie BXD 24a ($n=4$) zeigen hierbei eine signifikant (** $p < 0,0001$) höhere Proliferation als die Tiere der Linie BXD 13 ($n=6$).

Die Abbildung 3.9 fasst die ermittelten Werte der Proliferation für die Linien BXD 13 und BXD 24a im Vergleich zusammen. Insgesamt weisen die Tiere der Linie BXD 24a (n=4) die höchste Proliferationsaktivität (253872 ± 77228 ki67-Pixel/100x Bild) auf, während bei der Linie BXD 13 (n=6) deutlich niedrigere Werte der hepatischen Proliferationsaktivität ($146948 \pm 30836/100x$ Bild) beobachtet wurden. Die Linie BXD 24a wies damit signifikant ($p < 0,0001$) höhere ki67-Pixelwerte auf als die Linie BXD 13. Die Gegenüberstellung der hepatischen Proliferationsaktivität der Linie BXD13 zeigte keine Unterschiede zwischen Männchen (141902 ± 28501 ki67-Pixel/100x Bild) und Weibchen (151995 ± 32758 ki67-Pixel/100x Bild). Im Gegensatz dazu zeigen die weiblichen Tiere der Linie BXD 24a (292149 ± 63174 ki67-Pixel/100x Bild) eine höhere Proliferationsaktivität als die männlichen Tiere (215595 ± 72011 ki67-Pixel/100x Bild).

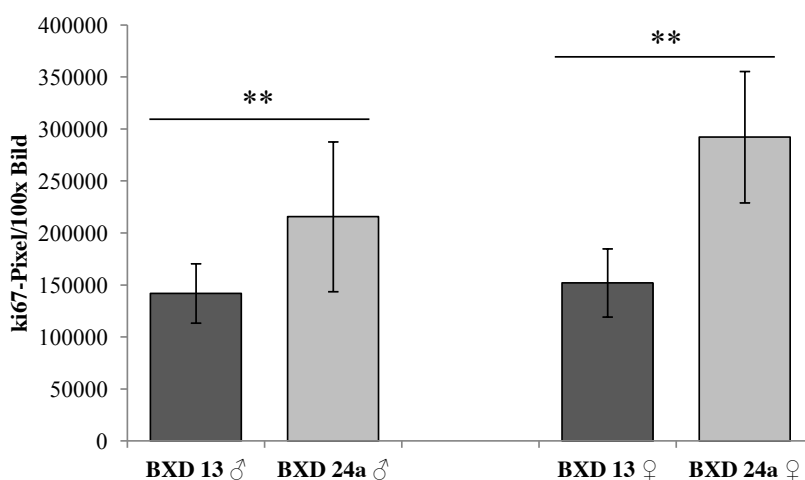


Abbildung 3.10: Hepatische Proliferationsaktivität nach CCl_4 -Injektionen über 1 Woche. MW \pm SD, ** $p < 0,0001$.

Die höhere Proliferationsaktivität der Linie BXD 24a erweist sich auch bei Gegenüberstellung der Linien BXD 13 und BXD 24a getrennt nach Geschlechtern als signifikant ($p < 0,0001$).

3.2.3 Veränderung der Proliferationsaktivität nach Langzeit-Schädigung mittels CCl_4

Um die Auswirkungen einer Schädigung durch CCl_4 über eine längere Zeit zu untersuchen, wurde bei jeweils 6 Tieren der Linien BXD 13 und BXD 24a eine CCl_4 -Behandlung über einen Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt, bei der zweimal wöchentlich CCl_4 gewichtsadaptiert injiziert wurde. Die Schnitte der in Paraffin eingebetteten Lebern wurden ebenfalls der im-

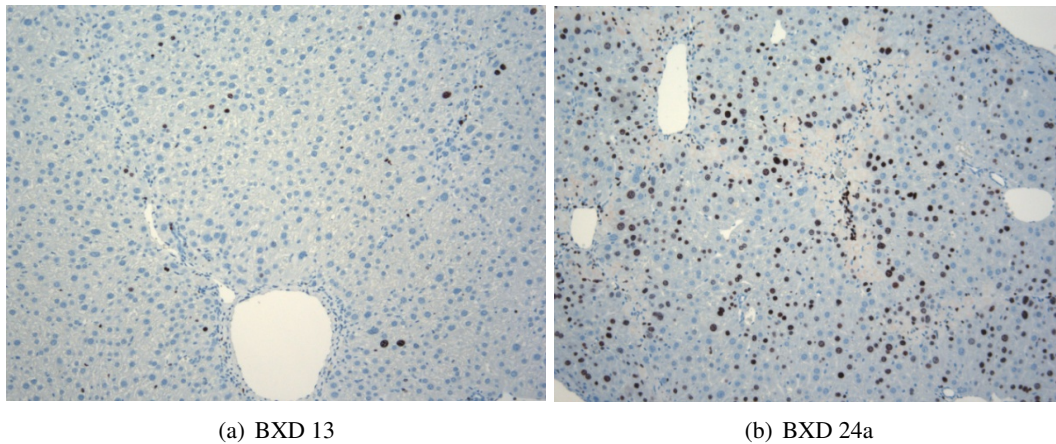


Abbildung 3.11: Darstellung von zwei Leberhistologien nach immunhistochemischer ki67-Färbung der Linie BXD 13 und BXD 24a. Die linke Leberhistologie zeigt ein Areal mit vergleichsweise niedriger Proliferationsaktivität, auf der rechten Leberhistologie zeigt sich eine relativ hohe Proliferationsaktivität. Vergrößerung 100-fach.

munhistochemischen ki67-Färbung unterzogen und verblindet in neun repräsentativen Bildern mittels GIMP die Pixelzahlen für ki67-positive rotbraune Zellen ermittelt. Die Anzahl der ki67-gefärbten Zellkerne differierte zum Teil beträchtlich zwischen den Tieren ($n=12$). Bei einzelnen Tieren stellten wir eine deutliche Akkumulation der ki67-positiven Zellkerne fest, bei anderen wiederum fanden sich lediglich einzelne ki67-positive Zellkerne (Abb. 3.11).

Zwischen den Linien BXD 13 und BXD 24a zeigt sich nach 6-wöchiger Behandlung mit CCl_4 insgesamt eine höhere mittlere Proliferationsaktivität der Linie BXD 24a (96185 ± 39167 ki67-Pixel/100x Bild) gegenüber der Linie BXD 13 (57340 ± 56581 ki67-Pixel/100x Bild). Der Unterschied zwischen den Linien erwies sich dabei nach Anwendung des Mann-Whitney-U-Test als signifikant ($p < 0,001$).

Die weiblichen Tiere der Linie BXD 13 zeigen nach 6-wöchiger Behandlung mit CCl_4 eine höhere Proliferation in den mit ki67-gefärbten Schnitten der Leber als die männlichen Tiere (91892 ± 56871 ki67-Pixel/100x Bild vs. 22788 ± 28498 ki67-Pixel/100x Bild). Innerhalb der Linie BXD 24a fiel bei den Männchen eine deutlich höhere Proliferation (122279 ± 34672 ki67-Pixel/100 x Bild) auf als bei den Weibchen (70091 ± 22600 ki67-Pixel/100x Bild). Bei Vergleich der mittleren hepatischen Proliferationsaktivität zwischen Männchen der beiden Linien bestätigte sich der beobachtete Unterschied in der Proliferation. Die Männchen der Linie BXD 24a zeigen eine signifikant ($p < 0,0001$) höhere mittlere Proliferationsaktivität (122279

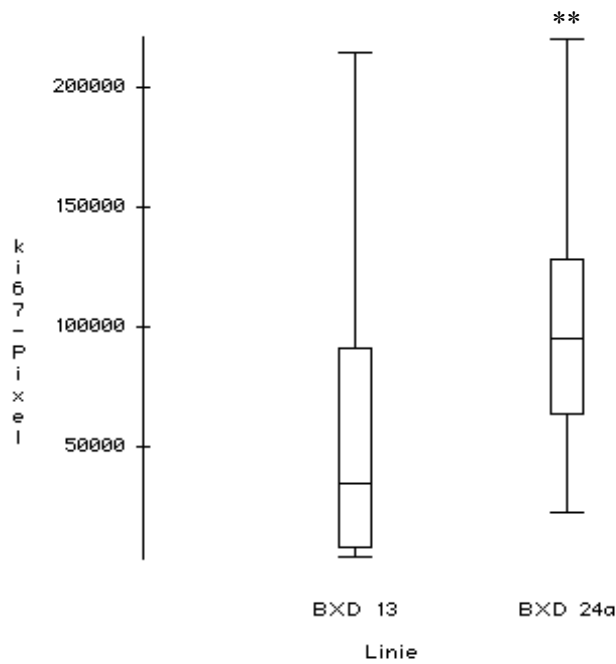


Abbildung 3.12: Hepatische Proliferationsaktivität (ki67-Pixel) im Vergleich zwischen den Linien BXD 13 (n=6) und BXD 24a (n=6) nach CCl₄-Injektionen über einen Zeitraum von 6 Wochen. Die Linie BXD 24a weist gegenüber der Linie BXD 13 eine signifikant (** p<0,0001) höhere hepatische Proliferationsaktivität auf. Darstellung als Boxplot.

± 34672 ki67-Pixel/100x Bild) als die Männchen der Linie BXD 13 (22789 ± 28498 ki67-Pixel/100x Bild).

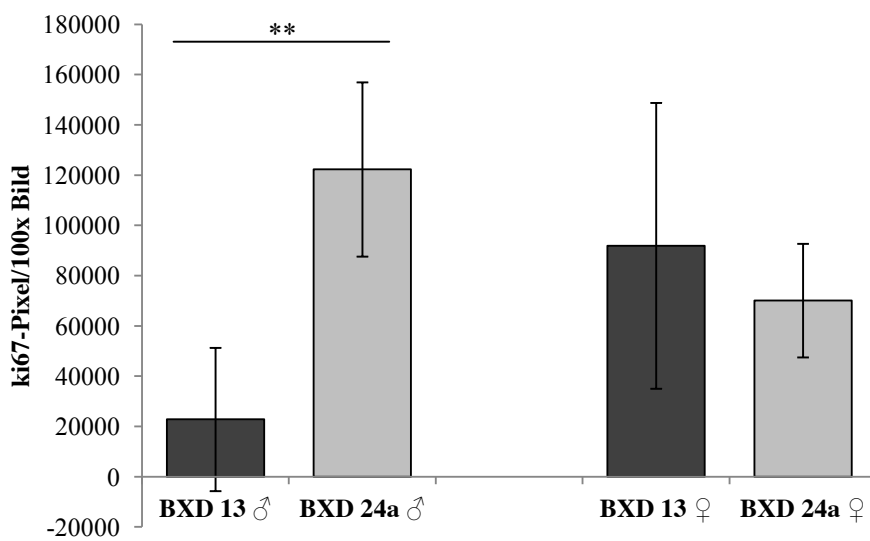


Abbildung 3.13: Hepatische Proliferationsaktivität nach Langzeitschädigung mit CCl₄ über einen Zeitraum von 6 Wochen. MW ± SD, ** p<0,0001.

