



**II. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**
(Direktor: Prof. Dr. Roland M. Schmid)

**Charakterisierung der Rolle des putativen adulten
Leberprogenitorzellkompartiments in der
Hepatokarzinogenese mittels *Lineage Tracing* im Mausmodell**

Julian Oliver Thalhammer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummary

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Fabian Geisler
2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 20.03.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.01.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1. Leberentwicklung und Leberaufbau.....	3
1.2. Die Rolle der duktaalen Reaktion in der Leberregeneration.....	5
1.3. HNF1 β als Marker duktaaler Reaktionen	7
1.4. Das HNF1bCreER Mausmodell als hocheffektives Werkzeug zum spezifischen <i>Lineage Tracing</i> des duktaalen Kompartiments in der Leberregeneration	10
1.5. Zur Rolle von Krebsstammzellen beim HCC und CC	13
1.6. Auf der Suche nach der Ursprungszelle der Lebertumoren	15
1.7. Mausmodelle zur Untersuchung der Sensibilität von Zellen der duktaalen Reaktion gegenüber onkogener Transformation	17
2 Zielsetzung.....	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Allgemeine Substanzen, Chemikalien und Materialien	22
3.1.2 Allgemeine Geräte.....	23
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	23
3.1.4 Antikörper.....	24
3.1.5 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide.....	26
3.2 Tierexperimentelle Materialien und Methoden.....	26
3.2.1 Verwendete Mauslinien.....	26
3.2.2 Tierexperimentelle Materialien und Anästhetika	28
3.2.3 Allgemeine Haltungsbedingungen	28
3.2.4 Spezialdiäten: DDC-Diät und CDE-Diät	29
3.2.5 Induktion der Rekombination mittels Cre-Rekombinase	30
3.2.6 DEN-Modell.....	30
3.2.7 Sektion der Mäuse und makroskopische Aufnahmen.....	31
3.3 Histologische Methoden	32
3.3.1 Gewebeaufbereitung für Paraffinhistologie.....	32
3.3.2 Gewebeaufbereitung für Gefrierschnitte (Kryoschnitte)	32
3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
3.3.4 Immunhistochemie	33
3.3.5 Immunofluoreszenz	34
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	34
3.4.1 Genotypisierung der Mäuse.....	34
3.4.2 PCR und Gelelektrophorese.....	35
4 Ergebnisse.....	36

4.1	Aus den Zellen der duktaalen Reaktion entstehen keine Lebertumoren in Mdr2 ^{-/-} -Mäusen.....	37
4.2	Aus den Zellen der duktaalen Reaktion entstehen keine Lebertumoren im DEN-Modell.	39
4.3	Die spezifische Aktivierung von Kras und Inaktivierung von p53 in HNF1β+ Zellen resultiert nicht in lebereigenen Tumoren, aber führt zu Adenokarzinomen in der Lunge aus Alveolarzellen Typ II.....	41
4.4	Leberspezifische Schädigungsmodelle führen zur malignen Transformation von HNF1β+ Zellen der Leber im HKP-Modell	46
4.4.1	HKP-Mäuse entwickeln HCC-ähnliche Tumoren aus HNF1β+ Zellen unter CDE-Diät ..	46
4.4.2	HKP-Mäuse unter DDC-Diät entwickeln Cholangiokarzinome aus HNF1β+ Zellen	49
5	Diskussion	53
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis.....	68
8	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur Entwicklung der Leber.	3
Abbildung 2: Gallengänge und Hering Kanäle im Schema und in der Histologie.....	5
Abbildung 3: Hypothetisches Schema der <i>streaming liver</i> angelehnt an die Veröffentlichung von (Furuyama et al., 2011).	6
Abbildung 4: Spezifische Expression von HNF1 β in Gallengangszellen und in der dukta- len Reaktion.	10
Abbildung 5: Hocheffektive und hochspezifische Markierung des dukta- len Kompartiments in <i>R26^{Tom}Hnf1bCreER</i> -Mäusen.....	11
Abbildung 6: Schemazeichnung zur normalen Differenzierung aus Stammzellen und zur Krebsentstehung.	14
Abbildung 7: Postuliertes Schema zur Rolle von Krebsstammzellen bzw. Ursprungszellen der Krebsentstehung in der Leber.	17
Abbildung 8: <i>Mdr2^{-/-}R26^{Tom}Hnf1bCreER</i> -Mäuse entwickeln typische HCCs.	37
Abbildung 9: Hepatozelluläre Karzinome entstehen nicht aus dem mutmaßlichen Leberprogenitorzell-Kompartiment im <i>Mdr2^{-/-}</i> -Modell.	38
Abbildung 10: In <i>R26^{Tom}Hnf1bCreER</i> -Mäusen entstehen im DEN-Modell klassische HCC-Knoten, welche makroskopisch tdTom negativ sind.	40
Abbildung 11: Hepatozelluläre Karzinome entstehen im DEN-Modell nicht aus dem mutmaßlichen Leberprogenitorzell-Kompartiment.	41
Abbildung 12: Kras-Aktivierung/p53-Inaktivierung in HNF1 β + Zellen führt zu Adenokarzinomen in der Lunge.....	43
Abbildung 13: Hetero- und homozygote HKP-Mäuse zeigen in der Leber außer einer milden dukta- len Reaktion keinen pathologischen Phänotyp oder spontane Tumorentwicklung.	45
Abbildung 14: HKP homozygote Mäuse unter CDE-Diät entwickeln HCC-ähnliche Tumoren aus HNF1 β + Zellen.....	49
Abbildung 15: In HKP hetero- und homozygoten Mäuse unter DDC-Diät entstehen Cholangiokarzinome aus HNF1 β + Zellen (1).	50
Abbildung 16: In HKP hetero- und homozygoten Mäusen unter DDC-Diät entstehen Cholangiokarzinome aus HNF1 β + Zellen (2).	52
Abbildung 17: Übersicht über die Ergebnisse der <i>Lineage Tracing</i> Versuche in der <i>R26^{Tom}Hnf1bCreER</i> -Maus.	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beschreibung der primären Antikörper mit verwendeter Verdünnung.....	24
Tabelle 2: Beschreibung der sekundären Antikörper mit verwendeter Verdünnung.....	25
Tabelle 3: Primer für Genotypisierungen.....	26
Tabelle 4: Ausführliche Beschreibung der verwendeten Mauslinien.....	27
Tabelle 5: Durch Kreuzung entstandene Mauslinien.....	27
Tabelle 6: Tierexperimentelle Materialien und Anästhetika.....	28

Abkürzungsverzeichnis

Alb	Albumin
AFP	α -Fetoprotein
BilIN	Biliäre Intraepitheliale Neoplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Cholangiokarzinom
CCl ₄	Tetrachlormethan
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDE	Cholin-defizient, Ethionin-supplementiert
CK19	Cytokeratin 19
Col IV	Kollagen IV
d	Tag
DAPM	Methyldianilin
DDC	3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
DEN	n-Nitrosodiethylamin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	duktale Reaktion
DRC, DRCs	<i>ductular reactive cell, ductular reactive cells</i>
E	Tag der Embryogenese
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GP73	Glykoprotein 73
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNF1 β	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1β</i>
HNF4 α	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4α</i>
ICC	Intrahepatisches Cholangiokarzinom
IF	Immunofluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
Kras	Kirstin-ras
krpm	tausend Umdrehungen pro Minute

LPC, LPCs	<i>liver progenitor cell, liver progenitor cells</i>
N2IC	intrazelluläre Domäne von Notch 2
mRNS	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
M	Monat
P	Postpartaler Tag
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SOX9	Sry HMG Box Protein 9
tdTom	tdTomato
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers für Kohlenhydrate, Fette und Aminosäuren. Zudem ist sie der Hauptort der Serumproteinsynthese, der Entgiftung, der Medikamentenkonjugation und besitzt eine wichtige Rolle im Säure-Basen-Haushalt. Des Weiteren produziert sie die Gallensäuren, enthält den mittelfristigen Energiespeicher und Vitaminvorrat des Körpers und übernimmt immunologische Aufgaben. Sie kann auf vielfältige Art und Weise erkranken. Akutes Leberversagen führt innerhalb weniger Tage zum Tod. Chronische Erkrankungen der Leber führen zur Vernarbung der Leber, was als Leberzirrhose bezeichnet wird. Eine Leberzirrhose höheren Stadiums stellt in der Regel einen irreversiblen Prozess dar, der nur durch die Transplantation eines Spenderorgans kurativ behandelt werden kann. Zudem können die Funktionen der Leber bis heute nicht zufriedenstellend konservativ oder artifiziell ersetzt werden.

Die Leber besitzt bemerkenswerte regenerative Kapazitäten, um ihre lebensnotwendigen Funktionen zu erhalten. So können Säugetiere den akuten Verlust von nahezu 75 Prozent der Lebermasse in nur wenigen Wochen vollständig kompensieren und das Organ erreicht annähernd sein Ausgangsvolumen (Duncan, Dorrell, & Grompe, 2009; Higgins & Anderson, 1931). In diesem Fall besteht der Hauptmechanismus der Leberregeneration aus der Hyperplasie und Proliferation reifer Hepatozyten und aller anderen Zelltypen der Leber (G. K. Michalopoulos, 2011). Im Fall einer chronischen Schädigung besitzt die Leber die Fähigkeit sich über noch nicht vollends geklärte Mechanismen selbst zu regenerieren. Besondere Bedeutung für die Regeneration unter chronischer Leberschädigung wird dem Phänomen der duktaalen Reaktion (DR) zugeschrieben. Unter der duktaalen Reaktion versteht man eine zelluläre Reaktion duktaalen Phänotyps, die nahezu in allen Formen akuter, wie auch chronischer Lebererkrankungen, auftritt (T. A. Roskams et al., 2004). Bei der duktaalen Reaktion werden an der Grenzfläche zwischen Portalfeld und Parenchym Zellinfiltrate einer Vielzahl verschiedener Zellen beobachtet (Gouw, Clouston, & Theise, 2011). Neben Sternzellen, Immunzellen und endothelialen Zellen, findet man charakteristischerweise auch phänotypisch biliäre Zellen bzw. intermediäre hepatobiliäre Zellen, welche ursprünglich in Rattenexperimenten entdeckt und aufgrund ihres Aussehens als Ovalzellen (*oval cells*) bezeichnet wurden (E. Farber, 1956). Später wurden diese Zellen von Leduc auch duktaale Hepatozyten genannt (Leduc, 1959). Heutzutage werden diese Zellen vorzugsweise als *ductular reactive cells* (DRCs) bezeichnet, und wenn im Folgenden von Zellen der duktaalen Reaktion gesprochen wird, sind ausschließlich diese Zellen mit duktaalem Phänotyp gemeint. Welches Zellkompartiment der Leber bei der duktaalen Reaktion proliferiert und aus welchem Kompartiment die DRCs stammen ist nicht definitiv geklärt. Eine weithin akzeptierte Hypothese besagt, dass DRCs transit-amplifizierende Zellen eines in den terminalen

Gallengängen (Heringskanälchen, *canals of Hering*, CoH) lokalisierten adulten fakultativen Stammzellkompartiments sind und somit eine Subpopulation biliärer Zellen darstellen. Zumeist konventionelle histologische 2D und *in vitro* Studien führten zur weitverbreiteten Hypothese, dass diese dukta len Zellen als bipotentia les zelluläres Reservekompartiment in der Leberregeneration fungieren. Demzufolge können DRCs sowohl zu Cholangiozyten als auch zu Hepatozyten differenzieren, sollte ein Replikationsblock die autogene Regeneration von Cholangiozyten und Hepatozyten verhindern. Sie stellen somit einen alternativen Notfallplan dar. DRCs werden aus diesem Grund häufig synonym als „Leberprogenitorzellen“ (LPC) oder „adulte Leberstammzellen“ bezeichnet (Malcolm R. Alison & Lin, 2016; Kordes & Haussinger, 2013; Kung & Forbes, 2009; Miyajima, Tanaka, & Itoh, 2014). Viele Hinweise wie die putative Plastizität der DRCs, sowie das Auftreten der DR in Erkrankungen, die eine Prädisposition für Leberkrebs darstellen, und auch die histologische Ähnlichkeit von DRCs mit bestimmten Subtypen von Hepatozellulären Karzinomen (HCC) und Cholangiokarzinomen (CC) führten zur Hypothese, dass dukta le Reaktionen Vorläuferläsionen dieser Karzinome darstellen könnten und somit die Ursprungszellen der dukta len Reaktion auch die Ursprungszellen dieser Karzinome sein könnten (Komuta et al., 2008; Yamashita & Wang, 2013).

Erstmals stehen im Mausmodell nun neuartige molekularbiologische Werkzeuge in Form des *Lineage Tracings* zur Verfügung, um diese Hypothese *in vivo* zu überprüfen. *Lineage Tracing* lässt sich in etwa als Verfolgen des Zellschicksals oder der Zelllinie übersetzen und ermöglicht es, ein Kompartiment zellspezifisch zu einem bestimmten Zeitpunkt mit einem permanenten Marker genetisch zu markieren. Dieser Marker, beispielsweise ein fluoreszierendes Protein, wird an alle Tochterzellen weitergegeben, die aus der Zielzelle hervorgehen, und ermöglicht so eine genaue Aussage über deren Abstammung (Kretzschmar & Watt, 2012; Madisen et al., 2010).

Durch *Lineage Tracing* der DRCs soll in der vorliegenden Arbeit mittels zweier verschiedener Ansätze geklärt werden, ob DRCs die Ursprungszellen der Lebertumoren HCC und CC sein können. Erstens werden Mäuse mit dem *Lineage* Marker in klassischen HCC-Mausmodellen untersucht und zweitens soll das DRC-Kompartiment durch DRC-spezifische genetische Manipulation von Onkogenen und Tumorsuppressoren auf seine Sensibilität gegenüber maligner Transformation untersucht werden. Die histologische Analyse der Mäuselebern mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IF-Mikroskopie) und Immunhistochemie (IHC) wird zeigen, ob potentiell zu beobachtende Tumore den weitergegebenen Marker der DRCs exprimieren und so zur Klärung der kontrovers diskutierten Frage beitragen, ob DRCs Ursprungszellen von Lebertumoren sein können.

1.1. Leberentwicklung und Leberaufbau

Die embryonale Entwicklung der Leber ist in ihren Signalwegen und morphologischen Merkmalen der dukталen Reaktion ähnlich, weshalb zunächst die embryonale Entwicklung und der adulte Aufbau der Leber besprochen wird (Kung, Currie, Forbes, & Ross, 2010; Zhang, Theise, Chua, & Reid, 2008). Die Entwicklung der Leber beginnt in der Maus um den embryonalen Tag 8,5 (E8,5) mit der Vereinigung des lateralen und medialen Entoderms zur Leberknospe. Daraufhin induzieren mesodermale Signale die hepatische Differenzierung und die Organogenese um E10 (Bort, Signore, Tremblay, Martinez Barbera, & Zaret, 2006). Die neu entstandenen hepatisch differenzierten Zellen werden als Hepatoblasten bezeichnet. Sie exprimieren hepatozytäre Proteine wie Albumin (Alb), α -Fetoprotein (AFP) und Transthyrethin und sind bipotent. Dies bedeutet, dass Hepatoblasten die Fähigkeit besitzen, sowohl zu reifen Hepatozyten, als auch Cholangiozyten zu differenzieren (Zaret, 2008). Die Entwicklung der Gallengänge erfolgt in zwei Schritten. Zunächst entsteht ab E15,5 aus einer Subgruppe der Hepatoblasten durch Differenzierung die sogenannte Duktalplatte rings um die Portalvene (Abbildung 1 links). Um E16,5 entwickeln sich aus der Duktalplatte asymmetrische Hohlstrukturen, die die späteren Gallengänge bilden. Durch die Differenzierung von parenchymseitigen Hepatoblasten zu Gallengangsepithelzellen entstehen anschließend Lumina (Abbildung 1 Mitte) (Carpentier et al., 2011). Schließlich werden die reifen Gallengänge vom Stroma der mesenchymalen Zellen umkleidet (Abbildung 1 rechts). In Vorarbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass der Notch Signalweg der entscheidende Faktor für die biliäre Differenzierung ist. Insbesondere das Fehlen von Notch2 erzeugt schwere Missbildungen im biliären System (Geisler et al., 2008). Dies zeigt sich beispielsweise in der hereditären Krankheit des Alagille-Syndroms, bei dem die Betroffenen aufgrund von Mutationen im Notch Signalweg unter anderem an einer Hypoplasie der intrahepatischen Gallengänge leiden (Morell, Fiorotto, Fabris, & Strazzabosco, 2013).

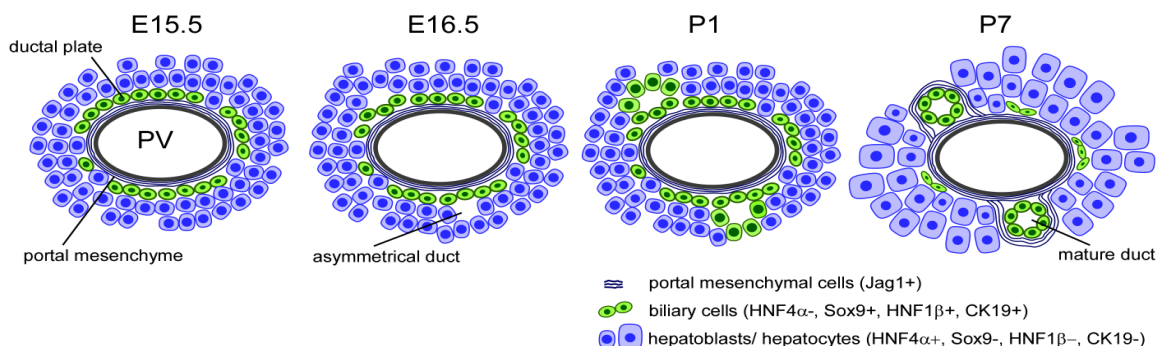


Abbildung 1: Schema zur Entwicklung der Leber.

Normale Entwicklung der Leber in der Maus ab E15,5 am Beispiel eines Portalfeldes. Die verschiedenen Zellen lassen sich durch ein zellspezifisches Expressionsmuster molekularer Marker unterscheiden. Modifiziert aus (Geisler & Strazzabosco, 2014)

Intrahepatisch beginnt das biliäre System mit der Formation des Kanalikulären Systems. Das Kanalikuläre System ist ein dreidimensionales Netzwerk aus Gallenkanälchen („Kanalikuli“), welches anatomisch durch einen apikalen Interzellularspalt zwischen 2-3 benachbarten Hepatozyten gebildet wird. Die kurze Verbindungszone des Kanalikulären Netzwerks zu den eigentlichen, aus Gallengangsepithel aufgebauten, periportalen interlobulären Gallengängen wird nach dem deutschen Anatom und Erstbeschreiber Ewald Hering als Hering-Kanälchen (*Canals of Hering*, CoH) bezeichnet (Hering, 1866). Die CoH leiten die Galle in die größeren Gallengänge weiter (Abbildung 2 links). In Ermangelung eines spezifischen Markers sind die Zellen der CoH histologisch nicht von biliären Zellen zu unterscheiden. Da die Zellen der CoH aus der Duktalplatte entstehen, stellen sie möglicherweise die adulten Reste der Duktalplatte dar (Carpentier et al., 2011). Demnach hätten sie sich hypothetisch die bipotenten Eigenschaften von Hepatoblasten bewahrt und könnten in der adulten Leber als adulte Leberprogenitorzellen (LPC) fungieren, aus denen die duktale Reaktion entsteht (Itoh & Miyajima, 2014; Naoki Tanimizu & Mitaka, 2014; Theise et al., 1999).

LPCs werden oft Stammzeleigenschaften zugeschrieben und als fakultative Stammzellen bezeichnet. In vielen anderen regenerativen Geweben wie Haut, Darm und hämatopoetischen System gelang es, die jeweiligen Stammzellen zu identifizieren, in der Leber jedoch noch nicht (G. K. Michalopoulos, 2014b; Sell, 1990; Yanger & Stanger, 2011). Die Idee der fakultativen Stammzelle besagt, dass diese Zelle nur in bestimmten Situationen Stammzeleigenschaften annimmt, wie zum Beispiel chronische Schädigungen mit Replikationsblockade der Hepatozyten. *Fakultativ* nennt man die LPCs, da sie nur in Erscheinung treten, wenn die Leber geschädigt wird (*injury-induced*). LPCs wurden bereits erfolgreich *post mortem* aus den Lebern von Mäusen in Leberschädigungs-Modellen isoliert (Dorrell et al., 2011; Huch et al., 2013; Lu et al., 2015; N. Tanimizu, Nishikawa, Ichinohe, Akiyama, & Mitaka, 2014). Als *Stammzellen* werden LPCs bezeichnet, da sie *in vitro* bipotent sind und sowohl zu Cholangiozyten als auch zu Hepatozyten differenzieren können. Dabei ist es wichtig, LPCs von den Hepatoblasten als fetale Stammzellen abzugrenzen (Boulter, Lu, & Forbes, 2013; Fausto, Campbell, & Riehle, 2006; G. K. Michalopoulos, 2011). Bisher existierte aber kein *in vivo* Nachweis für die Bipotenz von DRCs, und so war ihr Status als potentielle LPCs Gegenstand kontroverser Diskussionen.

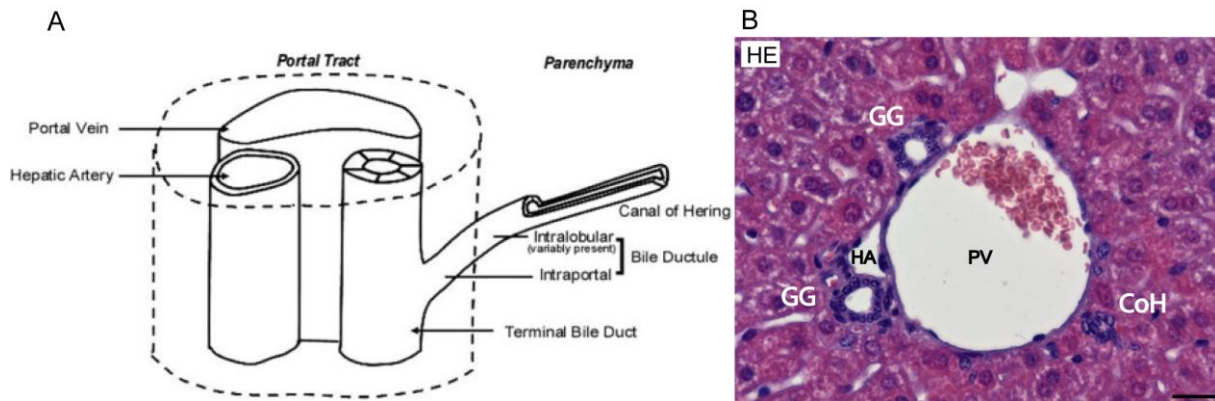


Abbildung 2: Gallengänge und Hering Kanäle im Schema und in der Histologie.

A) Schema der normalen Verzweigung eines Gallengangs beim Menschen übernommen aus (T. A. Roskams et al., 2004). In der murinen Leber findet sich wegen des geringeren mesenchymalen Bindegewebsaums meist kein oder ein stark verkürzter intralobulärer Gang. **B)** HE-Färbung eines Portalfeldes einer 198 Tage alten Wildtypmaus in 40x Vergrößerung. Es kommen zwei interlobuläre Gallengänge umgeben von mesenchymalen Bindegewebsaum zur Darstellung, die dem Terminal Bile Duct aus A entsprechen, sowie eine weitere Ansammlung biliärer Zellen, die ein Hering-Kanälchen darstellen. PV = Portalvene, HA = Arteria hepatica, GG = interlobulärer Gallengang, CoH = Hering-Kanälchen. Maßstabsbalken: 25 µm

1.2. Die Rolle der dukталen Reaktion in der Leberregeneration

Um dukтale Reaktionen und LPCs *in vivo* zu studieren und zur Charakterisierung der funktionellen Rolle der DR bzw. LPC in der Leberregeneration sind bislang DR-Tiermodelle nötig. Emmanuel Farber, der Erstbeschreiber der DRCs (damals: *oval cells*), führte in Ratten eine partielle Hepatektomie durch und unterband die natürliche Replikation der Hepatozyten durch vorherige Gabe von 2-Acetylaminofluoren, woraufhin er DRs beobachtete (Evarts, Nagy, Nakatsukasa, Marsden, & Thorgeirsson, 1989; E. Farber, 1956). Dieses Modell wird heute zwar auch noch in Ratten benutzt, führt allerdings in der Maus nicht zu einer DR und 2-Acetylaminofluoren verursacht zudem keine vollständige Blockade der Hepatozytenreplikation. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodelle sind die klassischen DR-Modelle, namentlich die 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine Diät (DDC-Diät) und die Cholin-defiziente Ethionin-supplementierte Diät (CDE-Diät) (G. K. Michalopoulos, 2011). Weitere Schädigungsmodelle, die in der Maus zu jeweils charakteristischen dukталen Reaktionen führen, sind einzelne oder wiederholte Gaben von Tetrachlormethan (CCl₄), Methylenedianilin (DAPM) oder hochdosiertem Paracetamol und die operative totale oder partielle Gallengangsligatur, bei der es durch Ligatur der Gallengänge zur Cholestase kommt (G. K. Michalopoulos, Barua, & Bowen, 2005; Santa Cruz, Liu, Kaphalia, & Kanz, 2007; Theise et al., 1999).

Die Verknüpfung von DR-Modellen mit *Lineage Tracing*-Modellen ermöglicht genauen Aufschluss über das Ursprungskompartiment der DR. Dabei sorgte 2011 eine Veröffentlichung von Furuyama für großes Aufsehen (Furuyama et al., 2011). In dieser wurde postuliert, dass Sry HMG Box Protein 9 (SOX9) positive biliäre Zellen, sowohl in der Homöostase als auch nach verschiedenen Schädigungsmodellen die Hauptquelle neuer

Hepatozyten darstellen, welche kontinuierlich von periportal nach zentrolobulär migrieren. SOX9+ Zellen dienen sozusagen als Quelle der Regeneration für das gesamte Leberläppchen (Abbildung 3). Diese Beobachtung verlieh der alten Hypothese einer *streaming liver* (engl. strömende Leber) neue Beachtung und schien diese zu bestätigen (Zajicek, Oren, & Weinreb, 1985). Nach dieser Theorie wandern die Hepatozyten in ihrem 200 Tage langen Lebenszyklus von periportal nach zentrolobulär, durchlaufen in den unterschiedlichen Azinusbereichen verschiedene Differenzierungsstufen mit unterschiedlichen enzymatischen Aufgaben und werden kontinuierlich durch periportale LPC ersetzt.

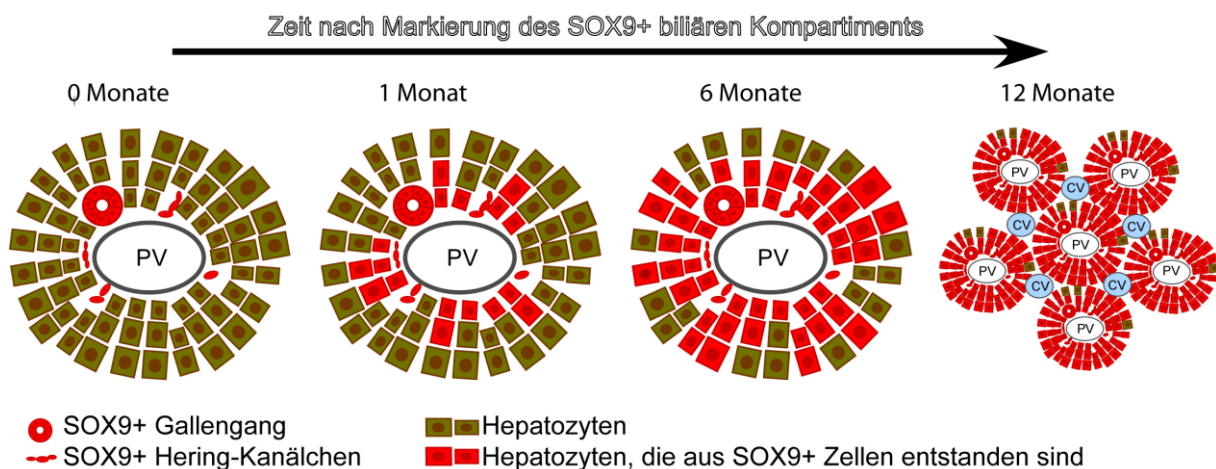


Abbildung 3: Hypothetisches Schema der *streaming liver* angelehnt an die Veröffentlichung von (Furuyama et al., 2011). Das SOX9+ Kompartiment wird Cre-induziert mit dem Fluoreszenzprotein tdTom markiert (rot). Dabei entstehen aus dem SOX9+ Kompartiment in der Leberhomöostase kontinuierlich neue Hepatozyten. Die Hepatozyten durchlaufen unterschiedliche Lebensabschnitte mit verschiedenen enzymatischen Funktionen, bis sie schließlich zu Grunde gehen. Dabei migrieren die Hepatozyten von periportal nach zentrolobulär. Nach 12 Monaten ist fast die gesamte Leber durch kontinuierliche Proliferation des SOX9+ Kompartiment erneuert worden. PV = Portalvene, CV = Zentralvene. Abbildung AG Geisler

Doch nur kurz darauf berichtete eine andere Arbeitsgruppe um Holger Willenbring, dass sich Hepatozyten nach verschiedenen Schädigungsmodellen beinahe ausschließlich aus Hepatozyten generieren (Malato et al., 2011). Es gelang ihnen nahezu 100% der Hepatozyten zu einem bestimmten Zeitpunkt mithilfe eines rekombinanten Cre-exprimierenden Adenovirus höchst spezifisch zu markieren. Sowohl in der Homöostase als auch nach diversen Schädigungsmodellen (CCl₄, BDL, DDC-Diät und $\frac{2}{3}$ partieller Hepatektomie) blieben fast alle Hepatozyten markiert, was eine signifikante Neogenese von Hepatozyten extrahepatozytären Ursprungs ausschließt. Eine weitere Studie von Español-Suñer et al., in der das biliäre Kompartiment mit einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase unter einem Osteopontin-Promotor markiert wurde, beobachtete, dass das LPC-Kompartiment in der normalen Leberhomöostase keine Differenzierung hin zu Hepatozyten zeigt und dies auch in den gängigen Schädigungsmodellen unterbleibt. Lediglich unter CDE-Diät beobachtete man nach zwei Wochen einen Hepatozytenanteil von

0,78 %, bzw. 2,45 % nach weiteren zwei Wochen Regeneration ohne CDE-Diät (Espanol-Suner et al., 2012). Dieser offensichtliche Widerspruch wurde in etlichen nachfolgenden Publikationen auf die mangelnde Spezifität der von Furuyama et al. verwendeten *Sox9CreERT2*-Cre-Rekombinase zurückgeführt, welche auch wenige periportale Hepatozyten markierte (Jors et al., 2015; Tarlow, Finegold, & Grompe, 2014; Yanger et al., 2014).

Während diese Untersuchungen allesamt im Mausmodell stattfanden, wurden für das Zebrafischmodell zwei Studien publiziert, die darauf hindeuten, dass vor allem die Schwere des akuten hepatozytären Schadens bestimmt, aus welchem Kompartiment die Regeneration erfolgt. So konnten in Zebrafischlarven Cholangiozyten in schweren Schadensverläufen über eine Dedifferenzierung zu Vorläuferzellen redifferenzieren und die Leber komplett erneuern und auch effektiv zu Hepatozyten differenzieren (Transit-Amplifikation) (Choi, Ninov, Stainier, & Shin, 2014; J. He, Lu, Zou, & Luo, 2014). Bei analogen Versuchen mit adulten Zebrafischen wurde allerdings eine konstitutive Cre-Rekombinase eingesetzt, womit nur eingeschränkte Aussagen über die Regeneration der adulten Leber möglich sind. Die Problematik von *Lineage Tracing* mit konstitutiven Cre-Rekombinasen wird später noch eingehender diskutiert (vgl. S. 18 und 58). Die Rolle der duktaalen Reaktion in der Regeneration stellt sich also in der Literatur widersprüchlich dar, insbesondere fehlen langfristige Beobachtungen über mehrere Monate, wie sie für die Analogie zum humanen chronischen Leberschaden erforderlich sind.

1.3. HNF1 β als Marker duktaaler Reaktionen

In den meisten der neueren *Lineage Tracing* Studien wird das Cre-loxP System verwendet, welches eine elegante Methode darstellt, um direkte Nachkommen einer Zielzelle bzw. spezifischen Zellpopulation zu identifizieren und zu verfolgen. Das Cre-loxP System ist ein bewährtes Instrument zur Erzeugung gewebsspezifisch konditionaler Knockout-Mäuse oder Reportermause (Kretzschmar & Watt, 2012). Bei der Cre-Rekombinase handelt es sich um ein Enzym, das DNS an speziellen Stellen, den sogenannten loxP (*Locus of crossover in P1*) Sequenzen, rekombinieren, also schneiden und ligieren kann (Nagy, 2000). Verbunden mit einem gewebsspezifischen Promotor, im Falle dieser Arbeit *Hepatocyte nuclear factor 1b* (*Hnf1b*), ist die Cre-Rekombinase nur in Geweben aktiv, in denen HNF1 β exprimiert wird. Zusätzlich kann der Promotor mit einer rekombinanten Ligandenbindungsdomäne eines Östrogenrezeptors (ERT2) verbunden werden, welche zwar nicht auf natürliche Östrogene reagiert, aber auf das synthetische Antiöstrogen Tamoxifen. Auf diese Weise kann die Cre-Rekombinase zu einem beliebigen Zeitpunkt durch Tamoxifengabe aktiviert werden. Induzierbare Knockouts („loss-of-function“) oder Reporter- und Onkogenaktivierungen („gain-of-function“) werden möglich, indem man eine CreERT2-Rekombinase transgene Maus mit

einer weiteren transgenen Maus kreuzt, bei der beispielsweise das Gen für p53 von loxP Sequenzen flankiert respektive gefloxt ist (Anastassiadis, Glaser, Kranz, Berhardt, & Stewart, 2010; Feil, Wagner, Metzger, & Chambon, 1997). Da diese Änderungen permanent in der DNS der Zelle verankert werden, werden sie auch an jede Zelle weitergegeben, die aus dieser Zelle entsteht. Wenn nun ein Reporter gen wie im Rahmen dieser Arbeit das Fluoreszenzprotein Rosa26-CAG-tdTomato (*R26^{Tom}*) exprimiert wird, erlaubt dies die gezielte Verfolgung der markierten Zelllinie (Madisen et al., 2010). Da die CreERT2-Rekombinase nur zum Zeitpunkt der Tamoxifenapplikation im Kern aktiv ist und Tamoxifen innerhalb von einigen Tagen abgebaut wird, erlaubt diese Methode die gezielte Verfolgung eines Kompartiments *in vivo* über einen beliebig langen Zeitraum. So lässt sich die zelluläre Plastizität der Zielpopulation optimal untersuchen, da ersichtlich wird, ob zum Analysezeitpunkt nur Zellen des gleichen Typs markiert sind oder auch phänotypisch andere Zellen, die somit aus der zu Beginn markierten Zellpopulation entstanden sein müssen. Das Verfolgen des Zellschicksals einer Zielzelle mittels des Cre-loxP Systems steht und fällt mit der Zellspezifität des Promotors, da nur bei exklusiver Markierung des Zielkompartiments ohne ektopische Markierung sichergestellt ist, dass man das richtige Kompartiment beobachtet. Ebenso muss sichergestellt sein, dass ausreichend viele Zellen des Zielkompartiments markiert werden, also eine genügend hohe Rekombinationsrate vorhanden ist. Ansonsten könnten beispielsweise ganze Subpopulationen, die histologisch nicht voneinander zu trennen sind, unerkant bleiben. Solche Subpopulationen könnten abweichende prospektive Zellschicksale besitzen. Insbesondere für unseren Versuchsaufbau ist dies entscheidend, da das eigentliche Kompartiment von Interesse nicht das gesamte biliäre Kompartiment ist, sondern die mutmaßlich darin enthaltene Subpopulation der LPC.

