

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Unfallchirurgie

Proliferativer Einfluss von Erythropoetin auf Lebertumorzellen

Jan Neumann

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. K. Nüssler, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 24.08.2012 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2013 angenommen.

Für meine lieben Eltern Ingrid und Gerd Neumann

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	3
2	<i>Einleitung</i>	7
2.1	Die Leber	7
2.2	Hepatobiliäre Tumore	8
2.3	Tumorzelllinien	17
2.3.1	AKN 1	17
2.3.2	Hep 3B	17
2.3.3	Hep G2	18
2.3.4	SK Hep1	18
2.3.5	HUH7	19
2.3.6	HCC-T	19
2.3.7	HCC-M	20
2.4	Therapie hepatobiliärer Tumore	21
2.4.1	Physiologische Kontrolle entarteter Zellen	25
2.5	Erythropoetin	25
2.5.1	Synthese	25
2.5.2	Funktion und Physiologie	26
2.5.3	Einsatz von Erythropoetin in der Medizin	27
2.5.4	Protektiver Effekt von rhuEPO auf Leberzellen	28
2.5.5	Missbrauch von rhuEPO – Doping im Sport	29
2.5.6	Nebenwirkungen der Therapie mit rhuEPO	30
2.6	Darbepoetin alpha	31
2.7	Fragestellung der Doktorarbeit	31
3	<i>Materialien und Methoden</i>	34
3.1	Verbrauchsmaterialien	34
3.2	Geräte	38
3.3	Zelltypen und Zellmedium	40
3.4	Zellbehandlung: Passagieren einer Zelllinie	41

3.4.1	Materialien	41
3.4.2	Versuchsaufbau	41
3.5	Zellbehandlung: Zellen einfrieren und auftauen	42
3.5.1	Materialien	42
3.5.2	Versuchsaufbau	43
3.6	Zellbehandlung: Zellen zählen	43
3.6.1	Materialien	43
3.6.2	Versuchsaufbau	44
3.7	Isolation von primären Hepatozyten	45
3.7.1	Materialien	45
3.7.2	Versuchsaufbau	47
3.8	Harnstoffmessung	49
3.8.1	Hintergrund	49
3.8.2	Materialien	50
3.8.3	Versuchsaufbau	53
3.9	Glukosemessung	54
3.9.1	Hintergrund	54
3.9.2	Lösungen	55
3.9.3	Versuchsaufbau	57
3.10	Färbungen: Glucose-6-Phosphatase	58
3.10.1	Hintergrund	58
3.10.2	Lösungen	58
3.10.3	Versuchsaufbau	60
3.11	Färbungen: Perjodsäure-Schiff	61
3.11.1	Hintergrund	61
3.11.2	Lösungen	61
3.11.3	Versuchsaufbau	61
3.12	Färbungen: Ölrot (Sudanrot Färbung)	62
3.12.1	Hintergrund	62
3.12.2	Lösungen	62
3.12.3	Versuchsaufbau	63
3.13	Fluoreszenzmessung mit Alamar Blue	64
3.13.1	Materialien	64
3.13.2	Versuchsaufbau	64

3.14 Darbepoetin Toxizität Test.....	65
3.14.1 Materialien	65
3.14.2 Versuchsaufbau	65
3.15 Apoptose Analyse mit DNA Leiter	67
3.15.1 Materialien	67
3.15.2 Lösungen	68
3.15.3 Versuchsaufbau	69
3.16 Apoptose Analyse mit Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie).....	70
3.16.1 Hintergrund	70
3.16.2 Materialien	70
3.16.3 Lösungen	71
3.16.4 Versuchsaufbau	71
3.17 Proliferations-Test mit Darbepoetin	72
3.17.1 Materialien	72
3.17.2 Versuchsaufbau	72
3.18 Proteingewinnung und Western Blot Analyse	73
3.18.1 Materialien	73
3.18.2 Versuchsaufbau	77
3.19 Statistik	79
4 Ergebnisse	80
4.1 Zellcharakterisierung.....	80
4.1.1 Harnstoff- und Glukosemessung	80
4.1.2 Färbungen.....	83
4.2 Wirkung von DPO auf humane Hepatozyten und Lebertumorzellen	87
4.2.1 Verringerte Zellzahl einzelner Tumorzelllinien nach Stimulation mit DPO	87
4.3 DPO induzierte Apoptose in Tumorzellen	89
4.3.1 Kein Hinweis von Apoptose im DNA Laddering	89
4.3.2 Fluorescence activated cell sorting Analyse	91
4.4 Hemmende Wirkung von DPO auf die Proliferation von HUH7	94
4.5 Western Blot	95
4.5.1 Vermehrte Expression von p53 in HUH7 Zellen	96
4.5.2 Vermehrte Expression von p53 in Hep3B Zelle	97

5	<i>Diskussion</i>	98
6	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	106
7	<i>Verzeichnisse</i>	109
7.1	Tabellenverzeichnis	109
7.2	Abbildungsverzeichnis	109
7.3	Abkürzungsverzeichnis	110
7.4	Literaturverzeichnis.....	111

2 Einleitung

2.1 Die Leber

Die Leber ist das größte innere Organ des Menschen und macht beim Erwachsenen ca. 2,5 % des Gesamtgewichtes aus. Sie liegt im rechten Oberbauch im rechten Subphrenicum. Entsprechend ihrer portalvenösen Versorgung wird sie in 8 Segmente unterteilt. Die Segmente I-IV bilden die linke Leberhälfte und die Segmente V-VIII die rechte Leberhälfte. Die Blutversorgung der Leber erfolgt nach einem besonderen Prinzip. Den größten Teil des zuführenden Blutvolumens erhält die Leber über die V. portae (Pfortader). Die V. portae ist ein Zusammenfluss von venösem Blut aus dem Großteil der abdominalen Organen. Über die V. portae gelangt vor allem sauerstoffarmes Blut in die Leber. Die sauerstoffreiche, arterielle Blutversorgung der Leber, wird über die A. hepatica propria aus der Aorta sichergestellt.

Die abführenden Gefäße der Leber bilden die Vv. portae, welche schließlich in die V. cava inferior münden und das Blut zum rechten Herzen zurück in den großen Blutkreislauf leiten.

Die V. portae, welche das Blut aus dem Magen-Darm-Trakt sammelt und zur Leber führt, ist ein wesentlicher Bestandteil für die Funktionen der Leber. Aufgrund ihrer Blutversorgung ist sie das zentrale Stoffwechselorgan unseres Körpers. Eine wichtige Aufgabe ist die Entgiftungsfunktion der Leber. Medikamente, Drogen und andere Giftstoffe welche im Blut enthalten sind werden in der Leber metabolisiert und anschließend über die Galle ausgeschieden. Weitere Aufgaben der Leber liegen in der Synthese und Exkretion von Plasmaproteinen, Cholesterin, Galle und Harnstoff. Neben Lipoproteinen und Vitaminen, werden in der Leber auch Kohlenhydrate in Form von Glykogen gespeichert (52,74).

Die makroskopische Gliederung der Leber in ihre 8 Segmente wird weiter unterteilt in die Leberläppchen, die histologische Baueinheit der Leber. Ein Läppchen besteht aus Hepatozyten, Kapillargefäßen und einer Zentralvene. Die zwischen den Hepatozyten verlaufenden, aus Endothelzellen bestehenden, Kapillargefäße (Sinusoide) transportieren das Blut der Pfortader zur Zentralvene des Leberläppchens. Sie enthalten leberspezifische Makrophagen (Kupfer-Zellen) und Ito-Zellen. Die Ito-Zellen bestehen aus Fetttropfen und dienen der Speicherung von resorbiertem Vitamin A. Der Raum zwischen dem

Endothelzellen und den Hepatozyten wird als Disse-Raum bezeichnet. Über diesen perisinusoidalen Raum findet der Stoffaustausch mit den Hepatozyten statt. Die zwischen den Hepatozyten verlaufenden Gallenkanälchen transportieren die Galle Richtung Läppchen-Peripherie, wo sie über die interlobulären Gallengänge schließlich in die extrahepatischen Äste des Ductus hepaticus gelangt.

An den Eckpunkten einzelner benachbarter Leberläppchen findet sich das Glisson-Trias, welche jeweils einen Ast der Pfortader, ein Ast der Leberarterie und einen Gallengang enthält.

Eine zentrale Funktion in jedem Leberläppchen spielen die Hepatozyten. Diese Leberepithelzellen stellen mit einer Größe von 20-40 μm die kleinste histologische Einheit der Leber dar. Sie haben eine kuboide bzw. polygonale Form mit einem zentralen Zellkern. Einige der Hepatozyten sind auch durch 2 Zellkerne gekennzeichnet. Hepatozyten verfügen über eine starke Regenerationsfähigkeit. Im Durchschnitt beträgt ihre Lebensdauer 150 bis 180 Tage. Neben dem Zellkern besitzen sie weiterhin reichlich Zellorganellen wie z.B. raues endoplasmatisches Retikulum, einen Golgi Apparat, sowie Lysosomen und das glatte endoplasmatische Retikulum (28,86,92).

2.2 Hepatobiliäre Tumore

Veränderungen der Leber und des biliären Systems können aus verschiedenen Gründen auftreten. Es werden gutartige Veränderungen von bösartigen unterschieden. Aufgrund der vielen verschiedenen Zelltypen im Leberparenchym können diese Entartungen jeweils unterschiedlichen Ursprungs sein. Je nach Ursprung bzw. Entstehungsort der Neoplasie können sie weiter unterteilt werden in primäre und sekundäre Entartungen.

Verteilung der häufigsten hepatobiliären Tumore

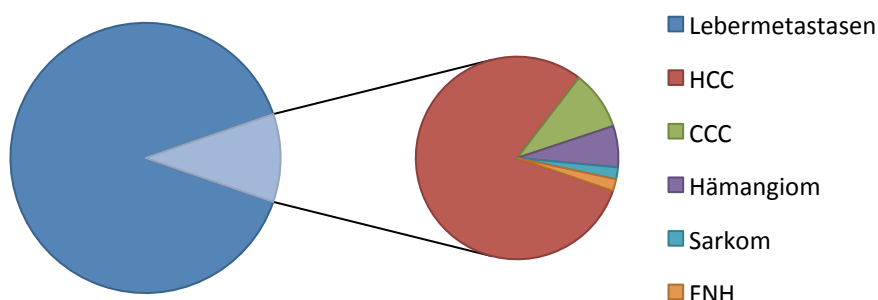


Abbildung 1 Verteilungsmuster der häufigsten hepatobiliären Tumore

HCC = Hepatozelluläres Karzinom, CCC = Cholangiozelluläre Karzinom, Hämangiom = kavernoöses Hämangiom, Sarkom = Hämangiosarkom, FNH = Fokal noduläre Hyperplasie (17,75)

Zu den primär gutartigen Erkrankungen zählt das kavernoöse Hämangiom. Es findet sich bei 0,5 – 0,7 % der Jugendlichen und Erwachsenen und ist damit die häufigste Veränderung aller primär gutartigen Lebertumoren. Frauen sind wesentlich häufiger betroffen als Männer, wobei in diesem Zusammenhang eine Hormonabhängigkeit, beispielsweise durch die Einnahme von Kontrazeptiva, des Tumors diskutiert wird. Die entarteten Zellen sind mesenchymalen Ursprungs und bilden in der Leber einen von Endothel ausgekleideten Hohlraum mit glatter Randbegrenzung. In über 90 % der Fälle finden sich ausschließlich solitär vorkommende Herde. Das kavernoöse Hämangiom zeigt nur selten eine klinische Symptomatik. Auftretende Komplikationen, wie die Ruptur des Hämangioms, sind eher selten. Häufig wird es als Zufallsbefund während der Oberbauchsonographie oder postmortal im Rahmen einer Obduktion festgestellt. Mithilfe der Sonographie lässt es sich diagnostisch durch seine echoreiche Struktur mit klarer Abgrenzung zum Leberparenchym als ein kavernoöses Hämangiom identifizieren (47,121).

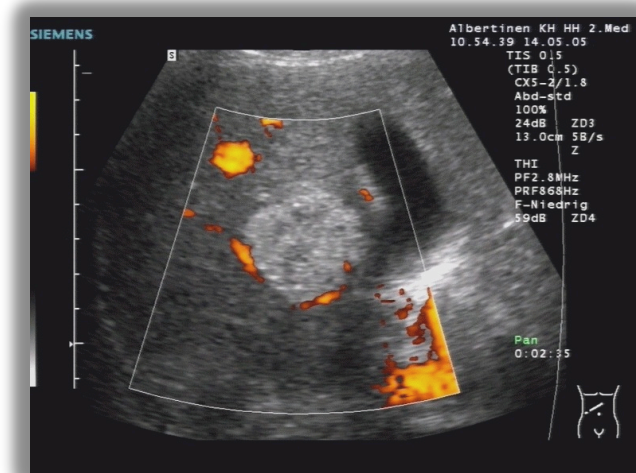


Abbildung 2 Kavernöses Hämangiom

Dargestellt ist eine Oberbauch-Sonographie. Im Bild ist eine echoreiche Struktur in Leber zu erkennen, welche das typische Bild eines kavernösen Hämangioms zeigt. (Modifiziert nach Sonographie-Atlas II. Medizin, Albertinen-Krankenhaus, Hamburg (3))

Eine weitere häufiger vorkommende gutartige Veränderung in der Leber ist die fokale noduläre Hyperplasie (FNH). Sie tritt gehäuft zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr auf. Der Tumor zeigt eine Hormonabhängigkeit und findet sich ebenfalls zu über 90 % bei Frauen. Pathologisch zeigt sich diese tumorartige Läsion als umschriebene, meist solitäre, Hyperplasie von strukturell normalen Hepatozyten. Während das Gallengangssystem erhalten bleibt, verlieren die Hepatozyten allerdings ihre normale Läppchenstruktur. Die versorgenden arteriellen Gefäße zeigen eine für den Tumor charakteristische sternenförmige Aufzweigung (Radspeichen-Struktur). Ein Übergang der Zellen in ein hepatozelluläres Karzinom ist bislang nicht beschrieben. Intermittierende Bauchmerzen sind unspezifische Symptome, welche sich aber nur in weniger als 10 % der Fälle zeigen. In der Sonographie sieht man in der Leber einen hyperechogenen, scharf begrenzten Herd. Mittels der Szintigraphie kann die fokale noduläre Hyperplasie eindeutig vom differentialdiagnostisch ähnlichen Leberzelladenom abgegrenzt werden. Gegebenenfalls kann zur weiteren Diagnostik auch ein CT oder MRT eingesetzt werden (30,47,124).

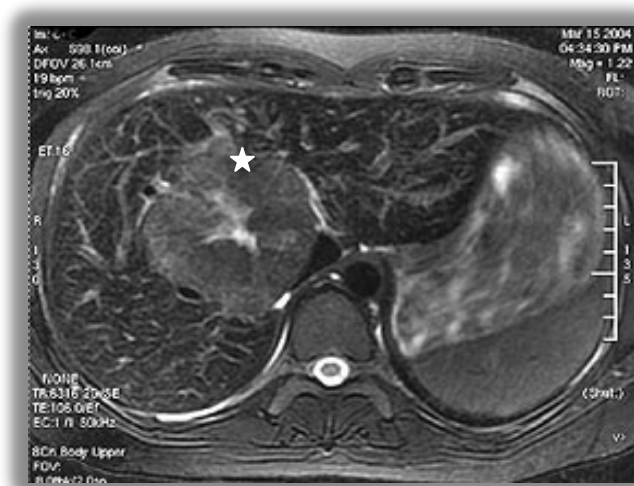


Abbildung 3 Fokal noduläre Hyperplasie

Dargestellt ist ein natives MRT Bild der Leber mit axialer Schichtführung in T2 Wichtung. Die fokal noduläre Hyperplasie stellt sich auf dem Bild als hypointense rundliche Struktur dar (). Kennzeichnend ist die zentrale Radspeichen-Struktur, welche auf dem Bild hyperintens aufleuchtet. (Modifiziert nach UniversitätsSpital Zürich – Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie (124))*

Das Leberzelladenom ist im Vergleich ein eher seltener gutartiger Tumor der Leber. Nachweislich zeigt sein Wachstum eine Hormonabhängigkeit und betrifft ebenfalls zu über 90 % nur Frauen v.a. im Alter von 15 bis 45 Jahren. Die Tumorzellen sind epithelialen Ursprungs. Wie auch die FNH entsteht das Leberzelladenom aus proliferierenden Hepatozyten welche ihre normale Zellstruktur behalten haben. Zusammen mit der nicht mehr vorhandenen Läppchenstruktur werden auch keine Gallengänge im Tumorgewebe ausgebildet. Eine Symptomatik wie Druckgefühl im Oberbauch oder uncharakteristische gastrointestinale Symptome zeigen sich nur in 50 % der Fälle. Der Übergang in ein hepatozelluläres Karzinom ist zwar möglich aber aktuell in der Literatur noch nicht beschrieben. In der Szintigraphie zeigt sich, im Gegensatz zur FNH, in der ersten Phase aufgrund der geringen Gefäßversorgung nur eine geringe Anreicherung im Tumorgewebe. In der späten Phase fehlen allerdings die abtransportierenden Gallengefäße und das Leberzelladenom fällt durch seine deutliche Anreicherung von Kontrastmittel auf (28,47).

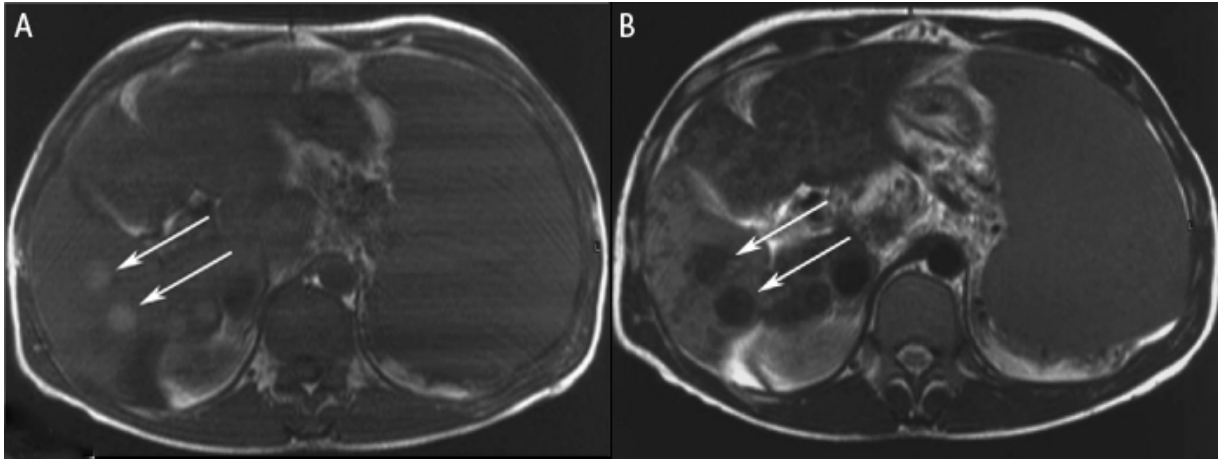


Abbildung 4 Leberzelladenom im MRT

Dargestellt ist ein natives MRT Bild mit axialer Schichtführung. In der T1 gewichteten Sequenz (Bild A) sieht man in der Leber 2 Herde mit hoher Signalintensität, während in der T2 gewichteten Sequenz (Bild B) die Herde eher hypointens dargestellt werden. (Modifiziert nach Layer van Kaick Delorme - Radiologische Diagnostik in der Onkologie (75))

Die Adenomatose ist eine sehr seltene Sonderform des Leberzelladenom. Sie zeigt keine Hormonabhängigkeit und tritt bei Männern und Frauen gleich häufig auf. Charakteristisch ist das Vorkommen von mehr als 10 Adenomen in einem sonst normalen Leberparenchym (15).

Entartete Zellen in der Leber können ihren Ursprung auch in extrahepatischem Gewebe haben. Das Cholangiom (Gallengangadenom) ist eine tumorartige Proliferation von epithelialen Zellen der Gallengänge und führt zu einem Sekretstau in den Gallengängen. Das gestaute Sekret kann in Form von solitären oder multiplen Zysten die ganze Leber durchsetzen. Kommt es anteilig noch zu einer vermehrten Bindegewebswucherung wird es als Cholangiofibrom bezeichnet (101).

Durch Zellwanderung, oder Verschleppung von Zellen finden sich teilweise noch viele weitere gutartige Veränderungen in der Leber. Neben den oben genannten Tumoren finden sich in der Leber u.a. auch Fibrome, Lipome oder Leiomyome (47).

Da aber viele dieser gutartigen Tumoren klinisch nur sehr selten auffällig werden, bleiben sie in der Mehrzahl der Fälle unentdeckt.

Während von gutartigen Leberveränderungen zum Großteil keine Gefahr für den Patienten ausgeht, sollte bei einer unklaren oder bösartigen Veränderung stets eine genaue Diagnostik durchgeführt werden. Nach schematischer Vorgehensweise stützt sich die Diagnostik auf vier Säulen: Die Klinik des Patienten, laborchemische Analysen, bildgebende Verfahren und die Histopathologie.