Die weiblichen Tiere zeigen eine entgegengesetzte Relation zwischen Proliferationsaktivität und TGF β RII-Expression nach einer Langzeitschädigung durch CCl $_4$ (Abb. 3.13). Bei den Weibchen der Linie BXD 13 stellten wir eine höhere mittlere Proliferationsaktivität (91892 ± 56871 ki67-Pixel/100x Bild) als bei den Weibchen der Linie BD 24a (70091 ± 22600 ki67-Pixel/100x Bild) fest. Der Unterschied zeigt in diesem Fall mit einem $p = 0.07$ keine statistische Signifikanz zwischen den beiden untersuchten Linien.

Durch Verlängerung des Behandlungszeitraumes mit CCl $_4$ von 1 Woche auf 6 Wochen nahm die Proliferationsaktivität der Leber deutlich ab. Sowohl die Linie BXD 13 als auch die Linie BXD 24a zeigten nach Verlängerung des Behandlungszeitraumes auf 6 Wochen eine signifikant ($p < 0,0001$) geringere mittlere Proliferationsaktivität. Die Linie BXD 24a zeigt insgesamt über beide Behandlungszeiträume eine signifikant ($p < 0,0001$) höhere mittlere Proliferationsaktivität als die Linie BXD 13 (Abb. 3.14).

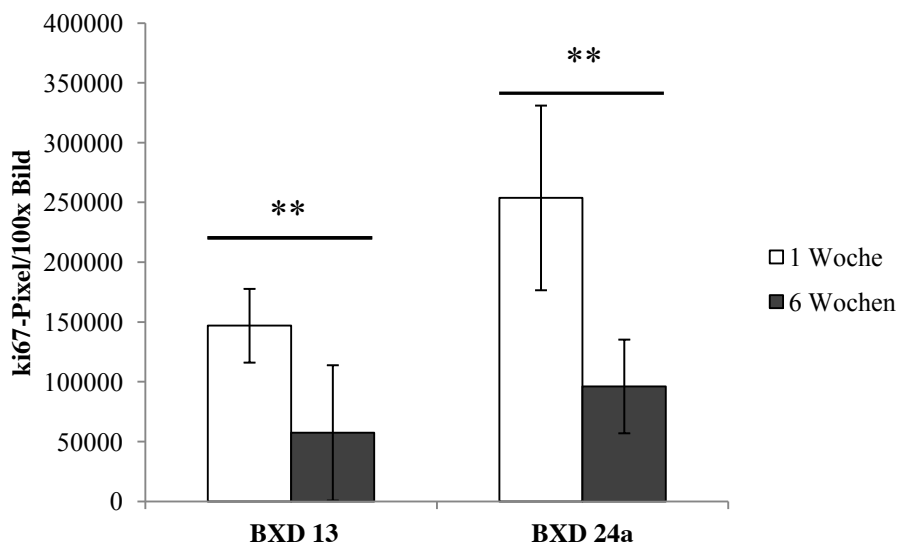


Abbildung 3.14: Darstellung der hepatischen Proliferationsaktivität nach CCl $_4$ -Injektionen über einen Zeitraum von 1 und 6 Wochen. MW \pm SD, ** $p < 0,0001$.

3.3 Analyse des Kollagengehaltes nach Leberschädigung

3.3.1 Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung nach Kurzzeit- CCl_4

Die Schnitte der in Paraffin eingebetteten Lebern der Linien BXD 13 und BXD 24a wurden mit Siriusrot gefärbt, um den Kollagengehalt der Leber nach CCl_4 -Injektionen zu quantifizieren. Von jedem Tier ($n=10$) wurde jeweils ein Schnitt gefärbt und verblindet lichtmikroskopisch mit Hilfe des Programmes Leica Application Suite ausgewertet (Abschnitt 2.3.4). Durch Siriusrot gefärbte Kollagenfasern fanden sich vorwiegend in periportalen Bereichen der Leber (Abb. 3.15).

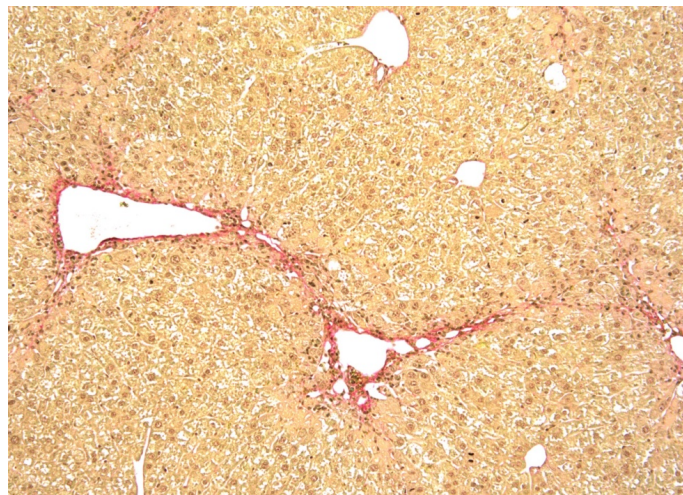


Abbildung 3.15: Ausschnitt eines Präparates in 100-facher Vergrößerung nach Siriusrot-Färbung. Die Kollagenfasern stellen sich rot dar, das restliche Gewebe erscheint in einer gelblichen Färbung.

Insgesamt wies die Linie BXD 13 einen signifikant ($p < 0,001$) höheren Kollagengehalt der Leber auf als die Linie BXD 24a ($0,84 \% \pm 0,40$ bzw. $0,57 \% \pm 0,37$; Abb. 3.16). Damit zeigte sich ein erhöhter Kollagengehalt bei Tieren mit niedrigerer Genexpression des TGF β RII.

Zwischen Männchen und Weibchen der Linien BXD 13 ($0,85 \% \pm 0,40$ bzw. $0,84 \% \pm 0,41$) und BXD 24a ($0,64 \% \pm 0,40$ bzw. $0,5 \% \pm 0,32$) ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Kollagengehaltes der Leber.

Zwischen den weiblichen Tieren der Linien BXD 13 und BXD 24a (Abb. 3.17) zeigte sich ein signifikanter ($p=0,003$) Unterschied des Kollagengehaltes der Leber nach einer Woche CCl_4 -Injektionen. Die Linie BXD 13 zeigt in der Gruppe der männlichen Tiere tendenziell einen höheren Kollagengehalt der Leber als die Linie BXD 24a ($0,85 \% \pm 0,40$ bzw. $0,64 \% \pm 0,40$; Abb. 3.17).

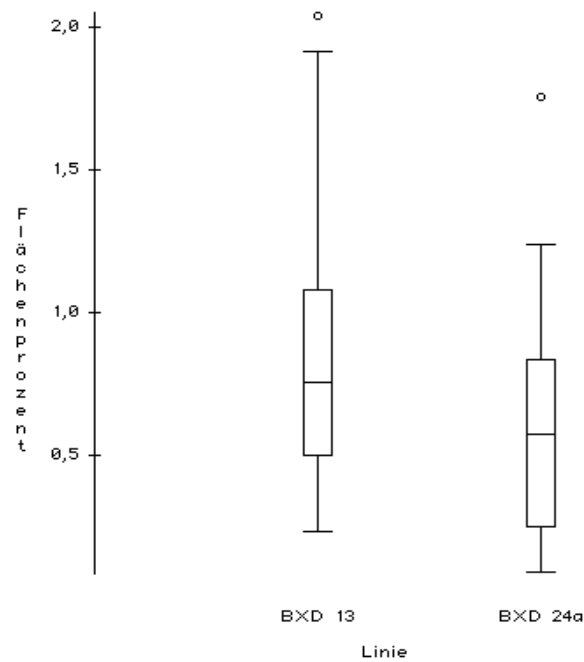


Abbildung 3.16: Prozentualer Kollagengehalt nach CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von einer Woche im Vergleich zwischen den Linien BXD 13 (n=6) und BXD 24a (n=4). Darstellung der Ergebnisse als Boxplot.

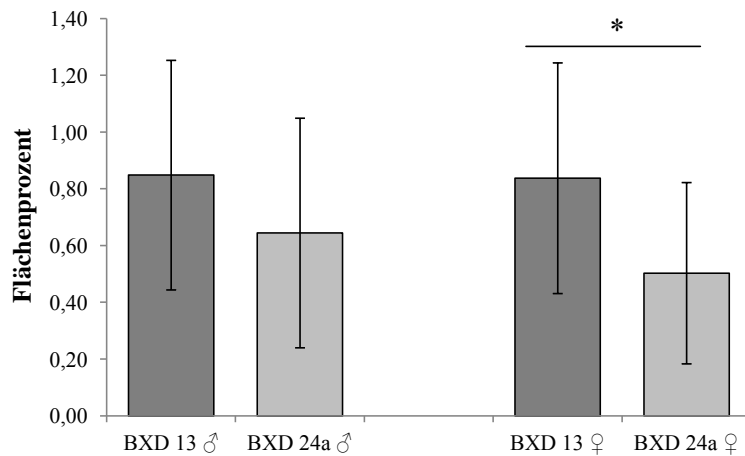


Abbildung 3.17: Mittlere Flächenprozent des Kollagengehaltes der Leber, bei männlichen und weiblichen Tieren der Linien BXD 13 und BXD 24a. MW \pm SD, ** $p < 0,0001$.

3.3.2 Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung nach Langzeit- CCl_4

Die histologischen Leberpräparate der Tiere (n=12) nach CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von 6 Wochen wurden ebenfalls der Siriusrot-Färbung unterzogen, um den Kollagengehalt zu quantifizieren.

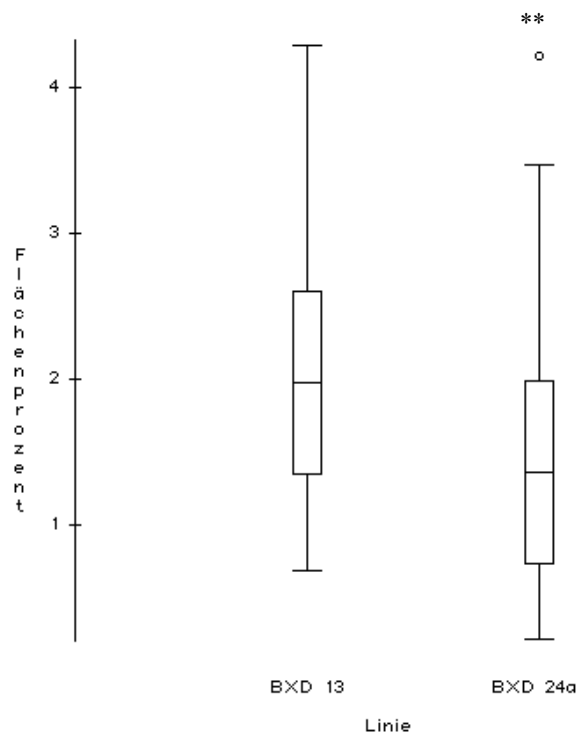


Abbildung 3.18: Prozentualer Kollagengehalt nach CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von 6 Wochen im Vergleich zwischen den Linien BXD 13 ($n=6$) und BXD 24a ($n=6$). Darstellung der Ergebnisse als Boxplot, ** $p < 0,0001$.

Insgesamt zeigte sich auch nach einem Behandlungszeitraum von 6 Wochen ein signifikant ($p=0,001$) höherer Kollagengehalt der Leber in der Linie BXD 13 gegenüber der Linie BXD 24a ($2,07 \% \pm 0,93$ bzw. $1,5 \% \pm 0,93$; Abb. 3.18). Die Ergebnisse zeigen erneut einen erhöhten Kollagengehalt der Leber bei niedrigerer TGF β RII-Expression.