In Vorarbeiten unserer Gruppe konnten wir zeigen, dass sich HNF1 β in der Leber als spezifischer Marker des biliären und des potentiellen LPC-Kompartiments sehr gut eignet (Jeliazkova et al., 2013). Das HNF1 β spezifische CreERT2 System wurde bereits von Solar et. al erfolgreich verwendet (*Hnf1bCreERT2* Mausmodell), um im Pankreas das zelluläre Schicksal der embryonalen HNF1b+ Kompartimente zu verfolgen (Solar et al., 2009). Es wurde uns freundlicherweise von Jorge Ferrer von der endokrinologischen Abteilung des Imperial College London zur Verfügung gestellt. Die *Hnf1bCreERT2* Maus enthält ein artifizielles bakterielles Chromosom im Exon 1 des *Hnf1b*-Lokus, das zur temporären nukleären Translokation der Cre-Rekombinase nach intraperitonealer Tamoxifeninjektion führt. Ohne Tamoxifenkontakt erfolgte die Cre-Expression lediglich zytoplasmatisch. *Hnf1b* ist ein Homöoboxgen, das eine entscheidende Rolle in der biliären Differenzierung bipotenter Hepatoblasten in der Embryogenese einnimmt. Im adulten Organismus wird HNF1 β neben dem biliären Kompartiment auch in anderen tubulär organisierten Epithelien wie dem

exokrinen Pankreas, den Nierentubuli und der Lunge exprimiert (De Simone et al., 1991; Lazzaro, De Simone, De Magistris, Lehtonen, & Cortese, 1992).

In der adulten Leber der Maus und des Menschen wird HNF1 β verstärkt in der duktaalen Reaktion nach Leberschädigungen exprimiert. Das Expressionsmuster gleicht in Immunofluoreszenzfärbungen (IF-Färbungen) nahezu komplett dem Expressionsmuster von anderen etablierten biliären Markern wie Cytokeratin-19 (CK19), SOX9 und A6 (Abbildung 4 A) (Jeliazkova et al., 2013). In simultanen IF-Färbungen mit zwei Antikörpern spricht man in diesem Fall von Co-Lokalisation der Fluoreszenzsignale. In adulten Hepatozyten, die typischerweise Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (HNF4 α) exprimieren, erfolgt keine Expression von HNF1 β , wie wir durch IF-Doppelfärbungen mit den jeweiligen Antikörpern zeigen konnten. Bei der Quantifizierung der Zellen zeigten sich nahezu vollständige Co-Lokalisation von HNF1 β und SOX9 bzw. CK19 und eine extrem geringe Co-Lokalisation von HNF1 β und HNF4 α (0,008%, Abbildung 4 B). In typischen Schädigungsmodellen, wie der CDE-Diät war die DR deutlich HNF1 β + (Abbildung 4 C und 4 D Mitte). Diese Ergebnisse ermutigten uns *Hnf1b* als vielversprechenden Promotor für das *Lineage Tracing* der duktaalen Reaktion zu benutzen, um zu überprüfen, inwiefern das biliäre Kompartiment und das darin mutmaßlich enthaltene LPC-Kompartiment zur Regeneration der Leber nach chronischer Schädigung beiträgt und ob Hepatozyten aus DRCs neu entstehen können (Abbildung 4 D).

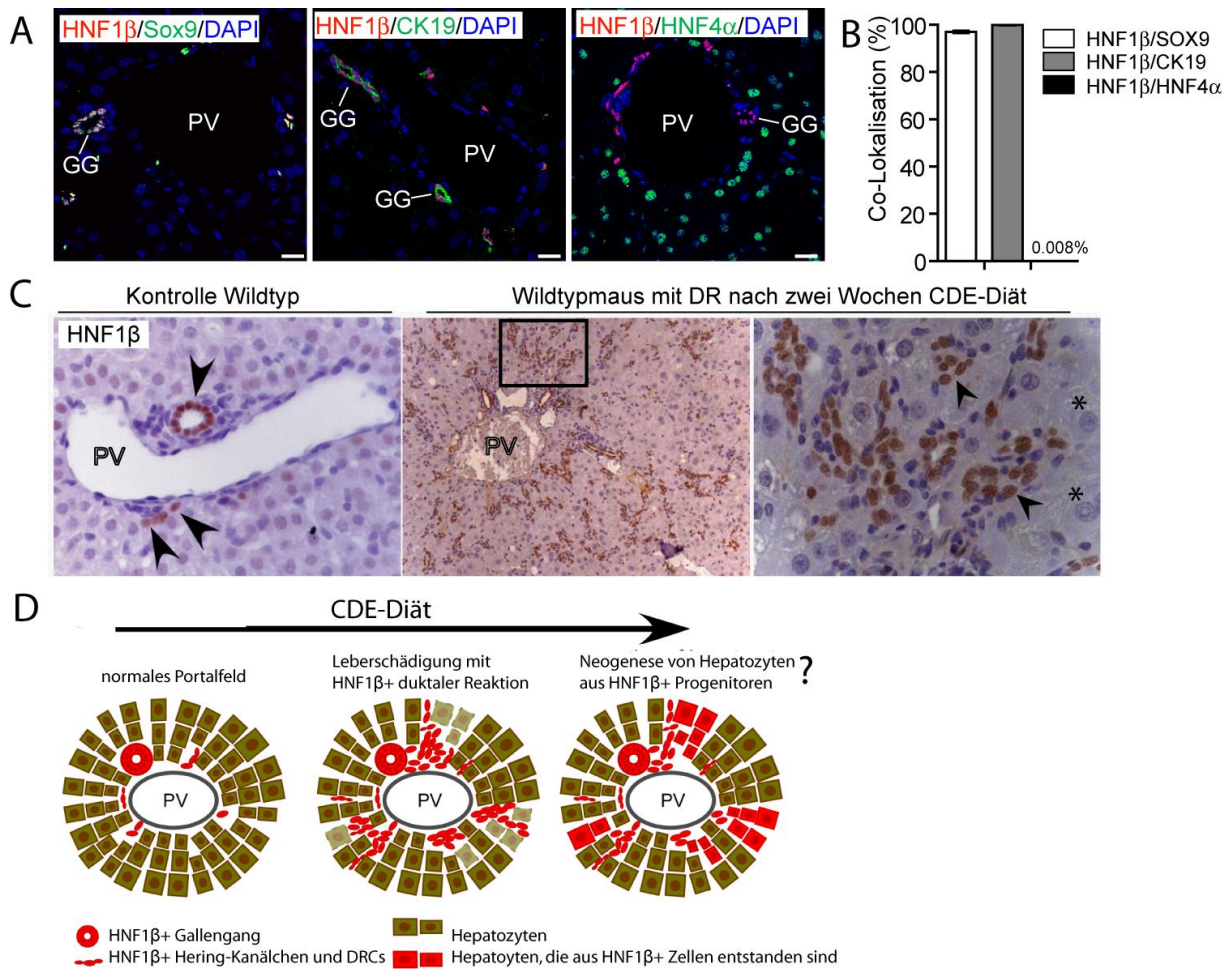


Abbildung 4: Spezifische Expression von HNF1β in Gallengangszellen und in der dukталen Reaktion.
A) IF-Doppelfärbung des Portalfeldes einer Wildtypmaus mit HNF1β, der Kernfärbung DAPI und jeweils SOX9, CK19 und HNF4α. Das Mischsignal aus rot, grün und blau bei Co-Lokalisation aller Färbungen zeigt sich im linken und mittleren Bild. Das Mischsignal von DAPI mit HNF1β bzw. DAPI mit HNF4α bei fehlender Co-Lokalisation von HNF1β und HNF4α zeigt sich im rechten Bild. Bezeichnet sind Portalvene (PV) und interlobuläre Gallengänge (GG). 40x Vergrößerung, Maßstabsbalken 20 μm. **B)** Grafische Darstellung der Co-Lokalisation in Prozent (y-Achse) verschiedener Zellmarker (x-Achse) mit HNF1β. HNF1β und SOX9 (97,04 % ± 0,52 %, n = 3), HNF1β und CK19 (99,89 % ± 0,10 %, n = 5). Nahezu keine Co-Lokalisation von HNF1β und HNF4α (0,008 % ± 0,004 %, n = 8). Ausgezählt an Wildtypmäusen nach IF-Doppelfärbungen mit den jeweiligen Markern wie in A zu sehen. **C)** IHC-Färbung mit HNF1β in Wildtypmäusen ohne und nach zwei Wochen unter CDE-Diät. Links: Portalfeld einer Wildtypmaus in 40x Vergrößerung (Pfeilspitzen = Gallengänge und biliäre Zellen). Mitte und rechts: Portalfeld einer Wildtypmaus nach zwei Wochen CDE-Diät mit deutlicher dukталer Reaktion in 20x bzw. 40x Vergrößerung (Ausschnitt). Eine Vermehrung der biliären Zellen im Sinne von DRCs, die HNF1β positiv sind (Pfeilspitzen), mit Invasion des periportalen Gewebes ist zu sehen. Außerdem typische Hepatozyten, die HNF1β negativ sind (Sternchen). **D)** Schema zur dukталen Reaktion nach CDE-Diät. Während Hepatozyten untergehen, expandieren und proliferieren biliäre HNF1β+ Zellen, im Sinne von DRCs einer dukталen Reaktion. HNF1β+ Leberprogenitorzellen differenzieren dabei hypothetisch zu einem unbekanntem Anteil zu Hepatozyten, um den Hepatozytenuntergang unter CDE-Diät zu kompensieren (rechts). Abbildung und Daten modifiziert aus Abbildung 1 in (Jors et al., 2015). Schema: AG Geisler

1.4. Das HNF1bCreER Mausmodell als hocheffektives Werkzeug zum spezifischen *Lineage Tracing* des dukталen Kompartiments in der Leberregeneration

In Vorversuchen der AG Geisler führten Simone Jörs und Petia Jeliazkova verschiedene Versuche durch, an denen ich im Rahmen meiner Dissertation mitwirkte, um die Rolle des biliären HNF1β+ Kompartiments beziehungsweise der potentiellen LPCs in der Leberregeneration zu untersuchen. Dabei wurde ein erfolgreiches *Lineage Tracing* möglich,

indem *Hnf1bCreERT2*-Mäuse mit *R26^{Tom}*-Reporter-mäusen zu *R26^{lox-STOP-tdTom};Hnf1bCreERT2^{+/-}*-Mäusen (kurz *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäusen) gekreuzt wurden (Abbildung 5 A). Diese Mäuse produzieren nach Induktion mit Tamoxifen das rote Fluoreszenzprotein tdTomato (tdTom) in den Zellen, die zu diesem Zeitpunkt HNF1β exprimiert hatten, und auch in allen Zelllinien, die davon abstammen. 4-5 Wochen alte *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse wurden dann – wie weiter unten beschrieben – einmalig mit Tamoxifeninjektion behandelt (intraperitoneale Injektion, i.p.), um die CreERT2-Rekombinase zu aktivieren und die HNF1β+ Zellen dadurch mit tdTom zu markieren. Die Mäuse wurden 7 Tage nach Induktion analysiert. Die Rekombinationsrate wurde errechnet aus dem Verhältnis von erfolgreich rekombinierten Zellen, also simultan tdTom+ und HNF1β+ Zellen, zu allen HNF1β+ Zellen. Die Rekombinationsrate wurde anhand von IF-Doppelfärbungen mit HNF1β bestimmt und lag bei > 84 % (Abbildung 5 B). In IF-Doppelfärbungen mit den biliären Markern SOX9 und CK19 wurden nahezu identische Raten beobachtet (Abbildung 5 C). Ektope Markierung HNF4α positiver Hepatozyten hingegen war mit 0,012 % extrem selten (Abbildung 5 C). Damit waren die wesentlichen Grundvoraussetzungen des *Lineage Tracing*, wie Markierungseffizienz und Zellspezifität, erfüllt.

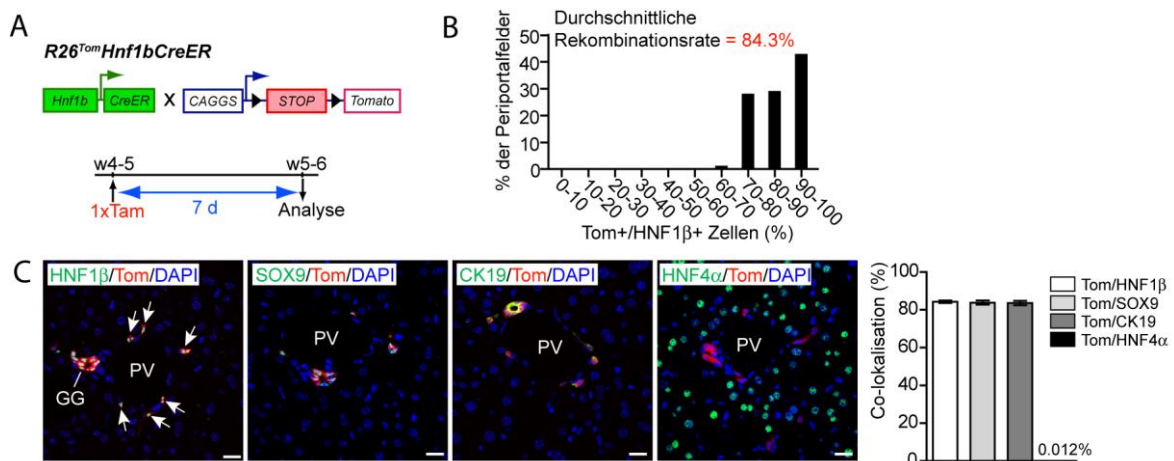


Abbildung 5: Hocheffektive und hochspezifische Markierung des duktaalen Kompartiments in *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäusen.

A) Schematische Darstellung des genetischen Mausmodells der *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse, die im Alter von 4-5 Wochen durch einmalige intraperitoneale Tamoxifeninjektion induziert wurden und nach 7 Tagen analysiert wurden. **B)** Anhand von IF-Färbung von HNF1β und DAPI ergab sich eine durchschnittliche Rekombinationsrate von 84,3 % ± 0,6 % (n=5, jeweils 30 Portalfelder). **C)** Repräsentative IF-Doppelfärbungen mit den jeweiligen Markern, wie sie für die Auszählung benutzt wurden. Das tdTom+ Signal war dabei auf HNF1β+/SOX9+/CK19+ Gallengänge und die CoH beschränkt. Co-Lokalisation mit HNF4α wurde als ektope Markierung von Hepatozyten interpretiert und war ein extrem seltenes Ereignis (0.012% ± 0.003%, n = 10). GG = Gallengang, PV = Portalvene, Pfeile = Hering-Kanälchen und biliäre Zellen, Tam = Tamoxifen. Maßstabsbalken: 20 µm. Modifiziert aus Abbildung 1 in (Jors et al., 2015)

Um das zelluläre Schicksal der HNF1β+ Zellen zu verfolgen und die Frage zu klären, ob diese Zellen in der Lage sind, zu Hepatozyten zu differenzieren, untersuchten wir zunächst deren Verhalten in zwei verschiedenen klassischen Leberschädigungsmodellen in *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäusen. Zunächst führten wir eine erweiterte 80 % partielle Hepatektomie durch. In der Analyse nach 10 Tagen zeigten sich keine tdTom+ Hepatozyten.

Um die Proliferation der Hepatozyten zu hemmen, wurde anderen *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäusen Retrorsin vor einer 2/3 partiellen Hepatektomie verabreicht, es zeigte sich aber das gleiche Ergebnis: Es war keine relevante Neogenese von Hepatozyten aus HNF1 β + Zellen zu beobachten (Abbildung 1 C im Zusatzmaterial (Jors et al., 2015)).

Neben diesen klassischen Regenerationsmodellen mit akutem Volumenverlust der Leber, setzten wir *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse weiteren etablierten Schädigungsmodellen aus, die jeweils durch eine DR bzw. durch eine putative LPC-Antwort charakterisiert sind und möglicherweise mit einer Regeneration der Hepatozyten durch DRCs/LPCs einhergehen (Gallengangsligatur, DAPM-Injektion, und zwei Wochen DDC- und CDE-Diät). Dabei wurde deutlich, dass die Zellen der beobachteten dukталen Reaktionen stets von Zellen des biliären HNF1 β + Kompartiment abstammen, da nahezu alle CK19+ Zellen der DR auch den Fluoreszenzmarker tdTom co-exprimierten. Dabei war bemerkenswert, dass wir abermals nahezu keine Neogenese von Hepatozyten aus dem tdTom+ markierten HNF1 β + biliären Kompartiment beobachten konnten, abgesehen von einem minimalen Anteil von 0,04% der Hepatozyten nach zwei Wochen unter CDE-Diät. Auch in dem chronischen genetischen Schädigungsmodell der *Mdr2*-Knockout Maus (*Mdr2^{-/-}R26^{Tom}Hnf1bCreER*), welches gleichzeitig ein inflammatorisch-getriggertes HCC-Modell darstellt, zeigte sich nach 5 Wochen zwar eine effektive tdTom-Markierung der DRCs, jedoch keine Neogenese von Hepatozyten aus dem biliären Kompartiment (Abbildung 2 in (Jors et al., 2015)). Somit zeigte sich für akute Leberschädigung keine Beteiligung des HNF1 β -Kompartimentes und damit des mutmaßlichen LPC-Kompartiments an der Neogenese von Hepatozyten.

Da jedoch die DR möglicherweise erst bei chronischer Leberschädigung signifikant zur Regeneration des hepatozytären Kompartiments beiträgt, beobachteten wir das zelluläre Schicksal der dukталen Zellen über mehrere Monate (G. K. Michalopoulos, 2014b; Williams, Clouston, & Forbes, 2014). Dabei wurden *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse nach 3 und 8 Monaten unter DDC-Diät und nach 4 Monaten unter CDE-Diät analysiert und *Mdr2^{-/-}R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse nach 6 und 12 Monaten. In all diesen Modellen war eine ausgeprägte DR zu beobachten, allerdings zeigte sich im DDC-Modell und im *Mdr2^{-/-}*-Modell keine signifikante Neogenese von tdTom+ Hepatozyten aus DRCs und im CDE-Modell zeigte sich eine minimale Neogenese von Hepatozyten aus DRCs (1,51 %) (Abbildung 3 in (Jors et al., 2015)). Auch in drei verschiedenen Langzeitmodellen chronischer Leberschädigung zeigte sich also kein bzw. ein marginaler Beitrag des HNF1 β + Kompartiments zur Neogenese von Hepatozyten.

Diese Daten stellten die Vorstellung von der dukталen Reaktion als relevante Notfalloption zur Regeneration von Hepatozyten ernsthaft in Frage und ließen Zweifel aufkommen, ob der Begriff Leberprogenitorzellen oder Hepatische Progenitorzellen für die Zellen der dukталen Reaktion wirklich angemessen ist, solange deren Funktion nicht endgültig geklärt ist. Etliche

weitere Arbeitsgruppen kamen in der Zwischenzeit diesbezüglich zu den gleichen Ergebnissen (Rodrigo-Torres et al., 2014; Schaub, Malato, Gormond, & Willenbring, 2014; Tarlow et al., 2014; Yanger et al., 2014).

Nach den Untersuchungen zur Plastizität des HNF1 β + Kompartiments während und nach der Regeneration chronischer Schädigungen, widmeten wir uns im nächsten Schritt der Leberkanzerogenese und der Frage, ob, wie weithin angenommen wird, Zellen des HNF1 β + Kompartiments Ursprungszellen des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) und des Cholangiokarzinoms (CC) sein können.

1.5. Zur Rolle von Krebsstammzellen beim HCC und CC

Bei Überlegungen zu Krebsstammzellen muss man die Begriffe tumorinitiierende Zelle bzw. Ursprungszelle („*cell of origin*“) und Krebsstammzelle unterscheiden. Diese werden unglücklicherweise häufig synonym verwendet. Der Begriff tumorinitiierende Zelle bezieht sich auf die tatsächliche Ursprungszelle des Tumors. Diese kann in bestimmten Tumoren auch eine Stammzelle sein. Krebsstammzellen im eigentlichen Sinn hingegen können sich auch erst im Laufe der Progression des Krebses (z.B. durch zunehmende Dedifferenzierung einer initial reifen Ursprungszelle) bilden. So können sich diese Zellen auch substantiell vom Phänotyp der Ursprungszelle unterscheiden und möglicherweise aufgrund ihres veränderten phänotypischen Erscheinungsbildes einen anderen Ursprungsort suggerieren (Visvader, 2011).

Obwohl allgemein angenommen wird, dass Krebs generell aus einer Ursprungszelle klonal entsteht, zeigt sich in vielen Tumoren, nicht nur in verschiedenen Patienten, sondern auch innerhalb eines Tumors, eine große Heterogenität der Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Verhaltens (Fialkow, 1976; McGranahan et al., 2015). Zur Erklärung dieses Phänomens werden klassischerweise mehrere Mechanismen herangezogen, wie stochastisch genetische und epigenetische Mutationen im Sinne einer klonalen Evolution. Auch veränderte äußere Bedingungen, wie die Mikroumgebung, können die Krebszellen beeinflussen (Magee, Piskounova, & Morrison, 2012).

Die Existenz von Krebsstammzellen wurde zunächst für maligne hämatopoetische Erkrankungen und später auch für viele solide Tumoren im ZNS und in der Mamma bewiesen (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003; Lapidot et al., 1994; Singh et al., 2004). Krebsstammzellen besitzen die Eigenschaft der Selbsterneuerung, können jede Zelle des Tumors produzieren und proliferieren kontinuierlich (Jordan, Guzman, & Noble, 2006; J. U. Marquardt, Factor, & Thorgeirsson, 2010; Nguyen, Vanner, Dirks, & Eaves, 2012). Um Krebsstammzellen in einem Tumor nachzuweisen, wird zunächst meist mittels Durchflusszytometrie eine bestimmte Subpopulation eines Tumors isoliert und anschließend in immunkomprimierte Wirtstiere transplantiert. Dabei entsteht aus

implantierten Krebsstammzellen der Ursprungstumor, während auch deutlich größere Mengen anderer implantierter Tumorzellen keine Tumorentstehung zur Folge haben (Abbildung 6 aus (Visvader, 2011)).

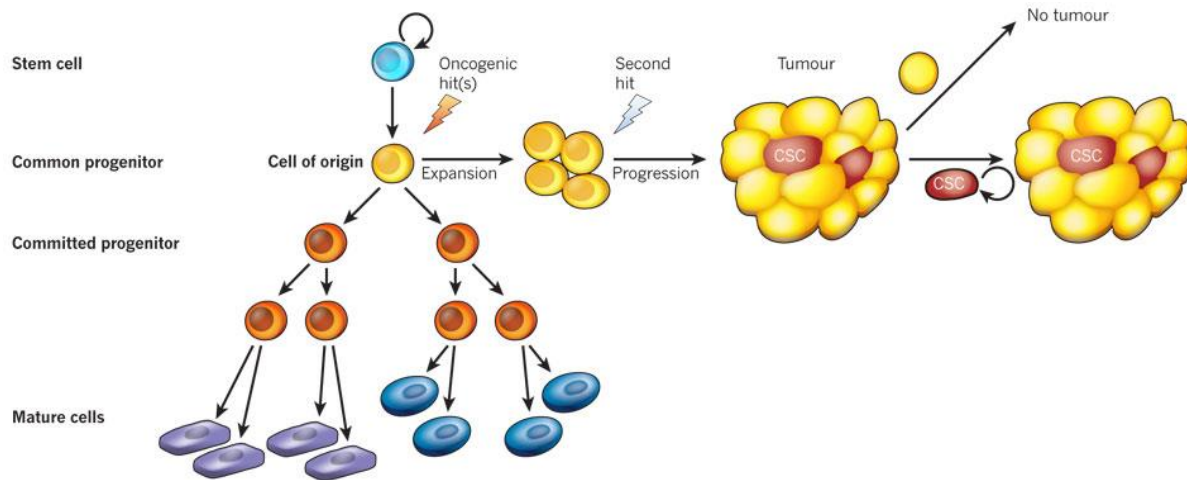


Abbildung 6: Schemazeichnung zur normalen Differenzierung aus Stammzellen und zur Krebsentstehung. Die Entwicklung von Krebsstammzellen (CSC) findet erst im Verlaufe der Krebsentstehung statt und ist von der Ursprungszelle („Cell of origin“) abzugrenzen. Dabei kann sich aus einer Krebsstammzelle potentiell ein ganzer Tumor entwickeln, aber aus den restlichen Tumorzellen nicht. Abbildung aus (Visvader, 2011)

Hier soll nun zunächst auf die verschiedenen Arten von Leberkrebs eingegangen werden und anschließend auf die Rolle von Krebsstammzellen und LPCs bei Leberkrebs. Die Gesamtheit der verschiedenen primären malignen Lebertumoren stellt die weltweit sechsthäufigste Krebsform dar und ist die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Männer sind dabei deutlich häufiger betroffen als Frauen. Die Zahlen für Inzidenz und Todesfälle gleichen sich weltweit mehr oder weniger, was die Malignität und die Schwierigkeiten in der Therapie verdeutlicht (Jemal et al., 2011).

Die häufigste Entität bildet hierbei das HCC mit einem Anteil von 70-85 %. Es entwickelt sich als gemeinsamer Endpunkt nahezu ausschließlich auf dem Boden einer chronischen Lebererkrankung. Unter anderem aufgrund der hohen Prävalenz von Hepatitis B und C in Südostasien und Afrika sind die meisten Patienten derzeit in diesen Ländern zu finden. Auch in westlichen Ländern stieg in den letzten Jahren die Inzidenz, was vermutlich auf die steigende Prävalenz von Hepatitis C und nicht alkoholischer Fettleberhepatitis zurückzuführen ist (Adipositas) (Scalera & Tarantino, 2014). Das zweithäufigste primäre Malignom der Leber mit einem Anteil von etwa 10 % ist das Cholangiokarzinom (CC), das ebenfalls auf der Grundlage chronischer Lebererkrankungen entsteht, jedoch auch in nicht chronisch geschädigten Lebern auftreten kann. Vor allem die Hepatitis-C-Virus-Erkrankung spielt dabei eine wichtige Rolle (Li et al., 2015). Für das CC zeichnet sich eine niedrige, aber steigende Inzidenz weltweit ab. Aufgrund der häufig infausten Prognose ist das CC auch bei geringer Fallzahl medizinisch relevant (Sia, Tovar, Moeini, & Llovet, 2013).

Auf der Suche nach Krebsstammzellen beim Leberkrebs sind bereits etliche Zelloberflächenmarker publiziert worden, mit deren Hilfe mutmaßliche Krebsstammzellen in der Leber isoliert werden konnten, darunter CD133 (Rountree, Ding, He, & Stiles, 2009), EpCam (Yamashita et al., 2013) und CD44 (Yang et al., 2010; Zheng et al., 2014). Dabei gilt als gesichert, dass zumindest ein gewisser Teil der Lebertumoren Krebsstammzellen bzw. Zellen mit Stammzellcharakter enthält (Oikawa, 2016; Rountree, Mishra, & Willenbring, 2012). Bemerkenswerterweise werden viele der vorgeschlagenen Marker für Krebsstammzellen auch vom regulären biliären Kompartiment exprimiert, in dem wie weiter oben beschrieben das Progenitorzellkompartiment der Leber vermutet wird. Dies wird von vielen als Hinweis auf die Abstammung von Krebsstammzellen aus dem Progenitorzell-Kompartiment gesehen. Zusätzlich wird eine gezielte Selektion von Krebsstammzellen durch diese Tatsache erheblich erschwert. Dabei könnte ein Ursprung von HCCs aus LPCs mit einem anderen biologischen Verhalten des Tumors assoziiert sein, da Hepatoblasten-ähnliche HCC Gen-Signaturen (also Signaturen ähnlich einer embryonalen Progenitorzelle) mit einer schlechten Prognose verknüpft sind (Lee et al., 2006). Es gibt derzeit keinen *in vivo* Nachweis, dass aus LPCs tatsächlich Krebsstammzellen entstehen können – was jedoch weithin angenommen wird – oder ob vielmehr eine Dedifferenzierung reifer Zellen im Laufe der Karzinogenese für den Progenitor-/bzw. Stammzellphänotyp verantwortlich ist, siehe Abbildung 7 aus (Yamashita & Wang, 2013).

1.6. Auf der Suche nach der Ursprungszelle der Lebertumoren

Diese Arbeit beschäftigt sich allerdings hauptsächlich mit dem Aspekt der tumorinitiierenden Zelle und Ursprungszelle („Cell of origin“) und weniger mit Krebsstammzellen. Herauszustellen ist, dass trotz der scheinbar eindeutigen Namen bis dato keine Einigkeit darüber herrscht, aus welchen Ursprungszellen HCCs und CCs entstehen. Außerdem stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Subtypen dieser beiden großen Entitäten durch Dedifferenzierung aus einer Ursprungszelle entstehen können oder unterschiedliche Ursprungszellen haben (Abbildung 5 aus (Yamashita & Wang, 2013)), sowie (Razumilava & Gores, 2014; Zucman-Rossi, Villanueva, Nault, & Llovet, 2015). Beim CC werden beispielsweise intrahepatisches CC (ICC), perihiläres CC und extrahepatisches CC unterschieden (Blechacz, Komuta, Roskams, & Gores, 2011; Cardinale, Carpino, Reid, Gaudio, & Alvaro, 2012; Nakanuma et al., 2014). Die Einteilung und Subgruppierung von HCC und CC erfolgt aber zurzeit nach histologischen Kriterien. Diese schließen aber nur die Differenzierung des Tumors zum Zeitpunkt der Probenentnahme ein, welche aufgrund zellulärer Plastizität nicht zwingenderweise mit der Differenzierung der Ursprungszelle übereinstimmen muss.

Da sich adulte Stammzellen selbst erneuern können, aber auch zu den verschiedenen Zellen eines Gewebes differenzieren können und ein höheres Proliferationspotenzial besitzen als differenzierte Gewebezellen, fragte man sich schon lange, ob adulte Stammzellen die Ursprungszellen von malignen Tumoren sind. In der Leber postulierte Sell noch vor den bahnbrechenden Arbeiten in anderen Organsystemen Stammzellen als Ursprungszellen des HCC und des CC (Sell & Dunsford, 1989). Sell entwickelte seine Hypothese anhand der Beobachtung, dass HCCs zu 90 % auf dem Boden chronischer Schädigungen und der daraus resultierenden Leberzirrhose entstehen und es hierbei zu Progenitorzellaktivierung im Rahmen duktaler Reaktionen kommt (Thorgeirsson & Grisham, 2002). *In vitro* Experimente, in denen zuvor isolierte p53 defiziente Ovalzellen/DRCs in immundefiziente Mäuse transplantiert wurden und zur Tumorentstehung führten, unterstützten diese Hypothese („proof-of-principle“) (Dumble, Croager, Yeoh, & Quail, 2002; Holczbauer et al., 2013). Ältere Studien zum Ursprung von HCC und CC fußten vor allem auf histologischen Analysen und postulierten klassischerweise Hepatozyten als Ursprungszellen des HCC und Cholangiozyten als Ursprungszellen des CC. Für gemischte Tumoren hingegen, mit Charakteristika beider Entitäten, wie dem Cholangiolzellulären Karzinom (CLC) wurden zudem LPCs auf Basis histologischer Ähnlichkeiten als mutmaßliche Ursprungszelle postuliert (Komuta et al., 2012; T. Roskams, 2006; F. Zhang et al., 2008). Neuere Studien, in denen Signalwege in Hepatozyten zellspezifisch aktiviert wurden, zeigten aber, dass Hepatozyten auch als Ursprungszelle des CC fungieren können (B. Fan et al., 2012; Sekiya & Suzuki, 2012; Zender et al., 2013). Dem mutmaßlichen LPC-Kompartiment der Leber wird eine enorme Plastizität zugesprochen und die potenzielle Fähigkeit, zu biliären Zellen und Hepatozyten zu differenzieren. Deshalb erscheint es möglich, dass LPCs unter onkogenem Druck maligne entarten können und somit LPCs Ursprungszellen des HCC und CC sein könnten.

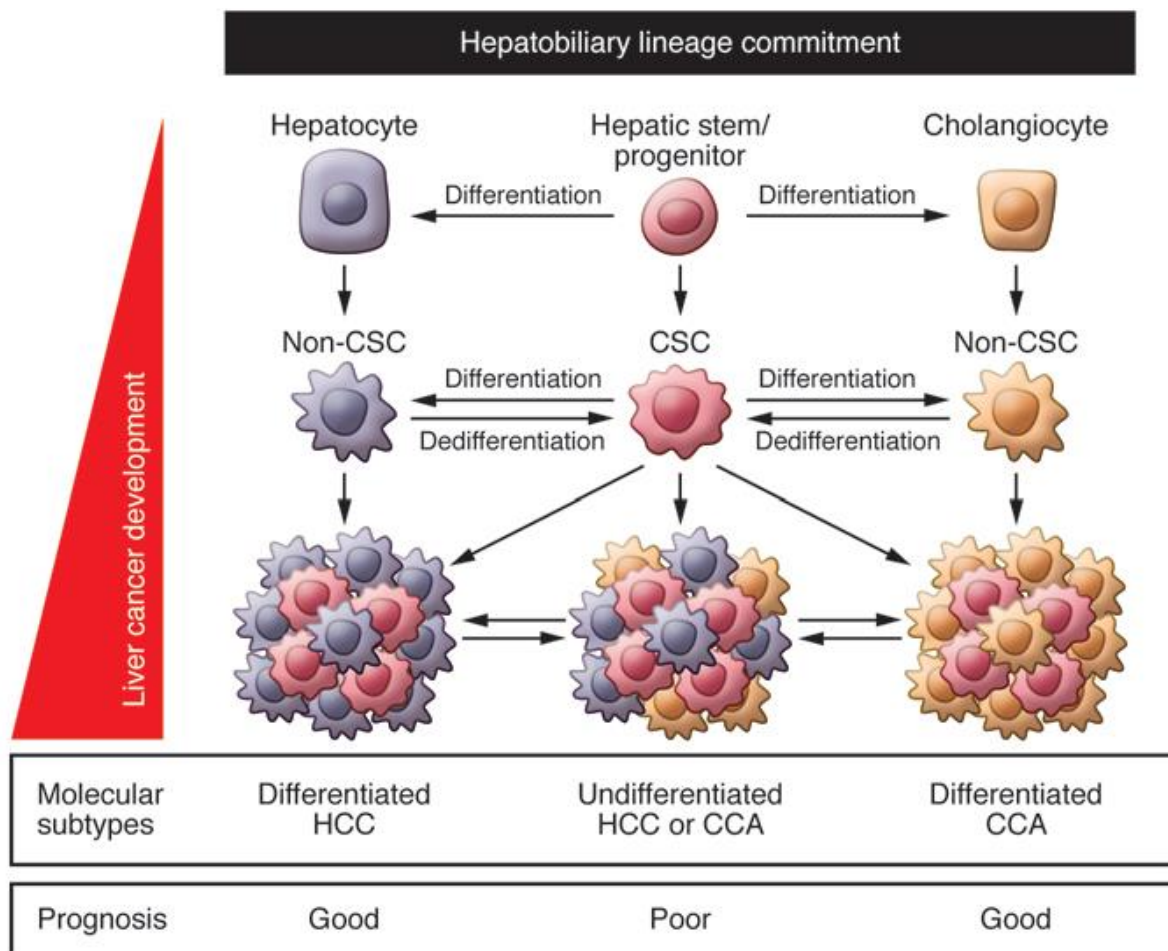


Abbildung 7: Postuliertes Schema zur Rolle von Krebsstammzellen bzw. Ursprungszellen der Krebsentstehung in der Leber.