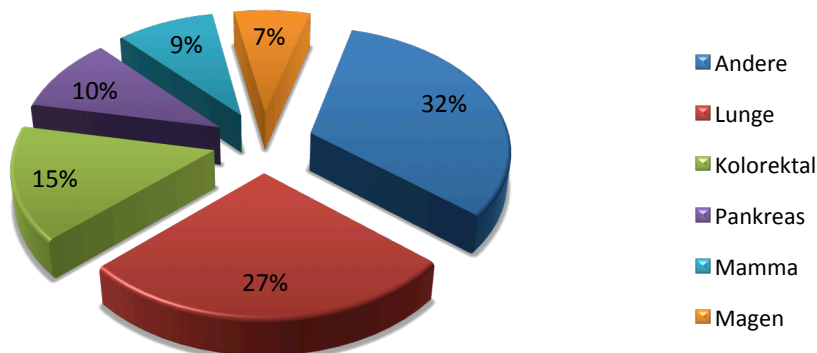
Viele bösartige Tumore können über einen langen Zeitraum klinisch stumm sein. Erst in fortgeschrittenen Stadien zeigen sich die ersten Symptome, wie z.B. Schmerzen im rechten Oberbauch oder eine lokale tastbare Raumforderung. Unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Müdigkeit, Nachtschweiß und Gewichtsverlust können ebenfalls ein Hinweis auf eine bösartige Veränderung sein. Verlegt der Tumor wichtige Strukturen, wie z.B. die abtransportierenden Gallengänge, zeigt sich eine zunehmende Gelbfärbung der Skleren bzw. im fortgeschrittenen Stadium auch an der Haut des Patienten (47,54).

Laborchemisch sollte vor allem das Alpha-1-Fetoprotein untersucht werden. Das Glykoprotein wird vermehrt von Lebertumorzellen freigesetzt und dient zur Verlaufskontrolle bzw. als Tumormarker von Lebertumoren (122). Leberspezifische Parameter wie GOT, GPT, γ -GT, AP, Albumin, INR und Bilirubin (9) sollten ebenfalls überprüft werden um Hinweise auf die Funktionsleistung der Leber zu erhalten.

Zur bildlichen Darstellung des Tumors eignet sich zunächst vor allem die Oberbauchsonographie. Sie ist in vielen Einrichtungen vorhanden und erlaubt eine erste nicht invasive Bildgebung der Leber. Zur genaueren Darstellung bzw. Lokalisation der Tumore kann eine kontrastmittelgestützte Computertomographie bzw. Magnetresonanztomographie eingesetzt werden. Um allerdings letztendlich Sicherheit über Art und Ursprung der Zellen zu erhalten, sollte jeweils von dem fraglich malignem Gewebe eine Probe entnommen werden um diese in der Histopathologie untersuchen zu lassen.

Bösartige Tumore in der Leber sind zu über 90 % sekundäre Entartungen in Form von Metastasen eines extrahepatisch gelegenen Primärtumors. Aufgrund der zentralen Lage der Leber in Bezug auf ihre Gefäßversorgung ist sie relativ häufig von Metastasen betroffen. Am häufigsten finden sich in der Leber Metastasen von einem Bronchial-, Kolorektal-, Pankreas-Mamma- und Magenkarzinom (117).

Häufigkeitsverteilung Lebermetastasen



Angaben nach J.R. Siewert, *Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie* (117)

Diagnostisch zeigen sich Metastasen in der Sonographie als teils multiple, echoarme Rundherde im Leberparenchym. Eine genauere Beurteilung erlaubt die Computertomographie. Metastasen stellen sich hier als rundliche/ovale hypodense Strukturen dar.

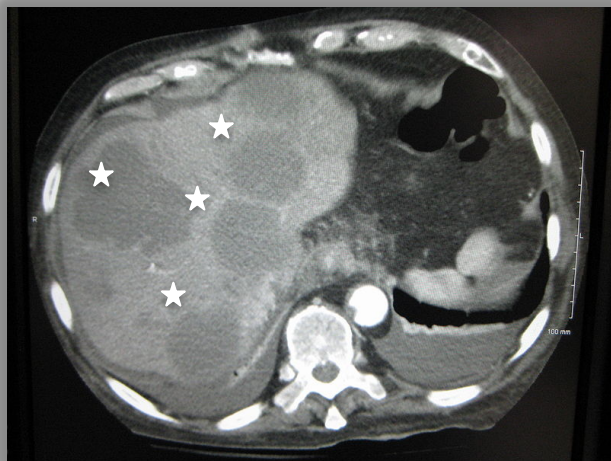


Abbildung 5 Lebermetastasen

Dargestellt ist ein axiales Schnittbild der Leber mittels Computertomographie nach Kontrastmittelgabe. Die Lebermetastasen zeigen sich hier als rundliche/ovale, im Vergleich zum Leberparenchym hypodense Strukturen (*). (Modifiziert nach James Heilamn, MD (51))

Wenn auch nur in einem prozentual geringerem Anteil, kommen in der Leber ebenfalls primär bösartige Veränderungen vor.

Das Hepatoblastom ist ein embryonaler Tumor unklarer Ätiologie, der vor allem im Kindesalter zwischen dem 6. Lebensmonat und 3. Lebensjahr auftritt. Er ist zu 60 – 70 % im rechten Leberlappen lokalisiert und zeigt eine Assoziation mit dem Beckwith-Wiedemann Syndrom und der familiären adenomatösen Polyposis. Das Hepatoblastom weist in der Sonographie eine erhöhte Echogenität auf. Hinweisend auf die Malignität des Tumors ist u.a. der Nachweis einer arteriellen Versorgung des Tumorgewebes. Zur genaueren Diagnostik empfiehlt sich eine Computertomographie bzw. Kernspintomographie (15,30,101).

Das Angiosarkom ist ein von Endothelzellen ausgehender Tumor. Ein Ursprung der Tumorzellen ausgehend von den Ito-Zellen ist ebenfalls möglich. Er zählt zu den 2 % aller primären Lebertumoren und betrifft vor allem Männer mit einer Inzidenz von $0,14-0,25 \times 10^6$ Einwohner. Makroskopisch zeigt sich eine schwammartige hämorrhagische Läsion. Sein multinoduläres Wachstum kann die gesamte Leber durchsetzen (29,110).

Das epitheloide Hämangioendotheliom ist eine weitere bösartige Veränderung der Leber und wird aufgrund seines langsamen Wachstums als niedrig maligne eingestuft. Zu 60 % betrifft er vor allem Frauen im 50. Lebensjahr. Bei unbekannter Ätiologie besteht der Verdacht einer Hormonabhängigkeit des Tumors infolge der Einnahme von Kontrazeptiva. Er wächst vor allem entlang präformierter Gefäßstrukturen und wird von daher auch als vaskulärer Lebertumor bezeichnet. Sein multifokales, intraazinäres Wachstum führt im Verlauf zu einer Atrophie der Hepatozyten (15,29).

Mit 10 – 20 % aller primären Lebertumoren, stellt das cholangiozelluläres Karzinom (CCC) eine häufiger vorkommende primäre maligne Entartung in der Leber dar. Als Ursache für die Entstehung des CCC wird eine dysplastische Epithelveränderung durch eine Punktmutation diskutiert. Zu 95 % findet sich beim CCC ein Adenokarzinom welches von seiner Lage in einen peripheren, zentralen und distalen Typ unterschieden werden kann. Von der Aufteilung her liegen 6 % rein intrahepatisch, 67 % zentral und 27 % perihilär. Das CCC tritt meist solitär auf und breitet sich intrahepatisch entlang der Gallengänge aus. Aufgrund der Lage besteht die Möglichkeit, dass der Tumor die Gallengänge komprimieren kann. Ein Risikofaktor für die Entstehung eines CCC ist die primär sklerosierende Cholangitis (29).

Die häufigste primäre maligne Entartung in der Leber ist das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Das HCC zeigt in Europa und in den USA eine zunehmende Inzidenz (54). Es stellt bei Frauen die 12. häufigste, sowie bei Männer die 7. häufigste Todesursache dar (103). Ätiologisch findet sich überwiegend eine zugrunde liegende Leberzirrhose, v.a. bedingt durch eine chronische Hepatitis B oder C Infektion, sowie chronischen Alkoholabusus oder eine Hämochromatose. Weiterhin kann sie auch medikamentös oder durch Aflatoxin bedingt sein. Aufgrund einer Mutation von ‚Caretaker‘-Genen kommt es zur Dysregulation von verschiedenen Kinasen und Wachstumsfaktoren, so das sich schließlich über eine adenomatöse Hyperplasie und Dysplasie ein HCC entwickeln kann. Makroskopisch zeigt sich eine scheckig gelbbraune Schnittfläche mit hellgelben Nekrosen und Blutungen. Es wächst meist solitär, multizentrisch und diffus infiltrierend (15,29,117).

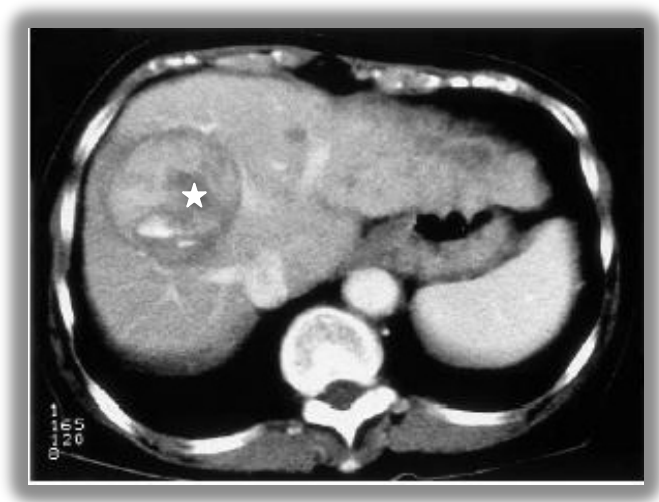


Abbildung 6 Hepatozelluläres Karzinom

Dargestellt ist ein axiales Schnittbild der Leber mittels der Computertomographie. Nach Kontrastmittelgabe zeigt sich das HCC in der Leber als rundlicher Herd, welcher in der portalvenösen Phase eine diffuse Anreicherung von Kontrastmittel zeigt (). (Modifiziert nach Deutsches Ärzteblatt 2001 (18))*

Das fibrolamelläre hepatozelluläre Karzinom stellt eine Sonderform des HCC dar. Es findet sich bei 1 – 5 % aller HCC Patienten. Besonders ist das Vorkommen von Tumorgewebe in einer nicht zirrhotischen Leber. Er tritt v.a. im 30. Lebensjahr auf und findet sich bei beiden Geschlechtern gleich häufig. Der gut abgrenzbare Tumor erreicht eine Größe von bis zu 10 cm und wächst meist solitär v.a. im Bereich des linken Leberlappens (29,30).

2.3 Tumorzelllinien

2.3.1 AKN 1

Die AKN1 Zellen wurden erstmals 1991 in Pittsburgh, USA aus humanen Leberzellen isoliert. Die Zellen verfügen über eine heterogene Zellpopulation, sowie viele Charakteristika von biliären Epithelien. Auf ihrer Oberfläche befinden sich epitheliale zytokeratinpolypeptide CK 8, 18 und 19. Zusätzlich können sie das anti-humane epithelial bezogene Antigen (MOC-31), sowie das humane epitheliale Antigen (HEA) exprimieren. Ebenso die Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, den hämatopoetischen Wachstumsfaktor, Stammzellen Faktoren und deren Rezeptoren. Obwohl die Fähigkeit Albumin zu produzieren nachgewiesen wurde, exprimieren die Zellen kein Albumin.

Sie wachsen in einem DMEM, Glukose angereichertem (4,5 g/l) Medium welches mit L-Glutamin, +10 % FCS, +1 % Penizillin/Streptomycin angereichert wird.

Die Zellen können mit 70 % Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO eingefroren und gelagert werden (95).

2.3.2 Hep 3B

Die Zelllinie wurde 1976 in Deutschland von einem 8 Jahre alten aus Afrika stammenden Jungen isoliert. Bezogen werden kann die Hep 3B Zelllinie über die Vertriebspartner der Health Protection Agency Culture Collections (25).

Die Hep 3B Zellen sind epithelialen Zellen, die einem hepatozellulären Karzinom entsprechen. Sie haben eine einschichtige Morphologie und verfügen beim Wachstum über adhärenente Eigenschaften. Um ihre Zellzahl zu verdoppeln benötigen sie ca. 40 – 50 Stunden. Die Zellen beinhalten Fragmente eines Hepatitis B Virus Genoms, wobei es unklar ist, ob die Zellen weiterhin infektiöse Hepatitis B Viren produzieren können und werden deshalb als Labor Kontaminierungsstufe 2 gehandhabt. Ursprünglich wurden die Zellen dazu genutzt um verschiedene Proteine wie z.B. Apha-fetoprotein, Albumin, Transferrin, alpha2-Makroglobulin, alpha1-Antitrypsin und Haptoglobin zu produzieren.

Sie wachsen in einem DMEM, Glukose angereichertem (4,5 g/l) Medium welches mit L-Glutamin, +10 % FCS, +1 % Penizillin/Streptomycin angereichert wird.

Die Zellen können mit 70 % Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO eingefroren und gelagert werden (2,26,66).

2.3.3 Hep G2

Die Zelllinie wurde 1975 in Argentinien während der Biopsie der Leber eines 15 Jahre alten Jungen mit einem hepatozellulären Karzinom isoliert. Bezogen werden kann die Hep G2 Zelllinie über die Vertriebspartner der Health Protection Agency Culture Collections (25).

Im Gegensatz zu der Hep 3B Zelllinie wurde in den Hep G2 Zellen kein Genom zur Produktion von Hepatitis B Viren gefunden. Die Zellen sind in der Lage verschiedene Proteine wie z.B. Alpha-Fetoprotein, Albumin, alpha2-Makroglobulin, alpha1-Antitrypsin, Transferrin, alpha1-Antichymotrypsin, Haptoglobin, Ceruloplasmin, Plasminogen, Komplement (C3, C4), C3 Aktivator, Fibrinogen, alpha1-Acid Glykoprotein, alpha2-HS Glykoprotein, β -Lipoprotein und Retinolbindungsprotein zu produzieren. Die Zellen haben eine endotheliale, einschichtige Morphologie mit adhärenenten Eigenschaften und wachsen in kleinen Aggregaten. Sie können in 50-60 Stunden ihre Zellzahl verdoppeln.

Sie wachsen in einem DMEM, Glukose angereichertem (4,5 g/l) Medium welches mit L-Glutamin, +10 % FCS, +1 % Penizillin/Streptomycin angereichert wird.

Die Zellen können mit 70 % Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO eingefroren und gelagert werden (2,26,66).

2.3.4 SK Hep1

Die SK Hep1 Zellen wurden 1971 in den USA aus einem Leberteileresektat eines 52 Jahre alten Mann isoliert, welcher mit Aszites unter einem Adenokarzinom der Leber gelitten hat.

Bezogen werden kann die SK Hep1 Zelllinie über die Vertriebspartner der Health Protection Agency Culture Collections (25).

Die Zellen haben eine endotheliale, einschichtige Morphologie und verfügen beim Wachstum über adhärente Eigenschaften. Sie benötigen ca. 30 Stunden um ihre Zellzahl zu verdoppeln. Ihr Karyotyp ist hyperdiploid bis hypertriploid.

Sie wachsen in einem DMEM, Glukose angereichertem (4,5 g/l) Medium welches mit L-Glutamin, +10 % FCS, +1 % Penizillin/Streptomycin angereichert wird.

Die Zellen können mit 70 % Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO eingefroren und gelagert werden (26).

2.3.5 HUH7

Die Zellen entstammen aus einem humanen Leberzellkarzinom und wurden 1982 in Okayama aus der Leber eines 57 jährigen Japaner isoliert. Bezogen werden kann die HUH7 Zelllinie über die Vertriebspartner der Japanese Collection of Research Bioresources (14).

Die Zellen haben eine endotheliale, einschichtige Morphologie und verfügen beim Wachstum über adhärente Eigenschaften. In den Zellen wurde kein positiver Nachweis für das Vorhandensein von Virus DNA gefunden.

Sie wachsen in einem DMEM, Glukose angereichertem (4,5 g/l) Medium welches mit L-Glutamin, +10 % FCS, +1 % Penizillin/Streptomycin angereichert wird.

Die Zellen können mit 70 % Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO eingefroren und gelagert werden (59).

2.3.6 HCC-T

Die HCC-T Zelllinie wurde uns freundlicherweise von der Forschungsgruppe Molekulare Hepatologie des Universitätsklinikum Mannheim – Fakultät für Klinische Medizin Mannheim unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Steven Dooley zur Verfügung gestellt (34).

Die Zellen wurden aus dem Resektat eines 69-jährigen Japaner gewonnen, welcher unter einem Hepatozellulären Karzinom mit komplizierender Leberzirrhose gelitten hat. Der gemessene Alpha-1-Fetoprotein Wert des Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation 570 ng/ml. In der Anamnese des Patienten war kein intensiver Alkoholkonsum bekannt. In der Radioimmunassay zeigten die Zellen keinen Nachweis für eine Hepatitis A oder B Infektion. In der Kultivierung zeigen die polygonalen Zellen eine typische epitheliale Zellmorphologie mit adhärenenten Eigenschaften. Sie benötigen ca. 24 Stunden um ihre Zellzahl zu verdoppeln.

Sie wachsen in einem DMEM, Glukose angereichertem (4,5 g/l) Medium welches mit L-Glutamin, +10 % FCS, +1 % Penizillin/Streptomycin und 2,5 % HEPES angereichert wird.

Die Zellen können mit 70 % Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO eingefroren und gelagert werden (107).

2.3.7 HCC-M

Die HCC-M Zelllinie wurde uns ebenfalls freundlicherweise von der Forschungsgruppe Molekulare Hepatologie des Universitätsklinikum Mannheim – Fakultät für Klinische Medizin Mannheim unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Steven Dooley zur Verfügung gestellt (34).

Die Zelllinie entstammt einem HbsAg positiven hepatozellulären Karzinom, welches von einem männlichen Japaner entnommen wurde. Das Vorhandensein einer Hepatitis B Infektion konnte in den Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Zellen verfügen über adhärenente Eigenschaften und zeigen eine epitheliale einschichtige Morphologie. Während die Sekretion von Alpha-1-Fetoprotein bei den Zellen nicht nachgewiesen worden ist, verfügen die HCC-M Zellen passager über die Fähigkeit Albumin zu produzieren. Zur Verdopplung ihrer Zellzahl benötigen sie ca. 24 Stunden.

Sie wachsen in einem DMEM, Glukose angereichertem (4,5 g/l) Medium welches mit L-Glutamin, +10 % FCS, +1 % Penizillin/Streptomycin und 2,5 % HEPES angereichert wird.

Die Zellen können mit 70 % Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO eingefroren und gelagert werden (129).

2.4 Therapie hepatobiliärer Tumore

Initial sollte vor Therapiebeginn unterschieden werden, ob es sich um eine gutartige oder bösartige Veränderung handelt. Während bei allen bösartigen Lebertumoren eine kurative Therapie angestrebt werden sollte, können viele gutartige Veränderungen in vitro unter regelmäßiger Kontrolle belassen werden. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass von ihnen keine Gefahr der Entartung ausgeht und sie klinisch unauffällig sind. Besteht Therapiebedarf, kann bei einer gutartigen Veränderung der Tumor mittels einer Enukleation bzw. Keilresektion entfernt werden. Diese Methoden gelten als sicher und können meist mit nur einem minimalen Blutverlust durchgeführt werden (61).

Ist die Diagnose eines bösartigen Lebertumors gestellt, richtet sich die Therapie zum einen nach der Art und Stadium des Tumors, der noch vorhandenen Leberfunktion sowie dem Allgemeinzustand des Patienten.

Potentiell kurativ ist vor allem die chirurgische Therapie im Rahmen einer Resektion bzw. in ausgewählten Fällen eine Hepatektomie mit anschließender Lebertransplantation. Um eine kurative R0 – Resektion zu erreichen, sollte die Resektion eines Lebertumors mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1 cm zwischen Resektions- und Tumorrand durchgeführt werden. Des Weiteren sollte die Resektion unter technischen und funktionellen Aspekten durchführbar sein. Das Tumorgewebe muss klar abgrenzbar sein und es sollten mindestens 2 Lebersegmente mit ausreichender Größe und vaskulärer Versorgung sowie biliärer Drainage belassen werden (15).

Der Grad der Leberzirrhose ist beim hepatozellulären Karzinom ein limitierender Faktor für die chirurgische Resektion des Tumorgewebes. Sie ist für die Therapieplanung von entscheidender Bedeutung, da abhängig vom Grad der Zirrhose die Leber in ihrer Regeneration und Funktion stark eingeschränkt sein kann. Bei bereits stark zirrhotisch verändertem Leberparenchym hat sich daher eine Lebertransplantation bewährt, bei welcher die Prognose-bestimmende Leberzirrhose gleich mit behandelt wird (64).

Da ein solcher Eingriff auch immer eine Belastung für den Körper darstellt, sollte die Operation nur durchgeführt werden, wenn der Patient für die Operation körperlich ausreichend belastbar ist. Ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten verschlechtert zugleich das perioperative Outcome (72). Neben der lebenslangen Einnahme von

Immunsuppressiva, was durch eine gute Compliance des Patienten gesichert werden sollte, müssen auch die peri- und postoperativen Risiken individuell berücksichtigt werden. Eine Abstoßung des Transplantats, oder das Auftreten von Thrombosen in der Leberarterie nach einer orthotopen Lebertransplantation sind seltene, aber schwerwiegende Komplikationen und erfordern in den meisten Fällen eine weitere chirurgische Intervention (119). Nicht zuletzt besteht aber das größte Problem in der Verfügbarkeit von Spenderorganen. Durch einen großen Mangel an Spenderorganen müssen viele Patienten lange auf eine Transplantation warten.