Der Kollagengehalt zwischen den männlichen und weiblichen Tieren der Linie BXD 13 war vergleichbar ($2,25 \% \pm 0,89$ bzw. $1,89 \% \pm 0,95$). Innerhalb der Linie BXD 24a konnte eine geschlechtsspezifische Variation des Kollagengehaltes nach CCl_4 über einen Zeitraum von 6 Wochen beobachtet werden. Die männlichen Tiere zeigten hierbei den geringsten Kollagengehalt der Leber ($1,24 \% \pm 0,79$), während die weiblichen Tiere mit einem Kollagengehalt von $1,76 \% \pm 1,01$ eine höhere Fibrose innerhalb der Linie BXD 24a aufwiesen.

Den höchsten Kollagengehalt wiesen die männlichen Tiere der Linie BXD 13 auf ($2,25 \% \pm 0,89$). Bei den Weibchen war der Kollagengehalt der Leber zwischen den Linien BXD 13 und BXD 24a vergleichbar ($1,89 \% \pm 0,95$ bzw. $1,76 \% \pm 1,01$, Abb. 3.19).

Die Verlängerung des Behandlungszeitraumes mit CCl_4 auf 6 Wochen führte erwartungsgemäß zu einem deutlichen Anstieg der Fibrose (Abb. 3.20). Beide untersuchten BXD-Linien wiesen

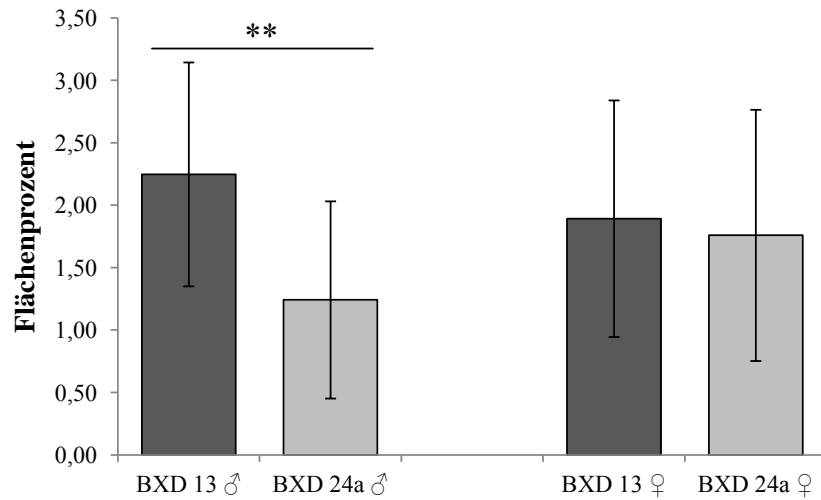


Abbildung 3.19: Mittlere Flächenprozent des Kollagengehaltes der Leber bei männlichen und weiblichen Tieren der Linien BXD 13 und BXD 24a. MW \pm SD, ** $p < 0,0001$.

nach 6-wöchiger Behandlung mit CCl_4 eine signifikant ($p < 0,0001$) höhere Fibrose auf. Dabei fiel bei der Linie BXD 13 sowohl nach einer Behandlung mit CCl_4 über 1 Woche als auch über 6 Wochen eine signifikant stärkere Fibrose auf als bei der Linie BXD 24a. Damit zeigen die Ergebnisse der Siriusrot-Färbung einen umgekehrten Trend zur Proliferation.

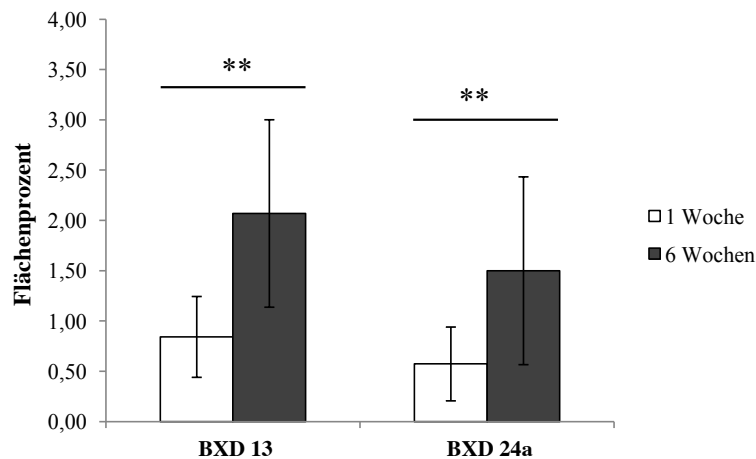


Abbildung 3.20: Mittlere Flächenprozent der Siriusrot-gefärbten Fläche der Leber nach CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von 1 und 6 Wochen der Linien BXD 13 und BXD 24a. MW \pm SD, ** $p < 0,0001$.

3.4 Einfluss der Leberschädigung auf die Apoptose

3.4.1 Apoptose in der Leber nach Kurzzeit- CCl_4

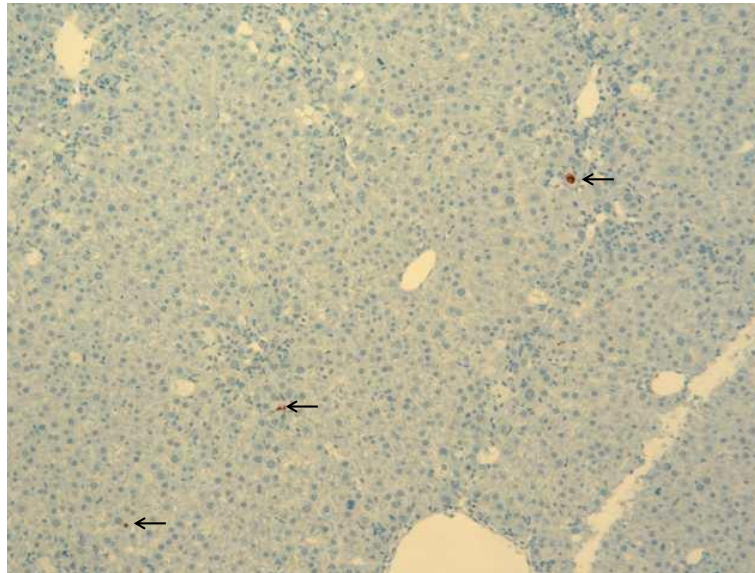


Abbildung 3.21: Darstellung eines exemplarischen Leberpräparates nach TUNEL-Färbung der Linie BXD 24a. Die Pfeile markieren braun gefärbte TUNEL positive, apoptotische Zellkerne. Vergrößerung 100-fach.

Um den Einfluss des TGF β R2 auf die Apoptose nach Schädigung der Leber durch CCl_4 zu untersuchen, führten wir eine TUNEL-Färbung an den Schnitten der in Paraffin eingebetteten Lebern der Tiere ($n=10$) mit Kurzzeit- CCl_4 über 1 Woche durch. Durch Markierung der Strangbrüche, die im Rahmen der Apoptose auftreten, werden die apoptotischen Zellkerne bräunlich gefärbt. Insgesamt zeigte sich in den Präparaten meistens vereinzelt vorkommende apoptotische Zellkerne (Abb. 3.21).

Zusätzlich berechneten wir für die untersuchten $n=10$ Tiere den Apoptoseindex. Dafür wurden die positiven Zellen der analysierten Bilder ($n=15/\text{Tier}$) addiert und durch die Gesamtzahl der Zellkerne aus 15 Bildern dividiert. Die Werte für den Apoptoseindex lagen zwischen 1,12–2,60 %. Der Mittelwert des Apoptoseindex lag bei $1,92 \% \pm 0,51$. (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Apoptoseindex [%] der untersuchten Tiere (n=10) nach Kurzzeit-CCl₄ über 1 Woche.

Tier	Geschlecht	Apoptoseindex [%]
Tier 1	w	2,42
Tier 2	w	2,39
Tier 3	w	1,59
Tier 4	w	2,21
Tier 5	w	2,60
Tier 6	m	1,12
Tier 7	m	1,30
Tier 8	m	2,17
Tier 9	m	1,66
Tier 10	m	1,70
MW		1,92
SD		0,51

Die Apoptoseindizes und damit das Ausmaß der Apoptose nach Leberschädigung der Linien BXD 13 und BXD 24a sind vergleichbar. Die Linie BXD 13 (n=6) weist mit einem Apoptoseindex von $1,99 \% \pm 0,40$ eine geringfügig höhere Apoptoserate auf als die Linie BXD 24a (n=4) mit einem Index von $1,81 \% \pm 0,69$ (Abb 3.22). Eine Korrelation zwischen der Expression des TGFbRII und der Apoptose konnte somit nicht beobachtet werden.

Zwischen den Männchen und Weibchen der Linie BXD 13 konnte kein wesentlicher Unterschied in der mittleren Anzahl der apoptotischen Zellen gefunden werden ($3,4 \pm 1,7$ bzw. $3,93 \pm 1,98$). Die Weibchen der Linie BXD 24a weisen von allen Tieren (n=10) die größte Anzahl an apoptotischen Zellen auf ($4,43 \pm 2,34$) und zeigen damit höhere Werte als die Männchen der Linie BXD 24a, die mit $2,23 \pm 1,79$ die geringste Anzahl an TUNEL-positiven Zellkernen aufweisen.

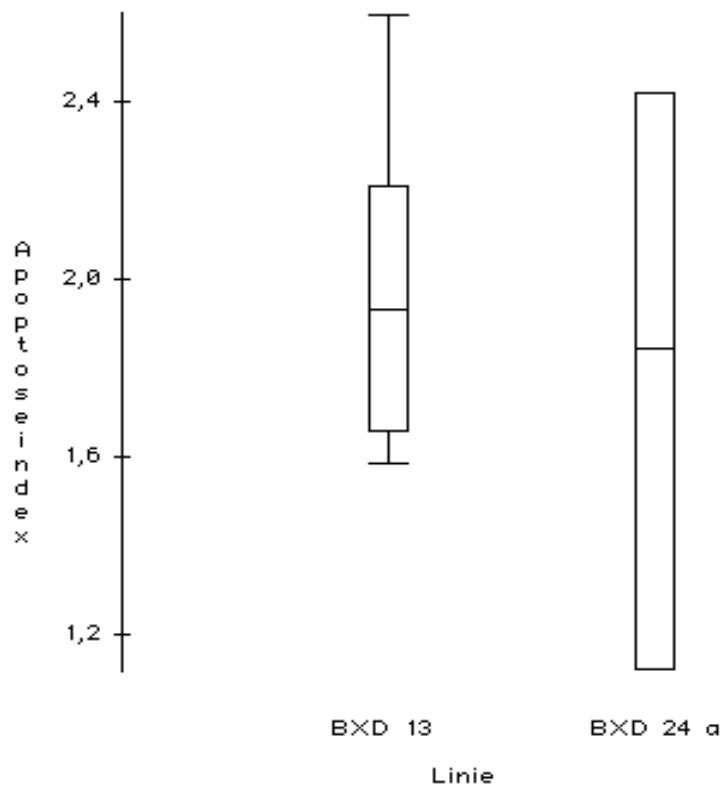


Abbildung 3.22: Apoptoseindex der Linien BXD 13 (n=6) und BXD 24a (n=4) nach 1-wöchiger Schädigung durch CCl₄-Injektionen. Darstellung als Boxplot.