LPCs könnten prinzipiell auf verschiedene Weise Ursprungszellen des HCC und CC (= CCA) sein. Entweder durch direkte Entwicklung zu Krebsstammzellen (= CSC) oder über die Differenzierung zu Hepatozyten und Cholangiozyten und deren maligne Entartung. Diese können wiederum zu CSC werden oder direkt zu HCC und ICC entarten. Außerdem kann sich aus einem differenzierten HCC und ICC mit vergleichsweise guter Prognose ein dedifferenziertes HCC oder ICC mit Mischphänotyp und schlechter Prognose entwickeln und vice versa. Abbildung übernommen aus (Yamashita & Wang, 2013).

1.7 Mausmodelle zur Untersuchung der Sensibilität von Zellen der duktaalen Reaktion gegenüber onkogener Transformation

Wie oben ausgeführt, ist die Identität der Ursprungszelle sowohl des HCC, als auch des CC nicht geklärt. Ob HCCs nun aus Hepatozyten oder bipotenten adulten Progenitorzellen bzw. ob CCs aus reifen Gallengangszellen, Progenitorzellen oder vielmehr durch Transdifferenzierung/Dedifferenzierung reifer Hepatozyten entstehen, ist weiterhin Gegenstand teilweise dogmatisch geführter Kontroversen (Brunt, Paradis, Sempoux, & Theise, 2015; R. V. Guest et al., 2014; Mu et al., 2015; Yamashita & Wang, 2013).

Um mittels *Lineage Tracing in vivo* zu überprüfen, ob aus Zellen der DR als mutmaßliches Kompartiment adulter Leberprogenitorzellen Tumoren in der Leber entstehen können, gibt es verschiedene Optionen. Eine Möglichkeit besteht darin, das putative „cell-of-origin-Kompartiment“ (in unserem Fall das HNF1β+ Kompartiment) mittels genetischem *Lineage*

Tracing irreversibel zu markieren und zu einem späteren Zeitpunkt nach Exposition in etablierten Tumormodellen für das HCC zu analysieren, ob die beobachteten Tumoren den *Lineage* Marker exprimieren. Im Falle eines positiven Nachweises des *Lineage* Markers (tdTom) in den Tumorzellen des HCC, würde dies die Abstammung des HCC aus Zellen des biliären bzw. eines bipotentialen Progenitorkompartimentes zeigen.

Für das HCC werden in der Maus zwei Modelle besonders häufig verwendet. Zum einen das chemisch-genotoxische DEN-Modell und zum anderen das konstitutive *Mdr2*^{-/-}-Modell. Beim DEN-Modell wird das Karzinogen n-Nitrosodiethylamine (DEN) i.p. injiziert. Das DEN-Modell besitzt eine Penetranz von etwa 60-80 % und führt in Wildtypmäusen nach 8 Monaten zu HCC-Knoten (Dill et al., 2013; G. He et al., 2013; Maeda, Kamata, Luo, Leffert, & Karin, 2005). Dabei ist der Allgemeinzustand der Tiere zu diesem Zeitpunkt aber nur unwesentlich beeinträchtigt, unter anderem da die Tumorentstehung im Wesentlichen auf die Leber begrenzt ist. DEN wird in Hepatozyten zu einem DNS alkylierendem Metaboliten verstoffwechselt (Verna, Whysner, & Williams, 1996) und führt zum Tod von Hepatozyten (J. L. Farber & Gerson, 1984). Da DEN viele Mutationen im Genom induziert und auch in Gensignaturen humaner HCCs viele Mutationen im Vergleich zu Tumoren anderer Gewebe zu finden sind, bildet es die humane Situation gut ab (Guichard et al., 2012). Des Weiteren zeigt sich im DEN-Modell auch die für den Menschen typische Geschlechterdisparität: Männliche Mäuse sind susceptibler für HCCs als Weibchen (Naugler et al., 2007). Zudem gibt es Hinweise auf eine inflammatorische Komponente des DEN-Modells und es weist histologisch und genetisch Parallelen zum humanen HCC mit ungünstiger Prognose auf (Lee et al., 2004). Aufgrund der starken dukталen Reaktion, die in diesem Modell vor der Tumorentstehung beobachtet wird und später die Tumorknoten häufig umgibt, wurde postuliert, dass die Zellen der dukталen Reaktion auch die Ursprungszellen des HCCs in diesem Modell darstellen (Andersen et al., 2010; T. Roskams, 2006).

Beim *Mdr2*-Knockout-Modell (*Mdr2*^{-/-}-Mäuse) handelt es sich um ein weiteres gut etabliertes und inflammations-assoziiertes HCC-Mausmodell, das 1994 von Mauad et al. beschrieben wurde (Mauad et al., 1994; Pikarsky et al., 2004). In *Mdr2*^{-/-}-Mäusen wird konstitutiv ein leberspezifisches P-Glykoprotein nicht exprimiert, welches Phosphatidylcholin durch die Membran der Hepatozyten in die Gallengänge transportiert. Dadurch kommt es zur Regurgitation der Gallensäuren und zur Cholestase mit konsekutiv hepatozytärer Schädigung. Die *Mdr2*^{-/-}-Maus dient zudem als Tiermodell der sklerosierenden Cholangitis (Fickert et al., 2004). Zunächst sind durch die Inflammation der Leber und die Toxizität der Gallensäuren Dysplasien in der Leber zu beobachten und nach etwa 16 Monaten entwickeln nahezu alle Mäuse HCCs. Das *Mdr2*^{-/-}-Modell ahmt dadurch die sequentielle HCC-Entwicklung im Menschen in vielen Punkten sehr gut nach (Katzenellenbogen et al., 2007) und führt zusätzlich zu einer massiven DR mit Expression von HNF1β und damit zu einer

„Aktivierung“ des LPC-Kompartiments, die nahelegt, dass HNF1 β + Zellen im *Mdr2*^{-/-}-Modell maligne entarten könnten und die Ursprungszellen des HCC sein könnten (Jors et al., 2015).

Eine andere Möglichkeit, das mutmaßliche Leberprogenitorzell-Kompartiment hinsichtlich der Rolle bei der Krebsentstehung zu untersuchen besteht darin, dieses Kompartiment onkogenem Druck auszusetzen. Dabei werden spezifisch im LPC-Kompartiment Onkogene aktiviert bzw. Tumorsuppressoren deletiert und anschließend analysiert, ob Zellen des LPC-Kompartiments maligne entarten und wenn ja, welchen Tumorphänotyp sie aufweisen. Dieser Ansatz wurde in der Forschung zum HCC und CC unter anderem von O'Dell et al. bereits durchgeführt. O'Dell et al. beschrieben CC-Entwicklung nach konstitutiver Cre-induzierter Überexpression von Kras und Deletion von p53 unter einem Albuminpromotor (O'Dell et al., 2012). Analog zu dieser Studie werden in der vorliegenden Arbeit die gleichen onkogenen Transformationen genutzt, allerdings bietet unser Ansatz die Möglichkeit, tatsächlich gezielt das biliäre und mutmaßliche LPC-Kompartiment zu untersuchen und die Transformationen erst durch Tamoxifeninjektion zu einem postpartalen Zeitpunkt zu aktivieren. Der von O'Dell et al. verwendete Albuminpromotor hat eingeschränkte Aussagekraft, da die Cre-Rekombinase nicht induzierbar war und somit Hepatoblastenspezifisch und nicht Hepatozyten-spezifisch ist. Damit erfolgt eine Aktivierung der Cre-Rekombinase sowohl in Hepatozyten, als auch in Cholangiozyten, wie eingangs bei der Leberentwicklung erwähnt (Abbildung 1) (Geisler et al., 2008).

Es erscheint sinnvoll, diejenigen Signalwege und Onkogene zu beeinflussen, die möglichst dem frühen, natürlichen Verlauf der Tumorentstehung entsprechen, um die Aussagekraft solcher Transformationsexperimente zu erhöhen. In humanen HCCs und CCs lässt sich beobachten, dass Mutationen, die das Tumorsuppressorgen p53 betreffen mit am häufigsten sind (Forner, Llovet, & Bruix, 2012; Schulze et al., 2015; Sia et al., 2013; Villanueva, Newell, Chiang, Friedman, & Llovet, 2007). Das p53 Gen ist eines der am längsten bekannten und am intensivsten beforschten tumorassoziierten Gene. Es nimmt eine zentrale Rolle in der Zellzykluskontrolle, Apoptose, DNS-Reparatur und Differenzierung ein und gilt als der Wächter des Genoms (Hainaut & Wiman, 2009). Für das HCC sind Mutationen im p53 Gen am stärksten mit einem LPC-ähnlichen Genexpressionsmuster assoziiert und haben eine ungünstige Prognose für den Patienten zur Folge (Woo et al., 2011). Ebenso treten Mutationen im p53 Gen in HCCs verschiedener Ätiologien wie viralen Hepatitiden und chemischen Kanzerogenen auf (Hussain, Schwank, Staib, Wang, & Harris, 2007). Aus diesen Gründen wählten wir die Inaktivierung von p53, als eine der Mutationen für ein genetisches Tumormodell zur Untersuchung der Karzinogenese.

Einen anderen Mechanismus der Karzinogenese stellen aktivierte Wachstumssignalkaskaden dar, bei denen im HCC der Epidermale Wachstumsfaktor

Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) und das Signal, welches von der GTPase ras ausgeht, in über 50 % der Fälle aktiv sind (Forner et al., 2012; Stephen, Esposito, Bagni, & McCormick, 2014). Da dieser wichtige Signalweg durch Kras konstitutiv angeschaltet wird und zudem in CCs 40 – 50 % aller Tumoren Kras-Mutationen aufweisen (Hezel, Deshpande, & Zhu, 2010; Isa et al., 2002), entschieden wir uns auch, Kras als Mutation für das transgene Tumormodell dieses Projekts zu wählen, auch wenn isolierte Kras-Mutationen in HCCs selbst eher selten auftreten (Calvisi et al., 2006).

2 Zielsetzung

Wie in der Einleitung ausgeführt, wird weithin angenommen, dass in der adulten Leber Leberprogenitor- bzw. fakultative Leberstammzellen in den terminalen Ästen des intrahepatischen Gallengangssystems residieren, welche in Form duktaler Reaktionen aktiviert werden. In den Vorarbeiten zu dieser Dissertationsarbeit konnten wir zeigen, dass duktale Reaktionen in verschiedenen Schädigungsmodellen aus dem biliären (HNF1 β +) Kompartiment entstehen, dabei aber nahezu ausnahmslos ihren biliären Phänotyp behalten und dass HNF1 β + Zellen auch nach schwerer Leberschädigung allenfalls minimal zur Neogenese von Hepatozyten beitragen (Jors et al., 2015).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Identität der Ursprungszelle der beiden häufigsten Lebertumoren HCC und CC nicht geklärt. LPCs bzw. DRCs werden unter anderem aufgrund ihrer hohen proliferativen Kapazität und der ihnen weithin zugeschriebenen zellulären Plastizität auch als Ursprungszellen von Leberkrebs vermutet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit dem *R26^{Tom}Hnf1bCreER Lineage Tracing* Mausmodell die hoch-kontrovers diskutierte Frage zu beantworten, ob bzw. unter welchen Bedingungen Zellen des HNF1 β + biliären/ bzw. mutmaßlichen LPC-Kompartiments als Ursprungszellen der beiden häufigsten primären Lebertumoren HCC und CC fungieren können.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- 1.) Entstehen HCCs in klassischen chemischen bzw. genetischen HCC-Mausmodellen aus dem mutmaßlich bipotenten LPC-Kompartiment?
 - a.) Zellulärer Ursprung des HCCs im DEN-Modell?
 - b.) Zellulärer Ursprung des HCCs im *Mdr2*^{-/-}-Modell?

- 2.) Ist das HNF1 β + Kompartiment als mutmaßliches LPC-Kompartiment empfänglich für onkogene Transformation durch genetische Manipulation in transgenen Mausmodellen?
 - a.) Führt die HNF1 β -spezifische Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 und/oder die Expression von onkogenem Kras („HKP-Modell“) zur Entwicklung von Tumoren und falls ja, welchen Phänotyp zeigen diese (HCC oder CC)?
 - b.) Wie verändert sich die Tumorgenese nach Kombination des HKP-Modells mit Schädigungsmodellen, die durch duktale Reaktionen und damit mutmaßlicher LPC-Aktivierung charakterisiert sind (HKP + DDC bzw. HKP + CDE)?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien besitzen zumindest einen Reinheitsgrad für analytische Zwecke.

3.1.1 Allgemeine Substanzen, Chemikalien und Materialien

Name	Hersteller
Aceton	Fa. Merk
Agarose	Fa. Peqlab
Blocking Kit, IHC, Avidin/Biotin	Fa. Vector
BSA, Bovines Serum Albumin	Fa. Serva
Cryo Pure Gefäß 1,6 ml weiß	Fa. Sarstedt
DAB Kit	Fa. Vector
DAPI-Mounting Medium, Eindeckelmedium	Fa. Vector Laboratories
Deckgläser 24x40mm	Fa. Medite
DNase-Set RNase free	Fa. Quiagen
dNTP Mix	Fa. Fermentas
EDTA	Fa. Fluka
Eisessig	Fa. Merck
Eosin, konzentriert, wässrig 2%	Fa. Waldeck
Ethanol, unvergällt 99,9%	Fa. Merck
Ethanol, 80 %, 96 % und absolut	Apotheke Klinikum rechts der Isar
Ethidiumbromid 1 %	Fa. Appllichem GmbH
Gene Ruler 100bp DNA ladder	Fa. Thermo Fischer Scientific
D(+)-Glucose	Fa. Sigma
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	Fa. Merck
Hydrogenperoxid, 30%	Fa. Merck
Isopropanol	Apotheke Klinikum rechts der Isar
Kassetten, grün und weiß	Fa. Medite
Magnesiumchlorid	Fa. Merck
β-Mercaptoethanol	Fa. Sigma
Mounting Medium, Eindeckelmedium, Vectashield	Fa. Vector Laboratories
Objektträger, Menzel-Gläser	Fa. Thermo Scientific
Paraformaldehyd, phosphatgepuffert 4%	Fa. Roth
PBS, Phosphatgepufferte Saline, DPBS	Fa. GIBCO
Pertex, Mounting Medium	Fa. Medite
Probenröhrchen PE, DM 22mm mit Eindrückdeckel	Fa. Roth
Proteinase K, PCR Grade	Fa. Roche
Ready Mix Red Taq, PCR Reaktions Mix	Fa. Sigma
Roticlear Xylol-Ersatz	Fa. Carl Roth GmbH
D(+)-Saccharose	Fa. Sigma
SDS, Natriumdodecylsulfat	Fa. Serva
Stickstoff, flüssig	Fa. Linde
TaqDNA Polymerase	Fa. Quiagen
Tierseren (Esel, Hase und Ziege)	Fa. Sigma

Tissue-Tek O.C.T. compound, Kryo-Medium
 Tris-Acetat-EDTA-Puffer-Stammlösung
 To-Pro3 Iodid
 TRIS, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
 Triton X-100
 Unmasking-Stock Solution,
 Antigendemaskierungslösung
 Vectastain ABC-Kit
 Zell-Lysepuffer 10x

Fa. Sakura
 Apotheke Klinikum rechts der Isar
 Fa. Invitrogen
 Fa. Roth
 Fa. Roche
 Fa. Vector-Lab
 Fa. Vector
 Fa. Cell Signalling

3.1.2 Allgemeine Geräte

Name	Hersteller
AxioCam MRc	Fa. Carl Zeiss AG
Axiowert 200M Mikroskop	Fa. Carl Zeiss AG
Einbettssystem	Fa. Leica Microsystems GmbH
Fluoreszenzlampe ebq 100 isolated	Fa. Kübler Codix
Geldokumentationssystem	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH
Konfokales Olympus FV10i Mikroskop	Fa. Olympus
Lichtquelle KL 1500 CD	Fa. Carl Zeiss AG und Fa. Schott
Microm HM 560 Cryostat, Kryotom	Fa. Thermo Scientific
Mikroskop Primo Star	Fa. Carl Zeiss AG
Mikroskop Stemi SV 11	Fa. Carl Zeiss AG
Mikrotom HM355S	Fa. Thermo Scientific
Mikrowelle	Fa. Siemens
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH
Neubauer-Zählkammer	Fa. LO-Laboroptik GmbH
PCR-Maschinen TPersonal/TGradient	Fa. Biometra
pH-Meter	Fa. WTW
Präzisionswaage Kern	Fa. Gottlieb Kern & Sohn GmbH
Thermomixer MHL 20	Fa. HLC
Tischzentrifuge 5417/5R	Fa. Eppendorf
Vortexer VF2	Fa. Janke&Kunkel IKA-Labortechnik
Waage PT600	Fa. Sarborius
Wasserbad	Fa. Thermo Fischer Scientific
Zentrifuge Galaxy Mini	Fa. VWR

3.1.3 Puffer und Lösungen

Antigendemaskierungslösung: 0,92 % Unmasking Solution Stock gelöst in destilliertem Wasser (dH₂O)

TE-Puffer: 1% TRIS, 0,1% EDTA gelöst in dH₂O

Zellysepuffer für DNA-Isolierung: 1% TRIS, 0,5% EDTA, 2,3% NaCl, 0,5% SDS gelöst in dH₂O bei pH 8,0

3.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen für Immunhistochemie (IHC) und Immunofluoreszenz (IF) verwendet:

Tabelle 1: Beschreibung der primären Antikörper mit verwendeter Verdünnung

Primäre Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung	Katalognummer
Acetyliertes-Tubulin	Maus	Sigma	1:250 (IF)	T6793
A6	Ratte	Geschenk von Valentina Factor	1:250 (IHC, IF)	
β-Catenin	Hase	Abcam	1:200 (IHC, IF)	Ab-32572
BrdU	Ratte	Serotec	1:100 (IHC, IF)	MCA2060
CC10	Hase	Santa Cruz	1:50 (IF)	Sc25554
Cytokeratin 19	Ratte	Dev. Studies Hybridoma Bank	1:200 (IHC, IF)	TROMA III
E-Cadherin	Maus	BD Transduction	1:100 (IF)	610181
EpCam(CD326)	Ratte	BD Pharmingen	1:100 (IF)	552370
GP73	Ziege	Santa Cruz	1:50 (IHC, IF)	Sc-48011
HNF1β (H85)	Hase	Santa Cruz	1:100 (IHC, IF)	sc-22840
HNF1β (C20)	Ziege	Santa Cruz	1:100 (IF)	sc-7411
HNF4α (H171)	Hase	Santa Cruz	1:100 (IF)	sc-8987
HNF4α (C19)	Ziege	Santa Cruz	1:100 (IF)	sc-6556
Ki-67	Hase	Abcam	1:250 (IHC, IF)	ab-15580
Kollagen Typ IV	Hase	Biozol	1:50 (IHC, IF)	CED-CL50451AP1
Laminin	Hase	Sigma	1:100 (IF)	L9393
Muc1	Ziege	Santa Cruz	1:100 (IHC)	Sc-6829
pERK	Hase	Cell Signalling	1:300 (IHC)	4370
SOX9	Hase	Millipore	1:100 (IHC, IF)	ab-5535
α-SMA	Maus	Dako	1:100 (IHC)	M0851
proSP-C	Hase	Millipore	1:100 (IF)	AB3786

Tabelle 2: Beschreibung der sekundären Antikörper mit verwendeter Verdünnung

Sekundäre Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung	Katalognummer
Biotinylierter- α -Hase	Ziege	Vector Laboratories	1:500 (IHC)	BA-1000
Biotinylierter - α -Ziege	Hase	Vector Laboratories	1:500 (IHC)	BA-5000
Biotinylierter - α -Maus	Ziege	Vector Laboratories	1:500 (IHC)	BA-9200
Biotinylierter - α -Ratte	Ziege	Vector Laboratories	1:500 (IHC)	BA-9400
α -Hase-Alexa-405	Ziege	Invitrogen	1:200 (IF)	A31556
α -Ratte-CF405M	Ziege	Biotium	1:200 (IF)	20374-500uL
α -Ratte-Alexa-488	Ziege	Invitrogen	1:500 (IF)	A11006
α -Hase-Alexa-488	Ziege	Invitrogen	1:500 (IF)	A11034
α -Maus-Alexa-488	Ziege	Invitrogen	1:500 (IF)	A11029
α -Hase-Alexa-555	Ziege	Invitrogen	1:500 (IF)	A21428
α -Ziege-Alexa-555	Esel	Invitrogen	1:500 (IF)	A21432
α -Ziege-Alexa-647	Esel	Invitrogen	1:200 (IF)	A21447
α -Ratte-Alexa-647	Ziege	Invitrogen	1:200 (IF)	A21247
α -Hase-Alexa-647	Ziege	Invitrogen	1:200 (IF)	A21244

3.1.5 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Tabelle 3: Primer für Genotypisierungen

Cre	vorwärts	5'-ACC AGC CAG CTA TCA ACT CG-3'
		5'-TTA CAT TGG TCC AGC CAC C-3'
	rückwärts	5'-TTA CAT TGG TCC AGC CAC C-3'
		5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'
CreERT2	vorwärts	5'-GAA TGT GCC TGG CTA GAG ATC-3'
		5'-AAC ACA CAC TGG AGG ACT GGC TAG G-3'
	rückwärts	5'-CAA TGG TAG GCT CAC TCT GGG AGA TGA TA-3'
		5'-CAA TGG TAG GCT CAC TCT GGG AGA TGA TA-3'
KrasG12d	vorwärts	5'-CAC CAG CTT CGG CTT CCT ATT-3'
		5'-CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC-3'
	rückwärts	5'-AGC TAA TGG CTC TCA AAG GAA TGT A-3'
LSL-TVA	vorwärts	5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'
	rückwärts	5'-GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC-3'
		5'-GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG-3'
p53loxP	vorwärts	5'-CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA-3'
	rückwärts	5'-AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC-3'
tdTomato	vorwärts	5'-AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA-3'
		5'-CTG TTC CTG TAC GGC ATG G -3'
	rückwärts	5'-CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC-3'
		5'-GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC-3'

3.2 Tierexperimentelle Materialien und Methoden

Alle Versuche wurden unter Einhaltung tierschutzrechtlicher Bedingungen des Gesundheitsministeriums und nach durch die Regierung von Oberbayern geprüften Protokollen des Zentrums für Präklinische Forschung der Technischen Universität München durchgeführt. Eine eigene Genehmigung der nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigungspflichtigen Tierversuche der Regierung von Oberbayern lag vor.

3.2.1 Verwendete Mauslinien

Alle Mauslinien wurden bereits beschrieben und kamen aus einem gemischten Hintergrund. *Hnf1bCreERT2*-Mäuse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jorge Ferrer von der endokrinologischen Abteilung des Imperial College London (Solar et al., 2009) und wurden mit $R26^{lox-STOP-lox-tdTom/+}$ ($R26^{Tom}$)-Mäusen verpaart, um $R26^{Tom}Hnf1bCreER$ -Mäuse zu erhalten (Madisen et al., 2010). Diese wurden entweder mit $Mdr2^{-/-}$ -Mäusen verpaart, um

Mdr2^{-/-}*R26*^{Tom}*Hnf1bCreER*-Mäuse (Smit et al., 1993) zu erhalten oder mit *Trp53*^{loxP/loxP} (*p53*^{F/F}) (Begus-Nahrman et al., 2009) und *LSL-Kras*^{G12d} (Hingorani et al., 2003), um HKP heterozygote und HKP homozygote Mäuse zu erhalten (siehe ausführliche Beschreibung in Tabelle 4 und Tabelle 5).

Tabelle 4: Ausführliche Beschreibung der verwendeten Mauslinien

Name	Kurzbezeichnung	Beschreibung
<i>Hnf1bCreERT2</i> ^{+/-}	<i>Hnf1bCreER</i>	Durch Tamoxifengabe wird die Cre-Rekombinase, in Geweben in denen HNF1b exprimiert wird, temporär durch nukleäre Translokation aktiviert
<i>R26lox-Stop-lox-LSL-Kras</i> ^{G12d}	<i>LSL-Kras</i> ^{G12d}	Transgenes Onkogen KirstinRas mit vorangehender gefloxter Stopkassette, welches nach Rekombination aktiv ist
<i>Trp53</i> ^{loxP/-}	<i>p53</i> ^{F/W}	Heterozygot gefloxtes p53 Gen, welches nach Rekombination herausgeschnitten wird
<i>Trp53</i> ^{loxP/loxP}	<i>p53</i> ^{F/F}	Homozygot gefloxtes p53 Gen, welches nach Rekombination herausgeschnitten wird
<i>R26</i> ^{lox-Stop-lox-tdTom/+}	<i>R26</i> ^{Tom}	Transgenes Konstrukt mit vorangehender gefloxter Stopkassette, welches für den Fluoreszenzfarbstoff tdTomato kodiert, welcher nach Rekombination exprimiert wird, da die Stopkassette deletiert wird

Tabelle 5: Durch Kreuzung entstandene Mauslinien

Name	Kurzbezeichnung	Beschreibung
<i>R26</i> ^{lox-Stop-lox-tdTom/+} ; <i>Hnf1bCreERT2</i> ^{+/-}	<i>R26</i> ^{Tom} <i>Hnf1bCreER</i>	Tamoxifen induzierbare Expression des Fluoreszenzfarbstoffes tdTomato im HNF1β+ Kompartiment
<i>Mdr2</i> ^{-/-} ; <i>R26</i> ^{lox-Stop-lox-tdTom/+} ; <i>Hnf1bCreERT2</i> ^{+/-}	<i>Mdr2</i> ^{-/-} <i>R26</i> ^{Tom} <i>Hnf1bCreER</i>	Generalisierter, konstitutiver Knockout des MDR2-Proteins, der zur HCC-Entwicklung führt und durch Tamoxifen induzierbare Expression des Fluoreszenzfarbstoffes tdTomato im HNF1β+ Kompartiment

<i>Trp53^{loxP/-};R26lox-Stop-lox- LSL-Kras^{G12d};R26^{lox-Stop-lox- tdTom/+};Hnf1bCreERT2^{+/-}</i>	HKP heterozygot	Tamoxifen induzierbare Expression des Fluoreszenzfarbstoffes tdTomato, heterozygote Deletion des Tumorsuppressorgens p53 und Aktivierung des Onkogens Kras im HNF1β+ Kompartiment
<i>Trp53^{loxP/loxP};R26lox-Stop-lox-LSL-Kras^{G12d};R26^{lox-Stop-lox-tdTom/+};Hnf1bCreERT2^{+/-}</i>	HKP homozygot	Tamoxifen induzierbare Expression des Fluoreszenzfarbstoffes tdTomato, homozygote Deletion des Tumorsuppressorgens p53 und Aktivierung des Onkogens Kras im HNF1β+ Kompartiment

3.2.2 Tierexperimentelle Materialien und Anästhetika

Tabelle 6: Tierexperimentelle Materialien und Anästhetika

Name	Hersteller	CAS-Nummer
Maisöl (Cornoil)	Fa. Sigma	8001-30-7
Cholin-defizientes Futter	Fa. MP Biomedicals	02960439 (Katalognummer)
DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine, Futter Altromin Standard Diät mit Zusatz von 0,1% DDC	Fa. Altromin	632-93-9
DEN, n-Nitrosodiethylamine	Fa. Supelco Analytical	55-18-5
DL-Ethionine 95% TLC, DL2-Amino-4-(ethylthio)butyric Säure	Fa. Sigma	67-21-0
Isofluran, Forene	Fa. Abbott	26675-46-7
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	Fa. Braun	7647-14-5
Tamoxifen	Fa. Sigma	10540-29-1

3.2.3 Allgemeine Haltungsbedingungen

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Maxi-Meiser-System/Thoren-Caging-System oder Techniplast-IVC) in den Räumen des Zentrums für Präklinische Forschung der Technischen Universität München. Dabei erhalten die Tiere Futter (Autklaviertes Mäusefutter Fa. Altromin) und Wasser (Trinkwasser bei Wechsel der Tränkflaschen 2 x pro Woche) ad libitum. Spezielles Holzgranulat dient als

Einstreu bei einmaligem Wechsel pro Woche. Außerdem erhalten die Mäuse Häuschen, Zellstoff und Holzwolle in ihren Käfigen. Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert mit personenlimitierter Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung und Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase. Das Hygienemanagement erfolgt gemäß Empfehlungen der FELASA. Die Haltung der Tiere erfolgt in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

3.2.4 Spezialdiäten: DDC-Diät und CDE-Diät

Die DDC-Diät bewirkt mittels eines nicht genau geklärten Mechanismus eine milde hepatische Entzündung und ist ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung der DR (Carpentier et al., 2011; C. Wang et al., 2012). Bei prolongierter Fütterung stellt die DDC-Diät ein Modell für inflammatorische Cholangiopathien dar, wie zum Beispiel die Primär Sklerosierende Cholangitis (Fickert et al., 2007). Der Schaden in der Leber manifestiert sich vor allem im biliären Kompartiment und es kann zu teils massiven intraduktalen Porphyrinablagerungen kommen, die den Gallenabfluss aus der Leber behindern.

Die DDC-Diät wurde in allen Versuchen dieser Arbeit eine Woche nach i.p. Tamoxifenapplikation gestartet. Unter DDC-Diät wurden die Tiere mit Spezialfutter gefüttert, welches mit 0,1 % DDC versetzt ist, bei ansonsten normalen Haltungsbedingungen. Die Tiere wurden während der Versuchszeit kontinuierlich überwacht und anhand von Bewertungsbögen beurteilt. Kriterien dabei waren absolutes Körpergewicht sowie dessen Dynamik, Spontanaktivität, Allgemeinbefinden, Aszites, Fellveränderungen, Ikterus und abnorme Körperhaltung. Auffällige Mäuse wurden häufiger überwacht und bei Bedarf wurde die DDC-Diät vorübergehend pausiert. Bei ausbleibender Verbesserung wurden die Tiere gemäß genau definierter Abbruchkriterien vorzeitig gekeult.

Die zweite Diät, die zum Einsatz kam, ist die CDE-Diät. Die CDE-Diät ist ebenfalls ein etabliertes Modell zur Untersuchung von DRs. Sie verursacht vornehmlich Schaden an adulten Hepatozyten (Akhurst et al., 2001; Tirnitz-Parker, Tonkin, Knight, Olynyk, & Yeoh, 2007). Betroffen sind davon vor allem Zone 2 Hepatozyten, also Hepatozyten, die nicht unmittelbar periportal oder perivenös gelegen sind. Während unter Kurzzeit-CDE-Diät vornehmlich eine ausgeprägte DR zu beobachten ist, führt die Langzeit-CDE-Diät nach vielen Monaten über Leberfibrose zur Leberzirrhose und schlussendlich zur HCC-Entwicklung (Passman et al., 2015). Bei der CDE-Diät wurden die Mäuse mit Cholindefizientem Spezialfutter und mit Ethionin-supplementiertem Wasser gefüttert. Für die Trinklösung wurde 1,65 g Ethionin in 1 l Wasser gelöst, das zur besseren Akzeptanz durch die Tiere, zusätzlich mit 1 % Glucose versetzt war und spätestens alle vier Tage frisch angesetzt wurde. Die CDE-Diät wurde eine Woche nach Tamoxifenapplikation gestartet. Die

Mäuse wurden analog zur DDC-Diät mit Bewertungsbögen überwacht und bei Bedarf wurde die CDE-Diät pausiert, die Tiere mit Haferflocken versorgt oder sie wurden vorzeitig gekeult.

3.2.5 Induktion der Rekombination mittels Cre-Rekombinase

Damit die Rekombination der DNS der transgenen Mäuse erfolgt, muss die bereits gewebspezifisch zytoplasmatisch exprimierte Cre-Rekombinase in den Nucleus transloziert werden. Dies erfolgte durch eine einmalige Tamoxifenapplikation mittels intraperitonealer Injektion. Die Injektion erfolgte zu einem modellspezifisch festgelegten Zeitpunkt, wie am Ende des Absatzes ausgeführt. Die i.p. verabreichte Tamoxifendosis der *Hnf1bCreER*-Mäuse beträgt 100 µg/g Mausgewicht (Jors et al., 2015). Die Injektion erfolgte unter Isoflurannarkose mittels einer 26 G Kanüle und einer 1 ml Einwegspritze im linken unteren Quadranten des Abdomens. Zur Herstellung der Injektionslösung wurde 10 mg Tamoxifen in einem Gemisch aus 100 µl 100 % Ethanol und 900 µl Maisöl aufgelöst, um eine Stocklösung von 10 mg/ml Tamoxifen zu erhalten mit dem Ziel 100 µg/g Mausgewicht zu injizieren. So wurden bei einer 20 g schweren Maus beispielsweise 200 µl injiziert.

Modell: Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion

Mdr2^{-/-}: Tag 21

DEN: Tag 10 (da DEN-Injektion bereits an Tag 17)

HKP homo und hetero: Woche 5-6

HKP homo mit CDE: 3 Mäuse Woche 3,5; 2 Mäuse Woche 5

HKP hetero mit DDC: Woche 5-6

HKP homo mit DDC: Woche 4,5-6,5

3.2.6 DEN-Modell

Das DEN-Modell stellt ein etabliertes Modell zur Untersuchung von HCCs dar. Dabei kann das Karzinogen n-Nitrosodiethylamine (DEN) mehrfach oder einmalig gegeben werden. In unserem DEN-Modell wurde DEN im Alter von 17 d unter Isoflurannarkose analog zur Tamoxifenapplikation i.p. injiziert. Zuvor wurde jedes Mal eine frische Lösung angesetzt, in der 1 µl DEN in 1 ml isotonischer 0,9 % NaCl-Lösung gelöst wurde. Jeder Maus wurde gemäß dem Protokoll von Naugler et al. eine standardisierte Dosis von 25 mg/kg Mausgewicht injiziert, was bei einer 10 g schweren Maus 250 µl dieser 0,1 % DEN-Lösung entspricht (Naugler et al., 2007). Die Induktion mit Tamoxifen fand im DEN-Modell mit Tag 10 bereits deutlich früher statt, als in den anderen Modellen. Nur so war es möglich, dem etablierten DEN-Modell mit DEN-Injektion an Tag 17 zu folgen, da die Markierung der HNF1β+ Zellen bereits vor Induktion der Karzinogenese stattfinden muss.