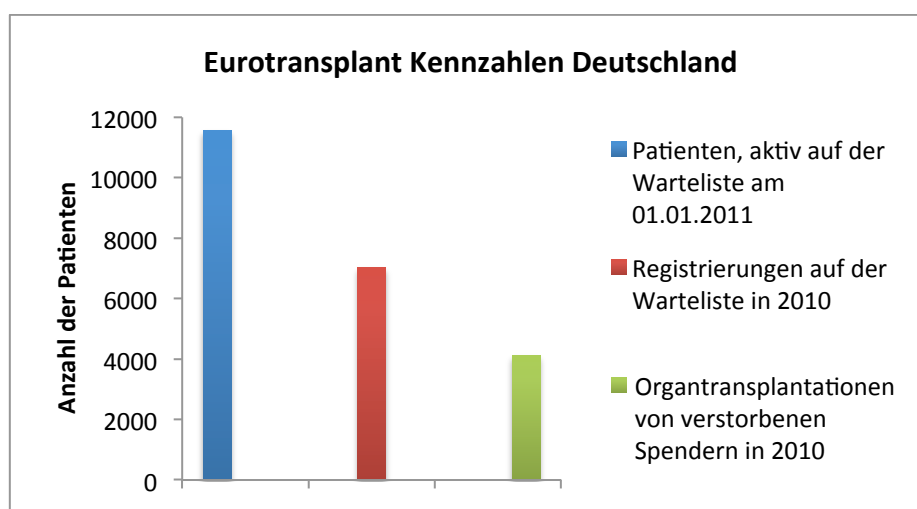


Abbildung 7 Eurotransplant Warteliste in Deutschland (43)

Eine lange Wartezeit führt wegen des progredienten Tumorwachstums oftmals zum sekundären Ausschluss der Patienten. Zur Überbrückung der Wartezeit stehen therapeutisch neben der Chirurgie noch weitere so genannte lokal ablativ Verfahren zur Verfügung (132).

Zu nutzen gemacht werden kann sich hier die überwiegend arterielle Versorgung des Tumors. Bei einer transarteriellen Chemoembolisation (TACE) bzw. transarteriellen Embolisation (TAE) wird die A. hepatica propria sondiert und das Kontrastmittel Lipiodol zusammen mit einem Chemotherapeutikum injiziert. Die Versorgung des Tumors wird unterbunden und gleichzeitig kann mithilfe des Kontrastmittels eine eventuell noch vorhandene Restversorgung des Tumors angiographisch dargestellt werden (15). Vor allem bei Patienten mit einem multinodulär auftretenden Leberzellkarzinomen kann die TACE als Therapie der Wahl angesehen werden (35).

Kleinere Tumore mit einer Größe von bis maximal 5 cm und nicht mehr als 3 Herden können alternativ auch mit einer perkutanen Ethanol-Injektionstherapie behandelt werden. Unter Ultraschallkontrolle wird eine 95 %ige Ethanollösung in das Tumorgewebe appliziert. Folglich kommt es zu einem nekrotischen Zelluntergang im Zielgewebe. Eine ähnliche Strategie verfolgt auch die radiofrequenzinduzierte Thermoablation (RITA) bzw. die laserinduzierte Thermoablation (LITT). Durch die induzierte lokale Erwärmung des Tumorgewebes wird das entartete Gewebe zerstört (106).

Viele experimentelle Therapiestrategien wie z.B. die Immun- bzw. Gentherapie, eine Therapie mit onkolytischen Viren, oder die Anwendung von Angiogenese- und Cyclooxygenase Inhibitoren befinden sich zum größten Teil noch in der Theorie (47). Die Untersuchung der molekularen Pathophysiologie des HCC konnte aber bereits zeigen, dass Wachstumsfaktoren und ihre entsprechenden Rezeptoren beim HCC häufig überexprimiert bzw. dysreguliert sind. Eine spezifische Blockade dieser Signalkaskaden könnte für die Therapie des HCC sehr wertvoll sein (58). In dieser Hinsicht konnten bereits erste Therapieerfolge mit Kinase-Inhibitoren erzielt werden. Der Kinase-Inhibitor Sorafenib blockiert die Serin-Threonin-Kinasen RAF-1 und die Tyrosinkinase des VEGF von Tumorzellen. Am Mausmodell konnte in präklinischen Studien durch die Gabe von Sorafenib eine Abnahme der Tumorangiogenese und Signalaktivität in Leberzellkarzinomen erreicht werden. Weitere klinische Studien zeigten nach Gabe von Sorafenib eine verlängerte Überlebenszeit von bis zu 3 Monaten bei Patientinnen, welche an einem Leberzellkarzinom erkrankt waren (80).

Im Vergleich zur kurativen Therapie von Lebertumoren sind die Ergebnisse einer Therapie mit Sorafenib zwar marginal, zeigen aber dennoch das Potential und die Wichtigkeit die Signalkaskaden der Tumorzellen besser zu verstehen und zu analysieren.

Neue experimentelle Studien konzentrieren sich vor allem auf das Membranprotein Glypican 3 (GPC3). GPC3 ist ein Glykosylphosphatidylinositol und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Migration der Tumorzellen. Während die Expression von GPC3 bei Cholangiokarzinomen, Adenokarzinom und benignen Leberläsionen nur selten nachgewiesen wurde, zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der GPC3 Expression bei Patienten mit einem HCC (137). Interessant ist somit der Einsatz von GPC3 als

Biomarker für frühe hepatozelluläre Karzinome (4), sowie auch als potentielle Zielstruktur in der Antikörper Therapie von Leberzellkarzinomen (56).

Kommen experimentelle Verfahren nicht in Frage und stellt sich der zu operierende Tumor initial als nicht resektabel dar, kann versucht werden die Tumormasse durch eine neoadjuvante Radio- bzw. Chemotherapie zu verkleinern.

Aufgrund der hohen Strahlenempfindlichkeit ist der Stellenwert der Strahlentherapie beim Leberkarzinom noch ungesichert. Bei einer großflächigen Bestrahlung des Organs dürfen die Werte 25-30 Gy nicht überschritten werden, da ansonsten schwere Hepatitiden auftreten können (102). Die Kombination von Strahlentherapie und Radiofrequenzablation kann allerdings bei inoperablen Lebermetastasen als sichere und relativ wirksame Methoden angesehen werden (116). Speziell die Kombination einer neoadjuvanten Chemotherapie zusammen mit einer anschließenden chirurgischen Resektion des Tumors wird als zukunftsweisend für die Verbesserung der Überlebensrate bei Patienten mit inoperablen Lebermetastasen angesehen (93).

Bei einer systemischen Chemotherapie werden allerdings nicht nur die entarteten Zellen angegriffen und zerstört, sondern ebenso auch körpereigene Zellen. Betroffen sind vor allem Zellen mit einer hohen Zellteilungsrate, wie z.B. die blutbildenden Zellen im Knochenmark. Durch den Verlust der blutbildenden Zellen im Knochenmark leiden die Patienten oft unter einer Anämie. Sie werden anfälliger für Infektionen und das abnehmende zirkulierende Blutvolumen führt zu einem absoluten Sauerstoffmangel. Allgemein leiden Patienten während einer Chemotherapie unter einer stark eingeschränkten Lebensqualität (55).

Um den Patienten trotz der Schwere der Erkrankung und therapiebedingter Nebenwirkungen eine angemessene Lebensqualität zu ermöglichen, sind weitere therapieunterstützende Maßnahmen notwendig. In diesem Zusammenhang wird rekombinantes Erythropoetin eingesetzt. Eine Anämie, welche während der Chemotherapie von kanzerogenen Erkrankungen auftritt, kann mit der Gabe von rhuEPO effektiv korrigiert werden (50).

2.4.1 Physiologische Kontrolle entarteter Zellen

Neben der konventionellen Medizin verfügt der Körper über eigene Mechanismen, um das Zellwachstum zu überwachen und zu kontrollieren. Das Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher über eine Aktivierung von Proteinkomplexen bei Schäden der DNA den Zellzyklus an bestimmten Kontrollpunkten anhalten kann (126). Wird ein solcher Schaden registriert, entfaltet p53 seine Wirkung über eine Arretierung des Zellzyklus mit anschließender Reparatur des Genomschadens. Über weitere p53-abhängige Signale kann im Falle eines schweren Schadens die Zelle mittels Aktivierung eines terminalen Zellzyklusarrest zur Apoptose und dem damit verbundenen Zelltod übergeleitet werden (45,114). Gleiches gilt auch für die Onkologie, in welcher man aufgrund seiner Überexpression in malignen Tumoren auf p53 aufmerksam wurde (89). Besonders hier ist p53 aufgrund seiner Funktion als Wächter des Genoms von essentieller Bedeutung, um eine weitere Proliferation von entarteten Tumorzellen zu verhindern (70). Dabei ist allerdings zu beachten, dass sich bei über 50 % der malignen Zellen eine mutierte Form von p53 finden lässt. Dies führt dazu, dass es in seiner eigentlichen Funktion gestört ist und die Zellen ungehindert proliferieren können (82,123). Als wichtiger Bestandteil der Tumorkontrolle (82) steht p53 immer wieder im Mittelpunkt der Tumorforschung, um über eine gezielte Aktivierung von p53 das proliferative Verhalten von Tumorzellen beeinflussen zu können (24,135)

2.5 Erythropoetin

2.5.1 Synthese

Erythropoetin ist ein Glykoproteinormon aus 164 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 24 kD (31), welches die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen fördert. Primär erfolgt die Synthese in den peritubulären kapillären Endothelzellen der Nieren. Außerhalb der Niere übernehmen die Hepatozyten einen Teil der Synthese von Erythropoetin (67).

Die tubulären Anteile der Niere, welche über Sensoren verfügen die den Sauerstoffgehalt des Blutes messen können, sitzen im proximalen Anteil des Nierentubulus (12). Diese Kontrolle verläuft über den hypoxia-inducibletranscriptionfactor (HIF), mit einer beta- und 2 Sauerstoff regulierenden HIF-alpha Untereinheiten (HIF alpha 1 und HIF alpha2). Unter normalen Sauerstoffverhältnissen sind beide alpha Untereinheiten hydroxiliert, was zu deren proteasomalen Degradation führt. Erst unter Hypoxie kann der HIF nicht mehr hydroxiliert werden und bleibt stabil (36). Unter hypoxischen Zuständen bindet alpha 1 an HIF-1beta. Das daraus resultierende Heterodimer1 bindet an die auf eine Hypoxie reagierenden Elementen im Zellkern (CREB-bindingprotein). Durch den Zusammenschluss mit weiteren Proteinen, u.a. dem transcriptioninitiationcomplex (TIC) entsteht ein Proteinkomplex der an die '3-Flanke des 5'-RCGTG-'3 bindet und weitere aktivierende Moleküle rekrutiert. Dies führt zu einer verstärkten mRNA Synthese und einer Produktion von Proteinen die letztendlich zu einer physiologischen Wiederherstellung des Sauerstoffgehalts führen (41).

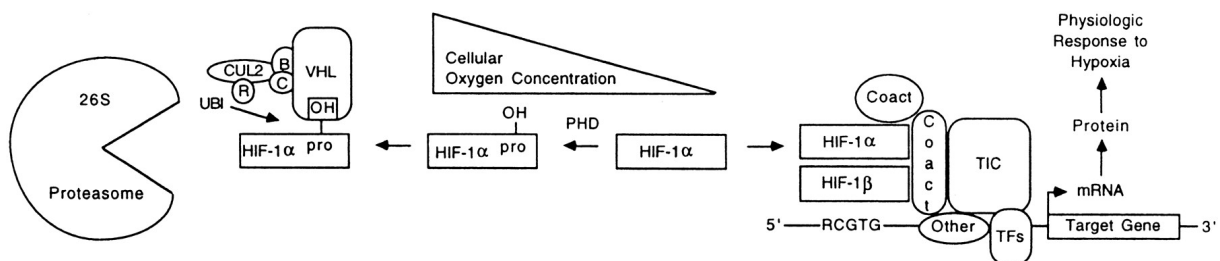


Abbildung 8 Regulation der HIF-1 α Expression durch zelluläre Sauerstoffkonzentration [4]

2.5.2 Funktion und Physiologie

Die Hauptfunktion von Erythropoetin liegt in der Steuerung der Erythropoese. Ein Vorgang bei dem im Rahmen der Hämatopoese hämatopoetische Stammzellen aus den blutbildenden Zellen des Knochenmarks in Erythrozyten umgewandelt werden.

Dieser Vorgang erfolgt von Geburt an und kann in Bedarfssituationen noch zusätzlich gesteigert werden. Hypoxische Zustände, sowie der allgemeine Mangel an Blut im Rahmen einer Anämie führen zu einer verstärkten Synthese von Erythropoetin mit dem Ziel das Blutvolumen und den damit verbundenen Sauerstoffgehalt wieder zu normalisieren. Anabole Zustände, wie sie unter intensiven Ausdauertraining oder dem körperlichem

Training in größerer Höhe vorkommen, führen ebenfalls zu einer gesteigerten Synthese von Erythropoetin.

Erythropoetin bindet an erythroide Vorläuferzellen im Knochenmark, welche auf ihrer Oberfläche einen Erythropoetin-Rezeptor exprimieren. Dies führt zu dem Ergebnis der Zellproliferation und Differenzierung von erythroiden Stamm- und Vorläuferzellen (41). Durch die Stimulation der Zelldifferenzierung wird die Hämatopoese angeregt, welche resultierend im Endergebnis eine gesteigerte Erythrozytenproduktion ergibt.

2.5.3 Einsatz von Erythropoetin in der Medizin

Die normale EPO Konzentration im Menschen beträgt 1.1 zu 27.3 mU/ml für MD EPO und 0.5 zu 16.7 mU/ml für AG EPO (88). Wie bereits erwähnt, liegt die Hauptaufgabe von EPO in der Steuerung der Hämatopoese. Mithilfe von DNA Technologie konnte das verantwortlich Gen für die EPO Produktion molekular geklont, sequenziert und in biologisch aktiven Säugetierzellen hergestellt werden (105). In der Medizin erlangte rekombinantes EPO (rhuEPO) einen hohen Stellenwert in der Therapie des renalen Nierenversagens zur Korrektur einer infolge von EPO Mangel entstehenden Anämie mit Wiederherstellung des normalen Hämatokrit-Wert. Eine Anämie ist laut der WHO definiert für einen Hämoglobin Wert < 13 g/dl für Männer und <12 g/dl für Frauen. Der Erfolg der Therapie ist, das die Patienten keine Transfusionen mehr benötigen und die damit verbundenen Risiken wie immunologische Reaktionen, Infektionen oder ein Eisenüberschuss vermieden werden können (38).

Als therapiebegleitende Maßnahme wird die Gabe von rhuEPO auch in der Onkologie eingesetzt. Eine chemotherapeutisch bedingte Anämie kann durch die Gabe von rhuEPO effektiv korrigiert werden (50). Ähnlich wird auch in der HIV Therapie rhuEPO genutzt um die knochenmarksschädigende Nebenwirkung des, während der HAART genutzten, Medikaments Zidovudin zu behandeln (62). Patienten mit einem EPO Level <500 IU/L erreichen durch den Einsatz von rhuEPO einen normalen Hämatokrit bei gleichzeitige Verminderung der benötigten Transfusionen (53). In der Chirurgie wird rhuEPO präoperativ eingesetzt, um bei Operationen mit zu erwartetem größerem Blutverlust eine anschließend benötigte allogene Transfusionen zu vermeiden (6).

Allgemein finden sich noch weitere Einsatzgebiete von rhuEPO zur Behandlung einer krankheitsassoziierten Anämie. Dazu gehören u.a. die rheumatoide Arthritis, allg. chronisch entzündliche und infektiöse Erkrankungen, myelodysplastische Syndrome oder Schwangerschaftsanämien (41).

2.5.4 Protektiver Effekt von rhuEPO auf Leberzellen

Mit der Option einer Resektions- bzw. Transplantationschirurgie bei Patienten mit Lebertumoren besteht zwar die Möglichkeit einer kurativen Therapie, jedoch können auch diese Methoden perioperativ zu Komplikationen führen. Während der Transplantation bzw. der Vorbereitungsphase ist die zu transplantierende Leber oft einer längeren Ischämiezeit ausgesetzt (115). Durch die anschließende Reperfusion der Leber in vitro kommt es durch Vasokonstriktion, Schwellung der Endothelzellen und Thrombozytenaggregation meist noch zu einer erweiterten Ischämiezeit im Lebertransplantat. Die Folge ist eine Aktivierung von Kupferzellen und neutrophilen Granulozyten, welche die Leberzellen noch zusätzlich schädigen können (27,90). Ein Anstieg von inflammatorischen Zytokinen und TNF- α wurde bereits während der Ischämie/Reperusionsphase beobachtet (136).

RhuEPO hat neben dem Effekt der gesteigerten Hämatopoese auch eine verstärkte proliferative Wirkung auf die Angiogenese (21), sowie antioxidative (5) und antiapoptotische (63) Eigenschaften. In Bezug auf das perioperative Management der Leberchirurgie könnte sich somit die Gabe von rhuEPO auch protektiv auf die Leberzellen während der Ischämie/Reperusionsphase ausüben (141). Versuche mit Ratten zeigten, dass es jeweils durch die Gabe von rhuEPO nach subtotaler Hepatektomie bzw. partieller Leberteileresektion zu einem verbesserten perioperativen Ergebnis in Bezug auf die Regeneration der Leberzellen kam. Durch eine gesteigerte Reperfusion zeigten die Leberzellen eine erhöhte Regenerationsfähigkeit bei gleichzeitiger Abnahme der Apoptose- und Nekroseaktivität (108). Dies zeigte sich vor allem durch eine geringere Caspase3-Aktivität und verbesserten Leberenzymwerte im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe (49).

2.5.5 Missbrauch von rhuEPO – Doping im Sport

Während die Anpassung einer Anämie auf physiologische Werte vor allem bei kranken Patientinnen das vorrangige Ziel ist, kann die Steigerung des Hämatokrit- bzw. Hämoglobinlevels über den Normbereich hinaus auch zu „positiven“ Effekten in Bezug auf die körperliche Leistung führen. In Relation zum steigenden Blutvolumen ist der Körper in der Lage mehr Sauerstoff aufzunehmen und zu transportieren. Dies machen sich vor allem Sportler zu Nutzen, um ihre Leistung durch Doping noch weiter zu steigern.

Im Sinne des klassischen Blut-Dopings nutzte man die Möglichkeit durch die Gabe von homologen oder autologen Bluttransfusionen das Blutvolumen effektiv zu erhöhen um einen leistungssteigernden Effekt zu erzielen. Auf professioneller Ebene benötigt dieses Verfahren aber zum einen eine gewisse Infrastruktur, sowie qualifizierte Hilfe bei der Applikation der Blutprodukte. Im Vergleich zur Bluttransfusion stellt sich somit die intravenöse oder subkutane Anwendung von rhuEPO als wesentlich einfacher dar um den gewünschten Effekt zu erreichen (120).

Mit der Entwicklung von rhuEPO entstanden auch die ersten Gerüchte über den Einsatz von rhuEPO als Dopingmittel im Sport. Ersten Berichten zufolge soll es bereits bei den Olympischen Winterspielen 1988 in Calgary, Kanada zum Doping Missbrauch von rhuEPO gekommen sein (23). Unter Verdacht standen vor allem ausdauernde Sportarten wie Cross-Country Skiing, Fahrradfahren, Langlauf und Triathlon. Während rhuEPO bereits seit seiner Existenz auf der Liste der verbotenen Substanzen der World Anti-Doping Agency (WADA) steht, ist es auch seit 1990 auf der Liste der Verbotenen Substanzen vom Internationalen Olympischen Komitee (IOC) zu finden (33,120).

Der Nachweis von EPO-Doping gelingt meist mittels isoelektrischer Fokussierung und Immunblot der Medikamente im Urin. Während die Aminosäuresequenz von humanen EPO und rhuEPO gleich ist, unterscheiden sie sich jedoch in sich doch in der Struktur ihrer Glykane. Mittlerweile gibt es aber viele weitere Erythropoese-stimulierende Substanzen (ESA), so dass der Nachweis zunehmend schwieriger wird (60).

Obwohl die Leistungssteigerung durch Doping mit rhuEPO verboten ist, finden sich auch heutzutage immer wieder Sportler welche unter dem Verdacht stehen rhuEPO genutzt zu haben, bzw. dies auch erwiesenermaßen getan haben.

2.5.6 Nebenwirkungen der Therapie mit rhuEPO

Eine verlängerte Gabe von rhuEPO führt, unabhängig vom Hämatokrit und Vasokonstriktion der Gefäße, zu einer Erhöhung des Blutdrucks (125). mRNA von EPO Rezeptoren auf endothelialen Vorläuferzellen zeigte, dass eine verkürzte Form des EPO Rezeptors auf den Zellen existiert, welcher als negativer EPO induzierter Rezeptor zu einer Blutdruckerhöhung führt. Das Verhältnis der gekürzten EPO Rezeptoren steht zu den normalen Rezeptoren in einer inversen Korrelation zur Produktion von cGMP, einem zellulären Botenstoff der u.a. an der Regulation des Blutdrucksystems beteiligt ist (81). Im Rahmen der Proliferation von Endothelzellen übt rhuEPO einen positiven Effekt auf die Angiogenese aus. RhuEPO fördert die Freisetzung von Endothelin-1 (ET-1), welches von den Endothelzellen freigesetzt wird. Die erhöhte Konzentration von ET-1 führt zur einer verstärkten Angiogenese mit vermehrter Zellwanderung (21).