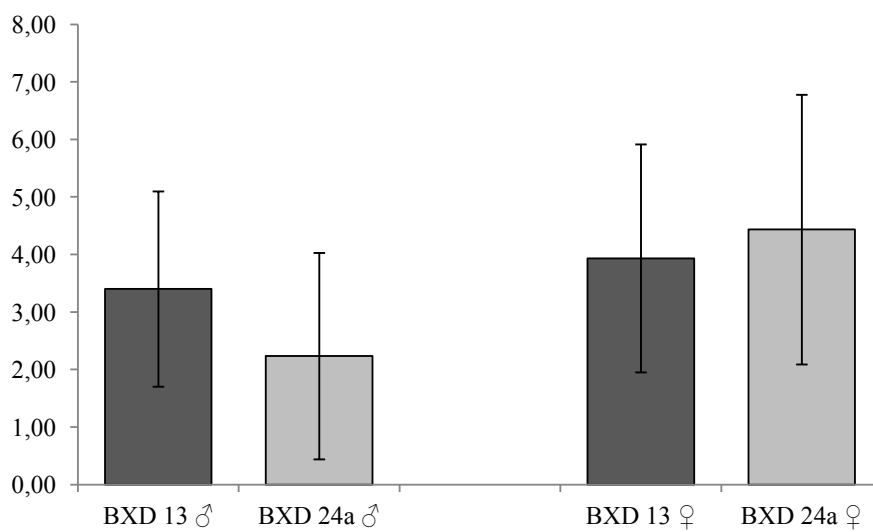


Abbildung 3.23: Mittlere Anzahl apoptotischer Zellen in den histologischen Schnittpräparaten der Leber. MW \pm SD.

Ein signifikanter ($p=0,006$) Unterschied der Apoptose findet sich zwischen Männchen der Linien BXD 13 und BXD 24a (Abb. 3.23). Die apoptotischen Zellzahlen innerhalb der Weibchen der Linien BXD 13 und BXD 24a sind vergleichbar (Abb. 3.23).

3.4.2 Apoptose in der Leber nach Langzeit- CCl_4

Die Verlängerung des Behandlungszeitraumes mit CCl_4 führte innerhalb der Linie BXD 24a zu keiner Zunahme der Apoptose der Leber. Nach 1 und 6 Wochen zeigte sich kein signifikanter ($p=0,9$) Unterschied in der Apoptose. Im Gegensatz dazu zeigt die Linie BXD 13 einen deutlichen Anstieg ($p=0,0015$) hinsichtlich der mittleren Anzahl an apoptotischen Zellen nach einem Behandlungszeitraum von 6 Wochen (Abb. 3.24).

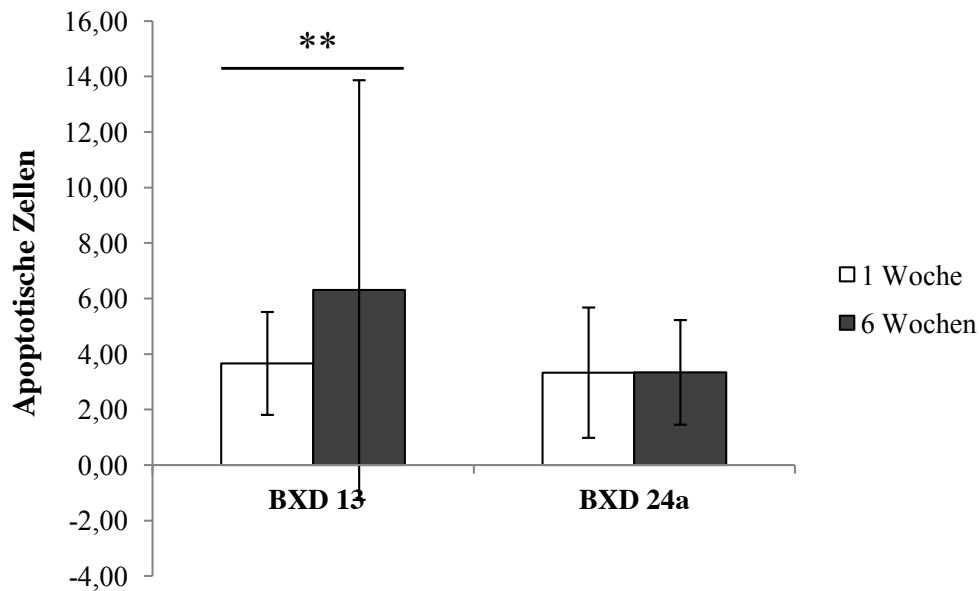


Abbildung 3.24: Mittlere Menge an apoptotischen Zellen der Linien BXD 13 und BXD 24a im Vergleich nach CCl_4 -Injektionen über einen Zeitraum von 1 und 6 Wochen. MW \pm SD, ** $p < 0,0001$.

Für die Tiere der Langzeit-Behandlung berechneten wir ebenfalls den Apoptoseindex, der die Rate an apoptotischen Zellen anzeigt. Dieser lag zwischen 1,86–13,63 %. Für den Mittelwert des Apoptoseindex erhielten wir $4,63 \% \pm 4,11$ (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Apoptoseindex [%] der untersuchten Tiere (n=12) nach Langzeit-CCl₄ über 6 Wochen.

Tier	Geschlecht	Apoptoseindex [%]
Tier 1	m	1,86
Tier 2	m	13,63
Tier 3	m	12,86
Tier 4	w	2,18
Tier 5	w	3,65
Tier 6	w	2,18
Tier 7	m	2,88
Tier 8	m	3,26
Tier 9	m	1,86
Tier 10	w	3,07
Tier 11	w	3,39
Tier 12	w	4,80
MW		4,63
SD		4,11

Nach Vergleich der mittleren Menge an apoptotischen Zellen in den Schnittpräparaten der Leber zeigt sich ein Unterschied zwischen den Geschlechtern der Linie BXD 24a (n=6). Die Weibchen zeigen hierbei die zweithäufigste mittlere Menge an positiven Zellen ($3,91 \pm 2,08$), während die mittlere Anzahl an apoptotischen Zellen der Männchen dem Ergebnis der Weibchen der Linie BXD 13 entspricht ($2,78 \pm 1,49$ bzw. $2,78 \pm 1,64$, Abb. 3.25).

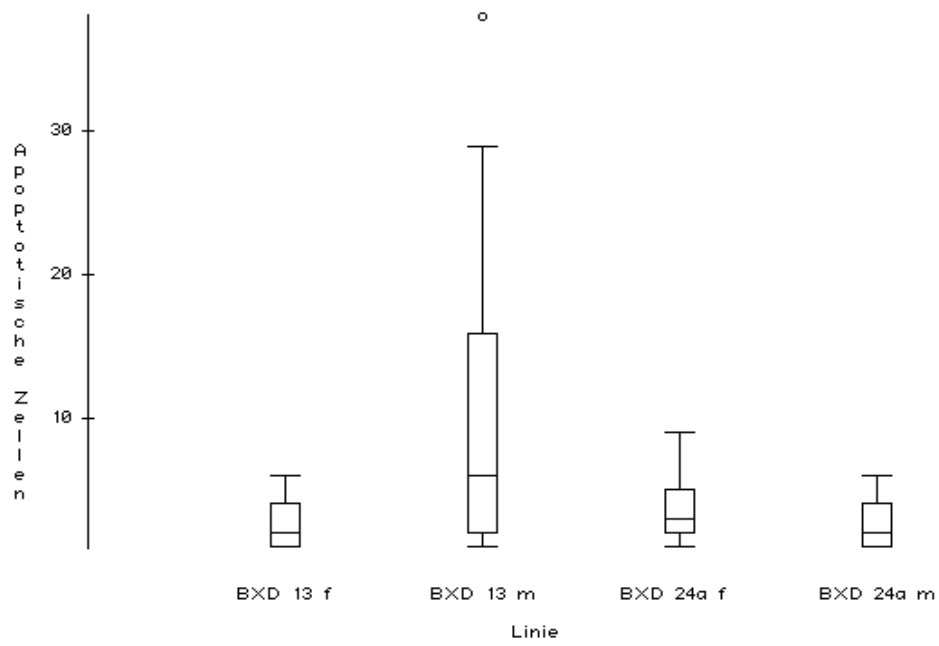


Abbildung 3.25: Mittlere Menge an apoptotischen Zellen der Leber der Linien BXD 13 und BXD 24a. Darstellung als Boxplot.

Kapitel 4

Diskussion

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Fortschritte hinsichtlich molekularer [36, 82, 111] und genetischer [12, 52, 77] Mechanismen der Leberfibrose erzielt werden. Dennoch bleiben bis heute viele Fragen der zugrundeliegenden genetischen Faktoren dieses sehr komplexen Prozesses ungeklärt, vor allem im Hinblick auf die Rolle von individuellen Genvarianten, ihrer Interaktionen und der daraus resultierenden Expressionsunterschiede, die als ursächlich für die Krankheitsprädisposition angesehen werden. Es besteht daher die Notwendigkeit, die Auswirkung von Genexpressionsunterschieden auf phänotypische Merkmale anhand eines geeigneten Modells, das die Komplexität der humanen Population und ihre hohe genetische Variabilität besser abbildet als bisherige Modelle, zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde deshalb das Modell der extrem exprimierenden Mauslinien angewendet, um die Auswirkungen von Expressionsvariation auf phänotypische Merkmale *in vivo* zu untersuchen. Das Ziel der Arbeit bestand darin, die Konsequenzen einer unterschiedlichen Expression des TGF β RII auf die Leberfibrose auf dem genetisch komplexen Hintergrund geeigneter BXD-Linien zu untersuchen und so die Nützlichkeit der extrem exprimierenden Mauslinien als Modell für Prädisposition bei komplexen humanen Erkrankungen zu überprüfen. Die Unterschiede der Expression des TGF β RII in der Leber von BXD 13 und BXD 24a korrelierten dabei teilweise mit phänotypischen Unterschieden in Proliferation, Fibrogenese und Apoptose.

4.1 Relative Genexpression des TGFbRII im Zusammenhang mit Leberfibrose

Die Grundlage dieser Arbeit bildeten die Expressionsdaten des TGFbRII von BXD-Mausinzuchtstämmen aus einer Arbeit von Gatti et al. [39]. Für das Modell der extrem exprimierenden Mauslinien wurden aus dieser Datenbank (www.genenetwork.org) geeignete Mauslinien ausgesucht, die hinsichtlich der Expression des TGFbRII einen möglichst großen Unterschied aufweisen. Dafür wählten wir zum einen die Linie BXD 13, die eine geringe Expression des TGFbRII aufweist, und zum anderen die Linie BXD 24a mit einer deutlich höheren Expression.

Das Zytokin TGF- β gilt als stärkstes profibrogenes Zytokin der Leber, das zur Aktivierung der hepatischen Sternzelle zu Kollagen produzierenden Myofibroblasten beiträgt [46]. Die Signale übermittelt TGF- β über einen Rezeptorkomplex, bestehend aus TGFbRI und TGFbRII, wobei TGFbRII als limitierender Faktor der Signaltransduktion angesehen wird [37]. Die zunehmende Schädigung scheint über die vermehrte Expression des TGFbRII zu einer Zunahme der TGF- β -Signaltransduktion zu führen. In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse zur Expression des TGFbRII nach Leberschädigung. Eine Zunahme der Expression des TGFbRII konnte in einer Arbeit von Chen et al. [25] gezeigt werden. Dabei wurde in kultivierten HSC von Ratten durch die Zugabe von Acetaldehyd, dem Hauptmetaboliten von Alkohol, ein Anstieg der Expression des TGFbRII mit gleichzeitiger Zunahme der TGF- β -Signaltransduktion nachgewiesen, die sich in einer deutlich vermehrten Ablagerung von Kollagen zeigte. Allerdings führte in einer anderen Arbeit eine Leberschädigung zu einer Abnahme der Expression des TGFbRII. Roulot et al. [85] konnten sowohl in Leberbiopsien von Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Virus-Infektion als auch in isolierten HSC eines Rattenmodells eine signifikante Abnahme der Expression des TGFbRII nachweisen. Die Reduktion der Expression ging dabei mit einer Abnahme der antiproliferativen Effekte bei gleichbleibender profibrogener Wirkung einher. Möglicherweise könnte daher die Expression des TGFbRII durch die Art der Schädigung beeinflusst werden.