3.2.7 Sektion der Mäuse und makroskopische Aufnahmen

Die Organentnahme an den Mäusen wurde nach cervikaler Dislokation nach Isoflurannarkose mit Abwarten bis zum Atemstillstand vollzogen. Das Abdomen wurde mit einer medianen Laparotomie eröffnet und der Darm angehoben, um Blut aus der Vena cava inferior mittels einer 26 G Kanüle und einer 1 ml Einwegspritze zu entnehmen (0,5 – 1 ml Vollblut, je nach Mausgröße). Anschließend wurde die Leber *in toto* entnommen und in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Je nach Genotyp und Phänotyp wurde ebenfalls der Thorax eröffnet und die Lunge möglichst ohne direkte Berührung entnommen und in PBS gewaschen. Stichpunktartig erfolgte ebenfalls eine Entnahme der rechten Niere, des Pankreas und der Milz. Die in PBS gewaschenen Organe wurden unter einem Zeiss Stemi SV 11 Mikroskop fotografiert. Makroskopische Fluoreszenzaufnahmen zur Detektion des tdTomato Farbstoffs wurden unter Abdunkelung und Zuschaltung einer Fluoreszenzlampe ebq 100 isolated mit entsprechendem Filter durchgeführt. Unmittelbar nach der fotografischen Dokumentation wurden für Protein- und RNS-Analysen etwa 1 mm² große Gewebstücke des linken Mittellappens der Leber, teilweise des rechten Unterlappens der Lunge und teilweise von offensichtlichen Tumorknoten der Leber und Lunge in separaten Kryotubes in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Auswahl der Gewebstücke zur histologischen Auswertung erfolgte standardisiert und war abhängig davon, ob nur Paraffinhistologie oder auch Gefrierschnitte bei tdTom+ Mäusen angefertigt werden sollten. Für Gefrierschnitte wurde ein etwa 2 mm dicker Streifen aus dem linken Unterlappen geschnitten, sowie der linke Mittellappen und der rechte Mittellappen verwendet. Der Rest der Leber wurde dann für Paraffinhistologie weiter prozessiert. Wurden keine Gefrierschnitte angefertigt, wurde analog ebenfalls ein 2 mm dicker Streifen aus dem linken Unterlappen geschnitten, sowie der linke Mittellappen und der rechte Mittellappen verwendet. Bei makroskopischem Tumorbefall wurde die Leber zwar in ihre einzelnen Lappen zerteilt, doch möglichst das gesamte Gewebe zur histologischen Untersuchung aufbereitet. Generell wurden größere Knoten vorzugsweise für Gefrierschnitte ausgewählt, da so die Beurteilung der Fluoreszenz des tdTom Markers in der IF-Analyse möglich war. Die Blutproben wurden bei 6 krpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand als Serum in einem neuen Eppendorf Gefäß bei -80 °C bis zur Analyse durch die Abteilung Klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar gelagert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte keine Analyse der RNS, der Proteine oder des Blutes, auch wenn diese Proben routinemäßig entnommen wurden.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Gewebeaufbereitung für Paraffinhistologie

Für die Paraffinhistologie wurden die Gewebeproben der Mäuse für 24 h in Paraformaldehyd im Kühlschrank bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Gewebe in eine Entwässerungsmaschine überführt. Hier durchliefen sie automatisch eine aufsteigende Alkoholreihe von 20 % Isopropanol bis 100 % in 20 % Schritten mit jeweils 60 min Dauer. In hundertprozentigem Isopropanol wurden die Proben für mindestens 8 h gehalten und darauf folgte eine dreistufige Xylol-Reihe. Dann wurden die Proben in Paraffinöl gebadet und im Wärmeschrank bei 55 °C bis 65 °C erhitzt und gelagert. Nach einer Mindestwartezeit über Nacht (8-16 h) wurden die Gewebestücke in passenden Kassetten mittels eines Einbettsystems mit heißem Paraffin übergossen, das zuerst auf einer Kühlplatte bei 4 °C und anschließend bei Raumtemperatur (RT) aushärtete. Die Proben wurden bei RT gelagert, aber auf -20 °C gekühlt, bevor sie mit einem Mikrotom HM355S geschnitten wurden. Die Schnitte wurden standardmäßig 2,5 µm dick und seriell angefertigt, auf Standard-Objektträger aufgezogen und bei RT bis zur Färbung gelagert.

3.3.2 Gewebeaufbereitung für Gefrierschnitte (Kryoschnitte)

Die Gewebeprozessierung für Gefrierschnitte für Immunfluoreszenzuntersuchungen unterschied sich von der Paraffinhistologie und es wurde möglichst lichtgeschützt gearbeitet, um das Fluoreszenzsignal des tdTom-Fluoreszenzfarbstoffes zu erhalten. Zur Fixierung wurden die Gewebeproben der Mäuse für 1 h in Formaldehyd aufbewahrt und durchliefen dann einen aufsteigenden Sucrosegradienten bestehend aus 10 %, 20 % und 30 % Sucrose gelöst in PBS für jeweils 2 h beziehungsweise bis zum Absinken der Organe. Die Einbettung erfolgte mittels TissueTek® blasenfrei in Cryo Pure Gefäßen mit 1,6 ml und die Lagerung bis zur weiteren Prozessierung bei -20 °C. Geschnitten wurden die Proben möglichst zeitnah vor der Färbung mit einem Kryotom Microm HM 560 Cryostat in 10 µm dicke, serielle Schnitte, welche auf Standardobjektträger aufgezogen wurden. Bis zur Färbung wurden die Schnitte lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Lebergewebe aller analysierten Mäuse wurden zur standardmäßigen Beurteilung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Außerdem wurde Gewebe von Lunge, Pankreas, Milz und Nieren stichpunktartig bzw. je nach makroskopischem Befund HE gefärbt und untersucht. Die aus dem Paraffinblock geschnittenen und dann auf Objektträger aufgezogenen Proben wurden 2 x 5 min in Roticlear deparaffinisiert und anschließend für jeweils 2 x 2,5 min in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 % und 80 %) und abschließend für 1 min in dH₂O rehydriert. Nach Färbung in Hämatoxylin (40 s) und Spülen

unter fließendem Leitungswasser erfolgte für 20 s die Gegenfärbung mit Eosin. Nach Waschen in dH₂O durchliefen die Proben für jeweils 2 x 1 min eine aufsteigende Ethanolreihe (80 %, 96 % und 100 %), bevor sie nach 2 x 3 min in Roticlear mit Pertex eingedeckelt wurden. Die Beurteilung erfolgte mit einem Lichtmikroskop.

3.3.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) dient dem gezielten Nachweis von Proteinen auf Einzelzellniveau. 2,5 µm dicke Schnitte wurden in Roticlear für 2 x 5 min entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (jeweils 2 x 2,5 min in 100 %, 96 % und 80 % Ethanol, dH₂O). Anschließend wurden die Proben in Antigendemaskierungslösung 3 min bei 600 W in einer Mikrowelle erhitzt und 15 min bei 360 W weiter erwärmt. Nach 20 min Abkühlen erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS für je 3 min und ein Peroxidaseblock mit 3 % H₂O₂ Lösung für 10 min, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Nach abermaligem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte ein gleichzeitiger Block für 1 h bei RT mit 5 % Serum der Spezies, in welcher der sekundäre Antikörper hergestellt wurde und 10 % Avidin in PBS gelöst, um unspezifische Protein-Antikörperreaktionen zu unterbinden. Das zugesetzte Avidin soll endogenes Biotin binden. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Proben für 18 h bei 4 °C inkubiert in einer PBS-Lösung aus dem ersten Antikörper, 5 % Serum und 10 % Biotin. Anschließend folgte nach dem Waschvorgang mit PBS die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in einer 5 % Serum PBS-Lösung für 1 h bei RT.

Der Sekundärantikörper bindet die F_c-Stelle des primären IG-G Antikörpers und ist selbst mit Biotin markiert. Dann wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min frisch angesetzte ABC-Lösung aufgetragen. Die ABC-Lösung wurde zuvor aus 2 Tropfen Reagenz A und 2 Tropfen Reagenz B auf 5 ml PBS hergestellt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Bei diesem Schritt entsteht ein Avidin-Biotin-Enzymkonjugat, das der Signalverstärkung dient. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte für 5 min die Färbung mit dem Chromogen Diaminobenzidin mittels DAB-Kit. Die DAB-Lösung bestand dabei aus 2 Tropfen Pufferlösung, 2 Tropfen H₂O₂, welches als Substrat fungiert und 4 Tropfen Diaminobenzidin auf 5 ml dH₂O.

Nun wurde dreimal mit dH₂O gewaschen, für 2 s in Hämatoxylin gegengefärbt, mit Leitungswasser gespült und in dH₂O gewaschen. Im Anschluss wurde für jeweils 2 x 1 min eine aufsteigende Ethanolreihe bestehend aus 80 %, 96 % und 100 % Ethanol zur Dehydrierung durchlaufen und vor dem Eindeckeln mit Pertex befanden sich die Schnitte noch 2 x 3 min in Roticlear. Die Fotos wurden mit einem Zeiss Axiowert 200M Mikroskop aufgenommen.

3.3.5 Immunofluoreszenz

Die Immunofluoreszenz (IF) erlaubt analog zur IHC den Nachweis von Proteinen auf Einzelzellniveau. Zusätzlich kann hier jedoch auch das in dieser Arbeit verwendete Reporterfluoreszenzprotein tdTom sichtbar gemacht werden. Hierdurch wird das *Lineage Tracing* möglich. Zur Färbung wurden die, wie in 3.3.2 beschrieben, prozessierten Gewebeproben bestehend aus seriellen, 12 µm dicken Schnitten zuerst 10 min mit PBS rehydriert. Anschließend wurden die Proben für 1h mit einer Blocklösung behandelt. Die Blocklösung bestand aus 1 % BSA, 10 % Serum der Spezies, in welcher der sekundäre Antikörper hergestellt wurde, und 1,7 % NaCl, gelöst in PBS. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in einer Lösung aus 0,5 % BSA, 10 % Serum, 1,7 % NaCl und 1 % Triton-X in PBS. Nach einer primären Inkubation bei 37 °C für eine Stunde erfolgte die weitere Inkubation für 18 h bei RT. Nach drei Waschschritten mit 1,7 % NaCl gelöst in PBS für 10 min erfolgte die Inkubation für 2 h mit dem sekundären Antikörper in einer Lösung analog zum primären Antikörper.

Der sekundäre Antikörper, an den ein fluoreszierendes Protein gekoppelt ist, bindet an die F_c-Stelle des primären Ig-G Antikörpers. Optional kann bei diesem Schritt auch das Kernfärbemittel ToPro 3 in der Verdünnung 1:3000 hinzugegeben werden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte gleichzeitig mit dem Eindecken mit Mounting Medium, sofern ToPro 3 nicht benutzt wurde, die Kernfärbung mit DAPI. Nach dreißig Minuten Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bei 4 °C lichtgeschützt bis zur Mikroskopie an einem konfokalen Olympus FV10i Mikroskop gelagert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde den Mäusen in Isoflurannarkose eine Probe des Mäuseschwanzes entnommen und anschließend die DNS aufgereinigt. Dazu wurde die Probe mit 200 µl Zellysepuffer und 10 µl Proteinase K bei 55 °C für 18 h in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend erfolgte der erste Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14 krpm. 200 µl des Überstandes wurden mit 200 µl Isopropanol versetzt und erneut für 12 min bei 14 krpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden 300 µl 4 °C kaltes 70 % Ethanol zugegeben und wiederum 10 min bei 14 krpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 45 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet, bevor es in 100 µl TE-Puffer für mindestens 12 h gelöst wurde.

3.4.2 PCR und Gelelektrophorese

Der Standard PCR-Ansatz zur Genotypisierung wurde mit 5,88 % DNS, 41,11 % RNase freiem dH₂O, 49,01 % PCR Ready Mix und 3,92 % Primermix durchgeführt und nach folgenden Temperaturzyklen durchgeführt. Dabei wurde der Mittelteil mit 1 min bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 50 s bei 72 °C 40-mal wiederholt. Bei der CreERT2 PCR erfolgte die Annealingphase von 58 °C im Standardansatz stattdessen bei 60 °C.

Zeit 6 min {1 min 30 s 50 s} x 40 7 min bis Entnahme

Temperatur 94 °C {94 °C 60 °C 72 °C} x 40 72 °C 4 °C

Anschließend wurden jeweils 20 µl des PCR-Produkts mit 17 µl Gene Ruler als Maßstab auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 120 V solange laufen gelassen bis die Banden deutlich zu unterscheiden waren, was meistens nach ca. 1,5 h der Fall war.

Die Gele wurden mit 8 g Agarose mit 9ml Tris-Acetat-EDTA-Stammlösung aufgelöst in 441 ml dH₂O für 8 min bei 600 W in einer Mikrowelle gekocht. Dann wurden 20 µl des DNS Interkalators Ethidiumbromid zur besseren Sichtbarkeit der Banden zugegeben und die Gele ausgegossen.

4 Ergebnisse

Die Identität der Ursprungszellen der beiden häufigsten Lebertumoren HCC und CC ist jeweils nicht eindeutig geklärt (B. Fan et al., 2012; Yamashita & Wang, 2013; Zucman-Rossi et al., 2015). Da in deskriptiven Studien Tumorzellen des HCC und CC Gensignaturen, Expressionen von Oberflächenmarkern und histologische Eigenschaften besaßen, die vergleichbar mit DRCs sind, werden die Zellen der duktaalen Reaktion als potentiell Ursprungszellkompartiment postuliert (Komuta et al., 2012; Lee et al., 2006; Rountree et al., 2012). Insbesondere dedifferenzierten und prognostisch ungünstigen Tumoren wird ein Ursprung aus dem DRC-Kompartiment zugesprochen. Diese Hypothese wurde zusätzlich dadurch unterstützt, dass den DRCs lange Zeit große putative Plastizität im Rahmen der Leberregeneration bei chronischen Inflammationsprozessen zugeschrieben wurde, doch diese erscheint angesichts neuerer Studien eingeschränkt (Jors et al., 2015; Schaub et al., 2014; Sekiya & Suzuki, 2014; Yanger et al., 2014). Das *Hnf1bCreER*-Mausmodell ermöglicht die spezifische und exklusive Markierung nahezu aller DRCs zu einem beliebig wählbaren Zeitpunkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff tdTom und erlaubt so die gezielte, experimentelle Untersuchung des karzinogenen Potentials dieses Kompartiments in einem immunkompetenten Setting, *in situ* und *in vivo*. Die komplexe Frage nach der Ursprungszelle eines Tumors lässt sich in allen unseren durchgeführten Experimenten beantworten, indem der Tumor in IF-Analysen auf tdTom-Markierung untersucht wird. Sind die DRCs tatsächlich das Ursprungskompartiment eines Tumors, so wird der Tumor durch die Cre-Rekombinase mit dem tdTom-Signal versehen worden sein und rot fluoreszieren. Um die DRCs bzw. LPCs als potenzielle Ursprungszellen des HCCs zu detektieren, benutzten wir das *Hnf1bCreER*-Modell mit tdTom als Reporter in zwei häufig verwendeten HCC-Modellen, dem DEN- und dem *Mdr2^{-/-}*-Modell.

4.1 Aus den Zellen der dukталen Reaktion entstehen keine Lebertumoren in *Mdr2*^{-/-}-Mäusen

Das *Mdr2*^{-/-}-Modell ist ein etabliertes HCC-Modell, bei dem es durch den konstitutiven Knockout des Transporterproteins MDR2 zur Cholestase und zur HCC-Entwicklung kommt. Zur Klärung der Frage, ob HCCs aus HNF1β⁺ DRCs hervorgehen können, wurden *Mdr2*^{-/-} *R26*^{Tom} *Hnf1b* *CreER*-Mäuse 48 Wochen nach Geburt analysiert. Die Induktion mit Tamoxifen fand bei diesen Mäusen an P21 durch eine i.p. Injektion statt. Nach 48 Wochen wurden makroskopisch 4,0 ± 3,1 tumorverdächtige Knoten pro Maus detektiert (n = 6, 4/6 mit makroskopisch sichtbaren Knoten). Die Tumorknoten zeigten in der HE-Färbung typische HCC-Merkmale (Abbildung 8 oben links und Mitte). In der IHC-Färbung mit dem Marker Kollagen IV (Col IV), einem Protein der extrazellulären Matrix, zeigte sich eine Veränderung des typischen Verteilungsmusters hin zu HCC-typisch verbreiterten Leberzellbälkchen (Abbildung 8 oben rechts). Die Zellproliferation im Bereich der Tumorknoten war deutlich mehr, als im normalem Lebergewebe, wie in der IHC-Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 zu sehen ist (Abbildung 8 unten links). Weitere etablierte HCC-Marker wie das Golgi Protein 73 (GP73) (Marrero et al., 2005) und AFP wurden ebenfalls vermehrt exprimiert (Abbildung 8 unten Mitte und rechts). Insgesamt stellte sich histopathologisch das klassische Bild eines HCCs dar.

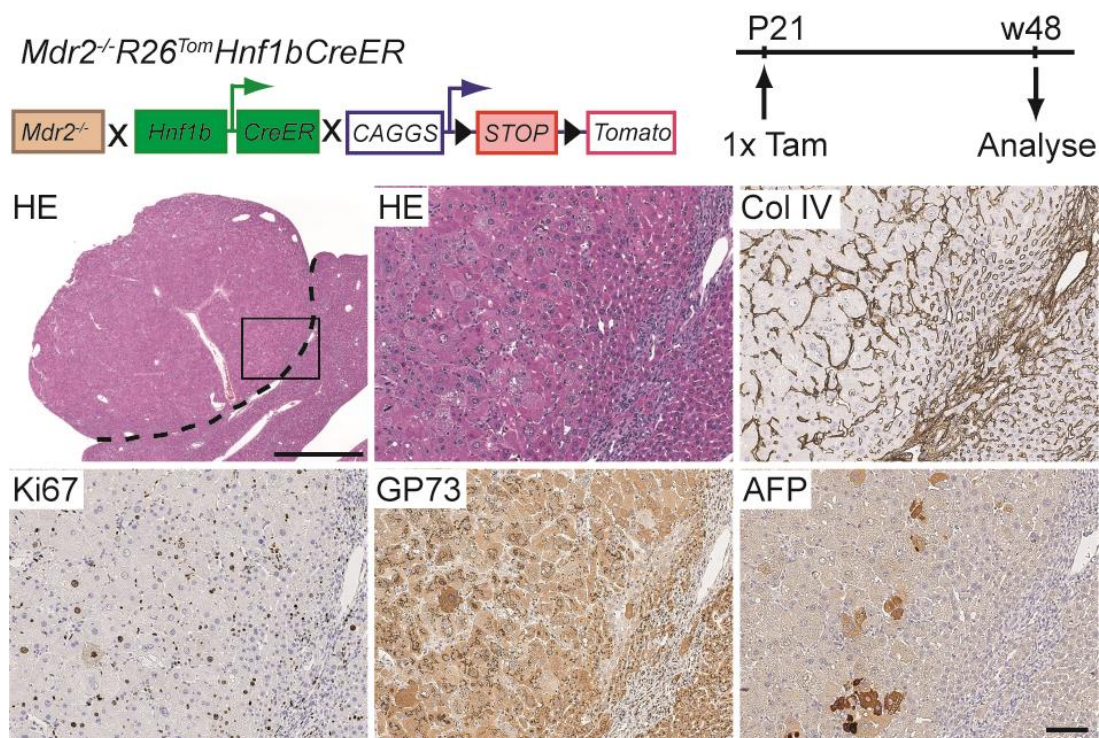


Abbildung 8: *Mdr2*^{-/-} *R26*^{Tom} *Hnf1b* *CreER*-Mäuse entwickeln typische HCCs.

Mdr2^{-/-} *R26*^{Tom} *Hnf1b* *CreER*-Mäuse wurden an P21 mit Tamoxifen induziert und nach 48 Wochen analysiert. Darstellung eines repräsentativen HCC Knotens in HE-Färbung links oben (gestrichelte Linie). Die Grenzfläche des Knotens ist vergrößert (20x) in seriellen Schnitten in HE und mit den Markern Col IV, Ki67 GP73 und AFP dargestellt. Es zeigt sich das typische Bild eines HCCs. Maßstäbsbalken: HE links oben 1000 µm, andere Färbungen jeweils 100 µm
Abbildung modifiziert aus (Jors et al., 2015)

In der makroskopischen Fluoreszenzanalyse waren die tumorverdächtigen Knoten nicht tdTom+ (Daten nicht gezeigt). IF-Analysen bestätigten dies mikroskopisch. In seriellen Gefrierschnitten wurden mittels HE-Färbungen und Col IV-IF-Färbungen HCC-Areale identifiziert und dann auf ihr tdTom Signal untersucht. Bemerkenswerterweise fanden sich in keinem der untersuchten HCC-Areale tdTom+ Tumorzellen (Abbildung 9). Selten waren am Rand der Knoten oder sogar innerhalb der Knoten tdTom+ Zellen zu sehen. Es ist allerdings davon auszugehen, dass diese tdTom+ Zellen durch Tumorwachstum verdrängte biliäre Strukturen darstellen, die von einer tdTom+ DR umgeben sind (mit Sternchen markiert in Abbildung 9). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass HNF1 β + Zellen und damit das putative adulte LPC-Kompartiment im *Mdr2*^{-/-}-Modell nicht die Ursprungszellen des HCC sind. Zudem legen diese Ergebnisse nahe, dass HCCs im *Mdr2*^{-/-}-Modell wahrscheinlich aus Hepatozyten entstehen.

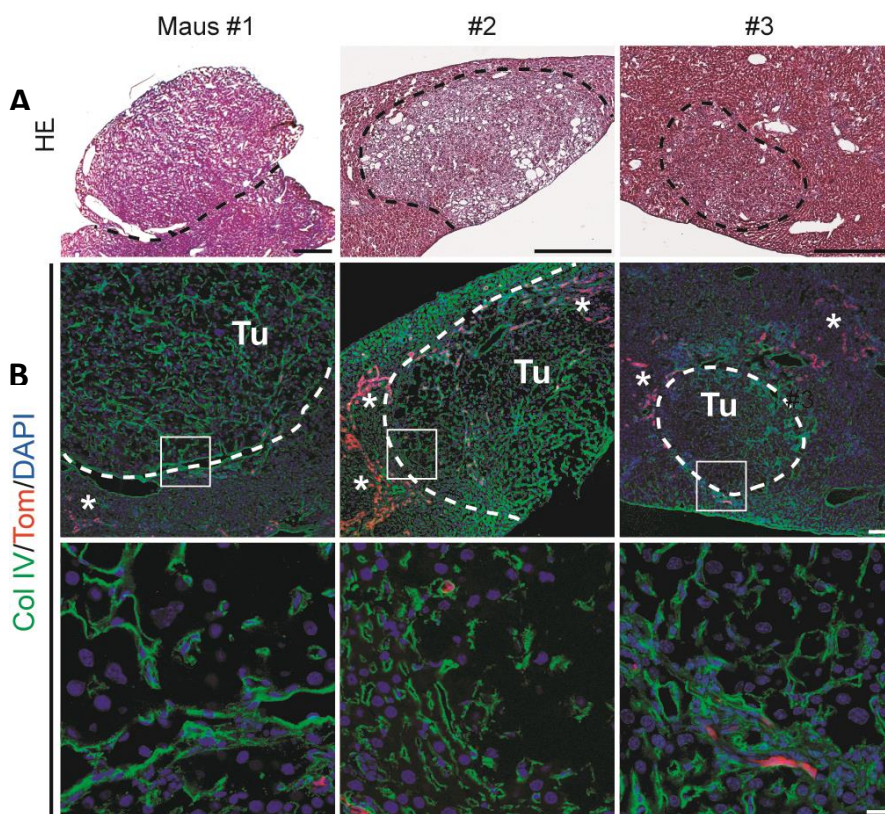


Abbildung 9: Hepatozelluläre Karzinome entstehen nicht aus dem mutmaßlichen Leberprogenitorzell-Kompartiment im *Mdr2*^{-/-}-Modell.

Darstellung serieller Kryoschnitte von repräsentativen HCC-Knoten in drei verschiedenen *Mdr2*^{-/-}*R26*^{Tom}*Hnf1b**CreER*-Mäusen nach jeweils 48 Wochen. **A)** HE aus Kryoschnitten mit HCC-Knoten (gestrichelte Linie). **B)** IF-Färbung mit Col IV, DAPI und tdTom (10x). Die Col IV Struktur innerhalb des HCC-Knotens ist stark verändert (gestrichelte Linie). Die tdTom+ Zellen der dukталen Reaktion oder anderer biliärer Strukturen sind typischerweise außerhalb der Tumorgrenze und nicht innerhalb zu finden und stellen in keinem Fall Tumorzellen dar (Sternchen). Darunter jeweils Vergrößerungen der Tumorgrenzen (60x). Maßstabsbalken: A) 500 μ m, B) 100 μ m, unten 20 μ m. Abbildung modifiziert aus (Jors et al., 2015)

4.2 Aus den Zellen der duktaalen Reaktion entstehen keine Lebertumoren im DEN-Modell

Nachdem wir zeigen konnten, dass HNF1 β ⁺ Zellen im *Mdr2*^{-/-}-Modell nicht die Ursprungszellen des HCC sind, untersuchten wir *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse in einem weiteren etablierten HCC-Modell: dem DEN-Modell. Gemäß etablierter Protokolle wird den Mäusen im DEN-Modell einmalig das Kanzerogen DEN an P17 i.p. injiziert, was zu einer zuverlässigen HCC-Entwicklung nach 8-12 Monaten führt (Naugler et al., 2007). Da die Markierung der HNF1 β ⁺ Zellen vor dem Eintritt des kanzerogenen Ereignisses stattfinden sollte, fand in diesem Experiment die Induktion der Cre-Rekombinase bereits an P10 statt. Die Rekombinationsrate wurde noch einmal gesondert für diesen abgewandelten Versuchsaufbau eine Woche nach Induktion an P17 bestimmt und war unverändert hoch bei $92,7 \pm 3,8\%$ (n = 3). Analog zur späteren Induktion mit Tamoxifen war die ektopische Markierung von Hepatozyten ein seltenes Ereignis. Die *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Maus ist somit auch bei den veränderten Bedingungen im DEN-Modell ein hochspezifisches Instrument für das *Lineage Tracing* des HNF1 β ⁺ duktaalen, putativen Leberprogenitorzell-Kompartiments (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Mäuse auf Tumorentwicklung fand nach 10-12 Monaten statt. Dabei wurden makroskopisch im Durchschnitt $6,0 \pm 2,8$ (n = 6) tumorverdächtige Knoten pro Maus detektiert. In der makroskopischen Fluoreszenz-Analyse war keiner der tumorverdächtigen Knoten tdTom⁺ (Abbildung 10 B). In der feingeweblichen Aufarbeitung der Lebern mittels HE-Färbung und IHC-Färbungen stellten sich die tumorsuspekten Knoten histopathologisch als klassische HCCs dar (Abbildung 10 C). Zu sehen sind HCC-typisch erweiterte Leberzellbälkchen in der Col IV-Färbung, eine vermehrte Proliferation der Tumorzellen in der Ki67-Färbung und die vermehrte Expression von GP73 und AFP in den Tumorknoten. Als Besonderheit ist in Abbildung 10 C beispielhaft die Darstellung eines Knotens im tumorverdächtigen Knoten zu sehen. Dies lässt sich nach der in 1.5 vorgestellten Theorie zur Entstehung von Krebsstammzellen als Entwicklung eines dedifferenzierten Subklons des HCC-Knotens interpretieren.

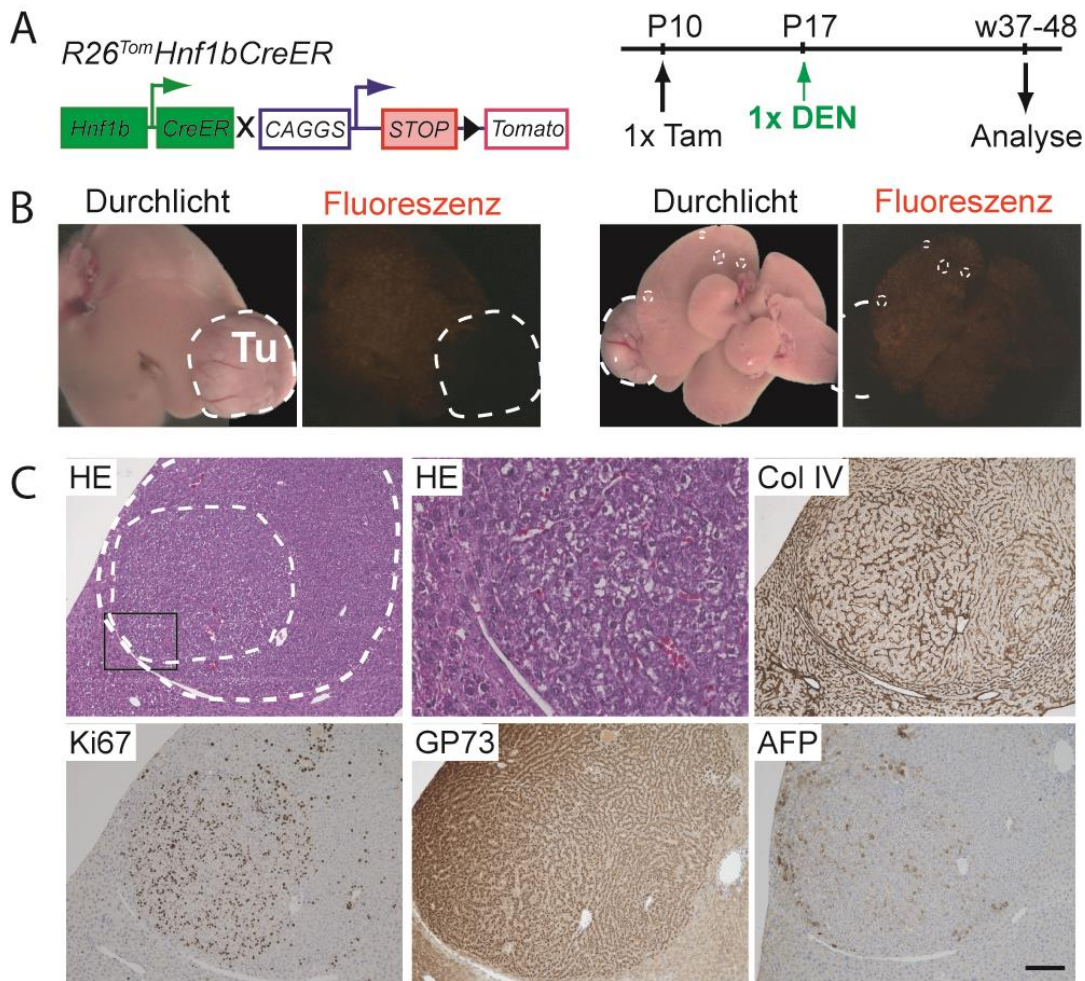


Abbildung 10: In $R26^{Tom}Hnf1bCreER$ -Mäusen entstehen im DEN-Modell klassische HCC-Knoten, welche makroskopisch tdTom negativ sind.

A) Schematische Darstellung des genetischen Mausmodells der $R26^{Tom}Hnf1bCreER$ -Mäuse. Induktion mit Tamoxifen an Tag 10, Injektion mit DEN an Tag 17 und Analyse nach 37-48 Wochen. **B)** Makroskopisch zeigen sich deutliche Tumorknoten, die jedoch in der Fluoreszenzaufnahme ausschließlich tdTom negativ sind. **C)** Histologisches Bild eines repräsentativen HCC-Knotens in HE-Färbung, der das Bild eines Knotens im Knoten („nodule in nodule“) zeigt (gestrichelte Linien). Die Grenzfläche des Knotens ist vergrößert in HE dargestellt und zeigt den Unterschied zwischen normalen Lebergewebe und HCC. Serielle Färbungen mit den Markern Col IV, Ki67 GP73 und AFP weisen typische HCC-Merkmale auf. Maßstabsbalken: 100 μ m. Abbildung modifiziert aus (Jors et al., 2015)

In der mikroskopischen IF-Analyse wurde das makroskopische Bild der tdTom negativen Tumorknoten bestätigt, und kein einziger der analysierten Knoten wies tdTom+ Tumorzellen auf (Abbildung 11). Lediglich in den Randgebieten der Tumorknoten waren tdTom+ Zellen im Sinne einer dukталen Reaktion des angrenzenden Lebergewebes oder eines verdrängten Portalfeldes mit Gallengang zu beobachten (mit Sternchen markierte Bereiche in Abbildung 11). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch im DEN-Modell HNF1 β + Zellen nicht maligne transformieren und keine Tumoren aus ihnen entstehen. Die Ursprungszelle der beobachteten HCCs liegt somit nicht im HNF1 β + Kompartiment und damit dem putativen LPC-Kompartiment. Diese Daten legen nahe, dass auch im DEN-Modell adulte Hepatozyten die Ursprungszellen des HCC darstellen.

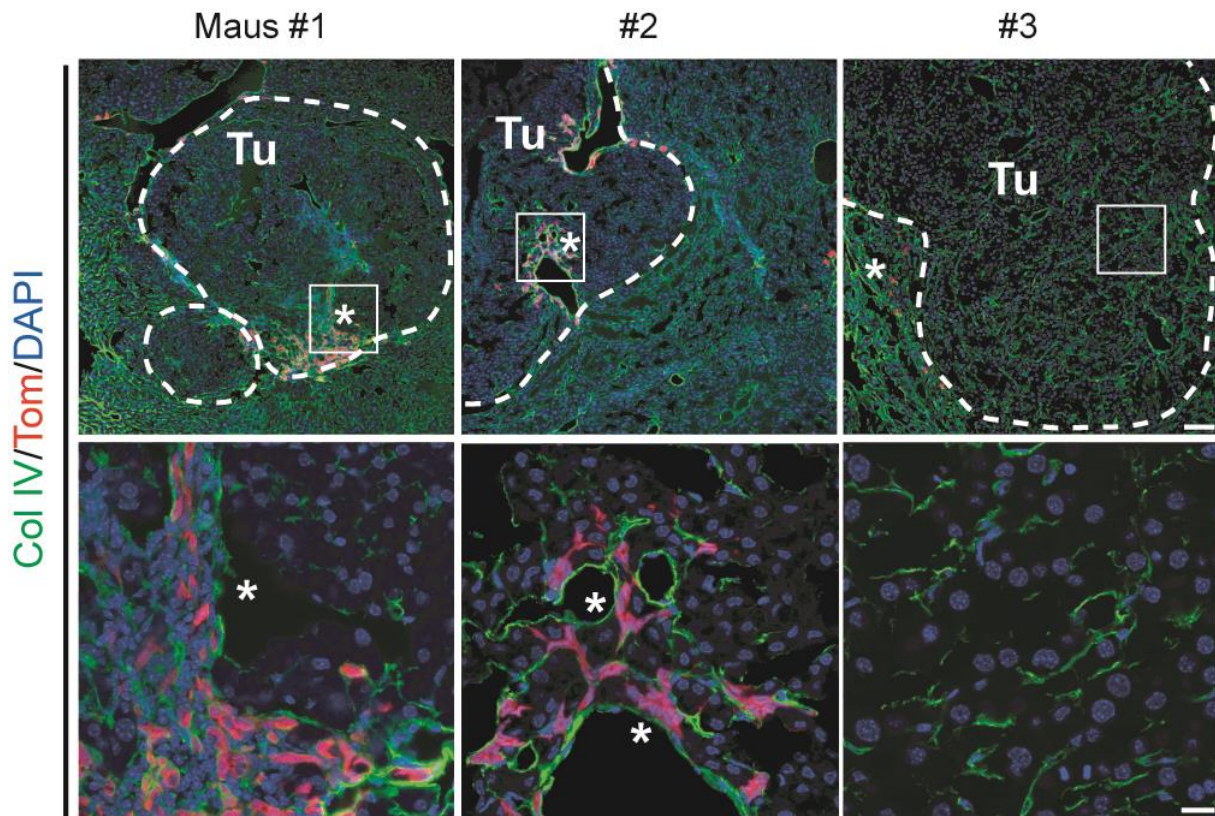


Abbildung 11: Hepatozelluläre Karzinome entstehen im DEN-Modell nicht aus dem mutmaßlichen Leberprogenitorzell-Kompartiment.