Während rhuEPO in der Onkologie als therapiebegleitende Maßnahme genutzt wird um Anämien effektiv zu korrigieren, scheint rhuEPO ebenfalls einen möglichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen zu haben. mRNA, welche für die Synthese von EPO und EPO Rezeptoren (EPOR) verantwortlich ist, wurde ebenfalls in nicht hämatopoetischen Zellen gefunden. Eine vermehrte Expression von EPOR auf Zellen von Mamma- und Nierenzellkarzinomen führte nach rhuEPO Gabe zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen (8,130,138). Weitere Untersuchungen in der Pädiatrie zeigten auch eine Expression von EPOR in einem Neuroblastome, Ewing Sarkome, Medulloblastom, Astrozytom, Ependymom, Wilms Tumor, Rhabdomyosarkom und Hepatoblastom (11). Ebenso beim malignen Melanom oder vestibularis Schwannom (32,113).

Aktuell finden sich aber noch weitere Studien, welche keine negative Wirkung von rhuEPO auf Tumorzellen nachweisen konnte. In diesen Studien konnte kein Beleg für die proliferative Wirkung von rhuEPO auf Tumorzellen wie z.B. Brustkrebs oder Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Nacken gefunden werden (13,57,68).

Aufgrund der unklaren Ausgangssituation über den Effekt von rhuEPO auf Tumorzellen, hat die U.S. Food and Drug Administration 2007 strikte Richtlinien für die Gabe von rhuEPO erstellt. Um eine Blutzelltransfusion zu vermeiden sollte zunächst nur mit der geringsten

Dosis von rhuEPO begonnen werden. Des Weiteren sollte ein Hb-Wert von 12 g/dl nicht überschritten werden (40).

2.6 Darbepoetin alpha

Das von uns verwendete Darbepoetin alpha ist ein gentechnisch verändertes Erythropoetin. Darbepoetin alpha wurden zwei Stickstoffgebundene Kohlenhydratketten hinzugefügt, so dass es im Vergleich zu rhuEPO, sowie dem endogenem EPO, über insgesamt fünf Kohlenhydratketten verfügt (39). Als Analog zu rhuEPO wirkt es über denselben Mechanismus wie endogenes EPO. Durch die um drei Ketten verlängerte Kohlenhydratkette erhält Darbepoetin eine bessere metabolische Stabilität und eine um bis zu dreifach verlängerte intravenöse Halbwertszeit. Dadurch kann die therapeutische Dosierung vermindert, bzw. die Intervalle der Verabreichung vergrößert werden. Eine sichere und erfolgreiche Gabe zur Behandlung von Anämien wurde in klinischen Studien bewiesen. Von der Europäischen Kommission und der FDA (Food and Drug Administration) wurde es für die subkutane und intravenöse Behandlung von chronischen Nierenversagen zugelassen (22,87).

2.7 Fragestellung der Doktorarbeit

Es gibt eine Vielzahl hepatobiliärer Tumore. Viele benigne Veränderungen der Leber sind oft klinisch inapparent und werden nur als Zufallsbefund entdeckt. Besteht kein Therapiebedarf, wie z.B. bei einer auffälligen Symptomatik oder durch die Gefahr einer Entartung der Zellen, kann der Tumor meist unter regelmäßiger Kontrolle in vivo belassen werden.

Stellt sich in der Diagnostik der Tumor als eine maligne Veränderung dar, besteht ein dringender Therapiebedarf, um eine weitere Ausbreitung des Tumors zu verhindern. Therapeutisch verspricht vor allem die chirurgische Entfernung des Tumors die größten Heilungschancen. Ergänzend kommen weitere sogenannte lokal ablativ Verfahren zum Einsatz um präoperativ eine Verkleinerung der Tumormasse zu erreichen. Alternativ besteht auch die Möglichkeit mithilfe der Radio- bzw. Chemotherapie die entarteten Zellen zu dezimieren. Da durch den Einsatz der Chemotherapie u.a. auch die blutbildenden Zellen des Knochenmarks angegriffen werden, leiden die Patienten oft unter einer Anämie. In diesem

Zusammenhang wird therapiebegleitend rhuEPO eingesetzt, um eine während der Chemotherapie auftretenden Anämie effektiv zu korrigieren.

Vielversprechende scheinen die Ergebnisse für den Einsatz von rhuEPO im Rahmen der Leberchirurgie. Je nach chirurgischer Vorgehensweise ist das Spenderorgan während einer Lebertransplantation einer längeren Ischämiezeit ausgesetzt, wodurch die Leberzellen Schaden nehmen können und sich das perioperative Ergebnis verschlechtert. Im Versuchsmodell mit Ratten konnte rhuEPO in präklinischen Studien bereits erfolgreich eingesetzt werden um die Regenerationsfähigkeit der Leberzellen nach einer Lebertransplantation zu fördern. RhuEPO steigert die Reperfusionrate und bietet zudem einen Schutz gegen Apoptose bzw. Nekrose.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen für den Einsatz von rhuEPO in der Onkologie. Während in einigen Studien festgestellt wurde, dass durch die Gabe von rhuEPO eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen stattfindet, konnte dieser negative Einfluss von rhuEPO auf Tumorzellen in anderen Studien nicht nachgewiesen werden.

Der Einsatz von rhuEPO kann somit prä- und postoperativ die Heilungschancen von Patienten mit Lebertumoren positiv beeinflussen. Mit dem Hintergrund, dass es für den Einsatz von rhuEPO in der Onkologie gegensätzliche Ergebnisse in Bezug auf die Proliferation von Tumorzellen gibt, stellt sich die Frage, wie der Einsatz von rhuEPO bei Patienten mit Lebertumoren zu bewerten ist. Wird das Wachstum von malignen Leberzellen durch rhuEPO beeinflusst?

Mit diesem Hintergrund haben wir humane Hepatozyten, sowie verschiedene Lebertumorzellen in ihren proliferativen Eigenschaften während der Stimulation mit rhuEPO untersucht.

Entsprechend formulierten wir folgende Ziele, um den Effekt von EPO zu untersuchen:

- Gewinnung und Kultivierung von humanen Hepatozyten aus einzelnen Leberteileresektaten.
- Kultivierung von Leberzelltumorklinien
- Charakterisierung von Lebertumorzellen im Vergleich mit humanen Hepatozyten.
- Ab welcher Konzentration wirkt rhuEPO toxisch auf humanen Hepatozyten bzw. Lebertumorzellen?
- Kommt es durch die Applikation von rhuEPO zum programmierten Zelltod in Lebertumorzellen?
- Lässt sich das proliferative Verhalten der Lebertumorzellen durch rhuEPO beeinflussen?
- Spielt p53 eine zentrale Rolle im proliferativen Verhalten von Tumorzellen, welche mit rhuEPO behandelt wurden?

3 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden alle Methoden, welche zur Durchführung der Versuche benötigt wurden genauer erklärt. Während alle Verbrauchsmaterialien und Geräte in einer Liste zusammengefasst sind, werden methodenspezifische Chemikalien bei dem jeweiligen Methodenabschnitt aufgelistet.

3.1 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
500 ml Flaschen (steril)	Schott AG, Mainz (Deutschland)
Akasolv, Aqua Care	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Alufolie	TIM-KWK Folien Verkaufs GmbH, Gaierhofen (Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Aqua Spüllösung (ddH ₂ O)	DeltaSelect GmbH, Dreieich (Deutschland)
Aquacare	neoLab Migge, München (Deutschland)
Buchnertrichter	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Cellstrainer	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen (Deutschland)
Cryo-Tubes 2 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Cuvetten: Uvette 220-1600 nm, 50-2000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
DMEM Medium Glukoseangereichert (4,5 d/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
D-PBS ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Easycoll Separation Lösung	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)

Einmalspritzen, 2-teilig, steril, 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Eppendorfgfäß	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Essigsäure, purum > 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Ethanol 70 %	Apotheke, MRI München (Deutschland)
Ethanol 99,8 %	Apotheke, MRI München (Deutschland)
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Formaldehyd	Apotheke, MRI München (Deutschland)
Gaze	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied (Deutschland)
Glasflasche für Agarosegel	Schott AG, Mainz (Deutschland)
Glaspipette, serologisch, steril 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	SPL Life Sciences, Gyeonggi-do (Südkorea)
Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
H ₂ O ₂ Lösung (30 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Handschuhe, sempercareedition, puderfrei, unsteril	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien (Österreich)
Chlorwasserstoff (HCL)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Kanülen	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Helipar (Desinfektionsmittel)	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen (Deutschland)
Humanes Insulin	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz (Deutschland)
Hydrokortison	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin (Deutschland)
Kollagenase P	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
Konische Röhrchen, Polypropylen, steril, 15ml, 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Kyröröhrchen	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)

Milchpulver (wenig Fett)	J.M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG, Obergünzburg (Deutschland)
Methanol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
N, N, N', N' - TMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Nitrozellulosemembran	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Papierhandtücher	Apotheke, MRI München (Deutschland)
Pasteurpipetten glas gross 230 mm, 150 mm	neoLab Migge, München (Deutschland)
PCR 8er-Strips mit separatem Deckelstreifen, PP, autoklavierbar, DNase-, DNA- und RNase- frei	Brand GmbH & Co. KG, Werheim (Deutschland) GmbH & Co KG, Wertheim
PCR Strips	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen (Deutschland)
Penizillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Pipettenspitzen T.I.P.S. Standard 0,1-10 µl, 2- 200 µl, 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Petrischale	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Rubber policeman	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2.0 ml	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Skalpell	Materiallager, MRI München (Deutschland)
Steri-Drape 2 Inzisionsfolie 600mmx450mm	3M Deutschland GmbH, Neuss (Deutschland)
Steriles Wasser	Apotheke, MRI München (Deutschland)
Sterilfilter	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Sulfohadmine B Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Tape	Materiallager, MRI München (Deutschland)

Triton	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Whatman Papier	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Williams E Medium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach (Deutschland)
Pinzette	neoLab Migge, München (Deutschland)
Zellkratzer 13 mm Klinge, 20 mm Klinge	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkulturflasche 175 cm ² mit Filterkappe	SPL Life Sciences, Gyeonggi-do (Südkorea)
Zellkulturflasche 75cm ² mit Filterkappe, Oberflächenbehandelt.	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkulturplatte 24 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkulturplatte 48 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkulturplatte 6 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkulturplatte 48 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Zellkulturplatte 96 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkulturschalen 10 cm Corning	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen (Deutschland)

3.2 Geräte

Gerät	Hersteller
8-Kanal Pipette Research® (variabel) 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Absaugpumpe: Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald (Deutschland)
Abzug	Köttermann GmbH & Co, KG, Uetze (Deutschland)
Bench	BDK (Luft- und Reinraumtechnik GmbH), Sonnebühl – Genkingen (Deutschland)
1-Kanal Pipette Research® (variabel) 2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
CAPS	Applichem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
ELISA-Reader: FluoStar OMEGA	BMG LabTech GmbH, Ortenberg (Deutschland)
Gel Kammer: Wide Mini Sub Cell 6R	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Gießständer	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Glas, dick mit Spacer	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Glasplatten, dünn	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Inkubator: Hera Cell 150	Haereus Holding GmbH, Hanau (Deutschland)
Intas Gel Jet Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen (Deutschland)
Kamm 10, 15 Wells	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke	
- 80° C	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf (Deutschland)
- 20° C No Frost Premium	
+ 4°C profiline	Liebher-Holding GmbH, Biberach an der Riss (Deutschland)

	Liebher-Holding GmbH, Biberach an der Riss (Deutschland)
Luer-Zange	Materialwirtschaft Klinikum MRI, München (Deutschland)
Magnet Mixer: MR Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (Deutschland)
Mastercycleregradient S	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Mikroskope:	
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)
Eclipse TS 100	Nikon, Tokio (Japan)
Mikrowelle	TechnoStar, Hannhofen (Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen (Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, Leon-Rot (Deutschland)
Peristaltikpumpe	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Ph-Meter: PB-11	Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Photo-Dokumentation für PCR-Gel	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen (Deutschland)
Photometer: Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Powereinheit	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Pipetus®Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt (Deutschland)
PowerPac™ HC Power Supply	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Shaker	Labinco BV, Breda (Holland)
Sterilisator: 2540 SL	Systemc GmbH, Wetzlar (Deutschland)
Thermostat	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Vortexer: Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Waage: EG 220-3 NM	Kern und Sohn GmbH, Balingen (Deutschland)
Wasserbad	Memmert GmbH Co Kg, Schwabach

(Deutschland)

Zentrifugen :

Centrifuge 5804R

Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)

Centrifuge 5417R

Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)

3.3 Zelltypen und Zellmedium

<i>Zelltyp</i>	<i>Zellmedium</i>
HUH7	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamine. + 10 % FCS; + 1 % Penizillin/Streptomycin
AKN 1	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamine. + 10 % FCS; + 1 % Penizillin/Streptomycin
HepG2	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamine. + 10 % FCS; + 1 % Penizillin/Streptomycin
SKHep1	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamine. + 10 % FCS; + 1 % Penizillin/Streptomycin
Hep3B	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamine. + 10 % FCS; + 1 % Penizillin/Streptomycin
HCC-T	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamine. + 10 % FCS; + 1 % Penizillin/Streptomycin; + 2,5 % Hapes
HCC-M	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamine. + 10 % FCS; + 1 % Penizillin/Streptomycin; + 2,5 % Hapes
Humane Hepatozyten	Williams Medium E mit 10 % FCS, 1mM Insulin, 15 mM HEPES, 0,8 µg/ml Hydrokortison, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 1 % nicht essentielle Aminiosäuren,

1 mM Natriumpyruvat

Tabelle 1 Zelltypen und benötigtes Medium

3.4 Zellbehandlung: Passagieren einer Zelllinie

3.4.1 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS (Dulbecco`s Phosphate Bufferd Saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkultur	
Zellmedium (abhängig vom Zelltyp)	

3.4.2 Versuchsaufbau

Nach lichtmikroskopischer Beurteilung der Zellkulturflasche wurde das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS entfernt wurde, wurde 1 ml Trypsin auf den Flaschenboden geben. Danach wurde die Zellkulturflasche für 5 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ in den Inkubator gestellt. Über eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zellkulturflasche ließ sich über die Morphologie und Beweglichkeit der Zellen kontrollieren, ob alle Zellen abgelöst worden sind. Sollte ein Großteil der Zellen noch am Boden haften, wurde die Zellkulturflasche für weitere wenige Minuten in den Inkubator gestellt und der oben genannte Schritt wiederholt.

Waren alle Zellen abgelöst, wurden 10 ml des geeigneten Zellmediums in die Zellkulturflasche gegeben. Das im Medium enthaltene FCS stoppt die Wirkung von dem Trypsin und verhindert, dass die Zellen durch eine längere Einwirkung von Trypsin Schaden nehmen. Die im Medium freischwimmenden Zellen wurden in ein 50 ml Flacon übertragen und bei 600 x G für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde aus dem Falcon das überschüssige Medium abgesaugt und erneut frisches Medium hinzugegeben. Nachdem die sich am Boden des Falcon befindlichen Zellen im Medium wieder gelöst wurden, konnte die Zelllösung auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden und anschließend wieder bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert werden (78). Um den Erfolg des Passagierens zu kontrollieren wurden die Zellen nach mehreren Stunden erneut mithilfe eines Lichtmikroskop beurteilt.

3.5 Zellbehandlung: Zellen einfrieren und auftauen

3.5.1 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
50 ml FCS GOLD EU approved	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
D-PBS (Dulbecco`s Phosphate Bufferd Saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Kryoröhrchen	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkultur	
Zellmedium (abhängig vom Zelltyp)	

3.5.2 Versuchsaufbau

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellkulturflaschen zunächst wie in Punkt „Passagieren einer Zelllinie“ isoliert (Zellen mit Trypsin ablösen und abzentrifugieren). Überschüssiges Medium wurde vorsichtig aus dem Falcon entfernt und Zellmedium, FCS sowie DMSO im Verhältnis 4:5:1 hinzugeben. Von der gut durchmischten Zelllösung wurde jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen übertragen und dieses bei -80°C eingefroren (Cave: Bei Raumtemperatur hat DMSO eine toxische Wirkung auf die Zellen. Von daher sollte dieser Schritt möglichst ohne größere Verzögerungen durchgeführt werden).

Zum Ausfrieren der Zellen wurde zuvor das jeweils geeignete Medium der Zellen auf 37°C erwärmt. 12 ml des erwärmten Zellemediums wurden auf ein 15 ml Falcon Röhrchen übertragen. Die aus dem Gefrierschrank entnommenen Kryoröhrchen wurde zügig unter Zugabe von warmem Medium (37°C) aufgetaut, auf ein 50 ml Falcon Röhrchen übertragen und anschließend bei 250-300 x G für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und durch frisches Zellmedium ersetzt. Anschließend wurde die Zelllösung in eine Zellkulturflasche übertragen und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert (78).

3.6 Zellbehandlung: Zellen zählen

3.6.1 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
D-PBS (Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Improved, Marienfeld (Deutschland)
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)

Zellkultur

Zellmedium (abhängig vom Zelltyp)

3.6.2 Versuchsaufbau

Wie in Punkt „Passagieren einer Zelllinie“ beschrieben, wurden die Zellen zunächst abgelöst und zentrifugiert. Eine Probe der Zelllösung wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und anschließend jeweils 20 µl der Lösung auf jede Seite der Neubauerzählkammer übertragen. Trypanblau färbt selektiv tote Zelle, da der Farbstoff aufgrund der nicht intakten Zellmembran diese passieren kann und über seine Anionen an Zellproteine im Zytoplasma bindet. Während bei vitalen Zellen die Membrandurchlässigkeit nicht gestört ist, kann der Farbstoff aufgrund seiner Größe ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) die intakte Zellmembran nicht überqueren. Tote Zellen erscheinen unter dem Mikroskop tiefblau gefärbt, wo hingegen sich die lebende Zellen als hell leuchtend darstellen (109).

Zur Vorgehensweise der Zählung siehe Abbildung unten. Gezählt wurden jeweils alle Zellen innerhalb der Kästchen und alle, welche sich am linken und unteren Rand der (blauen) Linie der Zählkammer befunden haben. Zu beachten ist, dass sich auf einer Neubauerzählkammer insgesamt 2 der in Abb. 9 gezeigten Zählkammer gegenüberliegen und auch beide vollständig ausgezählt werden müssen.

Bei einer zu geringen Zellzahl sollte zur genaueren Quantifizierung der Zellzahl eine weitere Zählung der Zellen mit einer neuen Zellprobe durchgeführt werden.

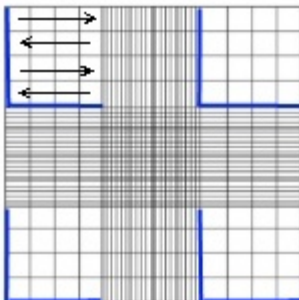


Abbildung 9 Neubauer Zählkammer (Ansicht unter Mikroskop)

Mit dem errechnetem Mittelwert aller gezählten Abschnitte ergab sich anhand der gegebenen Formel die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension: Aufgrund der 1:1 Verdünnung (Zelllösung mit Trypanblau) wurde der errechnete Mittelwert zunächst mit dem Faktor 2 multipliziert. Da die Zellen unter dem Lichtmikroskop mit einer Vergrößerung von 10x ausgezählt wurden, musste man im nächsten Schritt das Ergebnis noch mit dem Faktor 10.000 multiplizieren. Verrechnet man dieses Ergebnis mit dem Gesamtvolumen der gelösten Zellen (Anzahl der ml), erhielt man die Gesamtanzahl der Zellen (78).

$$\text{Gezählte Zellen} \times 2 \times 10.000 = \text{Zellen / ml Zellsuspension}$$

Tabelle 2 Formel für Zählung der Zellen in Neubauerzählkammer

3.7 Isolation von primären Hepatozyten

3.7.1 Materialien

<i>Lösung</i>	<i>Materialien</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Hersteller</i>
Perfusionslösung I 10x	83 g NaCl	1,42 M	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
(pH 7,5)	5 g KCl	76 mM	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
	24 g Hepes	100 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
	Volumen mit ddH ₂ O auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Perfusionslösung I 1x	50 ml Perfusionslösung I		
(pH 7,4)	0,475 g EGTA	2,4 M	Carl Roth GmbH+Co,

			Karlsruhe (Deutschland)
	0,408 g N-Acetyl-L-Cysteine	5 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	Volumen mit ddH ₂ O auf 450 ml Gesamtvolumen auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
<hr/>			
Perfusionslösung II 1x			
Lösung 1 (pH 7,6)	5,85 g NaCl	67 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	0,75 g KCl	6,7 mM	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
	36,0 g HEPES	100 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
	7,5 g Albumin	0,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	Volumen mit ddH ₂ O auf 1300 ml Gesamtvolumen auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
<hr/>			
Lösung 2 (pH 7,6)	1,05 g CaCl ₂ + 2H ₂ O	4,8 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	Volumen mit ddH ₂ O auf 150 ml Gesamtvolumen auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<hr/>			

			(Deutschland)
Stoplösung	100 ml FCSg	20 %	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
	500 ml D-PBS		PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
25 % Percoll-Lösung	15 ml D-PBS		PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
	5 ml Percoll-Lösung		

3.7.2 Versuchsaufbau

Um die humanen Hepatozyten aus dem entnommen Leberteilresektat zu isolieren, wurden die Zellen einer zweistufigen Perfusion unterzogen.