4.2 Einfluss von TGFbRII-Genexpressionsvariationen auf phänotypische Merkmale der Leberfibrose

Die Leberfibrose stellt eine Wundheilungsreaktion der Leber auf chronische Schädigung dar und ist auf molekularer Grundlage durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen, darunter HSC, Hepatozyten, Kupffer-Zellen, und Signalmolekülen charakterisiert [68]. Auf genetischer Ebene konnten bisher in Mausmodellen Zusammenhänge zwischen der Genexpression von inflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α [98]) sowie von Wachstumsfaktoren, insbesondere von TGF- β 1 [105], und der Fibroseentwicklung gefunden werden. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, die ausgewählten Mauslinien, die sich in ihrer Expression des TGFbRII möglichst stark unterscheiden, auf phänotypische Merkmale der Leberfibrose nach Schädigung mittels CCl₄ zu untersuchen. Dazu wurden anhand von histologischen und immunhistochemischen Färbungen die Auswirkungen der Schädigung auf die Leber untersucht (siehe 2.3). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass sich die beiden Mauslinien BXD 13 und BXD 24a hinsichtlich Proliferation und Kollagengehalt unterscheiden. Deutliche Unterschiede ergaben sich vor allem nach einer kurzzeitigen Schädigung der Leber mittels CCl₄ über einen Zeitraum von einer Woche. Hierbei zeigte sich eine Korrelation zwischen erhöhter TGFbRII-Expression und Proliferation. Die Analyse der histologischen Präparate nach immunhistochemischer ki67-Färbung ergab eine höhere Proliferation der Linie BXD 24a, die mit einer höheren basalen Expression des TGFbRII assoziiert ist.

Sowohl die Initiation als auch die Progression einer Leberfibrose gehen mit einer erhöhten Zellteilungsaktivität von HSC als auch von Hepatozyten einher [8, 27]. Zudem führt eine Schädigung der Leber, unabhängig von der jeweiligen Ätiologie, zu einer raschen Synthese von TGF- β , vor allem in HSC. Dies signalisiert die wichtige Rolle des profibrogenen Zytokins im Prozess der Wundheilungsreaktion [46]. Die Korrelation zwischen erhöhter Proliferationsantwort und erhöhter TGFbRII-Expression kann möglicherweise auf die TGF- β -vermittelte Aktivierung der HSC zu proliferativen Myofibroblasten zurückgeführt werden. Allerdings würde man im Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferation durch Aktivierung der HSC zu Myofibroblasten gleichzeitig eine erhöhte Kollagenablagerung erwarten, da Myofibroblasten als Hauptquelle der EZM gelten [82]. Unsere Ergebnisse der histologischen Kollagenanfärbung und die anschließende Quantifizierung zeigen jedoch einen umgekehrten Trend.

Im Laufe der Leberschädigung mittels CCl₄ über einen Zeitraum von 6 Wochen zeigte sich innerhalb der beiden untersuchten Linien eine Abnahme der Proliferation. Eine geringere Proli-

feration in Zusammenhang mit steigenden Konzentrationen an TGF- β im fortgeschrittenen Prozess der Leberfibrose deckt sich mit der Beobachtung, dass hohe Konzentrationen an TGF- β zu einer Inhibierung der Proliferation von Hepatozyten führen [73]. Dabei wiesen die ermittelten Daten der Proliferationsaktivität starke geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb der Linien auf. Der Einfluss des Geschlechts auf phänotypische Unterschiede innerhalb einer BXD-Linie konnte bereits früher gezeigt werden [23], wobei geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen den einzelnen BXD-Linien zum Teil beträchtlich variierten und nicht innerhalb jeder Linie zu finden waren [4]. Die ermittelten Unterschiede der Proliferation im Hinblick auf die Dauer der Leberschädigung könnten einen Hinweis auf unterschiedliche Effekte von TGF- β bei der Initiation der Leberfibrose und im weiteren Verlauf einer chronischen Schädigung nach mehreren Wochen geben.

Obwohl es sich bei den Reaktionen der Leber auf Kurzzeit- bzw. Langzeitschädigung um ineinander übergehende Verläufe handelt, stellen diese Reaktionen dennoch unterschiedliche Prozesse dar. Eine Kurzzeitschädigung führt zu einer akuten Entzündungsantwort der Leber, die der Regeneration von Hepatozyten mit dem Ziel des Ersatzes von nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen dient und lediglich mit einer limitierten Deposition von EZM einhergeht [10]. Zu den prominenten Molekülen im Rahmen einer akuten Schädigung zählen vor allem TNF- α , NF- κ B und Interleukine. Durch eine Langzeitschädigung wird eine entzündliche Dauerreaktion auf persistierende Schädigung hervorgerufen, die letztendlich nicht mehr durch Leberregeneration kompensiert werden kann und zum Ersatz der Hepatozyten durch EZM führt [10]. Besondere Bedeutung kommt hierbei den HSC sowie zahlreichen Zytokinen, insbesondere TGF- β , PDGF, IGF-I und TNF- α , zu.

Ein weiteres phänotypisches Merkmal der Leberfibrose, in dem sich die beiden untersuchten Mauslinien signifikant unterscheiden, stellt der Kollagengehalt der Leber nach Schädigung mittels CCl₄ dar. Wie bereits erwähnt zeigten die Ergebnisse der histologischen Siriusrot-Färbung, unabhängig vom Zeitraum der Schädigung, einen umgekehrten Trend zu den Ergebnissen der Proliferationsaktivität. Aufgrund der bisher erzielten Einblicke in die Pathophysiologie der Leberfibrose und deren molekularen Grundlagen hätten wir einen positiven Zusammenhang zwischen einer erhöhten TGF β RII-Expression und einem erhöhten Kollagengehalt der Leber nach Schädigung erwartet. Die Bedeutung des TGF- β -Signalweges für die Aktivierung und Aufrechterhaltung der EZM-Produktion ist in Mausmodellen mit Knockdown der TGF β RII-Expression belegt worden [37].

Das multifunktionale Zytokin TGF- β übt neben den antiproliferativen und profibrogenen Effekten auch einen Einfluss auf die Apoptose von Hepatozyten aus [75, 92]. Auf diese Weise trägt TGF- β zur Eliminierung geschädigter Zellen innerhalb von normalem Gewebe *in vivo* bei [54]. Der proapoptotische Effekt von TGF- β auf Hepatozyten konnte in transgenen Mäusen mit Überexpression von aktivem TGF- β in der Leber nachgewiesen werden [87]. Der zugrundeliegende Mechanismus der Induktion der Apoptose ist bisher noch weitgehend unbekannt. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- β durch Smad-vermittelte Induktion der DAP-Kinase zur Apoptose der Zellen führt [54]. Eine andere Arbeit demonstrierte die verstärkte Expression des proapoptotischen Proteins BIM durch TGF- β in Hepatozyten und B-Lymphozyten im Rahmen der Apoptose [80]. Trotz der in Studien dargestellten proapoptotischen Effekte von TGF- β zeigten die Tiere in der vorliegenden Arbeit nach Schädigung mittels CCl₄ keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Apoptose. Nach Verlängerung des Zeitraumes der CCl₄-Injektionen auf sechs Wochen, die zu einer Zunahme der Expression des TGF β RII führte, kam es nur bei zwei Tieren der Linie BXD 13 zu einem deutlichen Anstieg der apoptotischen Zellen, jedoch kann dieser Befund aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Tiere nicht abschließend eingeordnet werden.

4.3 Modell der extrem exprimierenden Mauslinien

Der genetische Einfluss auf die Prädisposition und Progression der Leberfibrose unterschiedlicher Genese konnte bereits in genomweiten Assoziationsstudien beim Menschen [58] sowie in Studien von Mausinzuchtstämmen [49, 94] bestätigt werden. Einen großen Beitrag zur Aufklärung der genetischen Faktoren leisteten hierbei QTL [60] und eQTL-Analysen [88], die aufgrund der technischen Durchführbarkeit von Genomsequenzierungen und Genexpressionsanalysen möglich wurden. Aufgrund der Erkenntnis, dass Variationen der Genexpression der Krankheitsprädisposition zugrundeliegen können [113], bedarf es eines Modells, mit dem der Einfluss der Genexpressionsvariationen auf die Leberfibrose *in vivo* untersucht werden kann. Durch die Analyse der Auswirkungen von Expressionsvariationen und den daraus resultierenden subtilen Auswirkungen auf Phänotypen sollte es möglich sein, ein besseres Verständnis komplexer pathophysiologischer Zusammenhänge zu erhalten (Abb. 4.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden phänotypische Unterschiede in Bezug auf Proliferation und Kollagenakkumulation in Abhängigkeit von der Expression des TGF β RII ermittelt. Diese phänotypischen Unterschiede zwischen den untersuchten Mauslinien deuten daraufhin, dass an

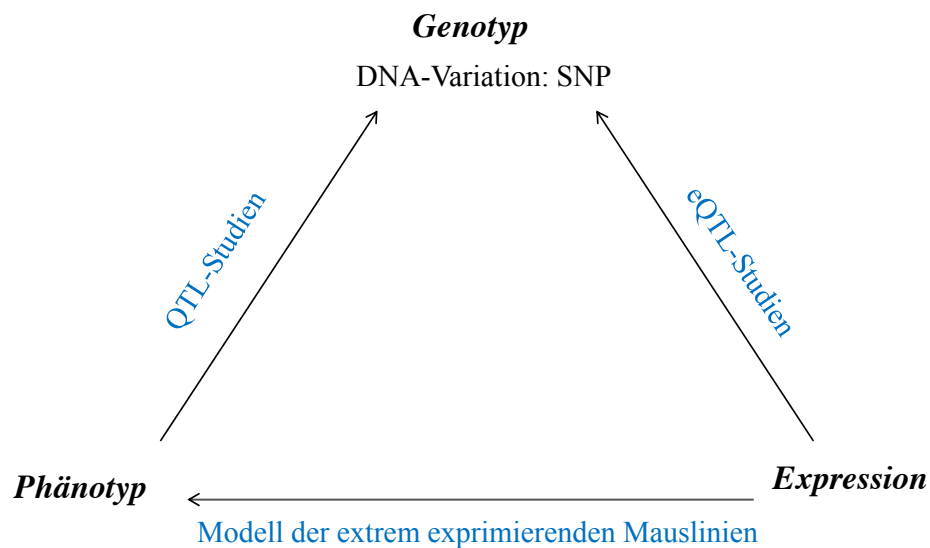


Abbildung 4.1: Bedeutung des Modells der extrem exprimierenden Mauslinien innerhalb von QTL- und eQTL-Analysen. Während mit Hilfe von QTL-Analysen genetische Suszeptibilitätsloci identifiziert werden und eQTL-Studien der Auffindung von genetischen Loci mit Einfluss auf Genexpression dienen, kann durch das Modell der extrem exprimierenden Mauslinien die Verbindung zwischen der Variation der Genexpression und der direkten Auswirkung auf den Phänotyp der Prädisposition bzw. Krankheit geschaffen werden.

der Entstehung der Leberfibrose Suszeptibilitätsgene beteiligt sind, da die Umweltfaktoren bei Mausinzuchtstämmen nahezu vollständig kontrolliert werden können und damit für die Krankheitsentstehung weitestgehend vernachlässigt werden können [97]. Während dieses Modell der Situation *in vivo* gerecht wird, stellt die damit einhergehende Komplexität eine große Hürde bei der Interpretation der Daten dar. Es ist nicht eindeutig nachweisbar, dass die festgestellten Unterschiede der Fibrose-Phänotypen auf die Expressionsvariation des TGFbRII zurückzuführen sind. Die gewählten Mauslinien unterscheiden sich ebenfalls in anderen Genen und deren Expressionswerten.