Repräsentative HCC-Knoten drei verschiedener DEN-behandelter *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse zu Woche 37-48. In Co-IF-Analysen (Col IV/DAPI/tdTom) zeigt sich die HCC-typisch veränderte Col IV Struktur innerhalb der HCC-Knoten (gestrichelte Linien, 10x). Die Knoten enthalten keine tdTom+ Tumorzellen (unten rechts). Die mit Sternchen markierten tdTom+ Bereiche sind im Sinne einer dukталen Reaktion (unten links) oder eines durch Tumorwachstum verdrängten Portalfeldes (unten Mitte) zu interpretieren (60x). Maßstabsbalken: Mitte 100 μ m, Unten 20 μ m. Abbildung modifiziert aus (Jors et al., 2015)

4.3 Die spezifische Aktivierung von *Kras* und Inaktivierung von *p53* in *HNF1 β* + Zellen resultiert nicht in lebereigenen Tumoren, aber führt zu Adenokarzinomen in der Lunge aus Alveolarzellen Typ II

Nachdem wir zeigen konnten, dass DRCs in zwei etablierten HCC-Modellen (*Mdr2*^{-/-}-Modell und DEN-Modell) nicht die Ursprungszellen des HCC sind, sollten DRCs gezielt auf ihre Sensibilität gegenüber maligner Transformation getestet werden.

Dazu wurden *LSL-Kras^{G12d}p53^{FW}R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse (HKP heterozygot) und *LSL-Kras^{G12d}p53^{FF}R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäuse (HKP homozygot) generiert, in denen in *HNF1 β* + Zellen nach der Induktion mit Tamoxifen, neben dem Fluoreszenzreporter tdTom das Onkogen *Kras* aktiviert und zudem das Tumorsuppressorgen *p53* heterozygot bzw. homozygot inaktiviert wird. Das Überleben HKP heterozygoter Mäuse (n = 12) war dabei in der Kaplan-Meier-Analyse statistisch nicht signifikant unterschiedlich vom Überleben HKP homozygoter Mäuse (n = 19, 191 d vs. 176 d, n.s., p=0,9258, KI 0,6708-1,500).

Überraschenderweise zeigte sich bei der Sektion der Mäuse stets eine makroskopisch nicht veränderte Leber, aber ein ausgeprägter Tumorbefund in der Lunge, der lebenslimitierend

war. Wie eingangs beschrieben, wird HNF1 β ebenfalls in der Lunge exprimiert (vgl. Seite 8 und Abbildung 12 E) (Lazzaro et al., 1992). Offensichtlich waren zum Zeitpunkt der Analyse aus der markierten HNF1 β + Zellpopulation in der Lunge Tumoren entstanden, die makroskopisch als tdTom+ fluoreszierende Knoten erkennbar waren (Abbildung 12 B links). Mikroskopisch waren diese Tumoren in der IF tdTom+ (Abbildung 12 B rechts) und in der HNF1 β -IHC-Färbung HNF1 β + (Daten nicht gezeigt). Histopathologisch zeigte sich das klassische Bild eines Adenokarzinoms der Lunge (Abbildung 12 C).

Um die Zellpopulation in der Lunge näher zu charakterisieren, die durch Kras-Aktivierung und p53-Deletion onkogen transformiert und Adenokarzinome ausbildet, wurde zunächst an *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäusen die Rekombinationsrate der HNF1 β + Zellen in der Lunge bestimmt. Diese war 7 d post Tamoxifen i.p. an P33 mit $16,78 \pm 2,2 \%$ ($n = 3$) deutlich geringer als in der Leber (Abbildung 12 F links). Möglicherweise führt die i.p. Injektion zu einem First-Pass-Effekt, sodass eine geringere Tamoxifendosis die Lunge erreicht. Zur weiteren Charakterisierung des HNF1 β + Lungenkompartiments wurden IF-Färbungen mit verschiedenen Lungenzellmarkern durchgeführt, wie dem Surfactant Protein C (SPC) als Marker der Alveolarzellen Typ II. Co-IF-Analysen der tdTom-Expression mit SPC zeigten, dass alle tdTom+ Zellen ausnahmslos SPC co-exprimierten (Abbildung 12 F 2. Spalte von links). Der Anteil der tdTom+ und SPC+ Zellen an allen SPC+ Zellen betrug $17,49 \pm 1,6 \%$ ($n = 3$). (Abbildung 12 F 2. Spalte). Weitere IF-Färbungen mit dem Clarazellmarker CC 10, sowie dem Zilienmarker acetyliertes Tubulin zeigten keine Co-Lokalisation mit tdTom (Abbildung 12 F rechts). In der adulten Lunge produzieren Alveolarzellen Typ II Surfactant. Eine Untergruppe der Alveolarzellen Typ II kann sich selbst erneuern und auch Alveolarzellen Typ I nach Lungenverletzungen generieren und besitzt somit Stammzeleigenschaften (Chen et al., 2017; Desai, Brownfield, & Krasnow, 2014). Zusammenfassend zeigte sich eindeutig die Abstammung der entstandenen Lungentumoren aus Alveolarzellen Typ II und weiterführend, dass Alveolarzellen Typ II als Ursprungszelle des Adenokarzinoms der Lunge fungieren können. Insbesondere die Aktivierung von Kras in Alveolarzellen Typ II führt zur Entwicklung von Adenokarzinomen, wie bereits beschrieben wurde (C. F. B. Kim et al., 2005; Lin et al., 2012). Zusätzlich wurde durch die beobachtete Kanzerogenese in der Lunge gezeigt, dass für das Ausbleiben eines Phänotyps in der Leber, nicht die mangelnde Funktionalität des transgenen onkogenen Konstrukts verantwortlich ist.

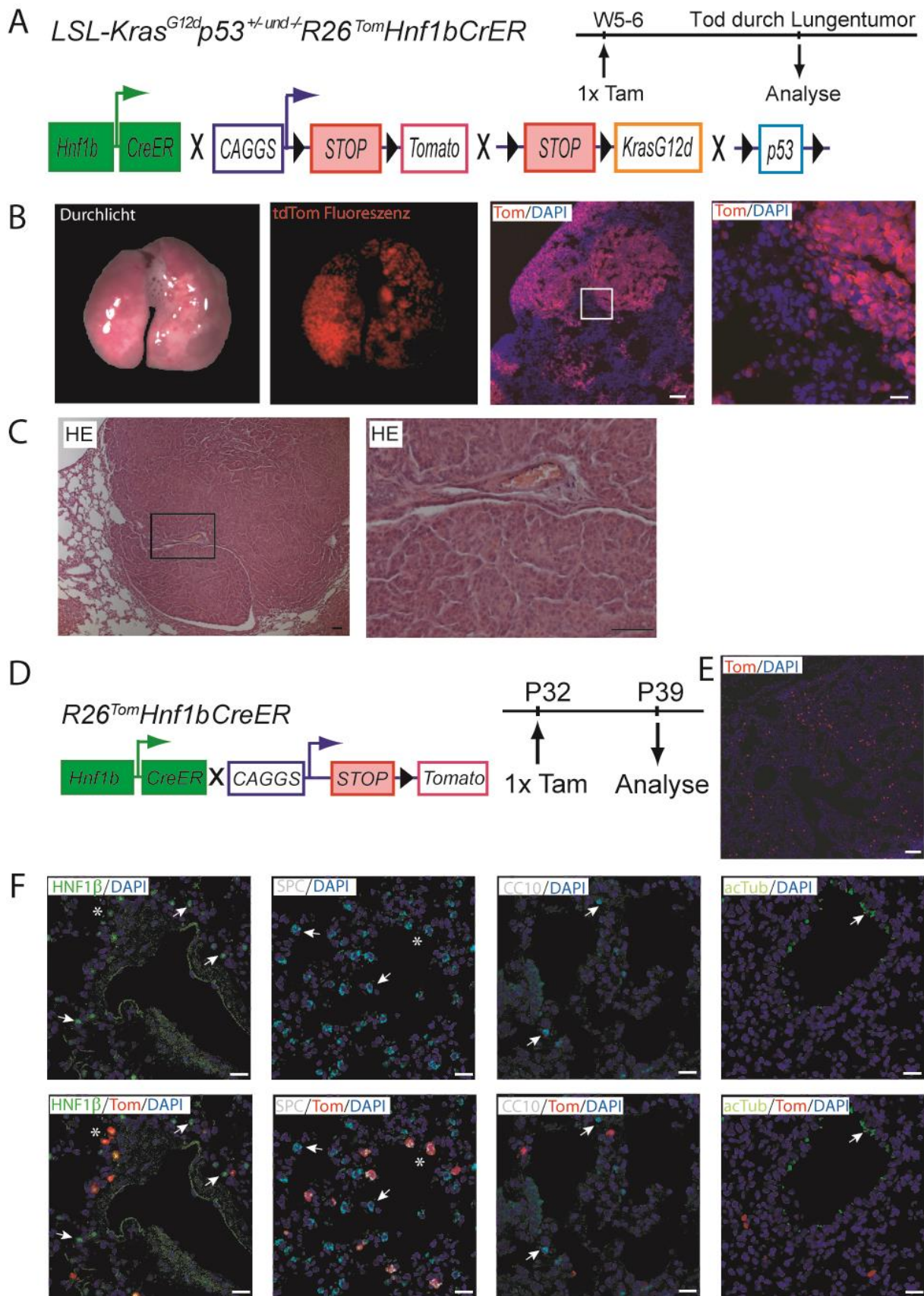


Abbildung 12: Kras-Aktivierung/p53-Inaktivierung in HNF1 β + Zellen führt zu Adenokarzinomen in der Lunge.
A) Schematische Darstellung des genetischen Mausmodells der HKP hetero- und homozygoten Mäuse. Die Analyse fand bei bevorstehendem Exitus durch Lungentumor statt (Durchschnitt: 182 d). **B)** Makroskopisch zeigt sich eine deutliche Tumorbildung in der gesamten Lunge, welche in der IF-Analyse tdTom+ sind (links). In der mikroskopischen IF-Analyse (tdTom/DAPI) sind im 10x und einem 60x vergrößerten Ausschnitt ebenfalls tdTom+ Knoten zu erkennen. **C)** In der HE-

Färbung in 5x und einem vergrößerten Ausschnitt in 20x Vergrößerung stellen sich die Tumoren als Adenokarzinome dar. **D)** Schematische Darstellung des genetischen Mausmodells der *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Maus. Zur Charakterisierung der HNF1 β + Zellen in der Lunge wurde die Cre-Rekombinase an Tag 32 aktiviert und die Mäuse an Tag 39 analysiert. **E)** Die Tamoxifenbehandlung führt in *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mäusen zur Cre-vermittelten Rekombination des tdTom-Reporters in einigen Zellen der Lunge (tdTom-IF, 10x Vergrößerung). **F)** Zur Charakterisierung der HNF1 β + Zellen wurden Co-IF-Analysen der Lunge mit DAPI und jeweils HNF1 β (links), dem Alveolarzell Typ II Marker SPC (2. von links), dem Clarazellmarker CC10 (3. von links) und dem Marker für respiratorisches Epithel acetyliertem Tubulin (rechts) angefertigt (60x Vergrößerung). In der unteren Reihe sind die Bilder der oberen Reihe mit Zuschaltung des tdTom-Leuchtsignal abgebildet. Einige Zellen in der Lunge sind HNF1 β +, wie aus der Literatur bekannt. Die Rekombinationsrate liegt bei 17 % (links, Sternchen: HNF1 β + und tdTom+ Zelle, Pfeil: HNF1 β + und tdTom- Zellen). Das *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Mausmodell markiert spezifisch eine Subpopulation der Alveolarzellen Typ II (2. von links, Sternchen: SPC+ und tdTom+ Zellen, Pfeile: SPC+ und tdTom- Zellen). Clarazellen und respiratorisches Epithel werden nicht markiert (rechts; Pfeile). Maßstabsbalken: B) 100 μ m, Ausschnitt 20 μ m C) 50 μ m E) 100 μ m F) 20 μ m

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen am Lungengewebe mit Kras-induzierter Ausbildung von Adenokarzinomen aus HNF1 β + Alveolarzellen Typ II, konnten wir makroskopisch in der Leber keinerlei Veränderungen feststellen. Bei Betrachtung unter Fluoreszenzlicht zeigte sich nur in der Gallenblase und dem Ductus hepaticus als biliärem HNF1 β + Gewebe ein tdTom+ Signal (Abbildung 13 B). In der histologischen Aufarbeitung der Leber beobachteten wir in der HE-Färbung zum Zeitpunkt der Analyse lediglich teilweise eine milde DR, jedoch keine Tumormanifestation und auch keine prämaligen Läsionen (Abbildung 13 C links). In einigen Portalfeldern zeigte sich eine geringe Vermehrung von HNF1 β + Zellen in der CK19 Färbung im Sinne einer duktaalen Reaktion, jedoch nicht sehr ausgeprägt und deutlich schwächer als beispielsweise nach typischen Schädigungsmodellen (z.B. CDE oder DDC-Diät) (vgl. Abbildung 13 C Mitte mit Abbildung 4 B).

Um zu überprüfen, ob die Rekombination der onkogenen Transformation durch Kras-Aktivierung in den HNF1 β + Zellen der Zellen erfolgte, wurde neben der Analyse der tdTom-Expression eine IHC-Färbung für die phosphorylierte Form der Extracellular-signal Regulated Kinase (pERK) durchgeführt. pERK befindet sich in der ras-Signalkaskade *downstream* von ras und stellt somit ein Surrogat für aktiviertes Kras in einer Zelle dar. Dabei zeigte sich, dass der Großteil der biliären Zellen positiv für pERK waren (vgl. Abbildung 13 C Mitte und rechts). In IF-Analysen stellte sich ebenso lediglich eine milde duktaale Reaktion tdTom+ Zellen dar (Abbildung 13 D). Die Rekombination in der Leber blieb auch in HNF1 β /tdTom-Co-IF-Analysen gleichbleibend hoch ($84,2 \pm 0,19$ %, n = 4, jeweils nach Tod durch Lungentumor, Daten nicht gezeigt).

Somit ist die ausbleibende Tumorentwicklung in der Leber nicht auf eine fehlende Aktivierung von Kras zurückzuführen, sondern auf die Resistenz der HNF1 β + Zellen gegenüber maligner Transformation durch Aktivierung von Kras. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass HKP hetero- und homozygote Mäuse phänotypisch keinerlei Unterschiede aufwiesen und die Leber zum Zeitpunkt der Analyse (maximal 279 d) trotz effektiver Rekombination ohne Anzeichen einer malignen Entartung und nur gering verändert war, während die rasch progrediente Entwicklung von Lungentumoren die Lebenserwartung bestimmte.

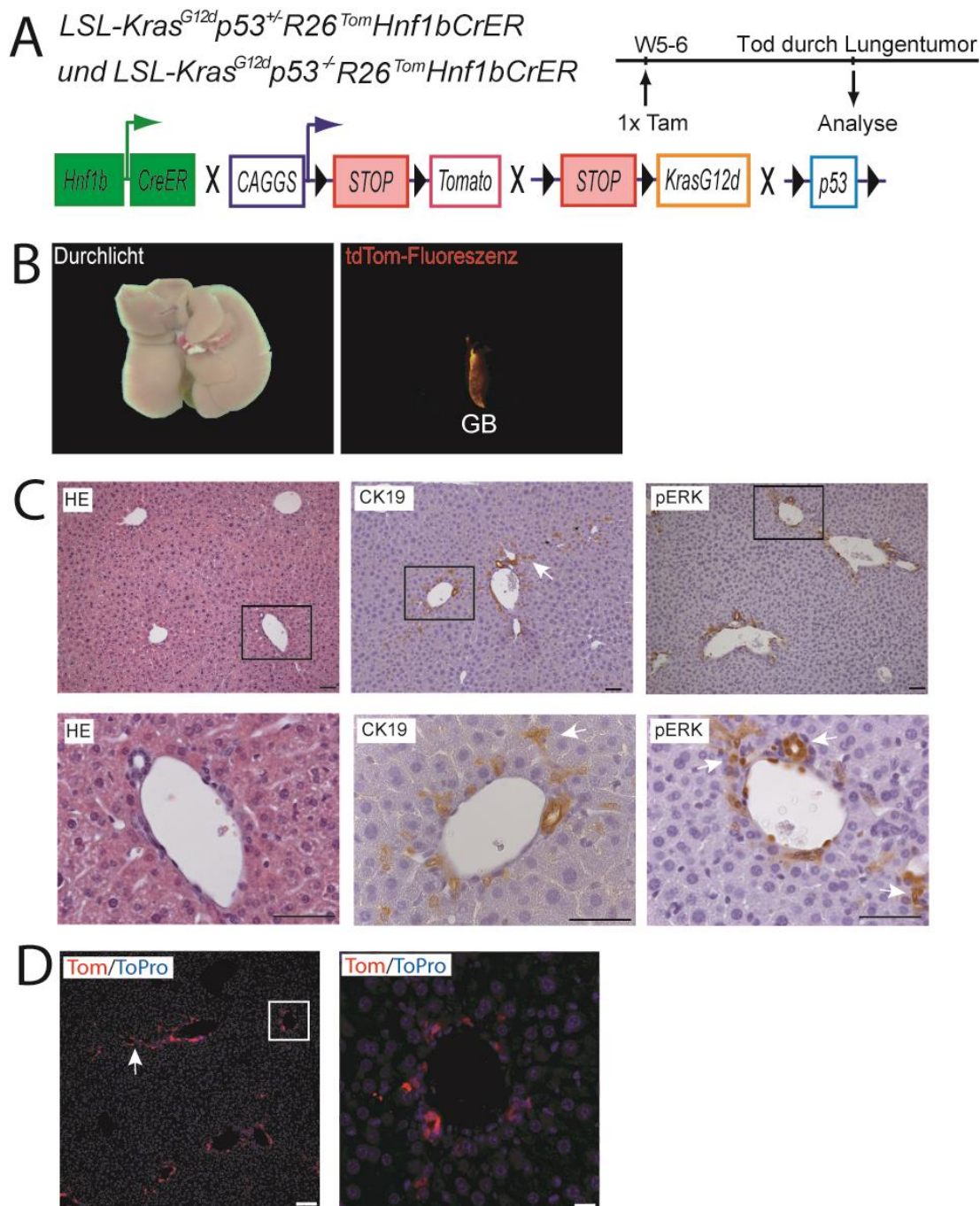


Abbildung 13: Hetero- und homozygote HKP-Mäuse zeigen in der Leber außer einer milden dukталen Reaktion keinen pathologischen Phänotyp oder spontane Tumorentwicklung.

A) Schematische Darstellung des genetischen Mausmodells der HKP hetero- und homozygoten Mäuse. Die Induktion der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen erfolgte in Woche 5-6. Die Analyse der Mäuse fand bei bevorstehendem Exitus durch Lungentumore statt (ϕ : 182 d). **B)** Makroskopisch zeigt sich eine unveränderte Leber (links), die auch in der IF-Analyse keine Auffälligkeiten aufweist (rechts). Die tdTom+ Gallenblase und Ductus hepaticus weisen als HNF1 β + Organe auf eine erfolgreiche Rekombination hin. **C)** Repräsentative mikroskopische Darstellung einer HKP heterozygoten Maus (225 d) deren Portalfeld regelhaft zur Darstellung kommt (HE-Färbung links). Repräsentative Darstellung einer HKP homozygoten Maus (102 d), in der eine milde dukтale Reaktion angedeutet ist (Pfeile CK19-IHC Färbung). Die Rekombination ist dennoch regelhaft erfolgt, da sich fast alle biliären Zellen in der pERK-IHC-Färbung pERK+ färben (Pfeile; HKP heterozygote Maus, 209 d, rechtes Bild; jeweils 10x Vergrößerung obere Reihe, 40x Vergrößerung untere Reihe). **D)** In einer repräsentativen IF-Analyse (tdTom/ToPro) einer HKP homozygoten Maus (102 d) zeigt sich trotz erfolgreicher Rekombination ein normales tdTom+ Verteilungsmuster der biliären Strukturen analog zu einer $R26^{Tom}Hnf1bCreER$ -Maus ohne Kras Aktivierung und p53-Inaktivierung. Eine milde DR ist an einigen Stellen zu beobachten (Pfeil; links: 10x Vergrößerung, rechts 60x Vergrößerung). Maßstabsbalken: C) 50 μ m, D) 100 μ m, 20 μ m

4.4 Leberspezifische Schädigungsmodelle führen zur malignen Transformation von HNF1 β + Zellen der Leber im HKP-Modell

Die HNF1 β -spezifische Aktivierung von Kras und Inaktivierung von p53 führte nicht zur malignen Transformation des hepatischen HNF1 β + Kompartiments in einem Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 182 d und maximal 279 d, sondern zeigte abgesehen von einer milden dukталen Reaktion keinen pathologischen Phänotyp in der Leber. Um das LPC-Kompartiment in der Leber gezielt zu aktivieren und damit einem proliferativen Stimulus auszusetzen, kombinierten wir das HKP-Modell mit chronischen Schädigungsmodellen (Desmet, 2011). Durch die chronische Inflammationsreaktion entsteht eine duktale Reaktion in deren Rahmen das HNF1 β + Kompartiment expandiert und proliferiert wie in unseren Vorversuchen gezeigt. Zusätzlich erfolgte HNF1 β -spezifisch die Aktivierung des Onkogens Kras und die Deletion des Tumorsuppressorgens p53 nach Tamoxifeninjektion (Desmet, 2011; Jors et al., 2015). Unter der Arbeitshypothese, dass diese zusätzliche Aktivierung mit einem proliferativen Stimulus den Druck zur malignen Transformation auf die HNF1 β + Zellen noch weiter erhöht, wurden HKP homozygote Mäuse analog zu den Vorversuchen zur chronischen Schädigung und Regeneration für jeweils 120-150 d Tage unter DDC- oder CDE Diät gehalten und anschließend analysiert. Die Induktion mit Tamoxifen erfolgte im Alter von 5-6 Wochen und der Beginn der Diäten erfolgte jeweils 4-7 d danach.

4.4.1 HKP-Mäuse entwickeln HCC-ähnliche Tumoren aus HNF1 β + Zellen unter CDE-Diät

Die CDE-Diät stellt ein etabliertes Modell zur chronischen Leberschädigung dar und schädigt dabei vor allem die Hepatozyten (Akhurst et al., 2001). Die Kombination der CDE-Diät mit dem HKP-Modell führt durch die Aktivierung des putativen Progenitorzellkompartiments in Form der dukталen Reaktion möglicherweise zur Tumorentwicklung aus HNF1 β + Zellen, auch wenn dies in HKP-Mäusen unter normaler Diät nicht der Fall war. Bei der Analyse der männlichen HKP homozygoten Mäuse nach 120 d unter CDE-Diät zeigten sich makroskopisch tumorverdächtige Knoten (Durchschnitt: $86,5 \pm 13,9$ Knoten, meist <1 mm, $n = 5$) (Abbildung 14 A). Diese Knoten waren in makroskopischen Fluoreszenzaufnahmen tdTom+ (Abbildung 14 A). In der mikroskopischen Analyse stellten sich in der HE-Färbung multiple tumorverdächtige Knoten aus Hepatozyten dar, die teils verdrängend wuchsen (Abbildung 14 B links oben). Diese Knoten zeigten in seriellen Färbungen eine vermehrte Proliferation in der Ki67-IHC-Färbung und exprimierten klassische HCC-Marker wie GP 73 und AFP (Abbildung 14 B). Die Kollagenstruktur erschien in der Col IV-Färbung ebenfalls verändert mit verbreiterten Leberzellbälkchen (Abbildung 14 B links unten). In der IHC-Färbung mit CK19 war, wie für die CDE-Diät üblich, eine ausgeprägte duktale Reaktion zu beobachten. Die tumorverdächtigen Knoten waren aber ausnahmslos CK19 negativ (Daten

nicht gezeigt). Wie bereits bei HKP-Mäusen unter normaler Diät demonstriert, waren die biliären Zellen bzw. die DRCs und auch die tumorverdächtigen Knoten in der pERK-IHC-Färbung pERK+ (Abbildung 14 B rechts oben). Das pERK+ Signal stellt ein Surrogat für die Aktivierung von Kras dar und weist somit auf die erfolgreiche Cre-vermittelte Rekombination hin, wie bereits oben beschrieben (vgl. S. 43). Allerdings waren auch zahlreiche weitere Foci pERK+. Diese oft periportal gelegenen pERK+ Foci präsentierten sich im Sinne einer klonalen Proliferation von Hepatozyten. Sie waren teils unauffällig in der normalen HE-Färbung, aber wiesen teils auch dysplastische Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigten sich in HKP-Mäusen unter CDE-Diät Tumoren, die HCC-typische Veränderungen aufwiesen. In Co-IF-Analysen mit tdTom und Col IV wiesen die DR und fast alle tumorverdächtigen Läsionen ein tdTom+ Signal auf. HNF1 β + Zellen und damit das putative adulte LPC-Kompartiment waren folglich die Ursprungszellen dieser Läsionen (Abbildung 14 C). In separaten Co-IF-Analysen von tdTom dem biliären Marker Sox9 bzw. dem hepatozytären Marker HNF4 α wurden die tdTom+ Tumorzellen auf ihre Differenzierung hin untersucht. Dabei zeigten sie eindeutig eine hepatozytäre Differenzierung und den Verlust der Expression von Sox9 (Abbildung 14 D). Aufgrund der eingeschränkten Lebenserwartung der HKP-Mäuse durch die Entwicklung von Lungentumoren konnten leider keine längeren Versuche durchgeführt werden, bei denen sicherlich weiter fortgeschrittene Tumorstadien untersucht werden hätten können.

Unsere Daten legen also nahe, dass das duktales Kompartiment in der Tat unter bestimmten Bedingungen als Ursprungszelle des HCCs fungieren kann. Unter CDE-Diät, Kras-Aktivierung und p53-Deletion scheint es über eine Transdifferenzierung von LPCs zu Hepatozyten sowie deren malignen Entartung zu kommen. Wie eingangs erläutert, ist das Ausmaß der Neogenese von Hepatozyten aus HNF1 β + Zellen unter CDE-Diät sehr umstritten (Espanol-Suner et al., 2012; Jors et al., 2015; Schaub et al., 2014; Yanger et al., 2014). Wir beobachteten in unserem *R26^{Tom}Hnf1bCreER Lineage Tracing* System nach 4 Monaten unter CDE-Diät 1,5 % tdTom+ Hepatozyten, die aus HNF1 β + Zellen entstanden sind (Jors et al., 2015). Interessanterweise scheint es so zu sein, dass bei einer höheren Rekombinationsrate der biliären Zellen auch mehr Hepatozyten ektop markiert werden und ein höherer Anteil der Neogenese von Hepatozyten mit Ursprung aus dem putativen LPC-Kompartiment beobachtet wird. Ob dies aber tatsächlich der Fall ist oder ob sich lediglich die ektop markierten Hepatozyten selbst erneuern und proliferieren, lässt sich bis dato nicht abschließend klären (Malcolm R. Alison & Lin, 2016). Die Ursprungszellen der beobachteten HCC-ähnlichen Tumoren in HKP Mäusen unter 4 Monaten CDE-Diät könnten also tatsächlich HNF1 β + LPCs sein oder ektop markierte Hepatozyten. Zur Verdeutlichung folgt eine beispielhafte Rechnung.

In der $R26^{Tom}Hnf1bCreER$ -Maus war die ektope Markierung von Hepatozyten zwar ein extrem seltenes Ereignis, aber trotzdem waren 7 d post Tamoxifen i.p. 0,012 % aller Hepatozyten tdTom+ (Jors et al., 2015). Bei insgesamt etwa 70.000.000 Hepatozyten in der Mausleber ergibt sich so statistisch ein Wert von 8400 tdTom+ markierten Hepatozyten pro Maus. Diese 8400 tdTom+ Hepatozyten exprimieren nach erfolgter Rekombination *Kras* und kein *p53* und könnten somit potenziell maligne entarten. Bei HKP-Mäusen ohne CDE-Diät beobachteten wir zum Zeitpunkt der Analyse 0,5 tdTom+ Hepatozyten pro Portalfeld (n = 8; 690 Portalfelder; Daten nicht gezeigt). Diese kommen als potenzielle Ursprungszellen der beobachteten HCC-ähnlichen Tumoren bei HKP-Mäusen unter CDE-Diät in Frage. Letztendlich erlaubt unser Versuchsaufbau deshalb also formell nicht den eindeutigen Schluss, dass das putative adulte LPC-Kompartiment Ursprungszelle des HCC sein kann.

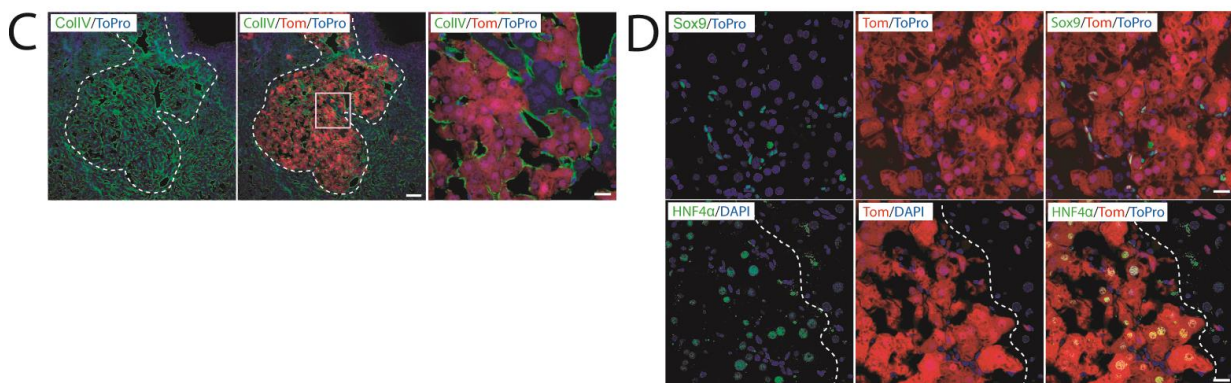
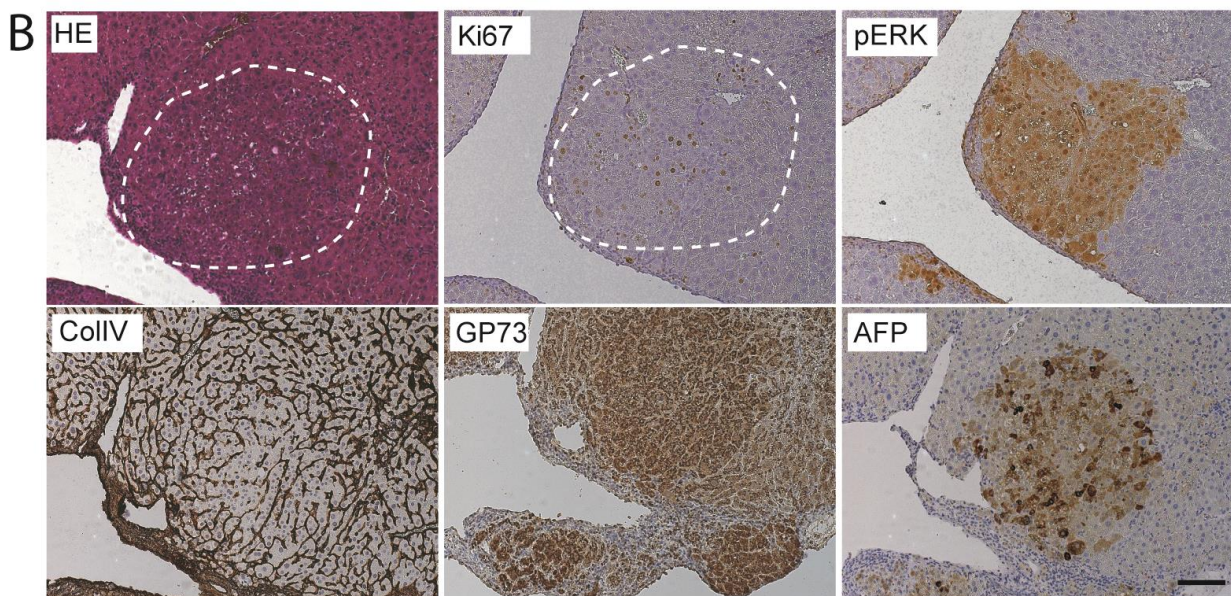
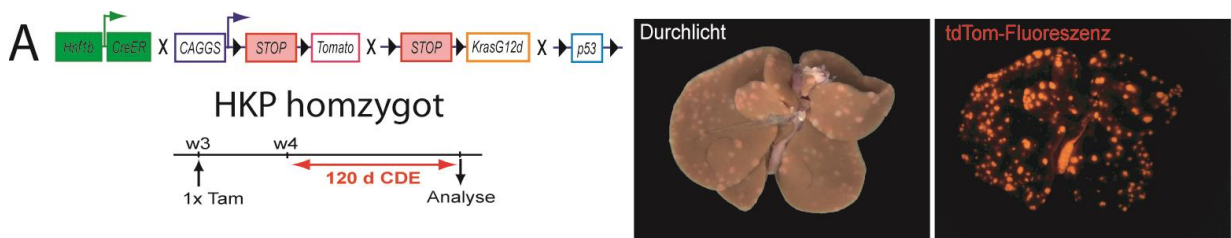


Abbildung 14: HKP homozygote Mäuse unter CDE-Diät entwickeln HCC-ähnliche Tumoren aus HNF1 β + Zellen.

A) Schematische Darstellung des genetischen Mausmodells der HKP homozygoten Mäuse. Die Induktion mit Tamoxifen erfolgte nach 3 Wochen und die Analyse nach 120 d unter CDE-Diät. Makroskopisch zeigt sich eine deutliche Entwicklung tumorverdächtiger Knoten (links), die in der Fluoreszenz-Aufnahme tdTom+ sind (rechts). **B)** Mikroskopisch zeigen sich diese Knoten in seriellen Schnitten als Ansammlung von Hepatozyten mit gestörter Leberarchitektur in HE und Col IV-IHC-Färbung (links, gestrichelte Linie), erhöhter Proliferation in der Ki67-IHC-Färbung (oben Mitte) und exprimieren HCC-typische Marker wie GP 73 und AFP (unten Mitte und links). Die erfolgte Rekombination und die Abstammung aus HNF1 β + Zellen zeigt sich als Surrogat an der deutlichen pERK-Positivität der Knoten. **C)** In der IF-Co-Analyse (tdTom/Coll IV/DAPI) bestätigt sich die erfolgte Rekombination und die Abstammung der Knoten mit gestörter Leberarchitektur aus HNF1 β + Zellen, da die Knoten deutlich tdTom+ sind. **D)** Die zelluläre Differenzierung der tdTom+ Zellen in den Knoten ist eindeutig hepatozytär und nicht biliär (obere Reihe: Co-IF-Färbung SOX9/tdTom/ToPro in der Mitte eines Knotens, untere Reihe Co-IF-Färbung HNF4 α /tdTom/DAPI an der Grenzfläche eines Knotens mit Tumor links der gestrichelten Linie). Es zeigt sich, dass die tdTom+ Tumorzellen aus Hepatozyten und nicht aus biliären Zellen bestehen und somit HCC-ähnlich sind. Maßstabsbalken: B) 100 μ m, C) 100 μ m, Ausschnitt 20 μ m, D) 20 μ m

4.4.2 HKP-Mäuse unter DDC-Diät entwickeln Cholangiokarzinome aus HNF1 β + Zellen

Die DDC-Diät stellt ein etabliertes Modell der chronischen Leberschädigung dar und schädigt dabei vor allem die biliären Zellen (Fickert et al., 2007). Die Kombination der DDC-Diät mit dem HKP-Modell führt durch die Aktivierung des putativen Progenitorzellkompartiments in Form der dukталen Reaktion möglicherweise zur Tumorentwicklung, auch wenn dies in HKP-Mäusen unter normaler Diät nicht der Fall war. Für die DDC-Diät wurden HKP homozygote (n = 12) und HKP heterozygote Mäuse (n = 7) mit Tamoxifen induziert (4. Woche) und eine Woche später für 117 bis 180 d mit DDC gefüttert. In der Sektion zeigten sich makroskopisch bei allen analysierten Mäusen deutliche DDC-typische Veränderungen an der Leber wie dunkle Färbung, Marmorierung und derbe Konsistenz. Zusätzlich waren makroskopisch bei 6 von 19 Mäusen tumorverdächtige Knoten zu sehen. Dies waren in 5 Fällen 1-2 Knoten im Umfang von 1-2 mm, eine Maus wies 12 Knoten auf. In der makroskopischen Fluoreszenzanalyse waren die Knoten stets makroskopisch tdTom+ (Abbildung 15 A). In der histologischen Co-IF-Analyse mit tdTom/CK19/DAPI zeigten alle untersuchten Lebern das Bild einer ausgeprägten tdTom+/CK19+ dukталen Reaktion, wie für DDC-Langzeit-Versuche üblich (Abbildung 15 B linke Spalte). Außerdem zeigten sich tdTom+/CK19+ Neoplasien im Sinne eines ICCs an den kleineren intrahepatischen Gallengängen der Portalfelder (Abbildung 15 B mittlere Spalte). An den größeren Gallengängen kam es ebenfalls zu tdTom+/CK19+ Veränderungen im Sinne von biliären intraepithelialen Neoplasien (BillIN) bis hin zum CC (Abbildung 15 B rechte Spalte). Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen HKP hetero- und homozygoten Mäusen. Die tdTom Positivität der beobachteten Veränderungen beweist den Ursprung der Veränderungen aus HNF1 β + Zellen und damit dem putativen LPC-Kompartiment (Abbildung 15).