Zum Aufbau des Perfusionssystems wurden zunächst die Perfusionslösungen I und II auf 39°C erhitzt und der pH-Wert beider Lösungen überprüft. Das Wasserbad wurde ebenfalls auf 39°C erhitzt. Die Optimierung der Temperatur des Perfusionssystems ist wichtig, da die maximale Aktivität der Kollagenase bei einer Temperatur von 37-40°C liegt. Die Flasche mit der Perfusionslösung I wurde in das Wasserbad gestellt, der Buchner-Trichter mithilfe von einem Gerüst fixiert und unterhalb eine leere sterile Flasche für den Gewebeabfall aufgestellt (siehe auch Abb. 9 Figur 1). Der Perfusionschlauch wurde zunächst mit beiden Enden in das Gefäß mit der Perfusionslösung I gestellt und vollständig mit dieser Lösung gefüllt, so dass sich keine Luft mehr im System befand.

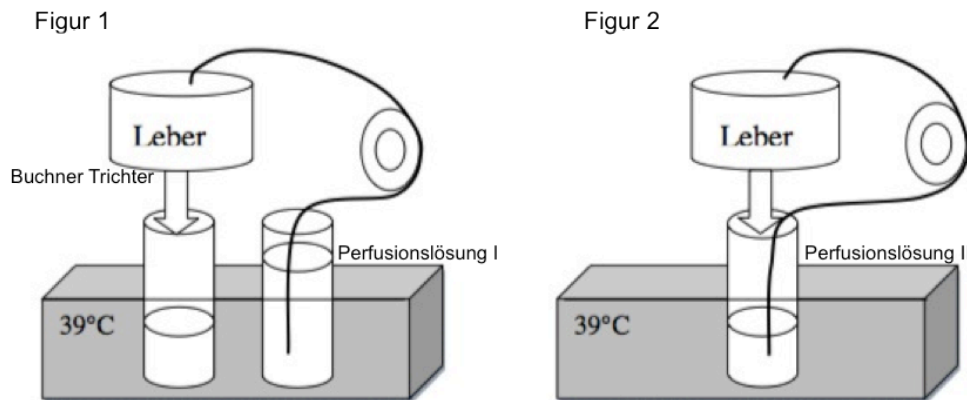


Abbildung 10 Perfusionsschema des Leberteilresektat

Dargestellt ist auf dem linken Bildabschnitt (Figur 1) der erste Perfusionsschritt zur Entfernung des Blutes aus den Gefäßen, sowie im rechten Bildabschnitt (Figur 2) der zweite Perfusionsschritt, bei welchem die Hepatozyten aus dem Gewebe der Leber gelöst werden.

Das präparierte Leberteilresektat wurde vorab unter sterilen Bedingungen mit einem Tupfer von oberflächlichen Blutresten befreit. Mithilfe von Kanülen wurden die Gefäße des Leberteilresektats sondiert und mit Gewebekleber fixiert, um anschließend eine ausreichende Perfusion der Lösung zu erreichen. Zur Entfernung des noch vorhandenen Blut aus dem Leberteilresektat, wurde das Resektat für einen Zeitraum von 20 – 30 Minuten mit mindestens 500 ml der Perfusionsslösung I durchspült (siehe auch Abb. 9 Figur 1).

Währenddessen wurden 150 ml der Perfusionsslösung II mit 45 mg Kollagenase P gemischt. Mithilfe der in der Perfusionsslösung II enthaltenen Kollagenase wurden die noch im Gewebe der Leber festsitzenden Hepatozyten gelöst. Die Lösung sollte für ca. 15 – 30 Minuten auf 37°C erwärmt werden.

Der Versuchsaufbau wurde nun so verändert, dass die Perfusionsslösung II durch das Leberteilresektat fließt und anschließend im System wieder rezirkulieren konnte (siehe auch Abb. 9 Figur II). Nach ca. 20 – 30 Minuten wurde die Rezirkulation unterbrochen und das Leberteilresektat in eine Petrischale mit der Stopplösung (4°C) gelegt. Durch die Zugabe von 20 % FCS in PBS wird die verdauende Wirkung der Kollagenase gestoppt.

Anschließend wurde das Leberteilresektat mit einem Skalpell schmetterlingsförmig eröffnet und die Zellen durch Schwenken und waschen aus dem Gewebe gelöst. Um die gelösten

Zellen zu sammeln wurde das noch vorhandene Lebergewebe erneut mit der Stopplösung ab gespült.

Um noch in der Zelllösung enthaltene Gewebereste zu entfernen, wurde die Zelllösung anschließend durch ein Sieb in ein 50 ml Falcon gefüllt und bei 70 G für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das sich am Boden befindliche Zellpellet wurde mit PBS resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Mithilfe eines Percoll-Gradienten wurden eventuell noch vorhandene Erythrozyten und tote Zellen entfernt. Dazu wurde in einem 50 ml Falcon eine 25 % Percoll-Lösung angesetzt. Anschließend wurden vorsichtig 4 – 5 ml der Zellsuspension der Percoll-Lösung zugegeben und bei 1278 x G (2500 rpm) bei 4°C für 12 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation bilden sich 2 Schichten: Zellreste und tote Zellen in der oberen Schicht und Leberzellen in der unteren Schicht. Nachdem die obere Schicht vorsichtig entfernt wurde, konnte man die sich am Boden befindlichen Leberzellen mit PBS resuspendieren.

Die Hepatozyten wurden anschließend mit Trypanblau behandelt, wodurch die Lebensfähigkeit der gewonnenen Zellen bestimmt werden konnte. Bei einem Zielwert von über 80 % lebenden Zellen, wurden die Zellen auf Kollagen beschichteten Platten ausgesät und mit dem entsprechendem Medium kultiviert (65,94).

3.8 Harnstoffmessung

3.8.1 Hintergrund

Beim Abbau von Aminosäuren kommt es durch die Abspaltung der Aminogruppe zur Bildung von Stickstoff. Dieser kann in den Harnstoffzyklus eingespeist werden und wird schließlich in Form von Harnstoff über die Niere ausgeschieden. Der Harnstoffzyklus findet vor allem in der Leber statt. Mit ca. 500 mmol (30 g) Harnstoff pro Tag ist die Leber einer der wichtigsten Produktionsorte für die Umwandlung von Stickstoff zu Harnstoff. Ornithin ist eine nichtproteinogene Aminosäure, welche im Harnstoffzyklus als Trägersubstanz fungiert um

die Metaboliten über die mitochondriale Zellmembran zu transportieren. Durch die Ornithin-Carbonyl-Transferase wird die Phosphatgruppe des Carbonylphosphat gegen Ornithin ausgetauscht. Das Reaktionsprodukt Citrullin kann dann weiter über den Ornithin/Citrullin-Transporter ins Zytosol transportiert werden (99).

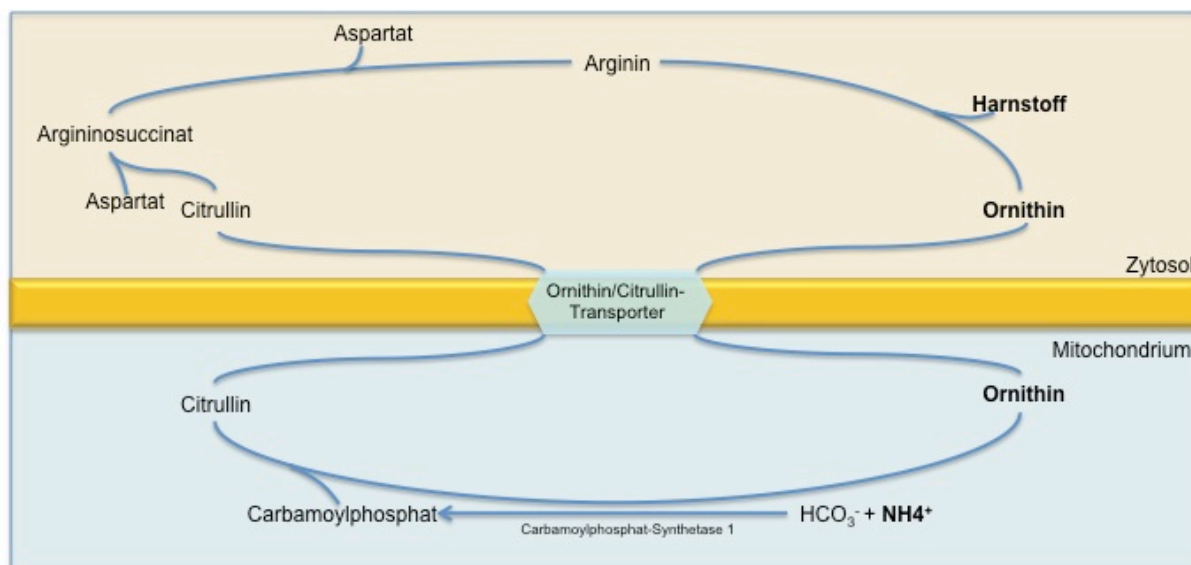


Abbildung 11 Harnstoffzyklus in der Leber

Dargestellt ist der schematische Ablauf des Harnstoffzyklus in einer Leberzelle. Die abgespaltene Aminogruppe kann im Mitochondrium in den Harnstoffzyklus aufgenommen werden. Über die Ornithin/Citrullin-Transporter gelangen die Zwischenprodukte in das Zytosol, wo schließlich das Endprodukt Harnstoff gebildet wird. Ornithin kann über den o.g. Transporter wieder ins Mitochondrium gelangen und der Zyklus beginnt von vorne (abgewandelt nach Duale Reihe Biochemie (100)).

3.8.2 Materialien

Lösung	Materialien	Endkonzentration	Hersteller
Ornithine Lösung (10 mg/ml) U3	10 mg Ornithine	100 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	17 mg NH ₄ CL	300 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)

1000 µl Reaktionslösung

NH ₄ CL Stock Lösung (17 mg/ml) U2	17 mg NH ₄ CL	300 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
---	--------------------------	--------	--

1000 µl Reaktionslösung

Reaktionslösung U1	0,0406 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O Stocklösung	1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	0,022 g Natriumpyruvatlösung	1 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
	200 ml D-PBS sterile		PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)

Harnstoff Stock Lösung	10 mg Harnstoff	100 µg/ ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
------------------------	-----------------	------------	--

100 ml dd H₂O

B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

10% Brij 35 Lösung	5 g Brij 35	30 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	50 ml dd H ₂ O		B. Braun Melsungen AG, Melsungen

		(Deutschland)
O-PhthalaldehydeLösung	800 ml ddH ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
	74 ml konz. H ₂ SO ₄	7,4 % Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	200 mg O-Phthalaldehyde	0,0002% Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	3 ml 30% Brij 35 Lösung	0,03% Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	alles mit ddH ₂ O auf 1 Liter Gesamtmenge auffüllen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

NED Reagenz	600 ml ddH ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
	222 ml konz. H ₂ SO ₄	22,2 % Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	5 g Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)

600 mg N-(1-naphtyl)- ethylenediamine- dihydrochloride	0,0006%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3 ml 30% Brij 35 Lösung	0,03%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
alles mit ddH ₂ O auf 1 Liter Gesamtmenge auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

3.8.3 Versuchsaufbau

Das Zellmedium wurde von der Zellkulturplatte entfernt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Jeweils 100 µl der Reaktionslösungen (U1-U3) wurden separat auf der Zellkulturplatte verteilt und die Zellen für 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt.

Vor dem nächsten Arbeitsschritt wurden die Harnstoff Standardwerte (3-fach Bestimmung) in einer nicht sterilen 96 Well Zellkulturplatte vorbereitet (siehe Tabelle).

<i>Harnstoff</i>	<i>Destilliertes Wasser</i>	<i>Harnstoff Stocklösung</i>
<i>100 µg/ml</i>		<i>80 µl</i>
<i>50 µg/ml</i>	<i>40 µl</i>	<i>40 µl</i>
<i>12,5 µg/ml</i>	<i>60 µl</i>	<i>20 µl</i>
<i>6,25 µg/ml</i>	<i>70 µl</i>	<i>1β µl</i>
<i>3,13 µg/ml</i>	<i>75 µl</i>	<i>5 µl</i>
<i>1,56 µg/ml</i>	<i>77,5 µl</i>	<i>2,5 µl</i>

<i>0,78 µg/ml</i>	<i>78,75 µl</i>	<i>1,25 µl</i>
<i>0 µg/ml</i>	<i>40 µl</i>	

Tabelle 3 Harnstoff Standards 3fach Bestimmung

Nach 24 Stunden wurden von dem Medium der Zellkulturplatte 80 µl des Überstand auf eine neue 96 Wellplatte übertragen (Die andere Zellkulturplatte konnte nun verworfen werden). Zusätzlich wurden pro Well 60 µl der O-Phthalaldehyde Lösung und 80 µl von dem NED Reagenz hinzugegeben (65). Die 96 Well Zellkulturplatten wurden für 1 bis 2 Stunden inkubiert und anschließend die Absorption bei 505 nm gemessen. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, wurde vorher die Enzymkinetik ermittelt um den genauen Zeitraum für die Inkubation zu bestimmen.

3.9 Glukosemessung

3.9.1 Hintergrund

Im katabolen Hungerzustand fehlen dem Körper zur Energiegewinnung mittels Glykolyse kohlenhydratreiche Abbauprodukte. Mithilfe der Glukoneogenese kann der Körper aus Metaboliten, welche keine Kohlenhydrate sind, Glukose herstellen welche dann zur Energiegewinnung genutzt werden kann. Als Hauptproduktionsort für die Glukoneogenese ist die Leber eines der wichtigsten Organe um den Körper auch im Hungerzustand mit Energiereserven zu versorgen. Ausgangsprodukte der Glukoneogenese sind u.a. Pyruvat bzw. Laktat, welches zuvor durch das Enzym Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert wurde (99).

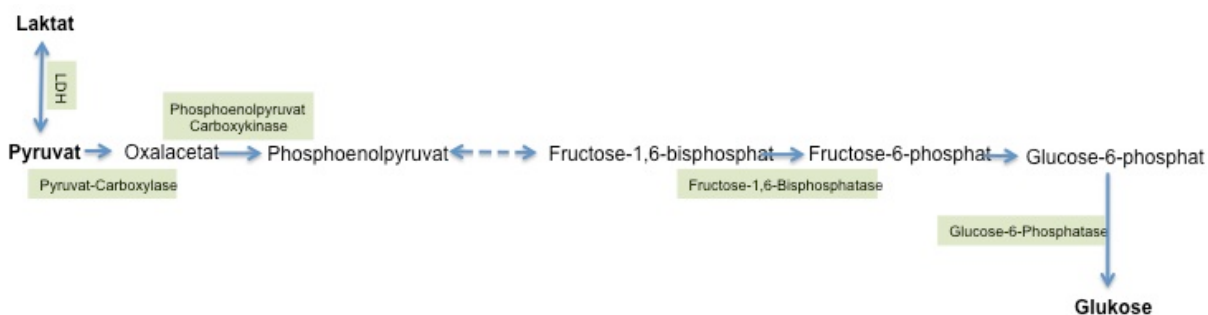


Abbildung 12 Glukoneogenese der Leber

Dargestellt ist der schematische Ablauf der Glukoneogenese. Aus den nicht-kohlenhydrathaltigen Produkten Pyruvat und Laktat entsteht über mehrere enzymatische Zwischenschritte Glukose.

3.9.2 Lösungen

Lösung	Materialien	Endkonzentration	Hersteller
Reaktionslösung	0,0406 g MgCL ₂ x 6H ₂ O Stocklösung	1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	0,022 g Natriumpyruvat	1 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
	200 ml D-PBS steril		PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
L-Laktate Lösung	1 mg/ml Reaktions-Puffer		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Glukose Stock Lösung	10,9 mg D-Glukose	600 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)

	100 ml ddH ₂ O	1 mM	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
1 M TRIS Buffer (pH = 8,0)	12.2 g TRIS(hydroxymethyl)- aminomethane	1 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	80 ml ddH ₂ O hinzufügen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
	pH auf 8,0 einstellen und Endvolumen mit 100 ml ddH ₂ O auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Gesättigte o-Dianisidine Lösung -20°C	10 mg o-Dianisidine	1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	1 ml 99,9 % Ethanol		Apotheke MRI München (Deutschland)
GLOX Lösung	15,5 mg Glukose Oxidase	0,04 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	2,8 mg Peroxidase	0,007 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	10 ml 1 M TRIS Buffer (pH 8,0)	250 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)

31,7 mg EDTA	0,2 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
40 ml ddH ₂ O		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
400 µl gesättigte Dianisidine Lösung	o- 0,01 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)

3.9.3 Versuchsaufbau

Das Zellmedium wurde von der Zellkulturplatte entfernt und die Zellen mit PBS waschen. Anschließend wurden jeweils 150 µl der Reaktionslösung in jedes Well der Zellkulturplatte übertragen und die Zellen für 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert.

Vor dem nächsten Arbeitsschritt wurden die Glukose Standardwerte (3fach Bestimmung) in einer nicht sterilen 96 Well Zellkulturplatte vorbereitet (siehe Tabelle).

<i>Glukose</i>	<i>Glukose Stocklösung</i>	<i>Destilliertes Wasser</i>
0 nmol/ml	0 µl	100 µl
10 nmol/ml	1,7 µl	98,3 µl
20 nmol/ml	3,3 µl	96,7 µl
30 nmol/ml	5 µl	95 µl
60 nmol/ml	10 µl	90 µl
90 µg/ml	15 µl	85 µl
120 µg/ml	20 µl	80 µl
150 µg/ml	25 µl	75 µl

Tabelle 4 Glukose Standards 3fach Bestimmung

Nach 24 Stunden wurden von dem Medium der Zellkulturplatte 100 µl des Überstand auf eine neue sterile 96 Wellplatte übertragen (Die andere Zellkulturplatte konnte nun verworfen werden). Zusätzlich wurden 150 µl der GLOX Lösung jedem Well hinzugegeben (65). Nachdem die 96 Wellplatte für weitere 1 – 2 Stunden inkubiert wurde, wurde die Absorption bei 420 nm gemessen. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, wurde vorher die Enzymkinetik ermittelt um den genauen Zeitraum für die Inkubation zu bestimmen.

3.10 Färbungen: Glucose-6-Phosphatase

3.10.1 Hintergrund

In einem Zwischenschritt der Glukoneogenese spaltet das Enzym Glucose-6-Phosphatase den anorganischen Phosphatrest des Substrates Glucose-6-Phosphat ab. Das freiwerdende Phosphat reagiert mit den in der Inkubationslösung enthaltenen Blei-Ionen, wodurch schwer lösliches Bleiphosphat ausfällt. Durch die Zugabe von Ammoniumsulfid wird das Bleiphosphat angefärbt und kann somit unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden.

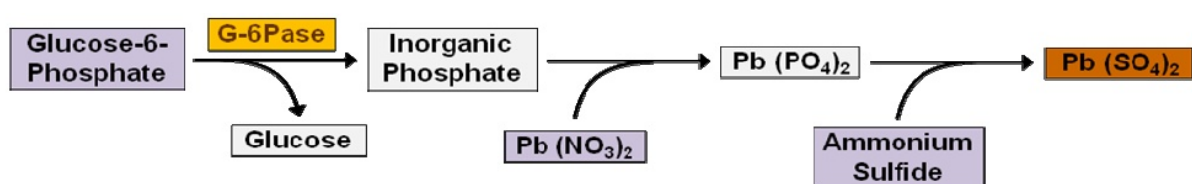


Abbildung 13 Glukose-6-Phosphatase Färbung

3.10.2 Lösungen

Lösung	Materialien	Endkonzentration	Hersteller
100mM TRIS Buffer (pH = 6,5)	18,1 g TRIS (hydroxymethyl) aminomethane	100 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)

	800 ml ddH ₂ O		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
	pH auf 6,5 einstellen und Gesamtvolumen mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Glucose-6-Phosphat Stocklösung	30 mg D-Glucose-6- Phosphate monosodiumsalt	0,6 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	5 ml 100 mM TRIS Buffer (ph 6,5)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Lead-Nitrate Stocklösung	40 mg Lead-Nitrate	0,8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	5 ml 100 mM TRIS Buffer (ph 6,5)	1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
G6Pase Färbelösung	800 µl 100 mM TRIS Buffer (pH 6.5)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	100 µl Glucose-6-Phosphate Stocklösung		
	100 µl Lead-Nitrate Stocklösung		

1 % Ammoniumsulfidlösung	100 µl 20 % sulfidlösung	Ammonium 1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	1,9 ml ddH ₂ O		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

3.10.3 Versuchsaufbau

Das Zellmedium wurde vorsichtig von der Zellkulturplatte entfernt. Um nicht adhärenente Zellen zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der geeigneten Menge an Glukose-6-Phosphatase Färbelösung wurde die Zellkulturplatte für 45 Minuten bei 37°C, 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt.

a)	96-well-platte	50 µl / Well
b)	48-well-platte	300 µl / Well
c)	24-well-platte	600 µl / Well

Tabelle 5 Glukose-6-Phosphatase Lösung pro Well

Nach Ablauf der Zeit wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen um noch überschüssige Färbelösung zu entfernen. Zur Fixation der Zellen wurde die Zellkulturplatte im Anschluss für 30 Sekunden mit 1 % Ammoniumsulfat Lösung bedeckt. Um das restliche Ammoniumsulfat zu entfernen, wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (65). Anschließend konnten die Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops beurteilt und dokumentiert werden.