Die Leberfibrose ist zudem eine komplexe Erkrankung, die durch die Interaktion zahlreicher Gene beeinflusst wird, deren isolierter Einfluss meist gering ist [47]. Eine weitere Einordnung von Genen und deren Funktion in den Prozess der Leberfibrose ist beispielsweise in transgenen oder Knockout-Mausmodellen möglich. Für eine bessere Aussagekraft des Modells der extrem exprimierenden Mauslinien sind Analysen weiterer Kandidatengene, basierend auf QTL-Analysen oder transgenen/knockout Modellen, sowie eine deutlich höhere Zahl von Mauslinien erforderlich.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass BXD-Linien mit unterschiedlicher basaler Genexpression des TGF β RII Unterschiede hinsichtlich phänotypischer Merkmale der Leberfibrose, insbesondere der Proliferationsaktivität, aufweisen. Zur umfassenden Klärung der Auswirkungen von Genexpressionsvariationen auf die Entstehung von Krankheiten bedarf es jedoch zusätzlicher Untersuchungen. In weiterführenden Arbeiten sollten zusätzliche Gene getestet und zwischen extrem exprimierenden Linien verglichen werden, die zuvor in Studien als profibrogen identifiziert wurden. Durch Erhöhung der Fallzahl kann dabei eine verbesserte Signifikanz mit höherer Aussagekraft des Modells der extrem exprimierenden Mauslinien erzielt werden. Ein generelles Problem der Studien anhand von Mausmodellen stellt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen dar. Die Suszeptibilität für komplexe Erkrankungen wie die Leberfibrose ist nicht allein auf genetische Determinanten zurückzuführen, sondern ebenfalls auf exogene Risikofaktoren, die in Tiermodellen kontrolliert werden können. Daher bedarf es immer wieder der Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Studien am Mausmodell auf den Menschen. Im Idealfall könnten die Ergebnisse aus den extrem exprimierenden Mauslinien genutzt werden, um das individuelle Risiko bei Patienten abzuschätzen. Anhand von Genexpressionsmustern könnte dadurch das Progressionsrisiko beurteilt werden [47]. Die Identifizierung weiterer genetischer Risikofaktoren und Erstellung individueller Gensignaturen könnten zu einem verbesserten Verständnis der Pathogenese komplexer Lebererkrankungen, wie der Leberzirrhose, beitragen und zukünftig zur Entwicklung personalisierter Therapiemöglichkeiten genutzt werden [41, 53, 66, 76, 100].

Literaturverzeichnis

- [1] Gesundheitsberichterstattung des Bundes. www.gbe-bund.de, Abruf: August 2013
- [2] Gesundheitsbericht für Deutschland, Kapitel 5.22. (1998)
- [3] *RNeasy® Mini Handbook*. Qiagen, September 2010
- [4] ANDREUX, Pénélope A ; WILLIAMS, Evan G. ; KOUTNIKOVA, Hana ; HOUTKOOPER, Riekelt H. ; CHAMPY, Marie-France ; HENRY, Hugues ; SCHOONJANS, Kristina ; WILLIAMS, Robert W. ; AUWERX, Johan: Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscalar integration of traits. In: *Cell* 150 (2012), Sep, Nr. 6, S. 1287–99
- [5] ARENDS, M J. ; MORRIS, R G. ; WYLLIE, A H.: Apoptosis. The role of the endonuclease. In: *Am J Pathol* 136 (1990), Mar, Nr. 3, S. 593–608
- [6] ARTHUR, M J.: Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 (2000), Aug, Nr. 2, S. G245–9
- [7] BACHEM, M G. ; SELL, K M. ; MELCHIOR, R ; KROPF, J ; ELLER, T ; GRESSNER, A M.: Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. In: *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63 (1993), Nr. 2, S. 123–30
- [8] BANGEN, JM ; HAMMERICH, L ; LAMBERTZ, D ; HUSS, S ; BARBACID, M ; TRAUTWEIN, C ; LIEDTKE, C: Genetische Inaktivierung von Cdk2 in Hepatozyten führt zu erhöhter Fibrogenese in der Leber. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51 (2013), Nr. 01, S. P_1_02

- [9] BAO, Lei ; PEIRCE, Jeremy L. ; ZHOU, Mi ; LI, Hongqiang ; GOLDOWITZ, Dan ; WILLIAMS, Robert W. ; LU, Lu ; CUI, Yan: An integrative genomics strategy for systematic characterization of genetic loci modulating phenotypes. In: *Hum Mol Genet* 16 (2007), Jun, Nr. 11, S. 1381–90
- [10] BATALLER, Ramón ; BRENNER, David A.: Liver fibrosis. In: *J Clin Invest* 115 (2005), Feb, Nr. 2, S. 209–18
- [11] BATALLER, Ramón ; BRENNER, David A.: Pathogenesis of Hepatic Fibrosis. In: *Textbook of Gastroenterology* (2009), S. 658–679
- [12] BATALLER, Ramón ; NORTH, Kari E. ; BRENNER, David A.: Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. In: *Hepatology* 37 (2003), Mar, Nr. 3, S. 493–503
- [13] BENYON, R C. ; IREDALE, J P.: Is liver fibrosis reversible? In: *Gut* 46 (2000), Apr, Nr. 4, S. 443–6
- [14] BERNARD, Philip S. ; WITTEWER, Carl T.: Real-time PCR technology for cancer diagnostics. In: *Clin Chem* 48 (2002), Aug, Nr. 8, S. 1178–85
- [15] BIERIE, Brian ; MOSES, Harold L.: TGF-beta and cancer. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 17 (2006), Nr. 1-2, S. 29–40
- [16] BISSELL, D M. ; ROULOT, D ; GEORGE, J: Transforming growth factor beta and the liver. In: *Hepatology* 34 (2001), Nov, Nr. 5, S. 859–67
- [17] BOENISCH, Thomas ; FARMILO, AJ ; STEAD, RH u. a.: *Handbook, Immunochemical Staining Methods*. Dako Corporation, 2001
- [18] BREITKOPF, K ; GODOY, P ; CIUCLAN, L ; SINGER, M V. ; DOOLEY, S: TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. In: *Z Gastroenterol* 44 (2006), Jan, Nr. 1, S. 57–66
- [19] BRUNT, Elizabeth M.: Nonalcoholic steatohepatitis. In: *Semin Liver Dis* 24 (2004), Feb, Nr. 1, S. 3–20
- [20] BUCH, Stephan ; SCHAFMAYER, Clemens ; VÖLZKE, Henry ; BECKER, Christian ; FRANKE, Andre ; ELLER-EBERSTEIN, Huberta von ; KLUCK, Christian ; BÄSSMANN,

- Ingelore ; BROSCH, Mario ; LAMMERT, Frank ; MIQUEL, Juan F. ; NERVI, Flavio ; WITTIG, Michael ; ROSSKOPF, Dieter ; TIMM, Birgit ; HÖLL, Christine ; SEEGER, Marcus ; ELSHARAWY, Abdou ; LU, Tim ; EGBERTS, Jan ; FÄNDRICH, Fred ; FÖLSCH, Ulrich R. ; KRAWCZAK, Michael ; SCHREIBER, Stefan ; NÜRNBERG, Peter ; TEPEL, Jürgen ; HAMPE, Jochen: A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. In: *Nat Genet* 39 (2007), Aug, Nr. 8, S. 995–9
- [21] BURT, A D. ; GRIFFITHS, M R. ; SCHUPPAN, D ; VOSS, B ; MACSWEEN, R N.: Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracycromicrotomy and immuno-gold labelling. In: *Histopathology* 16 (1990), Jan, Nr. 1, S. 53–8
- [22] CASTILLA, A ; PRIETO, J ; FAUSTO, N: Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. In: *N Engl J Med* 324 (1991), Apr, Nr. 14, S. 933–40
- [23] CHAMPY, Marie-France ; SELLOUM, Mohammed ; PIARD, Laetitia ; ZEITLER, Valerie ; CARADEC, Claudia ; CHAMBON, Pierre ; AUWERX, Johan: Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. In: *Mamm Genome* 15 (2004), Oct, Nr. 10, S. 768–83
- [24] CHAPMAN, R S. ; CHRESTA, C M. ; HERBERG, A A. ; BEERE, H M. ; HEER, S ; WHETTON, A D. ; HICKMAN, J A. ; DIVE, C: Further characterisation of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukaemic cells. In: *Cytometry* 20 (1995), Jul, Nr. 3, S. 245–56
- [25] CHEN, Anping: Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. In: *Biochem J* 368 (2002), Dec, Nr. Pt 3, S. 683–93
- [26] CLOUTHIER, D E. ; COMERFORD, S A. ; HAMMER, R E.: Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. In: *J Clin Invest* 100 (1997), Dec, Nr. 11, S. 2697–713
- [27] CONG, Min ; IWASAKO, Keiko ; JIANG, Chunyan ; KISSELEVA, Tatiana: Cell signals influencing hepatic fibrosis. In: *Int J Hepatol* 2012 (2012), S. 158547

- [28] CONSTANDINOU, Christothea ; HENDERSON, Neil ; IREDALE, John P.: Modeling liver fibrosis in rodents. In: *Methods Mol Med* 117 (2005), S. 237–50
- [29] CORREA, Candace R. ; CHEUNG, Vivian G.: Genetic variation in radiation-induced expression phenotypes. In: *Am J Hum Genet* 75 (2004), Nov, Nr. 5, S. 885–90
- [30] CROW, James F.: Haldane, Bailey, Taylor and recombinant-inbred lines. In: *Genetics* 176 (2007), Jun, Nr. 2, S. 729–32
- [31] DERYNCK, Rik ; ZHANG, Ying E.: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. In: *Nature* 425 (2003), Oct, Nr. 6958, S. 577–84
- [32] DIMAS, Antigone S. ; DEUTSCH, Samuel ; STRANGER, Barbara E. ; MONTGOMERY, Stephen B. ; BOREL, Christelle ; ATTAR-COHEN, Homa ; INGLE, Catherine ; BEAZLEY, Claude ; GUTIERREZ ARCELUS, Maria ; SEKOWSKA, Magdalena ; GAGNEBIN, Marilyne ; NISBETT, James ; DELOUKAS, Panos ; DERMITZAKIS, Emmanouil T. ; ANTONARAKIS, Stylianos E.: Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner. In: *Science* 325 (2009), Sep, Nr. 5945, S. 1246–50
- [33] EDWARDS, M J. ; KELLER, B J. ; KAUFFMAN, F C. ; THURMAN, R G.: The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 119 (1993), Apr, Nr. 2, S. 275–9
- [34] ENG, F J. ; FRIEDMAN, S L.: Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 (2000), Jul, Nr. 1, S. G7–G11
- [35] FRIEDMAN, S L.: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Jan, Nr. 4, S. 2247–50
- [36] FRIEDMAN, Scott L.: Mechanisms of hepatic fibrogenesis. In: *Gastroenterology* 134 (2008), May, Nr. 6, S. 1655–69
- [37] FU, Rongquan ; WU, Jinguo ; DING, Jiguang ; SHENG, Jifang ; HONG, Liang ; SUN, Qingfeng ; FANG, Hui ; XIANG, Dairong: Targeting transforming growth factor beta RII expression inhibits the activation of hepatic stellate cells and reduces collagen synthesis. In: *Experimental Biology and Medicine* 236 (2011), Nr. 3, S. 291–297