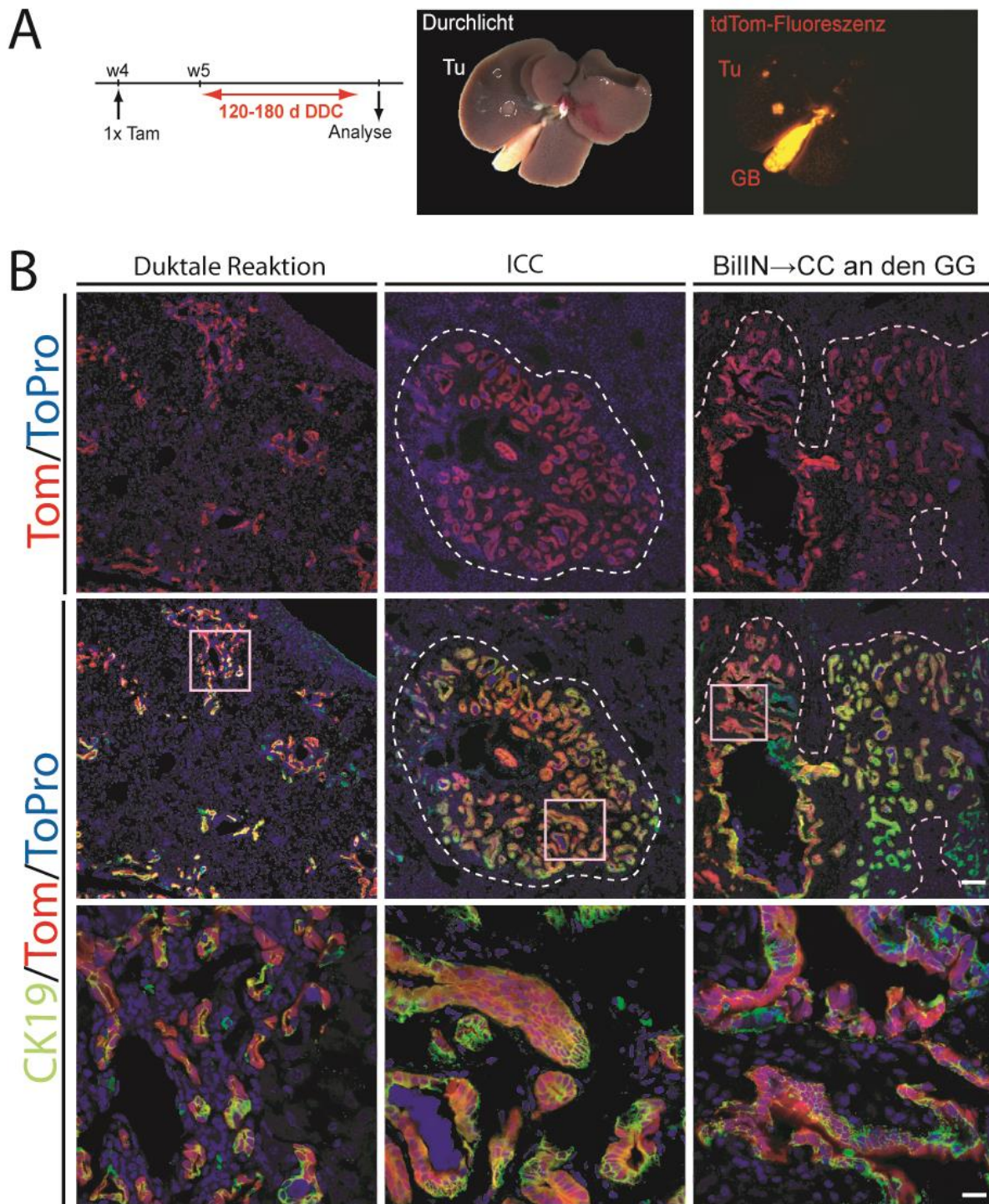


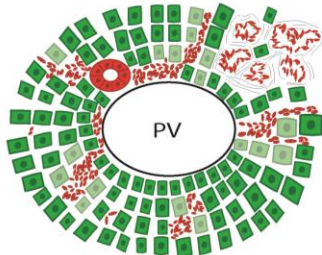
Abbildung 15: In HKP hetero- und homozygoten Mäuse unter DDC-Diät entstehen Cholangiokarzinome aus HNF1 β + Zellen (1).

A) HKP hetero- und homozygote Mäuse wurden nach 4 Wochen mit Tamoxifen induziert und nach 120 - 180 d unter DDC-Diät analysiert. Makroskopisch zeigen sich tumorverdächtige Knoten (links), die ein tdTom+ Fluoreszenzsignal besitzen (rechts). **B)** Mikroskopisch zeigt sich in der der Co-IF-Analyse mit tdTom/CK19/DAPI in allen untersuchten Lebern das Bild einer ausgeprägten tdTom+/CK19+ DR, wie für DDC-Langzeit-Versuche üblich (linke Spalte). Außerdem zeigen sich tdTom+/CK19+ Neoplasien im Sinne eines ICCs an den kleineren intrahepatischen Gallengängen der Portalfelder (mittlere Spalte). An größeren Gallengängen kommt es ebenfalls zu tdTom+/CK19+ Veränderungen im Sinne von biliären intraepithelialen Neoplasien (BillN) mit Übergang zum Cholangiokarzinom (Abbildung 15 B rechte Spalte). Typische Merkmale wie Kernatypien, zerstörte Drüsenarchitektur und Stromabildung zeigen sich in der 60x Vergrößerung in der unteren Spalte. Maßstabsbalken: Obere und mittlere Reihe 100 μ m, untere Reihe 20 μ m.

An den kleinen Gallengängen der Portalfelder bestanden die Veränderungen aus cribriformer Drüsenbildung mit Stromabildung (Abbildung 16 A). Da die Vorläuferläsionen des ICC nicht endgültig geklärt sind und für deren Klassifizierung zu diesem Zeitpunkt kein adäquates System etabliert ist, wurde die Beurteilung dieser Veränderungen lediglich nach den Kriterien Vorläuferläsion und ICC vorgenommen (Nakanuma et al., 2014). Vergleichbare Vorläuferläsionen wurden in anderen Studien zum Beispiel als biliäre Hamartome oder Von-Meyenberg-Komplexe bezeichnet (O'Dell et al., 2012). In unserer Studie zeigten sich ICC-Vorläuferläsionen in den meisten untersuchten Mäusen (15/19) und in fast der Hälfte der Mäuse (7/19) zeigten sich Läsionen, die mit einem ICC ausgehend von den kleinen Gallengängen vereinbar waren. Histologisch zeigten die Kerne in der HE-Färbung deutliche dysplastische Veränderungen. Die Tumorknoten besaßen teilweise fließende Übergänge ohne klare Abgrenzung zum umliegenden Parenchym im Sinne invasiven Wachstums (Abbildung 16 A links). In der CK19-Färbung zeigte sich die für CC typische CK19 negative Stromaentwicklung (Abbildung 16 A links, 3. von oben). In der Co-IF-Analyse mit tdTom/CK19/DAPI war ebenfalls zu sehen, dass das Stroma tdTom negativ und CK19 negativ war (Abbildung 15 B). Die Proliferationsrate in der Ki67-Färbung war karzinomtypisch signifikant erhöht in den biliären Zellen (Abbildung 16 A links unten). Die erfolgreiche Rekombination mit Kras-Aktivierung zeigte sich als Surrogat in der deutlichen pERK-Positivität der beobachteten Veränderungen (Abbildung 16 A rechts).

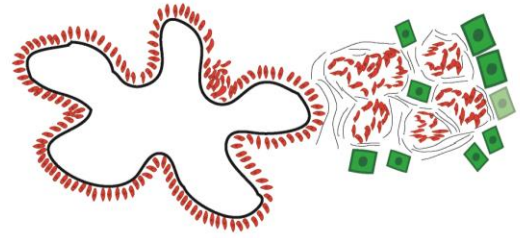
Die Veränderungen an den großen Gallengängen wurden anhand der Kriterien des Konsensuspapiers zu Vorläuferläsionen des perihilären und distalen CC als biliäre intraepitheliale Neoplasien (BillIN) beurteilt (Zen et al., 2007). In 18 von 19 analysierten Mäusen detektierten wir BillINs mit Übergang zum CC, wobei die BillIN negative Maus keine großen Gallengänge im untersuchten Präparat aufwies. Ein wichtiger Aspekt der BillIN Einteilung ist der Verlust der Polarität der Zellen, also das Aufsteigen der Kerne zum Lumen hin. Andere Aspekte sind die sogenannte Pseudostratifizierung und die Größe, Kern-Zytoplasmarelation und Form der Kerne (Abbildung 16 B links, Mitte). Die Proliferationsrate war in der Ki67-IHC-Färbung ebenfalls merklich erhöht (Abbildung 16 B links unten). Analog zu den Veränderungen der kleinen Gallengänge waren die beobachteten Veränderungen an den großen Gallengängen deutlich pERK+, was als Surrogat die erfolgreiche Rekombination mit Kras-Aktivierung und den Ursprung aus HNF1 β + Zellen nachweist (Abbildung 16 B rechts). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass im HKP-Modell mit zusätzlichem Proliferationsstimulus durch DDC-Diät HNF1 β + Zellen und damit das putative adulte LPC-Kompartiment Ursprungszellen des CC sein können. Bemerkenswert ist, dass es in HKP-Mäusen unter CDE-Diät ebenfalls zur Entwicklung von Tumoren bzw. Vorläuferläsionen aus HNF1 β + Zellen kommt, diese sich jedoch phänotypisch grundlegend unterscheiden (hepatozytärer vs. biliärer Phänotyp).

A



ICC ausgehend von den kleinen Gallengängen

B



BillN und Cholangiokarzinom ausgehend von den großen Gallengängen

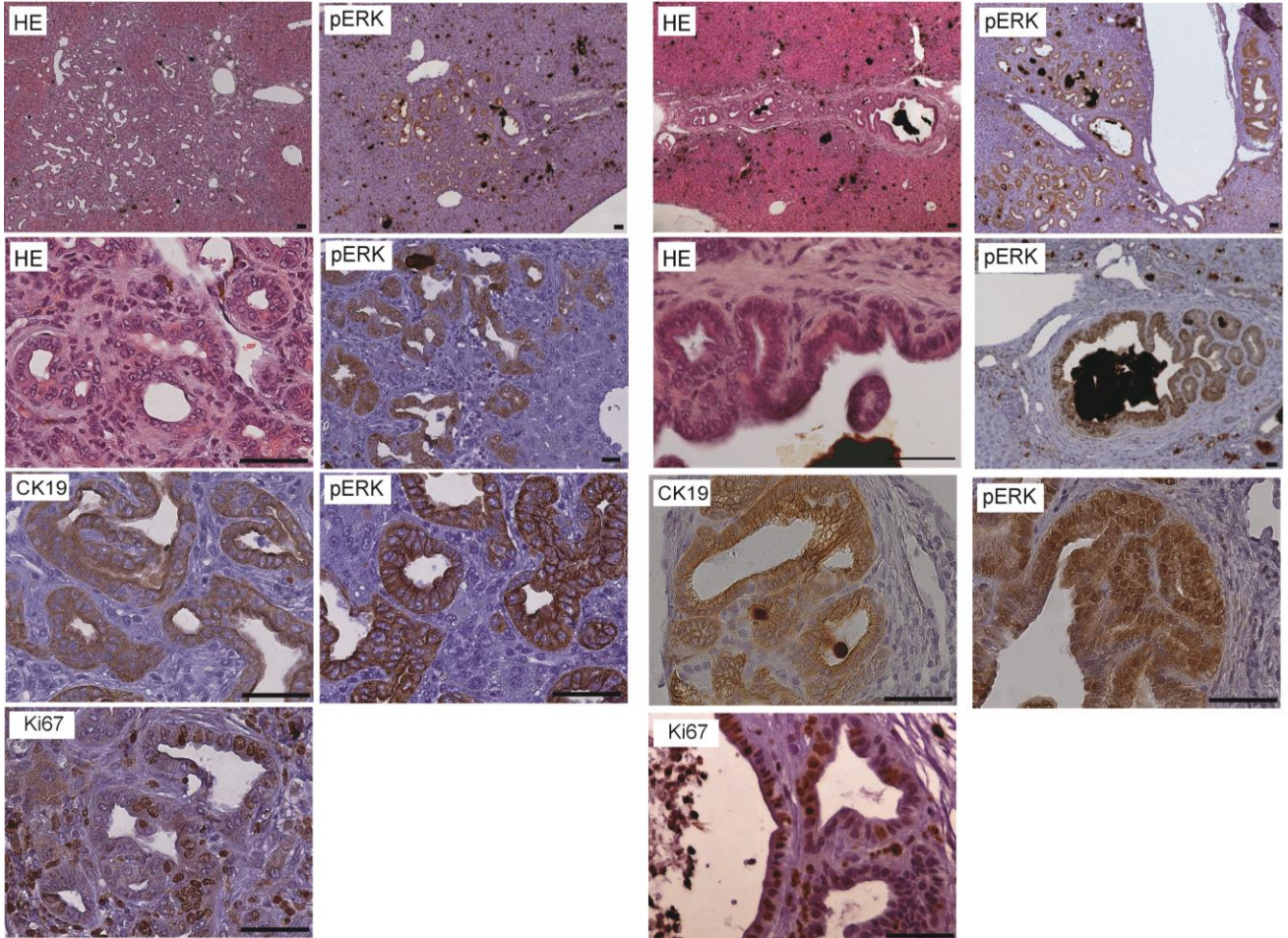


Abbildung 16: In HKP hetero- und homozygoten Mäusen unter DDC-Diät entstehen Cholangiokarzinome aus HNF1 β + Zellen (2).

A) HKP hetero- und homozygote Mäuse entwickeln nach 120 bis 180 d unter DDC-Diät intraparenchymale Veränderungen im Sinne eines ICC an den kleinen Gallengängen. ICC-Merkmale wie Kernatypien werden in der HE-Färbung deutlich (links oben), CK19 negative Stromabildung (links, 3. von oben) und deutlich erhöhte Proliferation in der Ki67-Färbung werden in den IHC-Färbungen sichtbar. Der Ursprung aus dem HNF1 β -Kompartiment zeigt sich als Surrogat durch die deutlich positive pERK-Färbung der Veränderungen (rechts). Das ICC scheint aus hamartomartigen Veränderungen zu entstehen. **B)** HKP hetero- und homozygote Mäuse entwickeln nach 120 bis 180 d unter DDC-Diät Veränderungen an den großen Gallengängen im Sinne von BillNs mit Übergang zum Cholangiokarzinom. Typische Merkmale sind der Verlust der Polarität der Zellen, Verlust der Drüsenarchitektur und Kernatypien (HE, links, 2. von oben). Außerdem zeigt sich sogenanntes Tafting (enge pinselförmige Anordnung der Kerne) (CK19, links, 3. von oben). Die Proliferation der Zellen ist deutlich erhöht (Ki67, links unten). Der Ursprung aus dem HNF1 β -Kompartiment zeigt sich durch die deutlich positive pERK-Färbung der Veränderungen (rechts) Maßstabsbalken: 50 μ m

5 Diskussion

Die Identität der Ursprungszellen des HCC und CC ist nicht zufriedenstellend geklärt bzw. wird hochkontrovers diskutiert. HCC und CC stellen dabei häufig eine Art gemeinsame Endstrecke verschiedener Formen chronischer Leberschädigung dar (Forner et al., 2012). In nahezu allen Formen chronischer Leberschädigung tritt die sogenannte duktale Reaktion auf, die eine Expansion duktaler Zellen darstellt und lange als Notfallkonzept zur Neogenese von Cholangiozyten und Hepatozyten im Falle chronischer Schädigung gesehen wurde (G. K. Michalopoulos, 2014a). Innerhalb des biliären Kompartiments wird eine Subpopulation von Zellen vermutet, denen ein besonders hohes proliferatives und regeneratives Potential zugeschrieben wird und die deshalb als LPCs bezeichnet werden. Die spezifische, isolierte Identifikation von LPCs mittels histologischer Marker ist nicht möglich, da diese meist ebenso vom gesamten biliären Kompartiment exprimiert werden. Dabei ist auffallend, dass viele postulierte histologische Marker für LPCs, auch von Tumorzellen des HCC oder CC exprimiert werden. Zudem weisen insbesondere Tumoren mit ungünstiger Prognose LPC-ähnliche Gensignaturen auf (Lee et al., 2006; Rountree et al., 2012). LPCs wurden unter anderem deshalb als Ursprungszellen des HCC und CC postuliert (Lee et al., 2006; Miyajima et al., 2014; T. Roskams, 2006; Yamashita & Wang, 2013). Für den Subtyp des Cholangiolozellulären Karzinoms wurde der Ursprung aus LPCs sogar explizit postuliert (Cardinale et al., 2012; Komuta et al., 2012). Auch die umstrittene putative Plastizität in der Regeneration nach chronischer Leberschädigung unterstützte die Hypothese der LPCs als Ursprungszellen des HCC und CC, da es in Form der DR zu einer massiven Expansion biliärer Zellen und damit putativen LPCs kommt.

Zur Beantwortung dieser Frage werden Studien benötigt, die über eine reine histologische Deskription hinausgehen und eine gezielte Verfolgung der LPCs *in vivo* erlauben. Dies wird durch das *Lineage Tracing* möglich, bei dem ein Zellkompartiment zu einem beliebig wählbaren Zeitpunkt spezifisch und dauerhaft markiert wird und so eine genaue Analyse der daraus hervorgehenden Tochterzellen oder möglichen Tumoren erlaubt. Unsere Vorarbeiten zum *Lineage Tracing* des HNF1 β + Kompartiments in der Leberregeneration im Langzeitversuch mit DDC-Diät, CDE-Diät und *Mdr2*^{-/-}-Mäusen, in denen sich kein (DDC, *Mdr2*^{-/-}) oder nur ein sehr geringer (CDE) Anteil an neu entstandenen Hepatozyten biliären Ursprungs fanden, weckten Zweifel an der *in vivo* Plastizität des HNF1 β + Kompartiments (Jors et al., 2015). Zuvor war von mehreren Studien *in vitro* gezeigt worden, dass DRCs bipotent sind (Huch et al., 2013; Sackett et al., 2009). Neuere Publikationen zu *in vivo* Mausstudien mit *Lineage-Tracing*-Ansätzen kamen allerdings wie unsere Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass die duktale Reaktion in der Maus *in vivo* einen eher unbedeutenden Anteil zur Hepatozytenrepopulation beiträgt und sich die Hepatozyten zum größten Teil aus

reifen Hepatozyten regenerieren (Schaub et al., 2014; Tarlow et al., 2014; Yanger et al., 2014). Ob Zellen der duktaalen Reaktion tatsächlich unter extremen Bedingungen wie z.B. einem vollständigen Proliferationsblock der Hepatozyten nicht doch in signifikanter Zahl zu Hepatozyten differenzieren können, wird aber weiterhin kontrovers diskutiert (Choi et al., 2014; Forbes & Newsome, 2016; George K. Michalopoulos & Khan, 2015; Raven et al., 2017). Eines der klassischen Kennzeichen des Krebses („*hallmarks of cancer*“) ist die unkontrollierte Proliferation, insofern erscheint es naheliegend, dass eine Zelle mit mehr Potential zur Regeneration durch Proliferation schneller entarten kann, als eine Zelle mit geringem Potential zur Regeneration (Hanahan & Weinberg, 2011). Zudem ist das Krebsrisiko stochastisch an die Anzahl der Zellteilungen einer Stammzelle gebunden (M. R. Alison, 2005; Tomasetti & Vogelstein, 2015). Das noch unbekannte Stammzellkompartiment der Leber ist somit theoretisch auf Grund der vielen Zellteilungen in der Regeneration besonders vulnerabel gegenüber der malignen Transformation. Deshalb sind die Themen Regeneration und Karzinogenese näher miteinander verbunden, als es auf den ersten Blick scheinen mag (Kuraishy, Karin, & Grivennikov, 2011).

Um das putative adulte LPC-Kompartiment hinsichtlich seines Potentials zur malignen Entartung zu charakterisieren, benutzten wir ein *Lineage Tracing* System des HNF1 β + Kompartiments im Mausmodell. Das HNF1 β + Kompartiment besteht in der Leber aus den Cholangiozyten des biliären Systems, inklusive der mutmaßlich in den CoH lokalisierten Leberprogenitorzellen. Die LPCs weisen vermeintlich ebenfalls eine biliäre Differenzierung auf und sind zumindest phänotypisch nicht von Cholangiozyten zu unterscheiden (Jors et al., 2015; Rodrigo-Torres et al., 2014; Theise et al., 1999). *Lineage Tracing* ermöglicht die spezifische, Cre-Rekombinase vermittelte Markierung des HNF1 β + Kompartiments zu einem beliebigen Zeitpunkt durch Tamoxifeninjektion. Die Markierung besteht aus dem roten Fluoreszenzprotein tdTom, das an alle Zellen weitergegeben wird, die aus dem markierten HNF1 β + Kompartiment durch Zellteilung entstehen. Sollten also HNF1 β + Zellen Ursprungszellen eines Tumors darstellen, wäre dieser Tumor ebenfalls mit dem tdTom Protein markiert. Um zu sehen, ob HNF1 β + Zellen Ursprungszellen des HCC sein können, kombinierten wir deshalb das *R26^{Tom}Hnf1bCreER Lineage Tracing* System mit zwei klassischen HCC Mausmodellen (chemisches DEN-Modell und genetisches *Mdr2^{-/-}*-Modell).

Aufgrund von Beobachtungen im DEN-Modell postulierte Sell 1989, dass das HCC aus einer Stammzelle der Leber entstehen könne (Goldfarb, Pugh, Koen, & He, 1983; Sell & Dunsford, 1989). Diese Frage konnte mangels wissenschaftlicher Methoden zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden und so herrschte auch über 20 Jahre später immer noch Ungewissheit und LPCs wurden als Ursprungszellen des HCC postuliert (T. Roskams, Katoonizadeh, &

Komuta, 2010; Sell & Leffert, 2008). Im DEN-Modell treten 8-12 Monate nach einmaliger i.p. Injektion des Karzinogens DEN HCCs auf und es reflektiert die humane Situation eines HCC mit ungünstiger Prognose gut (Aleksic et al., 2011; Guichard et al., 2012). Dies ist von Bedeutung, da humane HCCs mit ungünstiger Prognose oftmals Tumorzellen mit Expression von LPC-Oberflächenmarkern und LPC-ähnlichen Gensignaturen aufweisen, weshalb LPCs als potentielle Ursprungszellen von Tumoren mit ungünstiger Prognose gesehen werden (Lee et al., 2004; Lee et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten im DEN-Modell allerdings keine Abstammung der aufgetretenen HCC-Knoten oder prämaligen Läsionen aus dem HNF1 β + und damit dem putativen adulten LPC-Kompartiment. Trotz der sehr guten Markierungseffizienz des duktales Zellkompartiments von 93% durch das *R26^{Tom}Hnf1bCreER Lineage Tracing System* mit dem Fluoreszenzmarker tdTom waren die beobachteten DEN-induzierten Tumoren ausnahmslos tdTom negativ. Diese Daten sprechen eindeutig gegen LPCs als Ursprungszellen DEN-induzierter HCCs.

Als alternatives HCC-Modell wurde neben dem DEN-Modell das *Mdr2*-Knockout Modell mit dem *R26^{Tom}Hnf1bCreER Lineage Tracing System* kombiniert. Im *Mdr2*^{-/-}-Modell führt der konstitutive Knockout eines P-Glykoproteins, dessen Aufgabe die hepatozytäre Sekretion Phosphatidylcholins in die Gallenflüssigkeit ist, zur chronischen Cholestase und im Verlauf von 12 Monaten über inflammatorische Prozesse zur HCC-Entwicklung (Pikarsky et al., 2004; Pusterla et al., 2013). Dabei kommt es im *Mdr2*^{-/-}-Modell zu einer massiven duktales Reaktion und damit Aktivierung und periportalen Expansion des HNF1 β + LPC-Kompartiments (Jors et al., 2015). Diese Beobachtung scheint bedeutend, da eine Reduktion der duktales Reaktion im *Mdr2*^{-/-}-Modell durch einen Knockout des Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) eine verminderte HCC-Entwicklung zur Folge hatte (Pusterla et al., 2013). Vergleichbare Ergebnisse ergab ein Knockout des Chemokin Rezeptors 5 (CCR5) bei dem ebenfalls eine verminderte HCC-Entwicklung und eine reduzierte duktales Reaktion zu sehen waren (Barashi et al., 2013). Allerdings konnten beide Studien keinen kausalen Zusammenhang zwischen diesen beiden Beobachtungen aufzeigen. In unseren *Mdr2*^{-/-}*R26^{Tom}Hnf1bCreER* Mäusen zeigte sich zum Analysezeitpunkt eine massive tdTom+ duktales Reaktion, die somit aus dem duktales HNF1 β + Kompartiment entstanden ist. Trotz der zuverlässigen Markierung der duktales Reaktion mit tdTom, waren ausnahmslos alle beobachteten *Mdr2*^{-/-}-induzierten HCCs tdTom negativ. Das HNF1 β + Kompartiment beinhaltet somit weder im *Mdr2*^{-/-}-Modell, noch im DEN-Modell die Ursprungszelle des HCCs. Diese Daten lassen darauf schließen, dass wahrscheinlich Hepatozyten die Ursprungszellen DEN- und *Mdr2*^{-/-}-induzierter HCCs sind.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vielen anderen, neueren Studien. So zeigte die Untersuchung der Expression der biliären Marker CK7 und CK19 in DEN-behandelten Mäusen, dass diese Marker in keinem der hyperplastischen Knoten, sondern ausschließlich in entarteten HCC-Knoten exprimiert wurden („nodule in nodule“), was für eine Transdifferenzierung reifer Hepatozyten spricht und gegen LPCs als Ursprungszellen des HCCs im DEN-Modell (Santos et al., 2014). Einschränkend muss gesagt werden, dass in dieser Studie sehr wenige HCCs auftraten und die Autoren keinen formalen *Lineage Tracing* Ansatz anwendeten.

Allerdings gibt es mittlerweile auch *Lineage Tracing* Studien, die unsere Ergebnisse aus dem DEN- und *Mdr2*^{-/-}-Modell ebenfalls bestätigen. Mu et al. markierten das LPC-Kompartiment mit einer induzierbaren Cre-Rekombinase unter dem Osteopontin- oder Krt19-Promotor und konnten in DEN behandelten und *Mdr2*^{-/-}-Mäusen keine HCCs mit Ursprung aus dem LPC-Kompartiment beobachten. Auch eine Aktivierung des mutmaßlichen LPC-Kompartiments DEN-behandelter Mäuse durch zusätzliche DDC-Diät bzw. CDE-Diät führte nicht zu HCCs mit LPC-Ursprung. Die Markierung von Hepatozyten durch einen spezifischen Adenovirus konnte Hepatozyten als Ursprungszelle DEN- und *Mdr2*^{-/-}-induzierter HCCs nachweisen (Mu et al., 2015). Shin et al. zeigten in einer weiteren *Lineage Tracing* Studie, dass im DEN-Modell mit zusätzlichen CCl₄-Injektionen und in einem DEN-Modell mit zusätzlicher Aktivierung des Onkogens Myc-FoxM1 HCCs ausschließlich aus den mit einem spezifischen Adenovirussystem markierten Hepatozyten entstanden (Shin et al., 2016). Das mit einer induzierbaren Cre-Rekombinase unter dem forkhead box protein L1 (Foxl1)-Promotor markierte LPC-Kompartiment war in den gleichen Modellen nie das Ursprungskompartiment eines HCCs. Beide Studien konnten zeigen, dass LPC-Marker-exprimierende Zellen innerhalb der beobachteten HCCs, durch Transdifferenzierung von Hepatozyten entstanden sind und nicht originär aus dem LPC-Kompartiment stammen (Mu et al., 2015; Shin et al., 2016).

Eine Studie von Shibuya et al., die die Expression der biliären Marker CK7 und CK19 in chirurgisch resezierten, humanen HCCs (n=68) untersuchte, fand analog zu den Mausstudien CK7 und CK19 Expression stets in der Form eines Knotens im Gesamt HCC-Knoten („nodule in nodule“) (Shibuya, Kondo, Sano, Takada, & Asano, 2011). Vorläuferläsionen und dysplastische Foci in den resezierten Präparaten exprimierten CK7 und CK19 in keinem Fall. Dies lässt auf eine Dedifferenzierung von Hepatozyten zu jenen LPC-ähnlichen Zellen schließen, die als Leberkrebstammzellen angenommen werden (Oikawa, 2016; Rountree et al., 2012; Yamashita et al., 2013).

Da nun überwiegend Hepatozyten als Ursprungszellen des HCCs angenommen werden können (Jens U. Marquardt, 2016), stellt sich die Frage, ob eine bestimmte Subpopulation

von Hepatozyten empfindlicher gegenüber maligner Transformation ist. Einen Ansatz hierzu liefert eine Studie der Arbeitsgruppe um Michael Karin, die eine Subpopulation periportal gelegener Hybrid-Hepatozyten beschreibt, die sich durch simultane Expression hepatozytärer und biliärer Marker auszeichnet (Font-Burgada et al., 2015). Hybrid-Hepatozyten, die gemeinsam mit dem LPC-Kompartiment durch eine induzierbare Cre-Rekombinase unter einem Sox9-Promotor markiert wurden, waren in 3 verschiedenen HCC-Modellen (DEN-Modell / MUP-uPA Mäuse unter fettreicher Diät / STAM-Mäuse unter fettreicher Diät) nicht die Ursprungszellen der beobachteten HCCs. Allerdings vermuteten die Autoren nicht die onkogene Resistenz von Hybrid-Hepatozyten als Ursache dieser Beobachtung, sondern sahen dies in den drei untersuchten HCC-Modellen begründet, da periportal gelegene sogenannte Hybrid-Hepatozyten aufgrund der metabolischen Zonierung der Leber den kanzerogenen Prozessen in diesen Modellen weniger ausgesetzt sind, als die perivenös gelegenen Hepatozyten. Höchst interessant wäre also das *Lineage Tracing* in HCC-Modellen der als distinkter Subpopulation der Hepatozyten beschriebenen perivenösen Axin2+ Hepatozyten (B. Wang, Zhao, Fish, Logan, & Nusse, 2015). Letztendlich bleiben die Aussagen, die sich aus der vorliegenden Arbeit ableiten lassen, auf das DEN- und *Mdr2*^{-/-}-Modell beschränkt und in diesen Modellen bilden LPC definitiv nicht die Ursprungszellen des HCC. Es ist allerdings zum jetzigen Zeitpunkt nicht auszuschließen, dass bei einer völligen Erschöpfung der hepatozytären Regenerationsfähigkeit, wie zum Beispiel chronischen humanen Lebererkrankungen, Zellen des LPC-Kompartiments Ursprungszellen des HCC sein können (Benhamouche et al., 2010; Jens U. Marquardt, 2016).

Die zweithäufigste Leberkrebserkrankung ist das Cholangiokarzinom (CC). Dies ist aber schlicht ein beschreibender Sammelbegriff für eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, die biliäre Marker exprimieren. Die klassische Einteilung des Cholangiokarzinom in das intrahepatische (ICC), perihiläre und distale Cholangiokarzinom spiegelt die anatomische Tumorklassifikation von den CoH bis zum Ductus hepaticus communis und coledochus wider (Banales et al., 2016). Insbesondere das ICC vereint allerdings wiederum eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, die sich weiter unterteilen lässt. Vereinfacht gesagt ist der muzinöse-Gallengangs-ICC Typ eher dem perihilären CC in vieler Hinsicht ähnlich und der gemischte-Gallengangchen-ICC Typ weist Parallelen zum Cholangiolozellulären Karzinom auf (Cardinale et al., 2012; Cardinale, Carpino, Reid, Gaudio, & Alvaro, 2013; Komuta et al., 2012). Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass diese beiden ICC-Subtypen unterschiedliche Ursprungszellen besitzen. Während für den muzinösen-Gallengangs-ICC Typ reife Gallengangszellen als Ursprungszellen angenommen werden, werden für den gemischten-Gallengangchen-ICC Typ Leberprogenitorzellen oder auch transdifferenzierte Hepatozyten als Ursprungszellen vermutet (Banales et al., 2016; Wei et al., 2016). Vor

diesem Hintergrund bietet unser *R26^{Tom}HNF1bCreER Lineage Tracing System* die Möglichkeit, durch spezifische onkogene Transformation des HNF1 β + Kompartiments zu überprüfen, ob aus biliären Zellen und LPC Tumoren entstehen können und wenn ja, welchen Phänotyp sie exprimieren.

Zu diesem Zweck wurden *R26^{Tom}HNF1bCreER*-Reporter-Mäuse mit weiteren transgenen Mäusen gekreuzt, in denen nach Cre-vermittelter Rekombination der ras-Signalweg durch Kras Mutation aktiviert ist bzw. das Tumorsuppressorgen p53 hetero- bzw. homozygot deletiert ist. Die so erhaltenen HKP heterozygoten und HKP homozygoten Mäuse wurden bis zu ihrem Tod (\varnothing : 182 d) beobachtet. Die Todesursache waren hierbei allerdings tdTom+ Adenokarzinome der Lunge. Wir konnten zeigen, dass in HKP-Mäusen spezifisch eine HNF1 β + Subpopulation der Alveolarzellen Typ II tdTom+ markiert wird und die beobachteten Kras-induzierten Adenokarzinome der Lunge somit aus Alveolarzellen Typ II stammen. Diese Zellen gelten als potentiell Stammzellkompartiment der Lunge und wurden bereits in anderen Modellen als Ursprungszellen Kras-induzierter Adenokarzinome der Lunge identifiziert (De Simone et al., 1991; Desai et al., 2014; C. F. B. Kim et al., 2005; Lin et al., 2012). Im Gegensatz zu der lebensbeschränkende Kanzerogenese in der Lunge zeigte sich selbst in überdurchschnittlich lang überlebenden HKP-Mäusen eine normale Leberstruktur. Teilweise war eine milde DR zu beobachten, aber es waren keine prä-malignen oder malignen Läsionen in der Leber vorhanden. Dabei zeigte sich sowohl im Gesamtüberleben als auch in der Histologie kein Unterschied zwischen HKP hetero- und homozygoten Mäusen. Das Ausbleiben eines pathologischen hepatischen Phänotyps ist bemerkenswert, da die Cre-vermittelte Rekombination effektiv erfolgte (84 %). Auch die tdTom+ Adenokarzinome der Lunge, sowie die immunhistochemisch gesicherte erhöhte pERK-Expression als Surrogat für Kras-Aktivierung in duktalem Zellen belegen dies. Aufgrund der eingeschränkten Überlebenszeit kann letztlich nicht sicher ausgeschlossen werden, dass sich in HKP-Mäusen nach einem längeren Beobachtungszeitraum prä-maligne Läsionen oder Tumoren entwickelt hätten. Das Ausbleiben histologischer Veränderungen lässt dies jedoch eher unwahrscheinlich erscheinen.

Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da sich in anderen Studien nach Mutation von Kras und/oder Deletion von p53 in der Leber Tumoren entwickelten. O'Dell et al. beobachteten in Mäusen mit Kras-Mutation und homozygoter p53-Deletion durch eine konstitutiv aktive Cre-Rekombinase unter einem Albumin-Promotor ein Überleben der Versuchstiere von nur 19 Wochen und sowohl HCCs, als auch CCs (O'Dell et al., 2012). Katz et al. beobachteten in Mäusen mit homozygoter p53 Deletion durch eine konstitutive Cre-Rekombinase unter einem Albumin/AFP-Promotor nach 44 Wochen ebenfalls HCCs und CCs (Katz et al., 2012). Folglich wäre bei den von uns studierten HKP-Mäusen ebenfalls mit einer Tumorentwicklung

zu rechnen gewesen, da sich unser Beobachtungszeitraum auf maximal 30 Wochen erstreckte. Zur Interpretation dieser beiden Studien ist allerdings bedeutsam, dass der von O'Dell und Katz verwendete Promotor bereits embryonal in Hepatoblasten exprimiert wird, also deutlich vor der Segregation der biliären und hepatischen Linie (Geisler et al., 2008; Zaret & Grompe, 2008). In diesen beiden Studien kommt es also bereits frühzeitig in der Embryogenese zur Aktivierung des onkogenen Stimulus in der hepatozytären und biliären Zellreihe. Ein Rückschluss auf einer der beiden Reihen als Ursprungskompartiment der beobachteten Tumoren ist folglich nicht zulässig.

Katz et al. isolierten zudem aus $p53^{-/-}$ -Mäusen LPCs, die *in vitro* bipotent waren und aus den isolierten LPCs entwickelten sich in subkutanen Transplantationsversuchen in immunkompromittierten Mäuse Tumoren (Katz et al., 2012). Auch Holczbauer et al. isolierten LPCs, Hepatoblasten und adulte Hepatozyten aus Wildtypmäusen, transfizierten diese Zellen lentiviral mit den Onkogenen H-Ras, SV40LT und Reporterproteinen. Aus diesen transfizierten Zellen entwickelten sich sowohl *in vitro* und auch *in vivo* nach Transplantation in immundefizienten Mäusen Tumoren. Tendenziell gingen dabei aus mutmaßlichen Progenitorzellen eher dedifferenziertere Tumoren hervor (Holczbauer et al., 2013). Bereits zehn Jahre zuvor isolierten Dumble et al. Ovalzellen, heutzutage meist als LPC bezeichnet, aus einer p53 Knockout-Maus, die nach subkutaner Injektion in athymische, immunkompromittierte Mäuse zu HCC-ähnlichen Tumoren führten (Dumble et al., 2002). Die gezielte Isolation von LPCs ist allerdings sehr schwierig, da keine LPC-Marker etabliert sind und jede *in vitro* Passage einer Zellreihe die zelluläre Plastizität beeinflussen kann. Zusammenfassend erscheinen unsere *in vivo* Lineage Tracing Daten überzeugend genug, um sagen zu können, dass Kras-Aktivierung und p53-Deletion im biliären und LPC-Kompartiment nicht zur spontanen Tumorentwicklung (zumindest im untersuchten Zeitraum) führt, falls diese Mutationen erst in der adulten Maus aktiviert werden.

In den Untersuchungen zur spontanen Tumorentwicklung mit HKP-Mäusen befand sich die Leber in ihrer regulären Homöostase, bei der das LPC-Kompartiment nach gängiger Vorstellung keinen signifikanten Beitrag zur Regeneration der Leber leistet. Das LPC-Kompartiment wird dagegen bei chronischer Leberschädigung aktiviert, die auch einen Risikofaktor für Leberkrebs darstellt (Jors et al., 2015; George K. Michalopoulos & Khan, 2015; Schaub et al., 2014; Yanger et al., 2014). Zur Charakterisierung der Rolle des LPC-Kompartiments in der Karzinogenese kombinierten wir deshalb HKP-Mäuse mit etablierten Langzeitmodellen chronischer Leberschädigung: Der CDE-Diät und der DDC-Diät. Diese Schädigungsmodelle bilden einen zusätzlichen Proliferationsreiz für das LPC-Kompartiment in Form der DR und „aktivieren“ dieses sozusagen. Dabei zeigten HKP-Mäuse interessanterweise unter der eher hepatozytär-toxischen CDE-Diät einen komplett anderen

Phänotyp, als unter der eher biliär-toxischen DDC-Diät. HKP-Mäuse unter CDE-Diät bildeten makroskopische tdTom⁺ Tumoren, die sich mikroskopisch als HCC-ähnliche tdTom⁺ Tumoren darstellten und zeigten eine stark ausgeprägte tdTom⁺ duktale Reaktion. Wichtig hierbei ist, dass alleinige CDE-Diät in Kontrolltieren nach der gleichen Zeit (4 M) in unseren Vorversuchen nicht zur Tumorentwicklung führte (Jors et al., 2015). Nach deutlich längerer CDE-Diät (19 M) ist allerdings eine sehr hohe Inzidenz von HCCs zu beobachten (Yoshida et al., 1993). Eine *Lineage Tracing*-Studie mit einer tamoxifen-induzierbaren Osteopontin-Cre Rekombinase zeigte, dass eine alleinige CDE-Diät (12 M) zu vereinzelt HCCs führen kann, diese Tumoren aber nicht aus dem LPC-Kompartiment stammen (Mu et al., 2015). Die Autoren zeigten jedoch nicht, aus welchen Zellen diese Tumoren entstanden. In Ratten ist vielfach beschrieben worden, dass eine alleinige Applikation der CDE-Diät zur CC-Entwicklung führen kann (I. Guest, Ilic, & Sell, 2010). Umso bemerkenswerter erscheint im Vergleich mit der Literatur also unsere Beobachtung, dass das HNF1 β ⁺ Kompartiment unter CDE-Diät und zusätzlicher Kras-Aktivierung und p53-Deletion tatsächlich Ursprungszelle des HCC sein könnte.

Hierbei muss daran erinnert werden, dass es möglicherweise unter der CDE-Diät einen kleinen Anteil (~1,5-2,5 %) der Hepatozyten gibt, der sich aus dem LPC-Kompartiment regeneriert (Espanol-Suner et al., 2012; Jors et al., 2015). Diese Subpopulation wäre als Ursprungszellen der von uns beobachteten HCCs denkbar, da sie bereits hepatozytär differenziert sind. Allerdings ist eine definitive Schlussfolgerung nicht möglich, da in der *R26^{Tom}Hnf1bCreER*-Maus auch Hepatozyten ektop mit tdTom markiert werden, wenn auch in extrem geringen Maße (0,012 %) (Jors et al., 2015). Diese Hepatozyten exprimieren im Gegensatz zu reifen Hepatozyten wahrscheinlich schwach den biliären Marker HNF1 β und auch hepatozytäre Marker wie HNF4 α . Es ist also durchaus denkbar, dass sie der kürzlich beschriebenen Subpopulation der Hybrid-Hepatozyten angehören, die oben bereits erwähnt wurde (Font-Burgada et al., 2015). Font-Burgada et al. beobachteten keine Karzinogenese aus Hybrid-Hepatozyten in 3 „perivenösen“ Krebsmodellen, aber konnten dies für andere Krebsmodelle natürlich nicht ausschließen.

In Vorversuchen konnten wir ausschließen, dass die CDE-Diät selbst als Stimulus zu einer ektopten Rekombination durch die Cre-Rekombinase führt und so womöglich HNF1 β negative Zellen ektop Kras exprimieren könnten oder p53 Deletionen aufweisen könnten und durch diesen Mechanismus die Ursprungszellen der beobachteten HCCs bilden (Jors et al., 2015). Es stellt sich also die Frage, aus welchen Zellen die von uns beobachteten HCC-ähnlichen Tumoren in HKP-Mäusen unter CDE-Diät entstanden sind. A) Aus Hepatozyten die unter CDE-Diät aus dem LPC-Kompartiment transdifferenziert sind oder b) aus ektop markierten, eventuellen Hybrid-Hepatozyten. Keine dieser beiden Möglichkeiten lässt sich

durch unsere Versuche hinreichend sicher belegen oder ausschließen.

Der Phänotyp von HKP-Mäusen unter DDC-Diät unterschied sich deutlich vom Phänotyp der HKP-Mäuse unter CDE-Diät. Zwar wurde in der makroskopischen Fluoreszenzanalyse ebenso eine tdTom+ Tumorentwicklung beobachtet, aber mikroskopisch zeigte sich bei HKP-Mäusen unter DDC-Diät ein vollkommen anderer Phänotyp. Es wurden keine Tumoren hepatozytärer Differenzierung beobachtet, aber dafür tdTom+ Veränderungen an den großen Gallengängen im Sinne von BillNs mit Übergang zum CC und tdTom+ Veränderungen an den kleinen Gallengängen bis hin zu CCs. Außerdem war eine massive tdTom+ DR zu beobachten. Die in HKP-Mäusen unter DDC-Diät aufgetretenen CCs sind somit eindeutig aus dem HNF1 β + biliären und dem darin enthaltenen putativen LPC-Kompartiment entstanden. Wir versuchten unsere Beobachtungen nach der aktuell am meisten verwendeten Einteilung des CC anhand der anatomischen Tumorlokalisation zu differenzieren (Blechacz et al., 2011). Danach wird zwischen intrahepatischem(I) CC, perihilärem CC und distalem CC unterschieden. An den großen intrahepatischen Gallengängen ist das perihiläre CC lokalisiert. Dort finden sich zwar auch HNF1 β + Cholangiozyten, allerdings gelten diese als reife Cholangiozyten. Die HNF1 β + LPCs werden eher in den CoH vermutet, also am Übergang der Hepatozyten zu den kleinen Gallengängen (Theise et al., 1999). Auch der embryologische Ursprung beider Gewebe ist unterschiedlich (Kung et al., 2010). An den großen Gallengängen konnten wir die bereits beschriebene Sequenz von reaktiv veränderten Cholangiozyten über verschiedenen Stufen Biliärer Intraepithelialer Neoplasien bis hin zum perihilären CC nachvollziehen (Nakanuma et al., 2014; Zen et al., 2007). Über den Ursprung dieser Unterart des CC aus reifen Cholangiozyten herrscht weitgehend Einigkeit.

So beobachteten Guest et al. in einer *Lineage Tracing* Studie in Mäusen mit spezifischer homozygoter p53-Deletion durch eine induzierbare Cre-Rekombinase unter einem CK19-Promotor und zusätzlicher Behandlung mit Thioacetamid (6 M) die Entstehung von CCs aus dem biliären CK19+ Kompartiment mit einer Penetranz von 80 % (R. V. Guest et al., 2014). In Mäusen mit heterozygoter p53-Deletion und Thioacetamid (6 M) wurde dagegen kein einziges CC beobachtet, wobei wir allerdings keinen Unterschied zwischen HKP hetero- und homozygoten Mäusen unter DDC-Diät beobachten konnten, was am Ehesten auf die zusätzliche Kras-Aktivierung in unserem HKP-Modell zurückzuführen ist.

Für das ICC an den kleinen Gallengängen existieren sowohl verschiedene konkurrierende Einteilungen und Klassifikationen, als auch Hypothesen bezüglich der Ursprungszellen dieser Tumoren (Banales et al., 2016; Wei et al., 2016). Wir beobachteten an den kleinen Gallengängen tdTom+ Veränderungen, die biliären Hamartomen oder Von-Meyenburg-

Komplexen ähnelten und sich zu ICCs entwickelten. Biliäre Hamartome und Von-Meyenberg-Komplexe gelten zwar prinzipiell als benigne Läsionen, allerdings gibt es auch Studien in denen sie als Vorläuferläsionen des ICC postuliert wurden (Jain, Ahrens, & Finkelstein, 2010; H. K. Kim & Jin, 2011; Nakanuma et al., 2014). Insbesondere beschrieb O'Dell nach konstitutiver Kras-Aktivierung und p53-Deletion in Hepatoblasten Von-Meyenberg-Komplexe und CCs (O'Dell et al., 2012). Da alle von uns gefundenen biliären Veränderungen und CCs tdTom+ waren, belegen unsere Daten eindeutig, dass das HNF1β+ biliäre bzw. das LPC-Kompartiment prinzipiell Ursprungszelle des perihilären CC an großen Gallengängen und des ICC an kleinen Gallenwegen sein kann. Dies ist von Bedeutung, da andere Studien den Ursprung des ICC in dedifferenzierten Hepatozyten sahen (L. Fan et al., 2012; Sekiya & Suzuki, 2012; Zender et al., 2013).

Für die von uns beobachteten CCs in HKP-Mäusen unter DDC-Diät können ektopt tdTom+ markierte oder transdifferenzierte Hepatozyten als Ursprungszellen nahezu sicher ausgeschlossen werden, da in *R26^{Tom}HNF1bCreER*-Mäusen nach mehrmonatiger DDC-Diät nahezu keine tdTom+ Hepatozyten existieren (0,005 %) (Jors et al., 2015). Ein entscheidender Signalweg für die Entwicklung von CCs aus Hepatozyten scheint der Notch-Signalweg zu sein, wobei dieser auch in der HCC-Entstehung von Bedeutung ist (Geisler & Strazzabosco, 2014).

So publizierten Sekiya und Suzuki eine zweiarmlige *Lineage Tracing* Studie mit einem Cre-Rekombinase-induzierten Reporter für biliäre Zellen unter dem CK19 Promotor bzw. einem Cre-Rekombinase-induzierten Reporter für Hepatozyten unter einem *AlbCreER*-Promotor (Sekiya & Suzuki, 2012). Die Thioacetamid-behandelten Mäuse entwickelten CCs (6 M) aus Hepatozyten und die rekombinante Aktivierung der intrazellulären Domäne von Notch1 (N1IC) (Murtaugh, Stanger, Kwan, & Melton, 2003) unter dem Albumin Promotor beschleunigte den Phänotyp und die Inhibition des Notch-Signalweges durch Hes1-Knockout schützte die Mäuse vor CC-Entwicklung aus Hepatozyten (Imayoshi, Shimogori, Ohtsuka, & Kageyama, 2008). Wir konnten allerdings zeigen, dass die *AlbCreERT2*-Maus nicht hepatozytenspezifisch ist, sondern auch nach minimaler Tamoxifengabe in bis zu 40 % der biliären Zellen der kleinen Gallengänge eine Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination stattfindet: Das *AlbCreERT2*-Mausmodell ist also „leaky“ (Jors et al., 2015). Formal ist der Schluss auf Hepatozyten als Ursprungszellen der Thioacetamid-induzierten CCs also nicht möglich. Da allerdings Cholangiozyten und LPCs unter Markierung durch CK19-Promotor nicht die Ursprungszellen Thioacetamid-induzierter CCs waren, scheinen zumindest im Thioacetamid-Modell doch durch Notch-Signale transdifferenzierte Hepatozyten die Ursprungszellen von CCs zu sein (Sekiya & Suzuki, 2012).

Die Überexpression von N1IC und zusätzliche Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) unter einem induzierbaren viralen hepatozytenspezifischen Promotor führte ebenfalls über eine Transdifferenzierung von adulten Hepatozyten zu Cholangiozyten zur CC-Entwicklung und nicht zur HCC-Entwicklung (B. Fan et al., 2012). Bei konstitutiver Überexpression von N1IC in Hepatoblasten konnte ebenfalls CC-Entwicklung beobachtet werden (Zender et al., 2013), aber in einer anderen Studie auch CCs und zusätzlich HCCs (Villanueva et al., 2012). Konstitutive Überexpression von N2IC in Hepatoblasten führte zu HCCs und biliären Hyperplasien und konstitutive N2IC-Überexpression in Hepatoblasten in Kombination mit dem DEN-Modell zu akzelerierter HCC-Entwicklung und auch CC-Entwicklung (Dill et al., 2013). Die biologische Relevanz von Studien in denen Signalmoleküle wie N1IC überexprimiert werden, ist sehr schwer einzuschätzen, da diese über ein vielfaches des physiologischen Niveaus hinaus gehen – vor allem wenn schon in der Embryonalperiode Überexpression stattfindet und müssen so als „*proof-of-principle*“ Studien verstanden werden. Hier muss auch nochmals erwähnt werden, dass die Plastizität adulter Hepatozyten und damit die Fähigkeit im Falle chronischer Leberschädigungen zu Cholangiozyten zu differenzieren umstritten diskutiert wird (Lu et al., 2015; Suzuki, 2015). Die Studienlage in den Mausmodellen liefert also keinen eindeutigen Aufschluss über die Ursprungszelle des CC.

Die Studienlage zum humanen ICC weist gemeinsame Risikofaktoren für ICC und HCC auf, und deutet somit auf den Ursprung zumindest einiger ICC-Subtypen aus dedifferenzierten Hepatozyten hin (Tyson & El-Serag, 2011). Außerdem wurden p62 + Einschlusskörper in ICCs mit HCC Risikoprofil beobachtet, wobei diese Einschlusskörper typisch für Hepatozyten sind (Aishima et al., 2010). Ein weiteres Indiz für den Ursprung von ICCs aus Hepatozyten, ist das Auftreten von ICCs an Lokationen, an denen normalerweise nur Hepatozyten residieren (Blechacz et al., 2011). Es scheint also durchaus wahrscheinlich, dass sowohl Hepatozyten als auch biliäre Zellen ICCs verursachen können (Banales et al., 2016; Patel, 2014). Deshalb ist es erforderlich, Patienten mit ICCs in Zentren zu behandeln und in klinische Studien einzuschließen, die ICCs von perihilären und distalen CCs abgrenzen, um genauere Erkenntnisse, zum Beispiel über Vorläuferläsionen und prognostische Unterschiede zu gewinnen (Bridgewater et al., 2014). Der nächste Schritt wäre dann, Lebertumoren unabhängig ihres histologischen Phänotyps nach ihrem genetischen Profil zu klassifizieren, wie jüngst vorgeschlagen (Carotenuto et al., 2016). Höchstwahrscheinlich würde eine weitere Subklassifizierung im Sinne einer personalisierten Medizin deutliche Vorteile für Patienten bringen, da so der Weg zu einer personalisierten, gezielten molekularen Therapie eröffnet wird und so Patienten im Sinne der translationalen Forschung von Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung profitieren können. Die Ergebnisse unseres

HKP-Modells unter DDC-Diät zeigen zweifelsfrei, dass ICCs und perihiläre CCs aus dem biliären bzw. LPC-Kompartiment entstehen können. Da in dieser Arbeit stets das gesamte biliäre Kompartiment markiert wurde, ist keine genauere Differenzierung zwischen der Rolle der putativen Subpopulation der LPCs und der adulten Cholangiozyten möglich. Über einen potentiellen Ursprung von ICCs aus Hepatozyten kann ebenfalls keine Aussage getroffen werden, da dies nicht untersucht wurde. Das HKP-Modell unter DDC-Diät und CDE-Diät zeigt sehr anschaulich den Einfluss chronischer Inflammationsreaktionen auf die Karzinogenese und zeigt auch, wie unterschiedlich die Ergebnisse abhängig von der Wahl des Modells sein können und wie schwierig verallgemeinernde Rückschlüsse in der komplizierten Frage nach der Ursprungszelle des HCC und ICC sind. Die momentan vertretene Ansicht, dass eine weitere Unterteilung des ICC in einen gemischten Gallengängchen ICC Typ und einen muzinösen-Gallengangs-ICC Typ sinnvoll wäre und diese wahrscheinlich unterschiedliche Ursprungszellen haben, bestätigt sich durch unsere Ergebnisse (Banales et al., 2016; Wei et al., 2016).

In der Zusammenschau lässt sich festhalten, dass Leberprogenitorzellen als Ursprungszellen des HCCs in zwei wichtigen, sehr verschiedenen HCC-Modellen keine Rolle spielen und somit höchstwahrscheinlich Hepatozyten und nicht Leberprogenitorzellen Ursprungszellen des HCC sind. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass das biliäre bzw. LPC Kompartiment eine hohe Resistenz gegenüber maligner Transformation durch Kras-Aktivierung und p53-Defizienz besitzt. Erst durch zusätzliche Aktivierung durch Modelle chronischer Leberschädigung zeigt sich die prinzipielle onkogene Suszeptibilität des biliären Kompartiments, welches Ursprungszelle des ICC und perihilären CCs sein kann und unter bestimmten Modellbedingungen möglicherweise auch als Ursprungszelle des HCC fungieren kann. Abbildung 17 zeigt eine komplette Übersicht über die Ergebnisse dieser Arbeit.

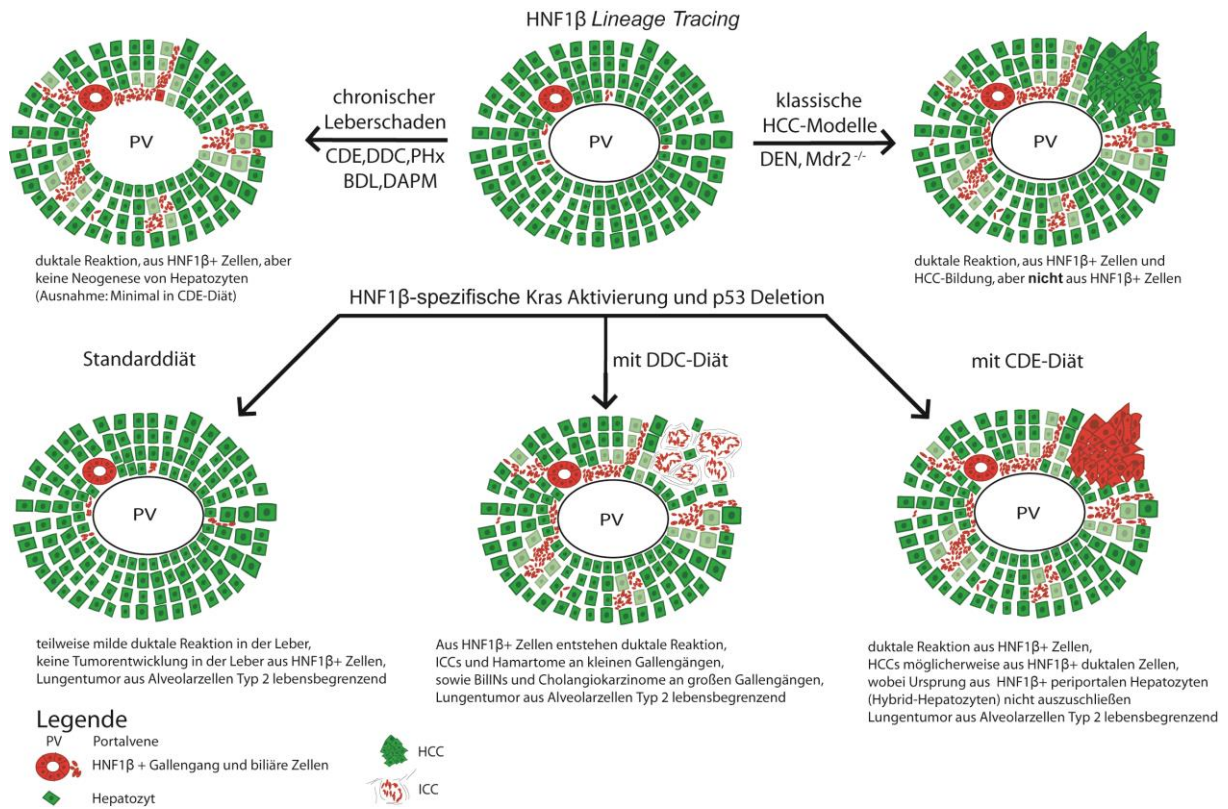


Abbildung 17: Übersicht über die Ergebnisse der Lineage Tracing Versuche in der R26^{Tom}Hnf1bCreER-Maus.

6 Zusammenfassung

Die Leber besitzt nach akuter und chronischer Schädigung außerordentliche Fähigkeiten zur Regeneration. Der akute Verlust von Lebergewebe, z. B. nach Resektion, wird durch die Proliferation reifer Hepatozyten kompensiert. Für die chronische Leberschädigung galt klassischerweise die Hypothese, dass Zellen der duktaalen Reaktion als bipotentiaales Reservekompartiment fungieren und zur Neogenese von Hepatozyten und Cholangiozyten beitragen. Die duktaale Reaktion bezeichnet eine vorwiegend periportale Expansion phänotypisch biliärer Zellen, die in beinahe allen Formen schwerster akuter oder chronischer Leberschädigungen beobachtet wird. Es wird weithin angenommen, dass die Zellen der duktaalen Reaktion transit-amplifizierende Zellen eines in den terminalen Gallengängen (Heringkanälchen) lokalisierten putativen adulten Stammzellkompartiments sind, weswegen sie auch oft als Leberprogenitorzellen bezeichnet werden. Neue Daten, u.a. von unserer Arbeitsgruppe, zeigten allerdings, dass die Zellen der duktaalen Reaktion und damit das Leberprogenitorzell-Kompartiment, allenfalls einen minimalen Beitrag zur Regeneration der Hepatozyten leisten.

Die Identität der Ursprungszellen der beiden häufigsten Leberkrebsentitäten Hepatozelluläres Karzinom (HCC) und Cholangiokarzinom (CC) ist unbekannt und wird kontrovers diskutiert. Leberprogenitorzellen wurden dabei aus verschiedenen Gründen als potentielle Ursprungszellen von HCC und CC postuliert. Leberprognitorzellen besitzen mutmaßlich große zelluläre Plastizität in der Regeneration der Leber. Einige Lebertumoren enthalten Zellen, die histologisch in ihrer Zellmarkerexpression Leberprogenitorzellen ähnlich sind, und auch in genetischen Expressionsanalysen gibt es Tumorzellen, die Leberprogenitorzellen ähnlich sind. Da von diesen Leberprogenitorzell-ähnlichen Zellen angenommen wird, dass sie Leberkrebsstammzellen sein könnten und die Prognose Leberprogenitorzell-ähnlicher Tumoren sehr ungünstig ist, ist es von hoher Relevanz zu klären, ob aus Leberprogenitorzellen tatsächlich Tumoren entstehen können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, in einem sogenannten *in vivo Lineage Tracing* Ansatz im Mausmodell zu überprüfen, ob das duktaale bzw. putative LPC-Kompartiment auch als Ursprungskompartiment von Lebertumoren fungiert. *Lineage Tracing* in $R26^{Tom}HNF1bCreER$ -Mäusen ermöglicht die gezielte Markierung des biliären HNF1 β + Kompartiments. Das HNF1 β + Kompartiment expandiert in der duktaalen Reaktion und enthält mutmaßlich das Leberprogenitorzell-Kompartiment. Beim *Lineage Tracing* werden HNF1 β -exprimierende Zellen dauerhaft und irreversibel zu einem beliebig wählbaren Zeitpunkt per Tamoxifeninjektion mit dem roten Fluoreszenzprotein tdTomato markiert und geben diesen Marker an sämtliche Tochterzellen weiter, die aus den markierten HNF1 β + Zellen entstehen. Tumoren, deren Ursprungszellen HNF1 β + sind, werden also ebenfalls durch tdTomato

markiert. $R26^{Tom}HNF1bCreER$ -Reporter-Mäuse wurden in zwei etablierten HCC-Modellen analysiert. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz mit großer Sicherheit gezeigt werden, dass HNF1 β ⁺ Zellen, und damit das putative adulte Leberprogenitorzell-Kompartiment, in den beiden untersuchten HCC-Modellen (DEN-Modell und Mdr2^{-/-}-Mausmodell) nicht die Ursprungszellen des HCC darstellen. In einem zweiten Ansatz wurde das HNF1 β ⁺ Kompartiment spezifisch auf seine Sensitivität gegenüber maligner Transformation getestet. Dazu wurde HNF1 β -spezifisch das Onkogen Kras aktiviert, sowie das Tumorsuppressorgen p53 hetero- bzw. homozygot inaktiviert (HKP-Modell). Im HKP-Modell starben die Mäuse vorzeitig (3-6 Monate) an primären Adenokarzinomen der Lunge, aufgrund der Expression von HNF1 β in Alveolarnzellen Typ II der Lunge. Im Leberparenchym waren keine dysplastischen Veränderungen zu beobachten. Um das Leberprogenitorzell-Kompartiment gezielt einem zusätzlichen Proliferationsstimulus auszusetzen, wurde das onkogene Stressmodell mit HNF1 β -spezifischer Kras-Aktivierung und p53-Defizienz (HKP-Modell) zusätzlich mit Langzeitmodellen chronischer Leberschädigung kombiniert: CDE-Diät und DDC-Diät. In Mäusen unter CDE-Diät entwickelten sich tdTomato⁺ HCC-ähnliche Tumoren. In Mäusen unter DDC-Diät entwickelten sich hingegen tdTomato⁺ Veränderungen der großen Gallengänge im Sinne von biliär intraepithelialen Neoplasien und CCs und tdTomato⁺ Veränderungen der kleinen Gallengänge im Sinne von intrahepatischen CCs. In beiden Fällen konnte per Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die Tumoren aus dem markierten HNF1 β ⁺ Kompartiment der duktaalen Reaktion stammen, wobei für das CDE-Modell sehr selten ektop markierte Hepatozyten als Ursprungszellen der HCC-ähnlichen Läsionen nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Die vorliegende Arbeit zeigt eindeutig, dass Leberprogenitorzellen in der Entstehung der HCCs in zwei wichtigen, sehr verschiedenen HCC-Modellen keine Rolle spielen und somit höchstwahrscheinlich Hepatozyten und nicht Leberprogenitorzellen Ursprungszellen des HCC sind. Außerdem wird gezeigt, dass das biliäre bzw. LPC Kompartiment eine hohe Resistenz gegenüber maligner Transformation durch Kras-Aktivierung und p53-Defizienz besitzt. Erst durch einen zusätzlichen Proliferationsreiz durch Modelle chronischer Leberschädigung zeigt sich Karzinogenese ausgehend vom duktaalen Kompartiment, welches dann Ursprungszelle des ICC und perihilären CCs und unter bestimmten Modellbedingungen möglicherweise auch Ursprungszelle des HCC sein kann.