3.11 Färbungen: Perjodsäure-Schiff

3.11.1 Hintergrund

Die Perjodsäure-Schiff (PAS) - Färbung dient zur Detektion von kohlenhydrathaltigen Komponenten in einer Zelle. Die Periodsäure oxidiert die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen. Mit den im Schiffs Reagenz enthaltenen schwefelsauren Fuchsin entstehen im Lichtmikroskop nachweisbare rot-violette Komplexe (71).

3.11.2 Lösungen

<i>Lösung</i>	<i>Materialien</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Hersteller</i>
0,1 % Periodsäure Schiff Lösung	25 mg Periodsäure	0,1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	5 ml ddH ₂ O		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

3.11.3 Versuchsaufbau

Das Zellmedium wurde vorsichtig von der Zellkulturplatte entfernt. Um nicht adhärente Zellen zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit PBS waschen. Zur Fixation wurden die Zellen für 5 Minuten mit 3,7 % Formaldehydlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Zellen mit der geeigneten Menge an 0,1 % Periodsäure Schiff Lösung bedeckt und die Zellkulturplatte für 5 Minuten bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert.

a)	96-well-platte	50 µl / Well
b)	48-well-platte	300 µl / Well
c)	24-well-platte	600 µl / Well

Tabelle 6 PAS Lösung pro Well

Nach Ablauf der Zeit wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen um noch überschüssige Färbelösung zu entfernen. Die Zellkulturplatte wurde mit Schiff's Reagenz bedeckt (Volumen siehe Tabelle oben) und auf einer Schwenkvorrichtung unter ständiger Bewegung für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einem erneuten Waschen der Zellen mit PBS konnte die Färbung der Zellen mit einem Lichtmikroskop beurteilt und dokumentiert werden (65).

3.12 Färbungen: Ölrot (Sudanrot Färbung)

3.12.1 Hintergrund

Der Farbstoff Ölrot O (Sudanrot) gehört zu den Azofarbstoffen. Er besteht aus zwei aromatischen Ringsystemen, die durch eine sogenannte Azogruppe (-N=N-) verbunden sind. Der pulverförmige Farbstoff ist sehr stabil und lässt sich leicht in Ölen, Kohlenwasserstoffen, Alkoholen und Ethern auflösen. In der Histologie kann er aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften zum Nachweis von neutralen Fetten in Zellkulturen und Spongiosa eingesetzt werden (10,19).

3.12.2 Lösungen

<i>Lösung</i>	<i>Materialien</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Hersteller</i>
Ölrot O Stock Lösung	0,7 g Ölrot O	0,35 % (w/v)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland) ¹

In einem Gesamtvolumen
von 200 ml Isopropanol lösen

Ölrot O Arbeitslösung	6 ml	Ölrot O Stock Solution	0,2 % (w/v)
	4 ml ddh ₂ O		
			B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

3.12.3 Versuchsaufbau

Das Zellmedium wurde vorsichtig von der Zellkulturplatte entfernt. Um nicht adhärenente Zellen zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit PBS waschen. Zur Fixation wurden die Zellen für 5 Minuten mit 3,7 % Formaldehydlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Formaldehydlösung wurden die Zellen mit der geeigneten Menge an Ölrot O Arbeitslösung bedeckt und die Zellkulturplatte für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung stehen gelassen.

a)	96-well-plate	50 µl / well
b)	48-well-plate	300 µl / well
c)	24-well-plate	600 µl / well

Tabelle 7 Ölrot O Lösung pro Well

Um noch ungebundene Ketten zu entfernen, wurden die Zellen gründlich mit Leitungswasser gewaschen (65). Anschließend erfolgte die mikroskopische Beurteilung und Dokumentation der Zellen.

3.13 Fluoreszenzmessung mit Alamar Blue

3.13.1 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Alamar Blue	Biozol GmbH, Eching (Deutschland)
Zellkultur in Zellkulturplatte	
Zellmedium (abhängig vom Zelltyp)	

3.13.2 Versuchsaufbau

In einer 96 Well Zellkulturplatte wurde jedem Well im Verhältnis 1:10 Alamar Blue hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellkulturplatte bei 37°C, 5 % CO₂ für 4 Stunden in den Inkubator gestellt. Um genaue Werte zu erzielen, sollte die Platte während dieser Zeit ohne Belichtung inkubiert bleiben. Ein längerer Einfluss von UV-Licht beeinflusst die fluoreszenzaktive Umwandlung von Resazurin in Resofurin. Resazurin wird als Indikator zur Bestimmung von Zellproliferation und Zytotoxizität in verschiedenen Zelllinien eingesetzt. Es ist ein wasserlöslicher Redox-Farbstoff, welcher in Mitochondrien von metabolisch aktiven und lebenden Zellen in das fluoreszenzaktive Resofurin umgewandelt wird (96).

Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellkulturplatte aus dem Inkubator genommen und die Zellanzahl über die Fluoreszenz bei 530/650 ex/em gemessen.

3.14 Darbepoetin Toxizität Test

3.14.1 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Alamar Blue	Biozol GmbH, Eching (Deutschland)
Aranesp [®] , (Darbepoetin) [20µg]	Amgen GmbH, München (Deutschland)
DMEM Serum free	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
D-PBS (Dulbecco`s Phosphate Bufferd Saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkultur	
Zellmedium (abhängig vom Zelltyp)	

3.14.2 Versuchsaufbau

Aus einer Zelllösung wurden jeweils 20.000 Zellen in einem Volumen von 100 µl gelöst und auf die einzelnen Wells verteilt. Die äußeren Reihen der 96 Well Zellkulturplatte wurden freigelassen (siehe auch Abb. 14).

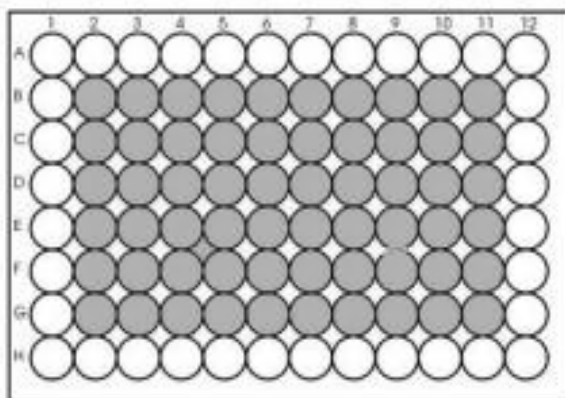


Abbildung 14 Ausplattieren der Zellen

Um die Zellen in den Wells zu adhären wurde die 96 Well Zellkulturplatte für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt.

Zum Ansetzen der Darbepoetin-Lösung wurde Darbepoetin alpha mit einer Konzentration von 40 mg/L (=40 ng/ml) mit Serum freien Medium im Verhältnis 1:1000 gemischt. Benötigt wurden noch 8 weitere Verdünnungsreihen. Für eine serielle Verdünnungsreihe von 1:2 wurde jeweils die Hälfte einer bereits angesetzten Lösung mit dem gleichen Volumen an Serum freien Medium in einem neuen Gefäß vermischt. Die Konzentration 30 ng/ml wurde separat angesetzt. Dazu wurde Serumfreies Medium mit Darbepoetin im Verhältnis von 1:13 gemischt. Waren alle Lösungen vorbereitet, wurde das Medium der 96 Well Zellkulturplatte durch die Darbepoetin-Lösung ersetzt. Beginnend mit der höchsten Konzentration wurden 100 µl in jedes Well einer Konzentrationsreihe übertragen. Die Kontrollreihe erhielt nur Serum freies Medium ohne den Zusatz von Darbepoetin.

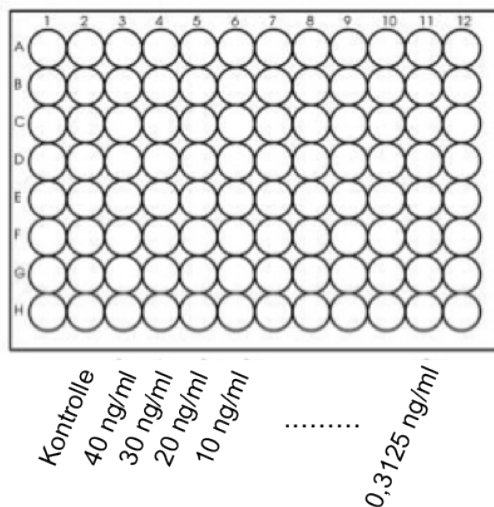


Abbildung 15 DPO Tox Test Konzentrationsreihe

Die äußeren Wells, ohne Zellinhalt, wurden mit Serum freien Medium aufgefüllt.

Die 96 Wellplatte wurde für 20 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Darbepoetin-Lösung entfernt und durch 10 µl Alamar Blue in jedem Well ersetzt. Während die Platte wieder in den Inkubator gestellt wurde, konnte nach

jeweils 2 und 4 Stunden die Fluoreszenz der Zellen mit „Alamar Blue 3D Tox“ (96) (s.a. Kapitel 3.14) gemessen werden.

3.15 Apoptose Analyse mit DNA Leiter

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, kann durch verschiedene Mechanismen, bzw. Stimuli ausgelöst werden. Eine Interaktion dieser Stimuli mit spezifischen Oberflächenrezeptoren führt über verschiedene Zwischenschritte zur Aktivierung der Apoptosekaskade an deren Ende der Zelltod steht. Durch die schrittweise Zerstörung der Zelle wird auch die Zellmembran aufgelöst und zytosolische DNAsen können in den Zellkern gelangen. Die genomische DNA wird durch die Nukleasen an exponierten Stellen des Chromatins in oligonukleosomale Fragmente gespalten. Diese DNA-Abbauprodukte können im Agarosegel anhand der typischen DNA-Leiter-Struktur nachgewiesen werden (29,133).

3.15.1 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
1,5 g Agarose Gel, peqGold Universal Agarose	Peqlab, Erlangen (Deutschland)
100 ml TBE-Buffer	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Puc19	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
7 µl Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol 100 %	Apotheke, MRI München (Deutschland)
Isopropanol	Apotheke, MRI München (Deutschland)
NaCl 4M	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Isomylalkohol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Phenol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Chlorophorm	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Proteinase K	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)

RNase A

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
(Deutschland)**3.15.2 Lösungen**

<i>Lösung</i>	<i>Materialien</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Hersteller</i>
DNA Leiter Lyse Puffer	TRIS (ph 8,0)	10 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	EDTA (pH 8,0)	25 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	NaCl	100 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	0,5 % SDS		Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	Auf 100 ml Gesamtvolumen auffüllen		
RNase-A Lösung	RNase-A 100 mg/ml	1 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	TE Buffer		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)

3.15.3 Versuchsaufbau

Zum Gießen des DNA Gels wurden 1,5 g Agarose Gel abgewogen, in 100 ml TBE gelöst und für 2 Minuten bei 900 Watt in die Mikrowelle gestellt. Die Lösung wurde solange erhitzt, bis sich das Gel vollständig im TBE gelöst hat. Nach der Zugabe von 7 µl Ethidiumbromid wurde die Lösung in eine Gelkammer geschüttet und das Gel für mindestens 20 Minuten zum Aushärten stehen gelassen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zuvor auf einer 6 Well Zellkulturplatte ausplattiert. Das Zellmedium wurde abgesaugt, in ein steriles Eppendorfgefäß übertragen und bei 2000 rpm, 4°C für 3 Minuten abzentrifugiert. Parallel dazu wurden 400 µl Lysis Buffer in jedes Well der Zellkulturplatte gegeben und mit einem Zellkratzer alle noch am Boden befindlichen Zellen eingesammelt. Aus dem zentrifugierten Eppendorfgefäß wurde das überschüssige Medium entfernt und anschließend der Lysis Buffer von der Zellkulturplatte in das Eppendorfgefäß übertragen. Nach Zugabe von 10 µl Proteinase K wurde die Zellen bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung über die Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden 200 µl 4M NaCl tröpfchenweise den Zellen hinzugegeben und das Eppendorfgefäß nach vorsichtigem Mischen für 1 Stunde in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Eppendorfgefäß erneut mit 14.000 rpm, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Zu dem Überstand wurde das gleiche Volumen von Phenol/Cholophorm/Isomylalkohol (im Verhältnis 25:25:1) hinzugegeben, alles durchmischt und für mindestens 2 Stunden bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Die aus dem Gefrierschrank entnommenen Proben wurden mit 14.000 rpm, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig entfernt. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten mit 14.000, 4°C zentrifugiert. Das Ethanol wurde mithilfe einer Pipette entfernt und das Eppendorfgefäß für 10 Minuten bei Raumtemperatur offen stehen gelassen. Nachdem das restliche Ethanol verdunstet ist, wurde 20 µl TE Buffer und 2 µl RNase-A Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für 30 Min bei 37°C, 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt.

Nach sorgfältigem Mischen der Proben wurden 2 µl der Probe in 98 µl TE Buffer gelöst und danach die OD bei 260 und 280 gemessen. 10 µg der Proben wurden auf das 1,5 % Agarose

Gel mit Ethidiumbromid geladen und das Gel für 1,5 – 2 Stunden mit 80 Volt laufen gelassen (16). Anschließend erfolgte mithilfe des Gel-Dokumentationsgerät die Beurteilung und Dokumentation der DNA Defragmentierung.

3.16 Apoptose Analyse mit Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)

3.16.1 Hintergrund

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besetzt darin, dass ein Strom von Zellen im einzelnen an einem Laserstrahl vorbeifließt. In Korrelation zu Art, Größe und Granularität der Zellen wird das Licht auf unterschiedliche Weise gestreut und anschließend von mehreren Photodetektoren erfasst. Die Informationen werden verarbeitet und zur Ansicht in tabellarischer oder graphischer Form dargestellt. Wurden die Zellen zuvor mit einem fluoreszierenden Farbstoff behandelt, wird die Fluoreszenzemission ebenfalls durch den Laser angeregt und mit einem zweiten Photodetektor erfasst. Dadurch können z.B. Farbstoffe wie Propidiumiodid, welche an die Guanin-Cytosin-Basenpaare der DNA einer Zelle binden, genutzt werden um den DNA Gehalt der Zelle zu messen (44,131).

Kommt es im Rahmen der Apoptose/Nekrose zu einer Änderung des Zellvolumens bzw. Auflösung der DNA kann dies mithilfe der Fluorescence activated cell sorting - Methode dargestellt werden.

3.16.2 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
D-PBS (Dulbecco`s Phosphate Bufferd Saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)

3.16.3 Lösungen

<i>Lösung</i>	<i>Materialien</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Hersteller</i>
HFS Lösung	Triton X-100	0,1 %	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	Natriumcitrat	0,1 %	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	Propidiumiodid	50 µg/ml	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)

3.16.4 Versuchsaufbau

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf einer 24 Well Zellkulturplatte ausplattiert und mit rhuEPO stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 12 Stunden konnten die Zelle mithilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting = FACS) untersucht werden.

Das überschüssige Medium wurde mit einer Pipette in ein FACS Röhrchen überführen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, welches ebenfalls in das FACS Röhrchen überführt wurde. Noch adhärente Zellen wurden mit 200 µl Trypsin / Well abgelöst und in das FACS Röhrchen hinzugegeben. Die Proben wurden bei 600 x G und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml kalten (unsterilem) PBS gewaschen und für 10 Sekunden auf dem Vortexer durchgemischt. Die Proben wurden anschließend erneut mit 600 x G, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig entfernt wurde, wurden jeweils 500 µl HFS-Propidiumiodid Lösung pro Röhrchen hinzugegeben und alles für 10 Sekunden auf dem Vortexer durchgemischt. Im Anschluss wurden die Proben für eine Nacht in Dunkelheit bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag konnten

die Proben am FACS vermessen werden: Dot Plot-SSC vs FSC; Histogramm Plot FL-2H oder FLA2 für Zellzyklus Messungen. 10000 counts/Messung (112).

3.17 Proliferations-Test mit Darbepoetin

3.17.1 Materialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Alamar Blue	Biozol GmbH, Eching (Deutschland)
Aranesp [®] , (Darbepoetin) [20µg]	Amgen GmbH, München (Deutschland)
DMEM Serum free	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
D-PBS (Dulbecco`s Phosphate Bufferd Saline)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkultur	
Zellmedium (abhängig vom Zelltyp)	

3.17.2 Versuchsaufbau

Aus einer Zelllösung wurden jeweils 20.000 Zellen in einem Volumen von 250 µl gelöst und auf die einzelnen Wells verteilt. Um die Zellen in den Wells zu adhären wurde die 96 Well Zellkulturplatte für 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt. Für jeden Tag, an dem die Proliferation gemessen wurde, wurde eine eigene Platte angefertigt. Für eine Messung über einen Zeitraum von 4 Tagen benötigte man 5 Platten. (Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4).

Von der aktuell zu messenden Platte (Bsp. Tag 0) wurde das Medium entfernt und durch 250 µl Alamar Blue und PBS im Verhältnis 1:9 ersetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Fluoreszenz der Zellen mit „Alamar Blue 3D Tox“ gemessen.

Alle anderen Zellkulturplatten, welche erst in den nächsten Tagen gemessen wurden, erhielten 250 µl einer Darbepoetin-Lösung mit einem Mischverhältnis von 1:1000 für Darbepoetin alpha und 5 % FCS Zellmedium, bzw. eine Kontrolllösung von 5 % FCS Zellmedium ohne Darbepoetin.

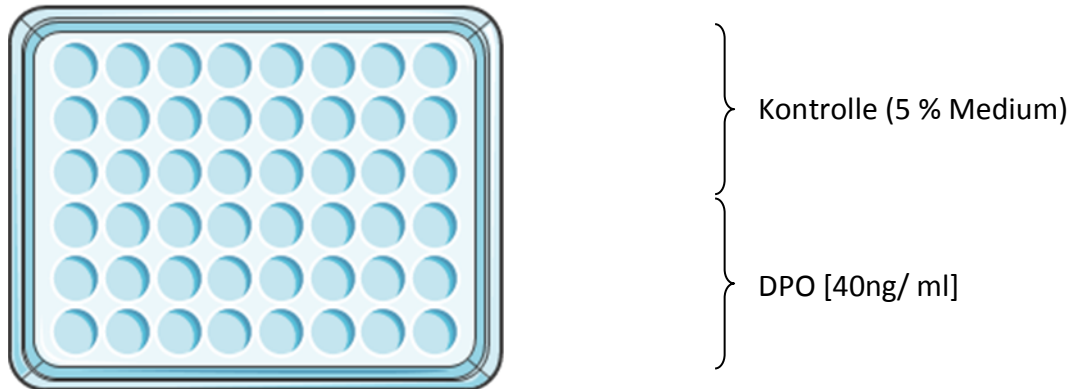


Abbildung 16 Proliferationstest

Bis zur Messung der Zellkulturplatten wurde diese wieder in den Inkubator gestellt. Ein Wechsel des Mediums, bzw. der DPO-Medium Lösung wurde bei einem Test über einen längeren Zeitraum alle 2 Tage durchgeführt.

Um an einem bestimmten Tag einen aktuellen Proliferationswert zu erhalten, wurde die benötigte Platte aus dem Inkubator genommen und nach dem oben genannten Verfahren mit „Alamar Blue 3D Tox“ (96) (s.a. Kapitel 3.14) gemessen.

3.18 Proteingewinnung und Western Blot Analyse

3.18.1 Materialien

<i>Lösung</i>	<i>Materialien</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Hersteller</i>
Lyse Puffer (pH 7,6)	TRIS-Base	10 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	NaCl	100 mM	Carl Roth GmbH+Co,

			Karlsruhe (Deutschland)
	0,5 % Nonident P-40		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	0,5 % Doxycholicsäure		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	EDTA in H ₂ O	10 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	Complete Stocklösung		
Lämmli Ladepuffer 5x	TRIS (ph 6,8)	300 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	50 % Glycerol		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	EDTA	5 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	10 % SDS		Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	0,05 % Brom Phenol Blau		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	12,5 % β -mercaptoethanol		Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)

Elektrophoresepuffer 5x	72 g Glycine	1 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	15 TRIS	125 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	5 g SDS	5 %	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	Volumen mit ddH ₂ O auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Laufpuffer	200 ml Elektrophoresepuffer		
	800 ml ddH ₂ O		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Transferpuffer (Anodenbuffer)	100 ml TRIS Caps 5x	0,05 M	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	75 ml Methanol	20 %	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	Volumen mit ddH ₂ O auf 500ml Gesamtvolumen auffüllen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Transferpuffer (Kathodenpuffer)	100 ml TRIS Caps 5x		Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	5 ml SDS	10 %	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

	Volumen mit ddH ₂ O auf 500ml Gesamtvolumen auffüllen		(Deutschland) B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Milchpulverlösung	5 % in TBS-T Puffer		Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
TBS-T Puffer (pH 7.6)	TRIS	10 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	NaCl	0,14 M	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
	0,1 % Tween-20		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	ddH ₂ O		B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Reaktionslösung (pH 8,5)	Luminol	0,25 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	p-Coumarinsäure	0,3 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
	TRIS-Puffer	100 mM	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
H ₂ O ₂ Lösung	TRIS-Puffer	100 mM	Carl Roth GmbH+Co,

(0,024 %, pH 8,0)

Karlsruhe
(Deutschland)

3.18.2 Versuchsaufbau

Um die Proteine aus den Tumorzellen zu gewinnen, wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer lysiert und anschließend für zehn Minuten bei 10.000 x G zentrifugiert. Um die Proteine quantitativ zu bestimmen, wurde diese mithilfe der Lowry Methode vermessen (83). Nach dem Prinzip der Bituretreaktion kommt es im ersten Abschnitt dieses Verfahren in einer alkalischen Lösung zu einer Bildung von blau-violetten Komplexen zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen. Im zweiten Abschnitt des Verfahrens werden die Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert, welches dann wiederum das gelbe Folin Ciocalteu Reagenz zu einem intensiv blauen Molybdanblau reduziert. Das Molybdanblau kann anschließend bei 750 nm vermessen werden.