- [38] FUJII, Tsutomu ; FUCHS, Bryan C. ; YAMADA, Suguru ; LAUWERS, Gregory Y. ; KULU, Yakup ; GOODWIN, Jonathan M. ; LANUTI, Michael ; TANABE, Kenneth K.: Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. In: *BMC Gastroenterol* 10 (2010), S. 79
- [39] GATTI, Daniel ; MAKI, Akira ; CHESLER, Elissa J. ; KIROVA, Roumyana ; KOSYK, Oksana ; LU, Lu ; MANLY, Kenneth F. ; WILLIAMS, Robert W. ; PERKINS, Andy ; LANGSTON, Michael A. ; THREADGILL, David W. ; RUSYN, Ivan: Genome-level analysis of genetic regulation of liver gene expression networks. In: *Hepatology* 46 (2007), Aug, Nr. 2, S. 548–57
- [40] GAVRIELI, Y ; SHERMAN, Y ; BEN-SASSON, S A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. In: *J Cell Biol* 119 (1992), Nov, Nr. 3, S. 493–501
- [41] GE, Dongliang ; FELLAY, Jacques ; THOMPSON, Alexander J. ; SIMON, Jason S. ; SHANNA, Kevin V. ; URBAN, Thomas J. ; HEINZEN, Erin L. ; QIU, Ping ; BERTELSEN, Arthur H. ; MUIR, Andrew J. ; SULKOWSKI, Mark ; MCHUTCHISON, John G. ; GOLDSTEIN, David B.: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. In: *Nature* 461 (2009), Sep, Nr. 7262, S. 399–401
- [42] GEORGE, J ; ROULOT, D ; KOTELIANSKY, V E. ; BISSELL, D M.: In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Oct, Nr. 22, S. 12719–24
- [43] GEWALTIG, Jan ; MANGASSER-STEPHAN, Kerstin ; GARTUNG, Carsten ; BIESTERFELD, Stefan ; GRESSNER, Axel M.: Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. In: *Clin Chim Acta* 316 (2002), Feb, Nr. 1-2, S. 83–94
- [44] GRATTAGLIANO, Ignazio ; UBALDI, Enzo ; BONFRATE, Leonilde ; PORTINCASA, Piero: Management of liver cirrhosis between primary care and specialists. In: *World J Gastroenterol* 17 (2011), May, Nr. 18, S. 2273–82

- [45] GRESSNER, A M. ; HAARMANN, R: Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. In: *Biochem Biophys Res Commun* 151 (1988), Feb, Nr. 1, S. 222–9
- [46] GRESSNER, Axel M. ; WEISKIRCHEN, Ralf ; BREITKOPF, Katja ; DOOLEY, Steven: Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. In: *Front Biosci* 7 (2002), Apr, S. d793–807
- [47] HANNIVOORT, Rebekka A. ; HERNANDEZ-GEA, Virginia ; FRIEDMAN, Scott L. u. a.: Genomics and proteomics in liver fibrosis and cirrhosis. In: *Fibrogenesis & Tissue Repair* 5 (2012), Nr. 1, S. 1–14
- [48] HELLERBRAND, C ; STEFANOVIC, B ; GIORDANO, F ; BURCHARDT, E R. ; BRENNER, D A.: The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. In: *J Hepatol* 30 (1999), Jan, Nr. 1, S. 77–87
- [49] HILLEBRANDT, Sonja ; GOOS, Claudia ; MATERN, Siegfried ; LAMMERT, Frank: Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus Hfib1 on chromosome 15. In: *Gastroenterology* 123 (2002), Dec, Nr. 6, S. 2041–51
- [50] HILLEBRANDT, Sonja ; WASMUTH, Hermann E. ; WEISKIRCHEN, Ralf ; HELLERBRANDT, Claus ; KEPPELER, Hildegard ; WERTH, Alexa ; SCHIRIN-SOKHAN, Ramin ; WILKENS, Gabriele ; GEIER, Andreas ; LORENZEN, Johann ; KÖHL, Jörg ; GRESSNER, Axel M. ; MATERN, Siegfried ; LAMMERT, Frank: Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. In: *Nat Genet* 37 (2005), Aug, Nr. 8, S. 835–43
- [51] HSU, S M. ; RAINE, L ; FANGER, H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. In: *J Histochem Cytochem* 29 (1981), Apr, Nr. 4, S. 577–80
- [52] HUANG, Hongjin ; CHEUNG, Ramsey ; DONALDSON, Peter T. ; LAMMERT, Frank: *Genetics and Liver Diseases, in textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, Third Edition (eds J. Rodés, J.-P. Benhamou, A. T. Blei, J. Reichen and M. Rizzetto)*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2008
- [53] HUANG, Hongjin ; SHIFFMAN, Mitchell L. ; FRIEDMAN, Scott ; VENKATESH, Ramasubbu ; BZOWEJ, Natalie ; ABAR, Olivia T. ; ROWLAND, Charles M. ; CATANESE, Jo-

- seph J. ; LEONG, Diane U. ; SNINSKY, John J. ; LAYDEN, Thomas J. ; WRIGHT, Teresa L. ; WHITE, Thomas ; CHEUNG, Ramsey C.: A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. In: *Hepatology* 46 (2007), Aug, Nr. 2, S. 297–306
- [54] JANG, Chuan-Wei ; CHEN, Chun-Han ; CHEN, Chun-Chieh ; CHEN, Jia-yun ; SU, Yi-Hsien ; CHEN, Ruey-Hwa: TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. In: *Nat Cell Biol* 4 (2002), Jan, Nr. 1, S. 51–8
- [55] JUNQUEIRA, L C. ; BIGNOLAS, G ; BRENTANI, R R.: Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. In: *Histochem J* 11 (1979), Jul, Nr. 4, S. 447–55
- [56] KANEL, Gary C.: *Textbook of Gastroenterology, Chapter 79: Liver: anatomy, microscopic structure, and cell types*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2009
- [57] KNITTEL, T ; JANNECK, T ; MÜLLER, L ; FELLNER, P ; RAMADORI, G: Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. In: *Hepatology* 24 (1996), Aug, Nr. 2, S. 352–60
- [58] KRAWCZYK, Marcin ; MÜLLENBACH, Roman ; WEBER, Susanne N. ; ZIMMER, Vincent ; LAMMERT, Frank: Genome-wide association studies and genetic risk assessment of liver diseases. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7 (2010), Dec, Nr. 12, S. 669–81
- [59] LAIHO, M ; WEIS, M B. ; MASSAGUÉ, J: Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)-beta receptor types I and II in TGF-beta-resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Oct, Nr. 30, S. 18518–24
- [60] LANDER, E S. ; BOTSTEIN, D: Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. In: *Genetics* 121 (1989), Jan, Nr. 1, S. 185–99
- [61] LIVAK, Kenneth J. ; SCHMITTGEN, Thomas D.: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. In: *methods* 25 (2001), Nr. 4, S. 402–408
- [62] LÖRKE, Julia ; ERHARDT, Andreas ; VOGT, Christoph ; HÄUSSINGER, Dieter: Nicht-invasive Diagnostik der Leberzirrhose. In: *Dtsch Arztebl* 104 (2007), Nr. 24, S. 1752–7

- [63] LOWRY, O H. ; ROSEBROUGH, N J. ; FARR, A L. ; RANDALL, R J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J Biol Chem* 193 (1951), Nov, Nr. 1, S. 265–75
- [64] LUCKEY, S W. ; PETERSEN, D R.: Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. In: *Exp Mol Pathol* 71 (2001), Dec, Nr. 3, S. 226–40
- [65] LUZIO, JP ; THOMPSON, Rodney J.: *Molecular medical biochemistry*. Bd. 4. Cambridge University Press, 1990
- [66] MARCOLONGO, Moira ; YOUNG, Bradford ; DAL PERO, Francesca ; FATTOVICH, Giovanna ; PERARO, Laura ; GUIDO, Maria ; SEBASTIANI, Giada ; PALÙ, Giorgio ; ALBERTI, Alfredo: A seven-gene signature (cirrhosis risk score) predicts liver fibrosis progression in patients with initially mild chronic hepatitis C. In: *Hepatology* 50 (2009), Oct, Nr. 4, S. 1038–44
- [67] MASSAGUÉ, J ; BLAIN, S W. ; LO, R S.: TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. In: *Cell* 103 (2000), Oct, Nr. 2, S. 295–309
- [68] MEDERACKE, I: Liver fibrosis - mouse models and relevance in human liver diseases. In: *Z Gastroenterol* 51 (2013), Jan, Nr. 1, S. 55–62
- [69] MEINDL-BEINKER, Nadja M. ; DOOLEY, Steven: Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. In: *J Gastroenterol Hepatol* 23 Suppl 1 (2008), Mar, S. S122–7
- [70] MELAMED, M D. ; GREEN, N M.: Avidin. 2. Purification and Composition. In: *Biochem J* 89 (1963), Dec, S. 591–9
- [71] MORLEY, Michael ; MOLONY, Cliona M. ; WEBER, Teresa M. ; DEVLIN, James L. ; EWENS, Kathryn G. ; SPIELMAN, Richard S. ; CHEUNG, Vivian G.: Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. In: *Nature* 430 (2004), Aug, Nr. 7001, S. 743–7
- [72] MORRIS, T ; ROBERTSON, B ; GALLAGHER, M: Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. In: *J Clin Microbiol* 34 (1996), Dec, Nr. 12, S. 2933–6