7 Literaturverzeichnis

- Aishima, S., Fujita, N., Mano, Y., Iguchi, T., Taketomi, A., Maehara, Y., Oda, Y., & Tsuneyoshi, M. (2010). p62+ Hyaline inclusions in intrahepatic cholangiocarcinoma associated with viral hepatitis or alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol*, *134*(3), 457-465. doi:10.1309/ajcp53yvvjczndzir
- Akhurst, B., Croager, E. J., Farley-Roche, C. A., Ong, J. K., Dumble, M. L., Knight, B., & Yeoh, G. C. (2001). A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology*, *34*(3), 519-522. doi:10.1053/jhep.2001.26751
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Aleksic, K., Lackner, C., Geigl, J. B., Schwarz, M., Auer, M., Ulz, P., Fischer, M., Trajanoski, Z., Otte, M., & Speicher, M. R. (2011). Evolution of genomic instability in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*, *53*(3), 895-904. doi:10.1002/hep.24133
- Alison, M. R. (2005). Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis. *Stem Cell Rev*, *1*(3), 253-260. doi:10.1385/scr:1:3:253
- Alison, M. R., & Lin, W.-R. (2016). Diverse routes to liver regeneration. *J Pathol*, *238*(3), 371-374. doi:10.1002/path.4667
- Anastassiadis, K., Glaser, S., Kranz, A., Berhardt, K., & Stewart, A. F. (2010). A practical summary of site-specific recombination, conditional mutagenesis, and tamoxifen induction of CreERT2. *Methods Enzymol*, *477*, 109-123. doi:10.1016/s0076-6879(10)77007-5
- Andersen, J. B., Loi, R., Perra, A., Factor, V. M., Ledda-Columbano, G. M., Columbano, A., & Thorgeirsson, S. S. (2010). Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. *Hepatology*, *51*(4), 1401-1409. doi:10.1002/hep.23488
- Banales, J. M., Cardinale, V., Carpino, G., Marzioni, M., Andersen, J. B., Invernizzi, P., Lind, G. E., Folseraas, T., Forbes, S. J., Fouassier, L., Geier, A., Calvisi, D. F., Mertens, J. C., Trauner, M., Benedetti, A., Maroni, L., Vaquero, J., Macias, R. I., Raggi, C., Perugorria, M. J., Gaudio, E., Boberg, K. M., Marin, J. J., & Alvaro, D. (2016). Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *13*(5), 261-280. doi:10.1038/nrgastro.2016.51
- Barashi, N., Weiss, I. D., Wald, O., Wald, H., Beider, K., Abraham, M., Klein, S., Goldenberg, D., Axelrod, J., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Galun, E., & Peled, A. (2013). Inflammation-induced hepatocellular carcinoma is dependent on CCR5 in mice. *Hepatology*, *58*(3), 1021-1030. doi:10.1002/hep.26403
- Begus-Nahrman, Y., Lechel, A., Obenauf, A. C., Nalapareddy, K., Peit, E., Hoffmann, E., Schlaudraff, F., Liss, B., Schirmacher, P., Kestler, H., Danenberg, E., Barker, N., Clevers, H., Speicher, M. R., & Rudolph, K. L. (2009). p53 deletion impairs clearance of chromosomal-*instable* stem cells in aging telomere-dysfunctional mice. *Nat Genet*, *41*(10), 1138-1143.
- Benhamouche, S., Curto, M., Saotome, I., Gladden, A. B., Liu, C. H., Giovannini, M., & McClatchey, A. I. (2010). Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes Dev*, *24*(16), 1718-1730. doi:10.1101/gad.1938710
- Blechacz, B., Komuta, M., Roskams, T., & Gores, G. J. (2011). Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *8*(9), 512-522. doi:10.1038/nrgastro.2011.131
- Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Martinez Barbera, J. P., & Zaret, K. S. (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol*, *290*(1), 44-56. doi:10.1016/j.ydbio.2005.11.006
- Boulter, L., Lu, W. Y., & Forbes, S. J. (2013). Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *J Clin Invest*, *123*(5), 1867-1873. doi:10.1172/JCI66026

- Bridgewater, J., Galle, P. R., Khan, S. A., Llovet, J. M., Park, J. W., Patel, T., Pawlik, T. M., & Gores, G. J. (2014). Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*, *60*(6), 1268-1289. doi:10.1016/j.jhep.2014.01.021
- Brunt, E. M., Paradis, V., Sempoux, C., & Theise, N. D. (2015). Biphenotypic (hepatobiliary) primary liver carcinomas: the work in progress. *Hepatic Oncology*, *2*(3), 255-273. doi:10.2217/hep.15.8
- Calvisi, D. F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E. A., Lee, J. S., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2006). Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*, *130*(4), 1117-1128. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.006
- Cardinale, V., Carpino, G., Reid, L., Gaudio, E., & Alvaro, D. (2012). Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World J Gastrointest Oncol*, *4*(5), 94-102. doi:10.4251/wjgo.v4.i5.94
- Cardinale, V., Carpino, G., Reid, L. M., Gaudio, E., & Alvaro, D. (2013). Notch2 signaling and undifferentiated liver cancers: evidence of hepatic stem/progenitor cell origin. *Hepatology*, *58*(3), 1188. doi:10.1002/hep.26280
- Carotenuto, P., Fassan, M., Pandolfo, R., Lampis, A., Vicentini, C., Cascione, L., Paulus-Hock, V., Boulter, L., Guest, R., Quagliata, L., Hahne, J. C., Ridgway, R., Jamieson, T., Athineos, D., Veronese, A., Visone, R., Murgia, C., Ferrari, G., Guzzardo, V., Evans, T. R. J., MacLeod, M., Feng, G. J., Dale, T., Negrini, M., Forbes, S. J., Terracciano, L., Scarpa, A., Patel, T., Valeri, N., Workman, P., Sansom, O., & Braconi, C. (2016). Wnt signalling modulates transcribed-ultraconserved regions in hepatobiliary cancers. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2016-312278
- Carpentier, R., Suner, R. E., van Hul, N., Kopp, J. L., Beaudry, J. B., Cordi, S., Antoniou, A., Raynaud, P., Lepreux, S., Jacquemin, P., Leclercq, I. A., Sander, M., & Lemaigre, F. P. (2011). Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology*, *141*(4), 1432-1438, 1438 e1431-1434. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.049
- Chen, Q., Suresh Kumar, V., Finn, J., Jiang, D., Liang, J., Zhao, Y. Y., & Liu, Y. (2017). CD44high alveolar type II cells show stem cell properties during steady-state alveolar homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *313*(1), L41-L51. doi:10.1152/ajplung.00564.2016
- Choi, T. Y., Ninov, N., Stainier, D. Y., & Shin, D. (2014). Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish. *Gastroenterology*, *146*(3), 776-788. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.019
- De Simone, V., De Magistris, L., Lazzaro, D., Gerstner, J., Monaci, P., Nicosia, A., & Cortese, R. (1991). LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J*, *10*(6), 1435-1443.
- Desai, T. J., Brownfield, D. G., & Krasnow, M. A. (2014). Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*, *507*(7491), 190-194. doi:10.1038/nature12930
- Desmet, V. J. (2011). Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch*, *458*(3), 251-259. doi:10.1007/s00428-011-1048-3
- Dill, M. T., Tornillo, L., Fritzius, T., Terracciano, L., Semela, D., Bettler, B., Heim, M. H., & Tchorz, J. S. (2013). Constitutive Notch2 signaling induces hepatic tumors in mice. *Hepatology*, *57*(4), 1607-1619. doi:10.1002/hep.26165
- Dorrell, C., Erker, L., Schug, J., Kopp, J. L., Canaday, P. S., Fox, A. J., Smirnova, O., Duncan, A. W., Finegold, M. J., Sander, M., Kaestner, K. H., & Grompe, M. (2011). Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev*, *25*(11), 1193-1203. doi:10.1101/gad.2029411
- Dumble, M. L., Croager, E. J., Yeoh, G. C., & Quail, E. A. (2002). Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, *23*(3), 435-445.
- Duncan, A. W., Dorrell, C., & Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, *137*(2), 466-481. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.044

- Espanol-Suner, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., Jacquemin, P., Lemaigre, F., & Leclercq, I. A. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology*, *143*(6), 1564-1575 e1567. doi:10.1053/j.gastro.2012.08.024
- Evarts, R. P., Nagy, P., Nakatsukasa, H., Marsden, E., & Thorgeirsson, S. S. (1989). In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res*, *49*(6), 1541-1547.
- Fan, B., Malato, Y., Calvisi, D. F., Naqvi, S., Razumilava, N., Ribback, S., Gores, G. J., Dombrowski, F., Evert, M., Chen, X., & Willenbring, H. (2012). Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest*, *122*(8), 2911-2915. doi:10.1172/JCI63212
- Fan, L., Xu, C., Wang, C., Tao, J., Ho, C., Jiang, L., Gui, B., Huang, S., Evert, M., Calvisi, D. F., & Chen, X. (2012). Bmi1 is required for hepatic progenitor cell expansion and liver tumor development. *PLoS One*, *7*(9), e46472. doi:10.1371/journal.pone.0046472
- Farber, E. (1956). Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res*, *16*(2), 142-148.
- Farber, J. L., & Gerson, R. J. (1984). Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. *Pharmacol Rev*, *36*(2 Suppl), 71s-75s.
- Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology*, *43*(2 Suppl 1), S45-53. doi:10.1002/hep.20969
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*, *237*(3), 752-757. doi:10.1006/bbrc.1997.7124
- Fialkow, P. J. (1976). Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta*, *458*(3), 283-321.
- Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A., Tilg, H., Krause, R., Lammert, F., Langner, C., Zatloukal, K., Marschall, H. U., Denk, H., & Trauner, M. (2004). Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*, *127*(1), 261-274.
- Fickert, P., Stoger, U., Fuchsbichler, A., Moustafa, T., Marschall, H. U., Weiglein, A. H., Tsybrovskyy, O., Jaeschke, H., Zatloukal, K., Denk, H., & Trauner, M. (2007). A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol*, *171*(2), 525-536. doi:10.2353/ajpath.2007.061133
- Font-Burgada, J., Shalpour, S., Ramaswamy, S., Hsueh, B., Rossell, D., Umemura, A., Taniguchi, K., Nakagawa, H., Valasek, Mark A., Ye, L., Kopp, Janel L., Sander, M., Carter, H., Deisseroth, K., Verma, Inder M., & Karin, M. (2015). Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell*, *162*(4), 766-779.
- Forbes, S. J., & Newsome, P. N. (2016). Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *13*(8), 473-485. doi:10.1038/nrgastro.2016.97
- Forner, A., Llovet, J. M., & Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, *379*(9822), 1245-1255. doi:10.1016/s0140-6736(11)61347-0
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J. M., Behringer, R. R., Nakamura, T., & Uemoto, S. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet*, *43*(1), 34-41. doi:10.1038/ng.722
- Geisler, F., Nagl, F., Mazur, P. K., Lee, M., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L. J., Radtke, F., Schmid, R. M., & Siveke, J. T. (2008). Liver-specific inactivation of Notch2, but not Notch1, compromises intrahepatic bile duct development in mice. *Hepatology*, *48*(2), 607-616. doi:10.1002/hep.22381
- Geisler, F., & Strazzabosco, M. (2014). Emerging roles of Notch signaling in liver disease. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.27268

- Goldfarb, S., Pugh, T. D., Koen, H., & He, Y. Z. (1983). Preneoplastic and neoplastic progression during hepatocarcinogenesis in mice injected with diethylnitrosamine in infancy. *Environ Health Perspect*, *50*, 149-161.
- Gouw, A. S., Clouston, A. D., & Theise, N. D. (2011). Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology*, *54*(5), 1853-1863. doi:10.1002/hep.24613
- Guest, I., Ilic, Z., & Sell, S. (2010). Age dependence of oval cell responses and bile duct carcinomas in male fischer 344 rats fed a cyclic choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Hepatology*, *52*(5), 1750-1757. doi:10.1002/hep.23880
- Guest, R. V., Boulter, L., Kendall, T. J., Minnis-Lyons, S. E., Walker, R., Wigmore, S. J., Sansom, O. J., & Forbes, S. J. (2014). Cell lineage tracing reveals a biliary origin of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res*, *74*(4), 1005-1010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1911
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., Clement, B., Balabaud, C., Chevet, E., Laurent, A., Couchy, G., Letouze, E., Calvo, F., & Zucman-Rossi, J. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, *44*(6), 694-698. doi:10.1038/ng.2256
- Hainaut, P., & Wiman, K. G. (2009). 30 years and a long way into p53 research. *Lancet Oncol*, *10*(9), 913-919. doi:10.1016/s1470-2045(09)70198-6
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- He, G., Dhar, D., Nakagawa, H., Font-Burgada, J., Ogata, H., Jiang, Y., Shalpour, S., Seki, E., Yost, S. E., Jepsen, K., Frazer, K. A., Harismendy, O., Hatzia Apostolou, M., Iliopoulos, D., Suetsugu, A., Hoffman, R. M., Tateishi, R., Koike, K., & Karin, M. (2013). Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell*, *155*(2), 384-396. doi:10.1016/j.cell.2013.09.031
- He, J., Lu, H., Zou, Q., & Luo, L. (2014). Regeneration of liver after extreme hepatocyte loss occurs mainly via biliary transdifferentiation in zebrafish. *Gastroenterology*, *146*(3), 789-800 e788. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.045
- Hering, E. (1866). Über den Bau der Wirbeltierleber. *Sitzber. Akad Wiss Wien Math Naturic Kl*, *54*, 496-515.
- Hezel, A. F., Deshpande, V., & Zhu, A. X. (2010). Genetics of biliary tract cancers and emerging targeted therapies. *J Clin Oncol*, *28*(21), 3531-3540. doi:10.1200/jco.2009.27.4787
- Higgins, G. M., & Anderson, R. M. (1931). Experimental pathology of the liver I Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology*, *12*(2), 186-202.
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V., Hruban, R. H., Lowy, A. M., & Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, *4*(6), 437-450.
- Holczbauer, A., Factor, V. M., Andersen, J. B., Marquardt, J. U., Kleiner, D. E., Raggi, C., Kitade, M., Seo, D., Akita, H., Durkin, M. E., & Thorgeirsson, S. S. (2013). Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology*, *145*(1), 221-231. doi:10.1053/j.gastro.2013.03.013
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S. F., van Es, J. H., Li, V. S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M. J., Haft, A., Vries, R. G., Grompe, M., & Clevers, H. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, *494*(7436), 247-250. doi:10.1038/nature11826
- Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W., & Harris, C. C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, *26*(15), 2166-2176. doi:10.1038/sj.onc.1210279

- Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2008). Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development*, *135*(15), 2531-2541. doi:10.1242/dev.021535
- Isa, T., Tomita, S., Nakachi, A., Miyazato, H., Shimoji, H., Kusano, T., Muto, Y., & Furukawa, M. (2002). Analysis of microsatellite instability, K-ras gene mutation and p53 protein overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*, *49*(45), 604-608.
- Itoh, T., & Miyajima, A. (2014). Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology*, *59*(4), 1617-1626. doi:10.1002/hep.26753
- Jain, D., Ahrens, W., & Finkelstein, S. (2010). Molecular evidence for the neoplastic potential of hepatic Von-Meyenburg complexes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *18*(2), 166-171. doi:10.1097/PAI.0b013e3181b94fd8
- Jeliazkova, P., Jors, S., Lee, M., Zimmer-Strobl, U., Ferrer, J., Schmid, R. M., Siveke, J. T., & Geisler, F. (2013). Canonical Notch2 signaling determines biliary cell fates of embryonic hepatoblasts and adult hepatocytes independent of Hes1. *Hepatology*, *57*(6), 2469-2479. doi:10.1002/hep.26254
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, *61*(2), 69-90. doi:10.3322/caac.20107
- Jordan, C. T., Guzman, M. L., & Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *N Engl J Med*, *355*(12), 1253-1261. doi:10.1056/NEJMra061808
- Jors, S., Jeliazkova, P., Ringelhan, M., Thalhammer, J., Durl, S., Ferrer, J., Sander, M., Heikenwalder, M., Schmid, R. M., Siveke, J. T., & Geisler, F. (2015). Lineage fate of ductular reactions in liver injury and carcinogenesis. *J Clin Invest*, *125*(6), 2445-2457. doi:10.1172/jci78585
- Katz, S. F., Lechel, A., Obenauf, A. C., Begus-Nahrman, Y., Kraus, J. M., Hoffmann, E. M., Duda, J., Eshraghi, P., Hartmann, D., Liss, B., Schirmacher, P., Kestler, H. A., Speicher, M. R., & Rudolph, K. L. (2012). Disruption of Trp53 in livers of mice induces formation of carcinomas with bilineal differentiation. *Gastroenterology*, *142*(5), 1229-1239.e1223. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.009
- Katzenellenbogen, M., Mizrahi, L., Pappo, O., Klopstock, N., Olam, D., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Domany, E., Galun, E., & Goldenberg, D. (2007). Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the mdr2-knockout mice. *Mol Cancer Res*, *5*(11), 1159-1170. doi:10.1158/1541-7786.mcr-07-0172
- Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R. T., & Jacks, T. (2005). Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell*, *121*(6), 823-835. doi:10.1016/j.cell.2005.03.032
- Kim, H. K., & Jin, S. Y. (2011). Cholangiocarcinoma arising in von Meyenburg complexes. *Korean J Hepatol*, *17*(2), 161-164. doi:10.3350/kjhep.2011.17.2.161
- Komuta, M., Govaere, O., Vandecaveye, V., Akiba, J., Van Steenberghe, W., Verslype, C., Laleman, W., Pirenne, J., Aerts, R., Yano, H., Nevens, F., Topal, B., & Roskams, T. (2012). Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology*, *55*(6), 1876-1888. doi:10.1002/hep.25595
- Komuta, M., Spee, B., Vander Borgh, S., De Vos, R., Verslype, C., Aerts, R., Yano, H., Suzuki, T., Matsuda, M., Fujii, H., Desmet, V. J., Kojiro, M., & Roskams, T. (2008). Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology*, *47*(5), 1544-1556. doi:10.1002/hep.22238
- Kordes, C., & Haussinger, D. (2013). Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest*, *123*(5), 1874-1880. doi:10.1172/JCI66027
- Kretschmar, K., & Watt, Fiona M. (2012). Lineage Tracing. *Cell*, *148*(1-2), 33-45. doi:10.1016/j.cell.2012.01.002
- Kung, J. W., Currie, I. S., Forbes, S. J., & Ross, J. A. (2010). Liver development, regeneration, and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*, *2010*, 984248. doi:10.1155/2010/984248
- Kung, J. W., & Forbes, S. J. (2009). Stem cells and liver repair. *Curr Opin Biotechnol*, *20*(5), 568-574. doi:10.1016/j.copbio.2009.09.004

- Kuraishy, A., Karin, M., & Grivennikov, S. I. (2011). Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. *Immunity*, *35*(4), 467-477. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.006
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645-648. doi:10.1038/367645a0
- Lazzaro, D., De Simone, V., De Magistris, L., Lehtonen, E., & Cortese, R. (1992). LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development*, *114*(2), 469-479.
- Leduc, E. H. (1959). Cell modulation in liver pathology. *J Histochem Cytochem*, *7*(4), 253-255.
- Lee, J. S., Chu, I. S., Mikaelyan, A., Calvisi, D. F., Heo, J., Reddy, J. K., & Thorgeirsson, S. S. (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet*, *36*(12), 1306-1311. doi:10.1038/ng1481
- Lee, J. S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I. S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D. F., Mikaelyan, A., Roberts, L. R., Demetris, A. J., Sun, Z., Nevens, F., Roskams, T., & Thorgeirsson, S. S. (2006). A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*, *12*(4), 410-416. doi:10.1038/nm1377
- Li, H., Hu, B., Zhou, Z. Q., Guan, J., Zhang, Z. Y., & Zhou, G. W. (2015). Hepatitis C virus infection and the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma: evidence from a systematic review and meta-analysis of 16 case-control studies. *World J Surg Oncol*, *13*. doi:10.1186/s12957-015-0583-9
- Lin, C., Song, H., Huang, C., Yao, E., Gacayan, R., Xu, S. M., & Chuang, P. T. (2012). Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development. *PLoS One*, *7*(12), e53817. doi:10.1371/journal.pone.0053817
- Lu, W.-Y., Bird, T. G., Boulter, L., Tsuchiya, A., Cole, A. M., Hay, T., Guest, R. V., Wojtacha, D., Man, T. Y., Mackinnon, A., Ridgway, R. A., Kendall, T., Williams, M. J., Jamieson, T., Raven, A., Hay, D. C., Iredale, J. P., Clarke, A. R., Sansom, O. J., & Forbes, S. J. (2015). Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol*, *17*(8), 971-983. doi:10.1038/ncb3203
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., & Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, *13*(1), 133-140. doi:10.1038/nn.2467
- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., & Karin, M. (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, *121*(7), 977-990. doi:10.1016/j.cell.2005.04.014
- Magee, J. A., Piskounova, E., & Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, *21*(3), 283-296. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.003
- Malato, Y., Naqvi, S., Schurmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M. A., Grimm, D., & Willenbring, H. (2011). Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest*, *121*(12), 4850-4860. doi:10.1172/JCI59261
- Marquardt, J. U. (2016). Deconvolution of the cellular origin in hepatocellular carcinoma: Hepatocytes take the center stage. *Hepatology*, *64*(4), 1020-1023. doi:10.1002/hep.28671
- Marquardt, J. U., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2010). Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: current concepts and clinical implications. *J Hepatol*, *53*(3), 568-577. doi:10.1016/j.jhep.2010.05.003
- Marrero, J. A., Romano, P. R., Nikolaeva, O., Steel, L., Mehta, A., Fimmel, C. J., Comunale, M. A., D'Amelio, A., Lok, A. S., & Block, T. M. (2005). GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, *43*(6), 1007-1012. doi:10.1016/j.jhep.2005.05.028
- Mauad, T. H., van Nieuwkerk, C. M., Dingemans, K. P., Smit, J. J., Schinkel, A. H., Notenboom, R. G., van den Bergh Weerman, M. A., Verkruijsen, R. P., Groen, A. K., Oude Elferink, R. P., & et al. (1994). Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal

- model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*, 145(5), 1237-1245.
- McGranahan, N., Favero, F., de Bruin, E. C., Birkbak, N. J., Szallasi, Z., & Swanton, C. (2015). Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. *Sci Transl Med*, 7(283), 283ra254. doi:10.1126/scitranslmed.aaa1408
- Michalopoulos, G. K. (2011). Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(2), 173-179. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.014
- Michalopoulos, G. K. (2014a). Advances in liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 1-11. doi:10.1586/17474124.2014.934358
- Michalopoulos, G. K. (2014b). The liver is a peculiar organ when it comes to stem cells. *Am J Pathol*, 184(5), 1263-1267. doi:10.1016/j.ajpath.2014.02.020
- Michalopoulos, G. K., Barua, L., & Bowen, W. C. (2005). Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology*, 41(3), 535-544. doi:10.1002/hep.20600
- Michalopoulos, G. K., & Khan, Z. (2015). Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease. *Gastroenterology*, 149(4), 876-882. doi:dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.004
- Miyajima, A., Tanaka, M., & Itoh, T. (2014). Stem/Progenitor Cells in Liver Development, Homeostasis, Regeneration, and Reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14(5), 561-574. doi:10.1016/j.stem.2014.04.010
- Morell, C. M., Fiorotto, R., Fabris, L., & Strazzabosco, M. (2013). Notch signalling beyond liver development: emerging concepts in liver repair and oncogenesis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 37(5), 447-454. doi:10.1016/j.clinre.2013.05.008
- Mu, X., Español-Suñer, R., Mederacke, I., Affò, S., Manco, R., Sempoux, C., Lemaigre, F. P., Adili, A., Yuan, D., Weber, A., Unger, K., Heikenwälder, M., Leclercq, I. A., & Schwabe, R. F. (2015). Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment. *J Clin Invest*, 125(10), 3891-3903. doi:10.1172/jci77995
- Murtaugh, L. C., Stanger, B. Z., Kwan, K. M., & Melton, D. A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25), 14920-14925. doi:10.1073/pnas.2436557100
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26(2), 99-109.
- Nakanuma, Y., Tsutsui, A., Ren, X. S., Harada, K., Sato, Y., & Sasaki, M. (2014). What are the precursor and early lesions of peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma? *Int J Hepatol*, 2014, 805973. doi:10.1155/2014/805973
- Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., & Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317(5834), 121-124. doi:10.1126/science.1140485
- Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., & Eaves, C. J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*, 12(2), 133-143. doi:10.1038/nrc3184
- O'Dell, M. R., Huang, J. L., Whitney-Miller, C. L., Deshpande, V., Rothberg, P., Grose, V., Rossi, R. M., Zhu, A. X., Land, H., Bardeesy, N., & Hezel, A. F. (2012). Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res*, 72(6), 1557-1567. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3596
- Oikawa, T. (2016). Cancer Stem cells and their cellular origins in primary liver and biliary tract cancers. *Hepatology*, 64(2), 645-651. doi:10.1002/hep.28485
- Passman, A. M., Strauss, R. P., McSpadden, S. B., Finch-Edmondson, M. L., Woo, K. H., Diepeveen, L. A., London, R., Callus, B. A., & Yeoh, G. C. (2015). A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet reduces morbidity and retains a liver progenitor cell response in mice. *Disease Models & Mechanisms*, 8(12), 1635-1641. doi:10.1242/dmm.022020
- Patel, T. (2014). New insights into the molecular pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol*, 49(2), 165-172. doi:10.1007/s00535-013-0894-y

- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., & Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, *431*(7007), 461-466. doi:10.1038/nature02924
- Pusterla, T., Nemeth, J., Stein, I., Wiechert, L., Knigin, D., Marhenke, S., Longerich, T., Kumar, V., Arnold, B., Vogel, A., Bierhaus, A., Pikarsky, E., Hess, J., & Angel, P. (2013). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a key regulator of oval cell activation and inflammation-associated liver carcinogenesis in mice. *Hepatology*, *58*(1), 363-373. doi:10.1002/hep.26395
- Raven, A., Lu, W. Y., Man, T. Y., Ferreira-Gonzalez, S., O'Duibhir, E., Dwyer, B. J., Thomson, J. P., Meehan, R. R., Bogorad, R., Koteliansky, V., Kotelevtsev, Y., Ffrench-Constant, C., Boulter, L., & Forbes, S. J. (2017). Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature*, *547*(7663), 350-354. doi:10.1038/nature23015
- Razumilava, N., & Gores, G. J. (2014). Cholangiocarcinoma. *Lancet*, *383*(9935), 2168-2179. doi:10.1016/s0140-6736(13)61903-0
- Rodrigo-Torres, D., Affò, S., Coll, M., Morales-Ibanez, O., Millán, C., Blaya, D., Alvarez-Guaita, A., Rentero, C., Lozano, J. J., Maestro, M. A., Solar, M., Arroyo, V., Caballería, J., van Grunsven, L. A., Enrich, C., Ginès, P., Bataller, R., & Sancho-Bru, P. (2014). The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology*, n/a-n/a. doi:10.1002/hep.27078
- Roskams, T. (2006). Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*, *25*(27), 3818-3822. doi:10.1038/sj.onc.1209558
- Roskams, T., Katoonizadeh, A., & Komuta, M. (2010). Hepatic progenitor cells: an update. *Clin Liver Dis*, *14*(4), 705-718. doi:10.1016/j.cld.2010.08.003
- Roskams, T. A., Theise, N. D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P. S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E. M., Crawford, J. M., Crosby, H. A., Desmet, V., Finegold, M. J., Geller, S. A., Gouw, A. S., Hytiroglou, P., Knisely, A. S., Kojiro, M., Lefkowitz, J. H., Nakanuma, Y., Olynyk, J. K., Park, Y. N., Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P. J., Strain, A. J., Thung, S. N., Wanless, I. R., & West, A. B. (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, *39*(6), 1739-1745. doi:10.1002/hep.20130
- Rountree, C. B., Ding, W., He, L., & Stiles, B. (2009). Expansion of CD133-expressing liver cancer stem cells in liver-specific phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10-deleted mice. *Stem Cells*, *27*(2), 290-299. doi:10.1634/stemcells.2008-0332
- Rountree, C. B., Mishra, L., & Willenbring, H. (2012). Stem cells in liver diseases and cancer: recent advances on the path to new therapies. *Hepatology*, *55*(1), 298-306. doi:10.1002/hep.24762
- Sackett, S. D., Li, Z., Hurtt, R., Gao, Y., Wells, R. G., Brondell, K., Kaestner, K. H., & Greenbaum, L. E. (2009). Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology*, *49*(3), 920-929. doi:10.1002/hep.22705
- Santa Cruz, V., Liu, H., Kaphalia, L., & Kanz, M. F. (2007). Effects of methylenedianiline on tight junction permeability of biliary epithelial cells in vivo and in vitro. *Toxicology Letters*, *169*(1), 13-25. doi:10.1016/j.toxlet.2006.11.007
- Santos, N. P., Oliveira, P. A., Arantes-Rodrigues, R., Faustino-Rocha, A. I., Colaço, A., Lopes, C., & Gil da Costa, R. M. (2014). Cytokeratin 7/19 expression in N-diethylnitrosamine-induced mouse hepatocellular lesions: implications for histogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, *95*(3), 191-198. doi:10.1111/iep.12082
- Scalera, A., & Tarantino, G. (2014). Could metabolic syndrome lead to hepatocarcinoma non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol*, *20*(28), 9217-9228. doi:10.3748/wjg.v20.i28.9217
- Schaub, J. R., Malato, Y., Gormond, C., & Willenbring, H. (2014). Evidence against a Stem Cell Origin of New Hepatocytes in a Common Mouse Model of Chronic Liver Injury. *Cell Rep*. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.003
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouze, E., Alexandrov, L. B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., Calatayud, A. L., Pinyol, R., Pelletier, L., Balabaud, C., Laurent, A., Blanc, J. F., Mazzaferro, V., Calvo, F., Villanueva, A., Nault, J. C., Bioulac-Sage, P.,

- Stratton, M. R., Llovet, J. M., & Zucman-Rossi, J. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*, *47*(5), 505-511. doi:10.1038/ng.3252
- Sekiya, S., & Suzuki, A. (2012). Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest*, *122*(11), 3914-3918. doi:10.1172/JCI63065
- Sekiya, S., & Suzuki, A. (2014). Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. *Am J Pathol*, *184*(5), 1468-1478. doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.005
- Sell, S. (1990). Is there a liver stem cell? *Cancer Res*, *50*(13), 3811-3815.
- Sell, S., & Dunsford, H. A. (1989). Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol*, *134*(6), 1347-1363.
- Sell, S., & Leffert, H. L. (2008). Liver cancer stem cells. *J Clin Oncol*, *26*(17), 2800-2805. doi:10.1200/JCO.2007.15.5945
- Shibuya, M., Kondo, F., Sano, K., Takada, T., & Asano, T. (2011). Immunohistochemical study of hepatocyte, cholangiocyte and stem cell markers of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, *18*(4), 537-543. doi:10.1007/s00534-010-0365-2
- Shin, S., Wangensteen, K. J., Teta-Bissett, M., Wang, Y. J., Mosleh-Shirazi, E., Buza, E. L., Greenbaum, L. E., & Kaestner, K. H. (2016). Genetic lineage tracing analysis of the cell of origin of hepatotoxin-induced liver tumors in mice. *Hepatology*, *64*(4), 1163-1177. doi:10.1002/hep.28602
- Sia, D., Tovar, V., Moeini, A., & Llovet, J. M. (2013). Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene*, *32*(41), 4861-4870. doi:10.1038/onc.2012.617
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396-401. doi:10.1038/nature03128
- Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N. M., van Roon, M. A., & et al. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, *75*(3), 451-462.
- Solar, M., Cardalda, C., Houbracken, I., Martin, M., Maestro, M. A., De Medts, N., Xu, X., Grau, V., Heimberg, H., Bouwens, L., & Ferrer, J. (2009). Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell*, *17*(6), 849-860. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.003
- Stephen, Andrew G., Esposito, D., Bagni, Rachel K., & McCormick, F. (2014). Dragging Ras Back in the Ring. *Cancer Cell*, *25*(3), 272-281. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017
- Suzuki, A. (2015). Evidence of cell-fate conversion from hepatocytes to cholangiocytes in the injured liver: in-vivo genetic lineage-tracing approaches. *Current Opinion in Gastroenterology*, *31*(3), 247-251. doi:10.1097/mog.0000000000000172
- Tanimizu, N., & Mitaka, T. (2014). Re-evaluation of liver stem/progenitor cells. *Organogenesis*, *10*(2). doi:10.4161/org.27591
- Tanimizu, N., Nishikawa, Y., Ichinohe, N., Akiyama, H., & Mitaka, T. (2014). Sry HMG box protein 9-positive (Sox9+) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM-) biphenotypic cells derived from hepatocytes are involved in mouse liver regeneration. *J Biol Chem*, *289*(11), 7589-7598. doi:10.1074/jbc.M113.517243
- Tarlow, B. D., Finegold, M. J., & Grompe, M. (2014). Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in oval cell injury. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.27084
- Theise, N. D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., & Crawford, J. M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*, *30*(6), 1425-1433. doi:10.1002/hep.510300614
- Thorgeirsson, S. S., & Grisham, J. W. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, *31*(4), 339-346. doi:10.1038/ng0802-339

- Tirnitz-Parker, J. E. E., Tonkin, J. N., Knight, B., Olynyk, J. K., & Yeoh, G. C. T. (2007). Isolation, culture and immortalisation of hepatic oval cells from adult mice fed a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Int J Biochem Cell Biol*, *39*(12), 2226-2239. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.008
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, *347*(6217), 78-81. doi:10.1126/science.1260825
- Tyson, G. L., & El-Serag, H. B. (2011). Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*, *54*(1), 173-184. doi:10.1002/hep.24351
- Verna, L., Whysner, J., & Williams, G. M. (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther*, *71*(1-2), 57-81.
- Villanueva, A., Alsinet, C., Yanger, K., Hoshida, Y., Zong, Y., Toffanin, S., Rodriguez-Carunchio, L., Sole, M., Thung, S., Stanger, B. Z., & Llovet, J. M. (2012). Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology*, *143*(6), 1660-1669 e1667. doi:10.1053/j.gastro.2012.09.002
- Villanueva, A., Newell, P., Chiang, D. Y., Friedman, S. L., & Llovet, J. M. (2007). Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, *27*(1), 55-76. doi:10.1055/s-2006-960171
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, *469*(7330), 314-322.
- Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C. Y., & Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid Axin2+ cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature*, *524*(7564), 180-185. doi:10.1038/nature14863
- Wang, C., Yang, W., Yan, H. X., Luo, T., Zhang, J., Tang, L., Wu, F. Q., Zhang, H. L., Yu, L. X., Zheng, L. Y., Li, Y. Q., Dong, W., He, Y. Q., Liu, Q., Zou, S. S., Lin, Y., Hu, L., Li, Z., Wu, M. C., & Wang, H. Y. (2012). Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice. *Hepatology*, *55*(1), 108-120. doi:10.1002/hep.24675
- Wei, M., Lu, L., Lin, P., Chen, Z., Quan, Z., & Tang, Z. (2016). Multiple cellular origins and molecular evolution of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett*, *379*(2), 253-261. doi:10.1016/j.canlet.2016.02.038
- Williams, M. J., Clouston, A. D., & Forbes, S. J. (2014). Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology*, *146*(2), 349-356. doi:10.1053/j.gastro.2013.11.034
- Woo, H. G., Wang, X. W., Budhu, A., Kim, Y. H., Kwon, S. M., Tang, Z. Y., Sun, Z., Harris, C. C., & Thorgeirsson, S. S. (2011). Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *140*(3), 1063-1070. doi:10.1053/j.gastro.2010.11.034
- Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., Zeng, S. S., Hayashi, T., Kondo, M., Takatori, H., Yamashita, T., Mizukoshi, E., Ikeda, H., Zen, Y., Takamura, H., Wang, X. W., & Kaneko, S. (2013). Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *57*(4), 1484-1497. doi:10.1002/hep.26168
- Yamashita, T., & Wang, X. W. (2013). Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J Clin Invest*, *123*(5), 1911-1918. doi:10.1172/JCI66024
- Yang, X. R., Xu, Y., Yu, B., Zhou, J., Qiu, S. J., Shi, G. M., Zhang, B. H., Wu, W. Z., Shi, Y. H., Wu, B., Yang, G. H., Ji, Y., & Fan, J. (2010). High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut*, *59*(7), 953-962. doi:10.1136/gut.2008.176271
- Yanger, K., Knigin, D., Zong, Y., Maggs, L., Gu, G., Akiyama, H., Pikarsky, E., & Stanger, B. Z. (2014). Adult Hepatocytes Are Generated by Self-Duplication Rather than Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2014.06.003
- Yanger, K., & Stanger, B. Z. (2011). Facultative stem cells in liver and pancreas: fact and fancy. *Dev Dyn*, *240*(3), 521-529. doi:10.1002/dvdy.22561

- Yoshida, L. S., Miyazawa, T., Hatayama, I., Sato, K., Fujimoto, K., & Kaneda, T. (1993). Phosphatidylcholine peroxidation and liver cancer in mice fed a choline-deficient diet with ethionine. *Free Radic Biol Med*, *14*(2), 191-199.
- Zajicek, G., Oren, R., & Weinreb, M., Jr. (1985). The streaming liver. *Liver*, *5*(6), 293-300.
- Zaret, K. S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet*, *9*(5), 329-340. doi:10.1038/nrg2318
- Zaret, K. S., & Grompe, M. (2008). Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science*, *322*(5907), 1490-1494. doi:10.1126/science.1161431
- Zen, Y., Adsay, N. V., Bardadin, K., Colombari, R., Ferrell, L., Haga, H., Hong, S. M., Hytiroglou, P., Kloppel, G., Lauwers, G. Y., van Leeuwen, D. J., Notohara, K., Oshima, K., Quaglia, A., Sasaki, M., Sessa, F., Suriawinata, A., Tsui, W., Atomi, Y., & Nakanuma, Y. (2007). Biliary intraepithelial neoplasia: an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. *Mod Pathol*, *20*(6), 701-709. doi:10.1038/modpathol.3800788
- Zender, S., Nicleleit, I., Wuestefeld, T., Sorensen, I., Dauch, D., Bozko, P., El-Khatib, M., Geffers, R., Bektas, H., Manns, M. P., Gossler, A., Wilkens, L., Plentz, R., Zender, L., & Malek, N. P. (2013). A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer Cell*, *23*(6), 784-795. doi:10.1016/j.ccr.2013.04.019
- Zhang, F., Chen, X. P., Zhang, W., Dong, H. H., Xiang, S., Zhang, W. G., & Zhang, B. X. (2008). Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence. *Histopathology*, *52*(2), 224-232. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02929.x
- Zhang, L., Theise, N., Chua, M., & Reid, L. M. (2008). The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology*, *48*(5), 1598-1607. doi:10.1002/hep.22516
- Zheng, Y. W., Tsuchida, T., Shima, T., Li, B., Takebe, T., Zhang, R. R., Sakurai, Y., Ueno, Y., Sekine, K., Ishibashi, N., Imajima, M., Tanaka, T., & Taniguchi, H. (2014). The CD133CD44 Precancerous Subpopulation of Oval Cells Is a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Stem Cells Dev*. doi:10.1089/scd.2013.0577
- Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C., & Llovet, J. M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, *149*(5), 1226-1239.e1224. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.061

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung während der Arbeit an meiner Dissertation bedanken.

Herrn Professor Dr. med. Roland M. Schmid danke ich für die Bereitstellung der technischen Einrichtungen an seinem Lehrstuhl.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. med. Fabian Geisler für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die exzellente, fortwährende Unterstützung und Hilfe zu jeder Zeit.

Nicht weniger möchte ich mich bei Dr. med. Petia Jeliaskova bedanken für die ausgezeichnete, intensive Betreuung, die sorgfältige Einarbeitung und Hilfe zu jedem Zeitpunkt.

Ebenso danke ich den weiteren Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Stefanie Dürl, Dr. rer. nat. Simone Jörs und Dr. med. Marc Ringelhan für Ihre fachliche und theoretische Hilfe und die geduldige Einarbeitung und die herzliche Atmosphäre.

Allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Am Ende, aber keinesfalls weniger, möchte ich meinen Eltern Hans und Anne Thalhammer danken, die mir die Beschäftigung mit der Dissertation in diesem Umfang erst ermöglichten und mich stets vor und während meines Studiums unterstützt haben.

Danke.