Für die Analyse der Proben wurden bis zu 50 µg Proteine pro Probe eingesetzt. Die mit einem Ladepuffer versetzten Proben wurden für 10 Minuten bei 99°C erhitzt und anschließend mittels Gelelektrophorese auf einem 10 %igem Acrylamidgel für 45 Minuten bei 200 V aufgetrennt.

Trenngel	Sammelgel
Acrylamide Lösung 40 % (37,5.1)	Acrylamide Lösung 40 % (37,5.1)
1,5 M TRIS (pH = 8,8)	0,5 M TRIS (pH = 6,8)
Destilliertes H ₂ O	Destilliertes H ₂ O
10 % SDS Lösung	10 % SDS Lösung
TEMED	TEMED
10 % APS Lösung	10 % APS Lösung

Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Danach wurden die Proben mithilfe eines Transferpuffers auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend für 45 Minuten bei 0,25 Ampere laufen gelassen. Wenn der

Transfer erfolgreich abgeschlossen wurde, kann man mit der Ponceau Färbung und dem darin enthaltenen roten Azofarbstoff die positiv geladenen Proteine auf der Membran nachweisen. Der Farbstoff wurde anschließend mit H₂O wieder abgewaschen.

Nachdem die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Milchpulverlösung geblockt wurde, erfolgte die Inkubation der Proben mit dem Erstantikörper verdünnt in 1 % Milchpulverlösung bei 4°C über Nacht. Nachdem die Proben erneut TBS-T Puffer gewaschen wurden, konnte der Zweitantikörper bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf die Membran gegeben werden. Um die Membran mit der Chemilumineszenzreaktion zu entwickeln, wurde eine Reaktionslösung angesetzt und auf die Membran gegeben. Dadurch wurde das Luminol durch die am Zweitantikörper gekoppelte Merrettichperoxidase oxidiert. Das dabei entstehende Signal kann schließlich mit einem Röntgenfilm aufgenommen werden (20).

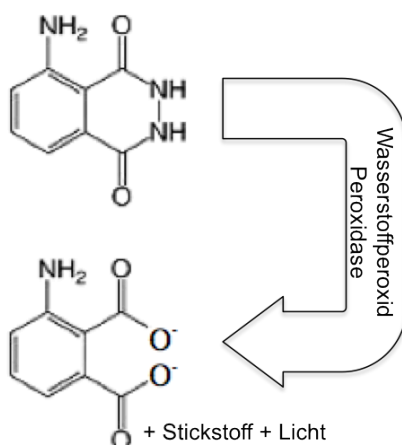


Abbildung 17 Enzymatische Oxidation von Luminol

Antikörper	Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Größe	Hersteller
GAPDH	Rabbit	1:5000	37 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (Deutschland)
p53	Mouse	1:1000	53 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (Deutschland)

Verwendete Erstantikörper

Antikörper	Verdünnung
Goat anti Rabbit	1:5000
Goat anti Mouse	1:5000

Verwendete Zweitantikörper

3.19 Statistik

Die Signifikanz, sowie die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Statistik-Programm Graph-Pad Prism 5 durchgeführt. Bei der Gegenüberstellung der gemessenen Werte von Lebertumorzellen im Vergleich mit den humanen Hepatozyten wurde zur statistischen Auswertung der Balkendiagramme der t-Test genutzt. Zur Verifizierung der Toxizität von rhuEPO auf die zu untersuchenden Zelllinien nach Stimulation mit rhuEPO wurde die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}), sowie für das Wachstumsverhalten der Zellen im Proliferationstest die lineare Regression bestimmt. Als statistisch ausreichendes Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Zellcharakterisierung

4.1.1 Harnstoff- und Glukosemessung

Im katabolen Zustand ist die Leber maßgeblich an der Energiebereitstellung mittels Glukoneogenese beteiligt. Als Ausgangsprodukte dienen nicht-kohlenhydrathaltige Produkte wie z.B. Pyruvat und Laktat. Untersucht wurde zum einen die basale Glukoseproduktion der Zellen, sowie nach der Zugabe von Pyruvat und Laktat.

Des Weiteren wird in der Leber durch den Harnstoffzyklus Stickstoff in Harnstoff umgewandelt und anschließend über die Niere ausgeschieden. Ornithin ist dabei eine wichtige Trägersubstanz um die Metaboliten über die mitochondriale Zellmembran zu transportieren. Untersucht wurde zum einen die basale Harnstoffproduktion, sowie nach der Zugabe von Ammoniumchlorid (NH_4Cl) und Ammoniumchlorid mit Ornithin.

Um Rückschlüsse darauf ziehen zu können, in welchem Maß die Lebertumorzellen fähig sind Harnstoff und Glukose zu produzieren wurden alle 7 Lebertumorzellen auf diese Eigenschaft hin untersucht. Die Zelllinien wurden jeweils unter den im Methodenteil angegebenen Bedingungen untersucht und zum Vergleich den humanen Hepatozyten gegenüber gestellt.

Die Glukosemessung in Abb. 18/19 zeigt, dass alle Tumorzelllinien im Verhältnis zu den humanen Hepatozyten nur im geringen Maß fähig sind Glukose zu produzieren. Da sich auch bei den Tumorzelllinien untereinander keine signifikanten Unterschiede ergeben haben und der Glukoseumsatz prozentual nur einen geringen Anteil an der Umsatzfähigkeit der humanen Hepatozyten beträgt, ist eine weitere Untersuchung der Tumorzellen in diesem Rahmen nicht erfolgt.

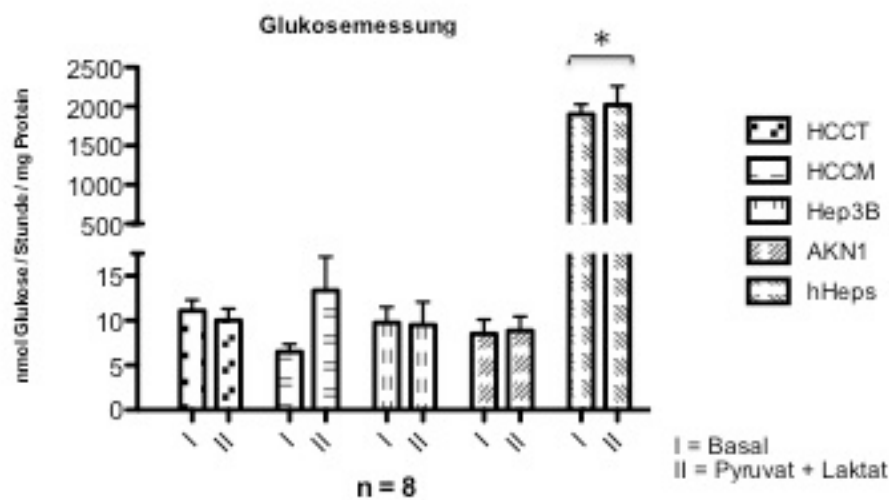


Abbildung 18 Glukosemessung der Lebertumorzellen im Vergleich mit humanen Hepatozyten

Dargestellt sind jeweils die Tumorzelllinien HCC-T, HCC-M, Hep3B und AKN1 im Vergleich mit humanen Hepatozyten. Gemessen wurde zum einen die basale Fähigkeit der Glukoneogenese, sowie nach der Zugabe von Pyruvat und Laktat. (* = Signifikanz der Tumorzellen gegenüber den humanen Leberzellen $p < 0.001$)

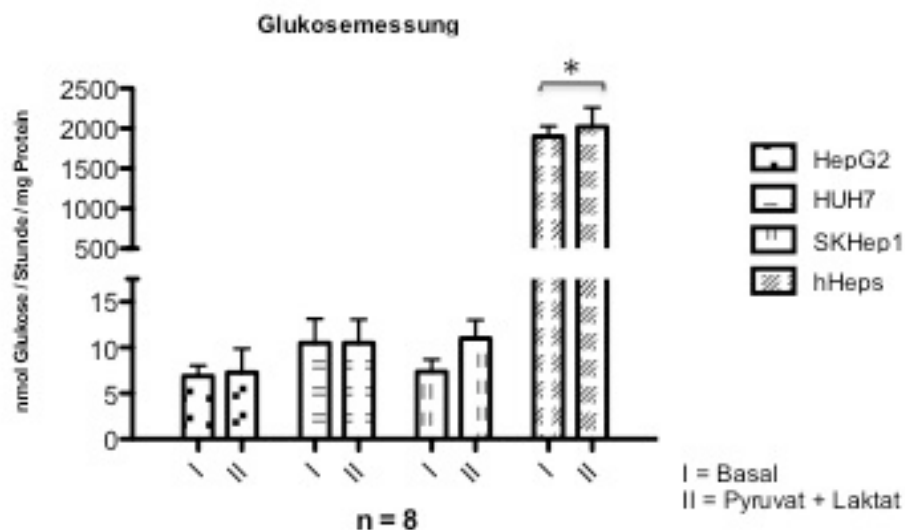


Abbildung 19 Glukosemessung der Lebertumorzellen im Vergleich mit humanen Hepatozyten

Dargestellt sind jeweils die Tumorzelllinien HepG2, HUH7 und SkHep1 im Vergleich mit humanen Hepatozyten. Gemessen wurde zum einen die basale Fähigkeit der Glukoneogenese, sowie nach der Zugabe von Pyruvat und Laktat. (* = Signifikanz der Tumorzellen gegenüber den humanen Leberzellen $p < 0.001$)

Auch bei der Harnstoffmessung in Abb. 20/21 zeigt sich, dass alle Tumorzelllinien im Verhältnis zu den humanen Hepatozyten nur im geringen Maß fähig sind Harnstoff zu produzieren. Da sich auch bei den Tumorzelllinien unter einander keine signifikanten Unterschiede ergeben haben und der Harnstoffumsatz prozentual nur einen geringen Anteil an der Umsatzfähigkeit der humanen Hepatozyten beträgt, ist eine weitere Untersuchung der Tumorzellen in diesem Rahmen nicht erfolgt.

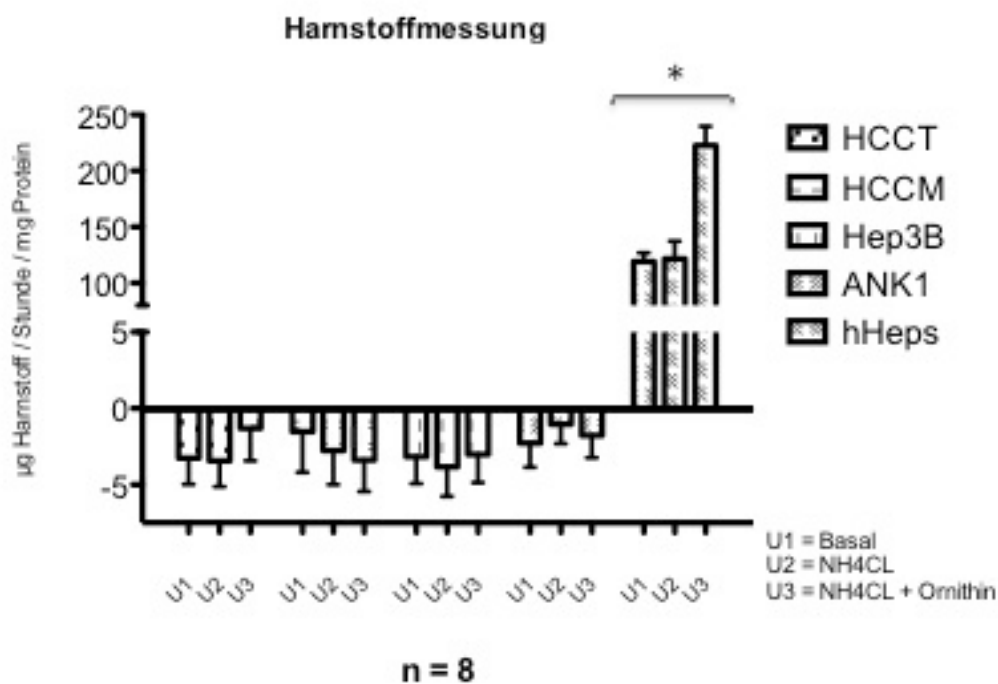


Abbildung 20 Harnstoffmessung der Lebertumorzellen im Vergleich mit humanen Hepatozyten

Dargestellt ist die Fähigkeit der Zellen Harnstoff umzusetzen. Der U1 Balken zeigt die basalen Ergebnisse der Zellen, während bei den Ergebnissen im U2 Balken zusätzlich NH₄CL sowie bei dem U3 Balken NH₄CL und Ornithin zugegeben wurde. (* = Signifikanz der Tumorzellen gegenüber den humanen Leberzellen $p < 0,01$)

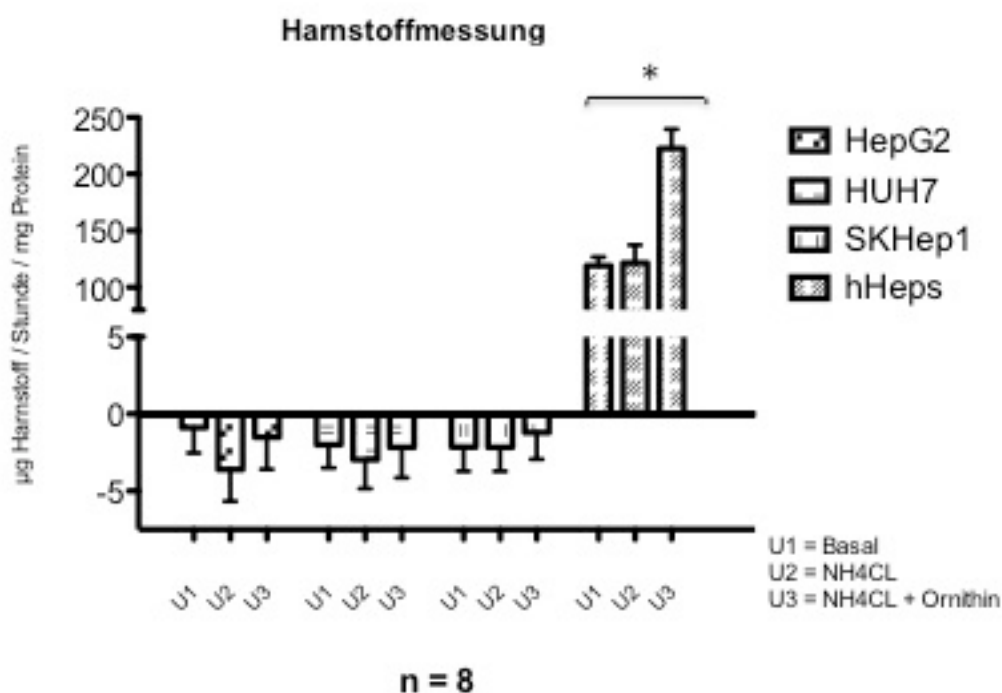


Abbildung 21 Harnstoffmessung der Lebertumorzellen im Vergleich mit humanen Hepatozyten

Dargestellt ist die Fähigkeit der Zellen Harnstoff umzusetzen. Der U1 Balken zeigt die basalen Ergebnisse der Zellen, während bei den Ergebnissen im U2 Balken zusätzlich NH₄CL sowie bei dem U3 Balken NH₄CL und Ornithin zugegeben wurde. (* = Signifikanz der Tumorzellen gegenüber den humanen Leberzellen $p < 0,01$)

4.1.2 Färbungen

Zur weiteren Charakterisierung der Tumorzelllinien wurden alle 7 Zelllinien mit verschiedenen Färbetechniken behandelt, lichtmikroskopisch beurteilt und fotografisch dokumentiert. Verglichen wurde die Intensität der Färbung jeweils mit einem Referenzbild von humanen Hepatozyten, welche mit der gleichen Technik angefärbt worden sind. Anhand dieser Versuche sollte ermittelt werden, inwieweit die sich Tumorzellen in den einzelnen Aspekten, welche durch die Färbung aufgezeigt werden, von den humanen Hepatozyten unterscheiden.

Glukose-6-Phosphatase Färbung

Während der Glukoneogenese wird durch das Enzym Glukose-6-Phosphatase der anorganische Phosphatrest des Substrates Glucose-6-Phosphat abgespalten. Bei der Glukose-6-Phosphatase Färbung kann mittels dem hinzugegebenem Ammoniumsulfid der abgespaltene Phosphatrest angefärbt werden. Über die Intensität der Färbung können somit Rückschlüsse auf die Aktivität bzw. das Vorhandensein des Enzym Glukose-6-Phosphatase gezogen werden.

Der Vergleich beider Zelllinien in Abb. 22 zeigt, dass die Intensität der Färbung bei den humanen Hepatozyten deutlichere größer ausfällt als bei den Tumorzellen. Bei den Tumorzellen zeigt sich nur eine schwache bis nicht vorhandene Färbung der Zellen. Da alle Tumorzellen das gleiche Ergebnis der Färbung gezeigt haben, wurde hier exemplarisch für alle Tumorzellen das Bild der HepG2 Tumorzellen den humanen Hepatozyten gegenüber gestellt.

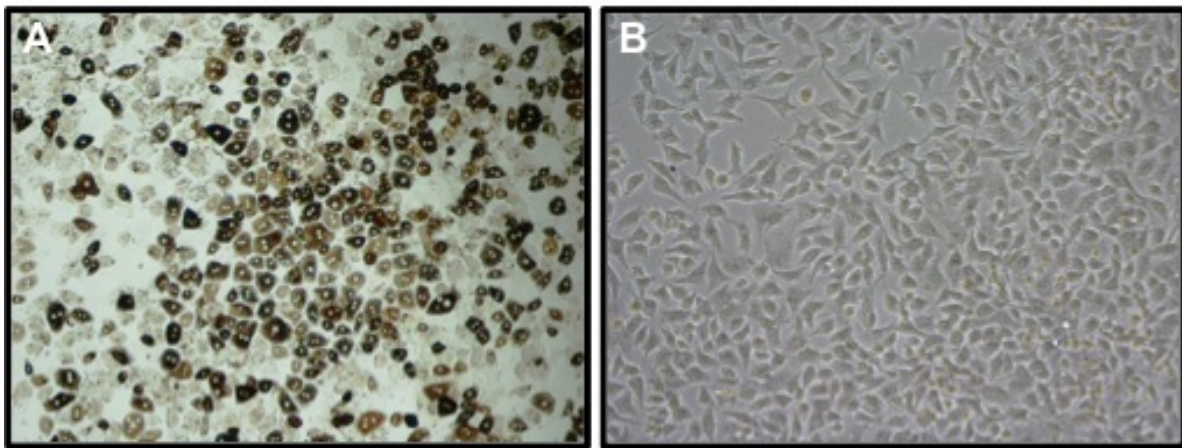


Abbildung 22 Glukose-6-Phosphatase Färbung Tumorzellen und humane Hepatozyten

Dargestellt sind links Zellen der humanen Hepatozyten (A), sowie rechts exemplarisch für die Lebertumorzellen die HepG2 Zellen (B). Beide Zellen wurden jeweils mit der Glukose-6-Phosphatase Färbung behandelt.

Ölrot-O Färbung

Der Azofarbstoff Ölrot-O (Sudanrot) löst sich sehr leicht in Ölen, Kohlenwasserstoffen, Alkoholen und Ethern. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von Ölrot-O kann man neutrale Fette in Zellkulturen und Spongiosa anfärben und im Lichtmikroskop darstellen.

Der Vergleich beider Zelllinien in Abb. 23 zeigt, dass die Intensität der Färbung bei den humanen Hepatozyten deutlichere größer ausfällt als bei den Tumorzellen. Die rötliche Aufhellung der humanen Hepatozyten weist auf ein vermehrtes Vorkommen von Neutralfetten innerhalb der Zellen hin. Bei den Tumorzellen hingegen zeigt sich nur eine schwache bis nicht vorhandene Färbung der Zellen. Da alle Tumorzellen das gleiche Ergebnis der Färbung gezeigt haben, wurde hier exemplarisch für alle Tumorzellen das Bild der AKN1 Tumorzellen den humanen Hepatozyten gegenüber gestellt.