- [73] NAKAMURA, T ; TOMITA, Y ; HIRAI, R ; YAMAOKA, K ; KAJI, K ; ICHIHARA, A: Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. In: *Biochem Biophys Res Commun* 133 (1985), Dec, Nr. 3, S. 1042–50
- [74] NICA, Alexandra C. ; DERMITZAKIS, Emmanouil T.: Using gene expression to investigate the genetic basis of complex disorders. In: *Hum Mol Genet* 17 (2008), Oct, Nr. R2, S. R129–34
- [75] OBERHAMMER, F ; BURSCH, W ; PARZEFALL, W ; BREIT, P ; ERBER, E ; STADLER, M ; SCHULTE-HERMANN, R: Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. In: *Cancer Res* 51 (1991), May, Nr. 9, S. 2478–85
- [76] PATIN, Etienne ; KUTALIK, Zoltán ; GUERGNON, Julien ; BIBERT, Stéphanie ; NALPAS, Bertrand ; JOUANGUY, Emmanuelle ; MUNTEANU, Mona ; BOUSQUET, Laurence ; ARGIRO, Laurent ; HALFON, Philippe u. a.: Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. In: *Gastroenterology* 143 (2012), S. 1244–52
- [77] POWELL, E E. ; EDWARDS-SMITH, C J. ; HAY, J L. ; CLOUSTON, A D. ; CRAWFORD, D H. ; SHORTHOUSE, C ; PURDIE, D M. ; JONSSON, J R.: Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. In: *Hepatology* 31 (2000), Apr, Nr. 4, S. 828–33
- [78] PREL, Jean-Baptist du ; RÖHRIG, Bernd ; HOMMEL, Gerhard ; BLETNER, Maria: Auswahl statistischer Testverfahren. In: *Dtsch Arztebl* 107 (2010), Nr. 19, S. 343–348
- [79] QI, Z ; ATSUCHI, N ; OOSHIMA, A ; TAKESHITA, A ; UENO, H: Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Mar, Nr. 5, S. 2345–9
- [80] RAMESH, Sneha ; QI, Xiao-Jun ; WILDEY, Gary M. ; ROBINSON, Janet ; MOLKENTIN, Jeffery ; LETTERIO, John ; HOWE, Philip H.: TGF beta-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. In: *EMBO Rep* 9 (2008), Oct, Nr. 10, S. 990–7
- [81] RECKNAGEL, R O. ; GLENDE, E A. Jr ; DOLAK, J A. ; WALLER, R L.: Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. In: *Pharmacol Ther* 43 (1989), Nr. 1, S. 139–54

- [82] REEVES, Helen L. ; FRIEDMAN, Scott L.: Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis. In: *Front Biosci* 7 (2002), Apr, S. d808–26
- [83] ROJAS, Andres ; PADIDAM, Malla ; CRESS, Dean ; GRADY, William M.: TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta. In: *Biochim Biophys Acta* 1793 (2009), Jul, Nr. 7, S. 1165–73
- [84] ROMEO, Stefano ; KOZLITINA, Julia ; XING, Chao ; PERTSEMLIDIS, Alexander ; COX, David ; PENNACCHIO, Len A. ; BOERWINKLE, Eric ; COHEN, Jonathan C. ; HOBBS, Helen H.: Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. In: *Nat Genet* 40 (2008), Dec, Nr. 12, S. 1461–5
- [85] ROULOT, D ; SEVCSIK, A M. ; COSTE, T ; STROSBERG, A D. ; MARULLO, S: Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. In: *Hepatology* 29 (1999), Jun, Nr. 6, S. 1730–8
- [86] SAIKI, R K. ; GELFAND, D H. ; STOFFEL, S ; SCHARF, S J. ; HIGUCHI, R ; HORN, G T. ; MULLIS, K B. ; ERLICH, H A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (1988), Jan, Nr. 4839, S. 487–91
- [87] SANDERSON, N ; FACTOR, V ; NAGY, P ; KOPP, J ; KONDAIAH, P ; WAKEFIELD, L ; ROBERTS, A B. ; SPORN, M B. ; THORGEIRSSON, S S.: Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Mar, Nr. 7, S. 2572–6
- [88] SCHADT, Eric E. ; MONKS, Stephanie A. ; DRAKE, Thomas A. ; LUSIS, Aldons J. ; CHE, Nam ; COLINAYO, Veronica ; RUFF, Thomas G. ; MILLIGAN, Stephen B. ; LAMB, John R. ; CAVET, Guy ; LINSLEY, Peter S. ; MAO, Mao ; STOUGHTON, Roland B. ; FRIEND, Stephen H.: Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. In: *Nature* 422 (2003), Mar, Nr. 6929, S. 297–302
- [89] SCHOLZEN, Thomas ; GERDES, Johannes: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *Journal of cellular physiology* 182 (2000), Nr. 3, S. 311–322
- [90] SCHUPPAN, D: Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. In: *Semin Liver Dis* 10 (1990), Feb, Nr. 1, S. 1–10

- [91] SCHUPPAN, Detlef ; AFDHAL, Nezam H.: Liver cirrhosis. In: *Lancet* 371 (2008), Mar, Nr. 9615, S. 838–51
- [92] SCHWALL, R H. ; ROBBINS, K ; JARDIEU, P ; CHANG, L ; LAI, C ; TERRELL, T G.: Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. In: *Hepatology* 18 (1993), Aug, Nr. 2, S. 347–56
- [93] SHI, Yigong ; MASSAGUÉ, Joan: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. In: *Cell* 113 (2003), Jun, Nr. 6, S. 685–700
- [94] SHI, Z ; WAKIL, A E. ; ROCKEY, D C.: Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Sep, Nr. 20, S. 10663–8
- [95] SIEGENTHALER, Walter ; BLUM, Hubert E.: *Klinische Pathophysiologie*. Bd. 9. Thieme, 2006
- [96] SIEGMUND, Sören V ; DOOLEY, Steven: Kapitel 20: Alkohol und Leber. In: *Alkohol und Alkoholfolgekrankeheiten: Grundlagen-Diagnostik-Therapie* (2005), S. 230–257
- [97] SILVER, LM: *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. 1995. 2011
- [98] SIMEONOVA, P P. ; GALLUCCI, R M. ; HULDERMAN, T ; WILSON, R ; KOMMINENI, C ; RAO, M ; LUSTER, M I.: The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 177 (2001), Dec, Nr. 2, S. 112–20
- [99] SOOKOIAN, Silvia ; PIROLA, Carlos J.: Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* 53 (2011), Nr. 6, S. 1883–1894
- [100] SPELIOTES, Elizabeth K. ; YERGES-ARMSTRONG, Laura M. ; WU, Jun ; HERNAEZ, Ruben ; KIM, Lauren J. ; PALMER, Cameron D. ; GUDNASON, Vilmundur ; EIRIKSDOTTIR, Gudny ; GARCIA, Melissa E. ; LAUNER, Lenore J. u. a.: Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. In: *PLoS genetics* 7 (2011), Nr. 3, S. e1001324

- [101] STRANGER, Barbara E. ; NICA, Alexandra C. ; FORREST, Matthew S. ; DIMAS, Antigone ; BIRD, Christine P. ; BEAZLEY, Claude ; INGLE, Catherine E. ; DUNNING, Mark ; FLICEK, Paul ; KOLLER, Daphne ; MONTGOMERY, Stephen ; TAVARÉ, Simon ; DELOUKAS, Panos ; DERMITZAKIS, Emmanouil T.: Population genomics of human gene expression. In: *Nat Genet* 39 (2007), Oct, Nr. 10, S. 1217–24
- [102] SWEAT, F ; PUCHTLER, H ; ROSENTHAL, S I.: Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. In: *Arch Pathol* 78 (1964), Jul, S. 69–72
- [103] THELLIN, O ; ZORZI, W ; LAKAYE, B ; DE BORMAN, B ; COUMANS, B ; HENNEN, G ; GRISAR, T ; IGOUT, A ; HEINEN, E: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. In: *J Biotechnol* 75 (1999), Oct, Nr. 2-3, S. 291–5
- [104] TSUKAMOTO, Hidekazu ; MATSUOKA, M ; FRENCH, SW u. a.: Experimental models of hepatic fibrosis: a review. In: *Seminars in liver disease* Bd. 10, 1990, S. 56–65
- [105] UEBERHAM, Elke ; LÖW, Rainer ; UEBERHAM, Uwe ; SCHÖNIG, Kai ; BUJARD, Hermann ; GEBHARDT, Rolf: Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. In: *Hepatology* 37 (2003), May, Nr. 5, S. 1067–78
- [106] VALLE, Laura ; SERENA-ACEDO, Tarsicio ; LIYANARACHCHI, Sandya ; HAMPEL, Heather ; COMERAS, Ilene ; LI, Zhongyuan ; ZENG, Qinghua ; ZHANG, Hong-Tao ; PENNISON, Michael J. ; SADIM, Maureen ; PASCHE, Boris ; TANNER, Stephan M. ; CHAPELLE, Albert de l.: Germline allele-specific expression of TGFBR1 confers an increased risk of colorectal cancer. In: *Science* 321 (2008), Sep, Nr. 5894, S. 1361–5
- [107] VENTER, J C. u. a.: The sequence of the human genome. In: *Science* 291 (2001), Feb, Nr. 5507, S. 1304–51
- [108] WENG, Hong-Lei ; CIUCLAN, Loredana ; LIU, Yan ; HAMZAVI, Jafar ; GODOY, Patricio ; GAITANTZI, Haristi ; KANZLER, Stefan ; HEUCHEL, Rainer ; UEBERHAM, Uwe ; GEBHARDT, Rolf ; BREITKOPF, Katja ; DOOLEY, Steven: Profibrogenic transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. In: *Hepatology* 46 (2007), Oct, Nr. 4, S. 1257–70
- [109] WHEELER, M D. ; KONO, H ; YIN, M ; NAKAGAMI, M ; UESUGI, T ; ARTEEL, G E. ; GÄBELE, E ; RUSYN, I ; YAMASHINA, S ; FROH, M ; ADACHI, Y ; IIMURO, Y ;

- BRADFORD, B U. ; SMUTNEY, O M. ; CONNOR, H D. ; MASON, R P. ; GOYERT, S M. ; PETERS, J M. ; GONZALEZ, F J. ; SAMULSKI, R J. ; THURMAN, R G.: The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. In: *Free Radic Biol Med* 31 (2001), Dec, Nr. 12, S. 1544–9
- [110] WIEGAND, Johannes ; BERG, Thomas: The Etiology, Diagnosis and Prevention of Liver Cirrhosis: Part 1 of a Series on Liver Cirrhosis. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 110 (2013), Nr. 6, S. 85–91
- [111] WIGHT, Thomas N. ; POTTER-PERIGO, Susan: The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? In: *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (2011), Nr. 6, S. G950–G955
- [112] WRANA, J L. ; ATTISANO, L ; WIESER, R ; VENTURA, F ; MASSAGUÉ, J: Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. In: *Nature* 370 (1994), Aug, Nr. 6488, S. 341–7
- [113] YAN, Hai ; ZHOU, Wei: Allelic variations in gene expression. In: *Curr Opin Oncol* 16 (2004), Jan, Nr. 1, S. 39–43
- [114] YEE, L J. ; TANG, J ; HERRERA, J ; KASLOW, R A. ; LEEUWEN, D J.: Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. In: *Genes Immun* 1 (2000), Aug, Nr. 6, S. 386–90

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an alle, die mich im Rahmen meiner Doktorarbeit unterstützt haben und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Roman Liebe für die gute Zusammenarbeit und Betreuung, die vielen Diskussionen und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Frank Lammert für die Überlassung des Themas und für die zahlreichen Anregungen und nicht zuletzt die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Lammert bedanken, die mich während des experimentellen Teils der Arbeit unterstützt haben. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. Susanne Weber für die Einführung in die verschiedenen Färbemethoden. Danken möchte ich ebenfalls Rabea Hall für die Einführung und Hilfe bei der Auswertung histologischer Schnitte sowie bei der PCR.

Ein großes Dankeschön geht zudem an Annika Bohner für die vielen Ratschläge und stetige Hilfsbereitschaft im Labor.

Danke auch an Katrin Hochrath für die Hilfe bei der Auswertung der RT-PCR.

Vielen lieben Dank an meine Familie für die Ermöglichung des Studiums und die uneingeschränkte seelische und moralische Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und darüber hinaus.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Jakob Schröder, der mich durch seine Liebe und sein Vertrauen immer wieder gestärkt hat und mir auf diese Weise die größte Unterstützung war.