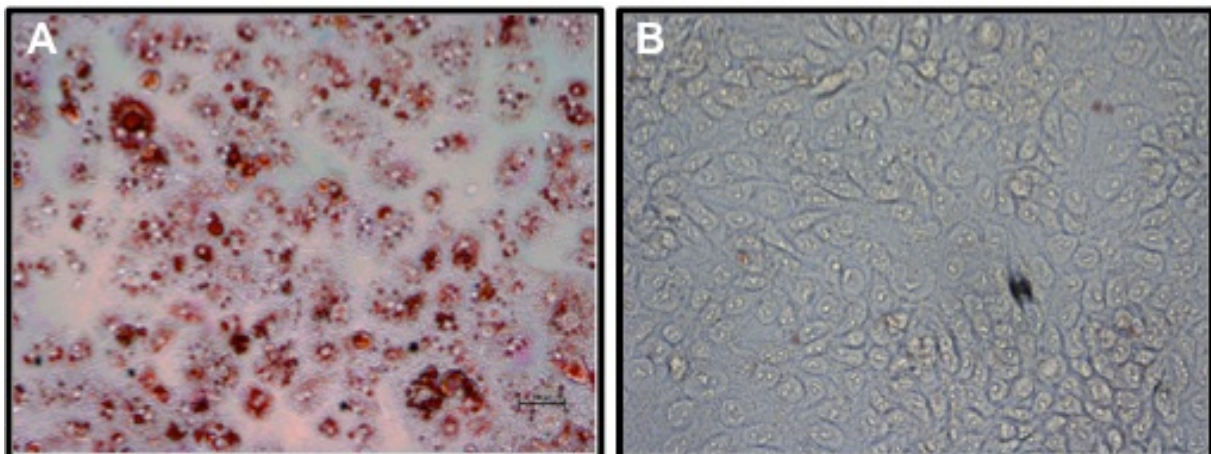


Abbildung 23 Ölrot-O Färbung Tumorzellen und humane Hepatozyten

Dargestellt sind links Zellen der humanen Hepatozyten (A), sowie rechts exemplarisch für die Lebertumorzellen die AKN1 Zellen (B). Beide Zellen wurden jeweils mit der Ölrot-O Färbung behandelt.

Perjod Säure-Schiff (PAS) Färbung

Die lichtmikroskopischen nachweisbaren rot-violetten Komplexe der PAS Färbung dienen zum Nachweis von kohlenhydrathaltigen Komponenten, wie z.B. Glykolen, Zellulose oder neutralen Mukopolysacchariden, in einer Zelle.

Der Vergleich beider Zelllinien in Abb. 24 zeigt, dass die Intensität der Färbung bei den humanen Hepatozyten deutlich größer ausfällt als bei den Tumorzellen. Die intensive rot-violette Färbung der humanen Hepatozyten lässt auf ein vermehrtes Vorkommen von kohlenhydrathaltigen Komponenten in den Zellen schließen. Die Tumorzellen zeigen zwar auch eine leichte rot-violette Färbung, allerdings nicht mit der gleichen Intensität wie sie bei den humanen Hepatozyten zu sehen ist.

Da alle Tumorzellen das gleiche Ergebnis der Färbung gezeigt haben, wurde hier exemplarisch für alle Tumorzellen das Bild der SkHep1 Tumorzellen den humanen Hepatozyten gegenüber gestellt.

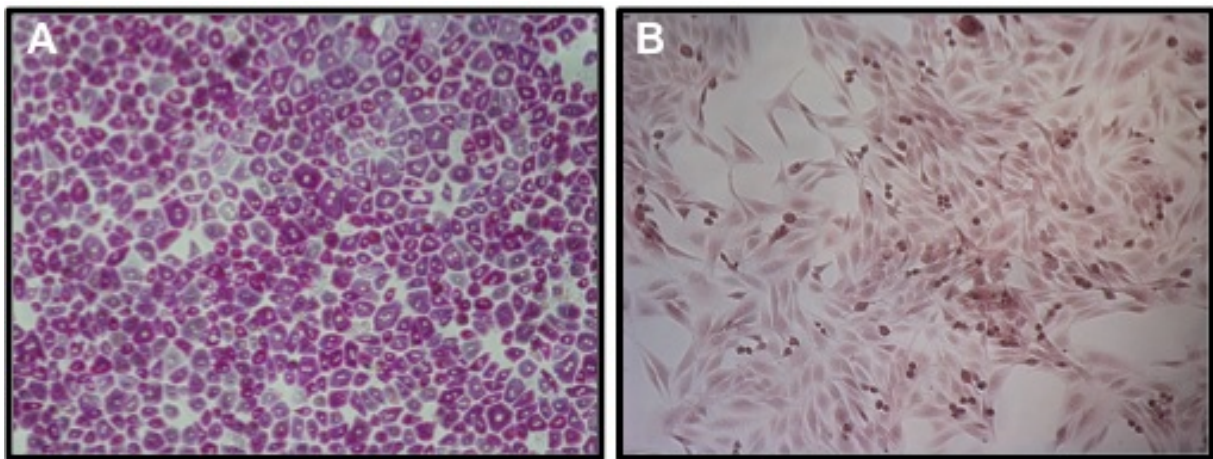


Abbildung 24 PAS Färbung Tumorzellen und humane Hepatozyten

Dargestellt sind links Zellen der humanen Hepatozyten (A), sowie rechts exemplarisch für die Lebertumorzellen die SkHep1 Zellen (B). Beide Zellen wurden jeweils mit der Perjod-Säure Schiff Färbung behandelt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bei allen 3 Versuchen die Tumorzellen nicht mit der gleichen Intensität anfärben ließen wie es jeweils bei den humanen Hepatozyten zu sehen war. Somit konnte hier kein signifikantes Ergebnis erzielt werden und die weiteren Versuche konzentrierten sich vor allem auf den toxischen bzw. proliferativen Einfluss von DPO auf die Zellen.

4.2 Wirkung von DPO auf humane Hepatozyten und Lebertumorzellen

Zur Bestimmung der Toxizität von DPO auf humanen Hepatozyten und Lebertumorzellen wurden die Zellen auf einer 96 Wellplatte kultiviert und mit Serum freiem Medium sowie unterschiedlichen DPO Konzentrationen (0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40, ng/ml) für 20 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dienten humanen Hepatozyten bzw. Tumorzellen, welche ohne den Zusatz von DPO inkubiert wurden.

Nach 20 Stunden wurde das Medium entfernt und durch Alamar Blue ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 2 Stunden wurde die Fluoreszenz in den noch lebenden Zellen mit „Alamar Blue 3D Tox“ gemessen.

4.2.1 Verringerte Zellzahl einzelner Tumorzelllinien nach Stimulation mit DPO

Ziel des Versuches war es, einen Grenzwert zu ermitteln, ab welchem die DPO Konzentration toxisch auf die Tumorzellen, bzw. humanen Hepatozyten wirkt und es zu einem Abfall der Zellzahl kommt. Die nach der Stimulation gemessene Fluoreszenzaktivität der Zellen gab Rückschlüsse auf die noch vorhandenen lebenden Zellen.

In Abb. 25 ist das Ergebnis aller Zelllinien graphisch zusammengefasst. Während sich bei vielen Zelllinien die Zellzahl auch bei einer hohen Konzentration an DPO nicht verringert hat, zeigten vor allem die Tumorzelllinien Hep 3B und HUH7 ein anderes Verhalten. Beide Zelllinien sind zu Beginn im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen in ihrer Zellzahl gleich. Im weiteren Verlauf zeigt sich aber bei steigender DPO Konzentration die Zellzahl der behandelten Tumorzellen degressiv. Ausgehend von den unbehandelten Kontrollzellen zeigt sich nach Stimulation mit DPO bei den Tumorzellen Hep 3B eine Abnahme der Zellzahl um ca. 50 % (EC₅₀ 3.077). Noch deutlicher zeigt sich dieser Effekt bei den Tumorzellen HUH7. Im Verlauf nimmt die Zellzahl um bis zu 80 % ab (EC₅₀ 5.365). Nach der Behandlung mit der höchsten DPO Konzentration, sind von der ursprünglichen HUH7 Zellpopulation nur noch $\frac{1}{5}$ der Zellen vorhanden.

Interessant war unter diesem Gesichtspunkt vor allem die Frage, ob dieses Verhalten generell für alle Tumorzellen gilt und wie sich eine hohe Konzentration von DPO auf humane Hepatozyten auswirkt. Die Stimulation von humanen Hepatozyten mit DPO zeigte keinen toxischen Einfluss auf ihre Zellzahl. Der lineare Verlauf in Abb. 25 zeigt, dass selbst bei einer hohen Konzentration von DPO die Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten humanen Hepatozyten unverändert ist. Die Tumorzelllinien HepG2, SkHep1, AKN1 und HCC-M zeigen das gleiche Ergebnis. Ihre Zellzahl wurde durch die Stimulation mit DPO nicht beeinflusst. Somit ließ sich bei diesen Tumorzelllinien kein Nachweis für eine toxische Wirkung von DPO mit einer Konzentration von bis zu 40 ng/ml erbringen. Die Tumorzelllinie HCC-T zeigte nach Stimulation mit DPO im Verlauf eine geringe Abnahme ihrer Zellzahl. Wurden die Zellen mit der höchsten DPO Konzentration behandelt, zeigte sich im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen eine Abnahme der Zellzahl um ca. 15 %. Verglichen mit dem bereits beschriebenen Effekt von DPO auf die Tumorzelllinien Hep 3B und HUH7, ist der gemessene toxische Effekt von DPO auf die HCC-T Tumorzellen allerdings nur gering.

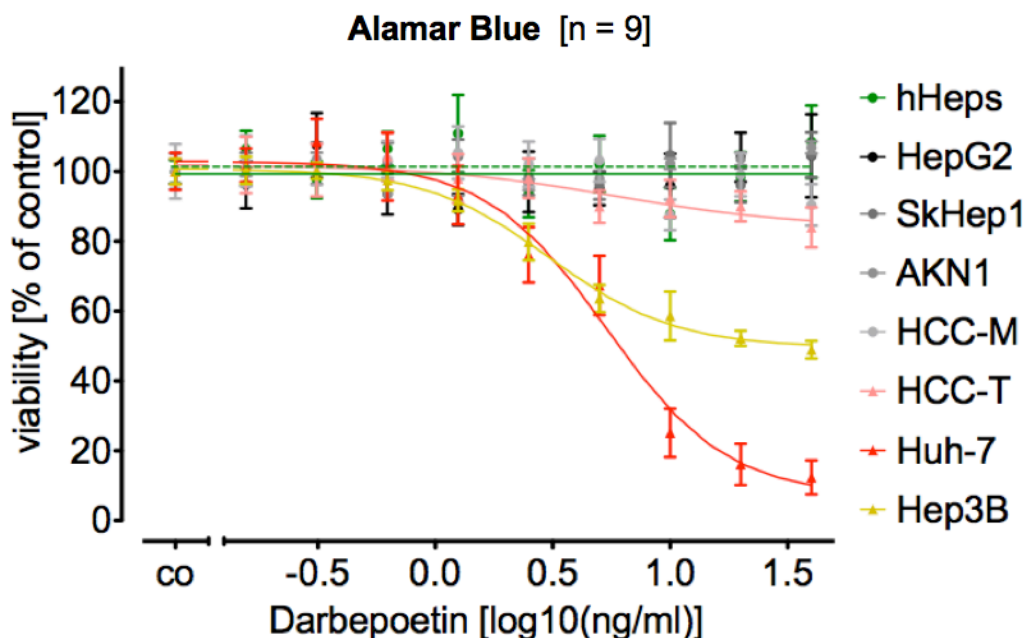


Abbildung 25 Wachstumsverhalten humaner Hepatozyten und Tumorzellen unter Behandlung mit DPO

Dargestellt ist das fraktionelle Überleben der Zellen nach einer Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von DPO im Vergleich zu unbehandelten Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach der Behandlung mit DPO ein Großteil der behandelten Tumorzellen in ihrer Zellzahl nicht beeinflusst werden und DPO keinen toxischen Effekt auf diese Tumorzellen ausübt. Gleiches gilt für die humanen Hepatozyten, bei welchem ebenfalls kein toxischer Einfluss von DPO auf ihre Zellzahl gezeigt werden konnte.

Nur bei den Tumorzelllinien Hep3B und HUH7 zeigte sich ein deutlich toxischer Effekt von DPO. Vor allem die Zellzahl der HUH7 Tumorzellen konnte durch die Stimulation mit DPO um bis zu 80 % verringert werden. Unklar ist aber noch, durch welchen Prozess die Abnahme der Zellzahl nach Stimulation mit DPO zu begründen ist. Da sich bei der Tumorzelllinie HUH7 die signifikantesten Ergebnisse gezeigt haben, wurden mit dieser Zelllinie zur genaueren Analyse weitere Versuche durchgeführt.

4.3 DPO induzierte Apoptose in Tumorzellen

Die Untersuchung der Tumorzelllinien, während der Behandlung mit DPO, verdeutlichte vor allem eine Auffälligkeit bei den HUH7 Zellen. Wie gezeigt werden konnte, gab es eine Abnahme der Zellanzahl in Relation zur ansteigenden DPO Konzentration. Erste Überlegungen wodurch sich dieses Verhalten begründen ließe beliefen sich auf Frage nach einem durch DPO induziertem Zelluntergang.

4.3.1 Kein Hinweis von Apoptose im DNA Laddering

Zur Überprüfung ob DPO als Ursache für einen programmierten Zelltod der HUH7 Zellen in Frage kommt wurden die Zellen auf einer 6 Well Zellkulturplatte ausplattiert, mit einer erhöhten Konzentration an DPO stimuliert (30, 40 ng/ml) und für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche ohne den Zusatz von DPO inkubiert wurden. Anschließend wurden die DNA Proben der Zellen eingesammelt und auf ein 1,5 % Agarose Gel mit Ethidiumbromid aufgetragen.

Der zu untersuchende Faktor bei diesem Versuch war, ob sich in der Gelelektrophorese eine Apoptoseleiter zeigt. Die Darstellung einer DNA Leiter wird als sensitive Methode

angesehen, um einen programmierten Zelltod vom nekrotischen Zelluntergang zu unterscheiden (133). Lässt sich mithilfe der Gelelektrophorese nach Stimulation der Tumorzellen mit DPO eine DNA Leiter darstellen, ist dies ein Hinweis darauf, dass in den Zellen eine Apoptose stattgefunden hat. Die DNA aus nekrotischen Zellen würde sich hingegen als sogenannte DNA-Schmierer („smear“) zeigen (46).

Die DNA Proben der HUH7 Zellen welche mit 30 bzw. 40 ng/ml stimuliert wurden zeigen kein für die Apoptose charakteristisches Längsmuster in der DNA Gelelektrophorese. Gleiches gilt für die Proben der Kontrollzellen welche nicht mit DPO stimuliert wurden. Dies verdeutlicht, dass durch die Stimulation von DPO keine Apoptose in den Zellen stattgefunden hat.

Ein Absterben der Zellen aufgrund von Nekrose kann anhand dieser Gelelektrophorese ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich auch hierfür keine typischen Anzeichen finden lassen. Sollte ein nekrotischer Vorgang stattgefunden haben, würden sich auf dem Bild sogenannte DNA Schmierer („smear“) zeigen.

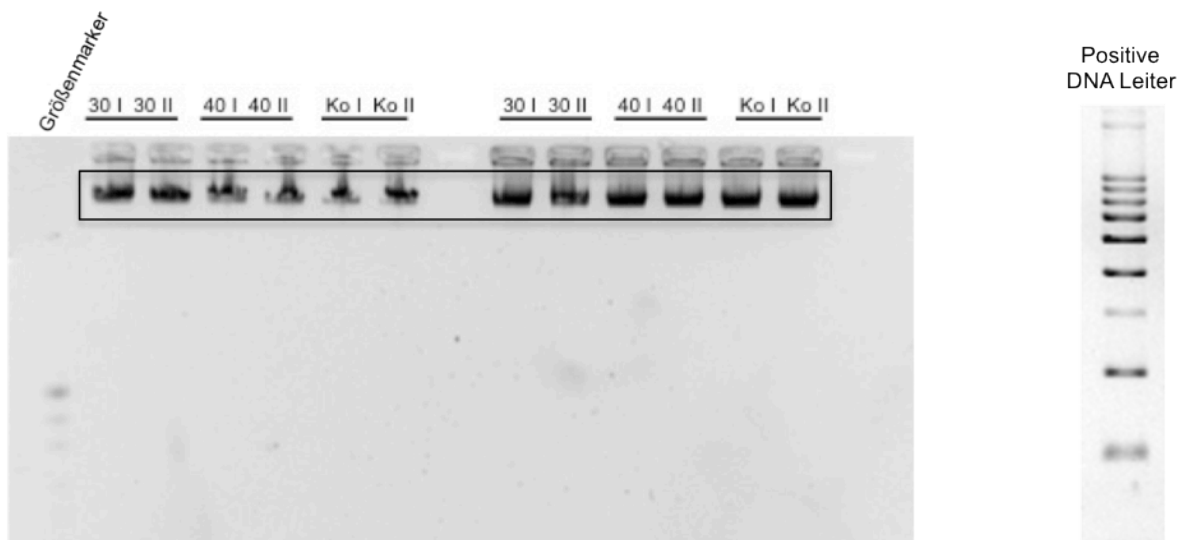


Abbildung 26 Gelelektrophorese Tumorzelllinie HUH7

Dargestellt sind 2 verschiedene DNA Proben der HUH7 Tumorzellen, welche jeweils zuvor mit einer Konzentration von 30 ng/ml (30 I+II) bzw. 40 ng/ml (40 I +II) sowie ohne DPO (Ko I+II) stimuliert wurden. Größenmarker = Puc19. Das rechte Bild zeigt exemplarisch den Verlauf einer positiven DNA Leiter bei vorhandenen DNA Fragmenten (69).

Die Gelelektrophorese der anderen Tumorzelllinien lässt ebenfalls kein charakteristisches Längsmuster in Form einer DNA Leiter bzw. Schlieren der DNA erkennen. Aufgrund der Ergebnisse der Gelelektrophorese können auch bei diesen Tumorzellen apoptotische bzw. nekrotische Zellvorgänge ausgeschlossen werden.

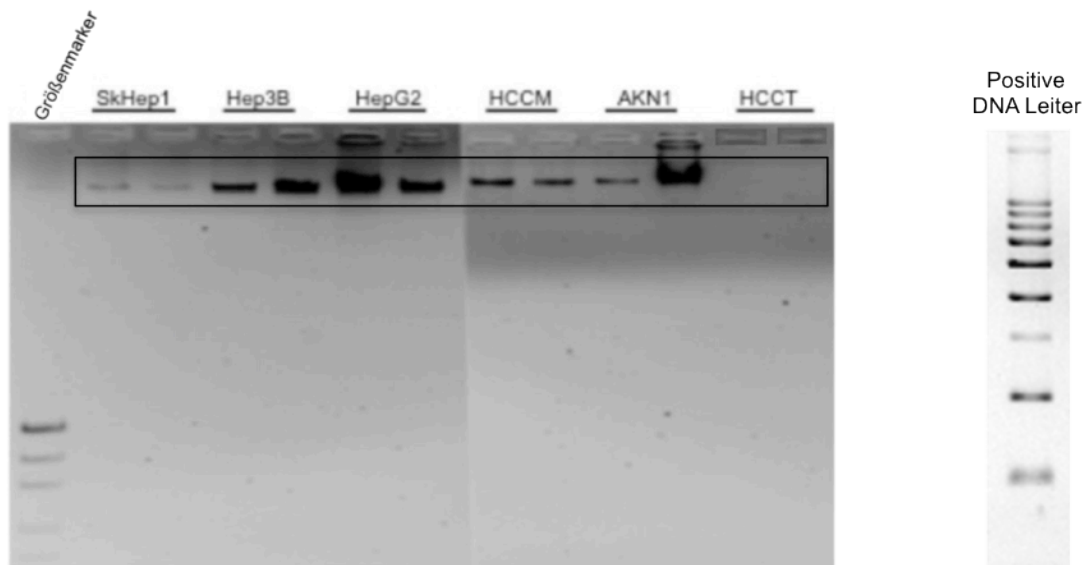


Abbildung 27 Gelelektrophorese Tumorzelllinien SkHep1 Hep3B HepG2 HCC-M AKN1 HCC-T

Dargestellt sind 2 verschiedene DNA Proben der Zellen SkHep1, Hep3B, HepG2, HCC-M, AKN1 und HCC-T. Die jeweils linke DNA Probe wurde mit 40 ng/ml DPO stimuliert. Die jeweils rechte Probe wurde nicht mit DPO stimuliert und dient als Kontrolle. Größenmarker = Puc19. Das rechte Bild zeigt exemplarisch den Verlauf einer positiven DNA Leiter bei vorhandenen DNA Fragmenten (69).

4.3.2 Fluorescence activated cell sorting Analyse

Zur weiteren Analyse der HUH7 Zellen in Bezug auf die Frage nach einem Zelluntergang wurde zusätzlich die Methode der Durchflusszytometrie mit Hilfe eines FACS Gerätes angewendet. Dieses Messverfahren erlaubt die Analyse der Zellen nach ihrer Form und Struktur. Mit der Auswertung können Rückschlüsse auf die Granularität, Größe und DNA-Gehalt (durch Färbung der DNA mit Propidiumiodid) der Zellen gezogen werden und somit untersucht werden ob eine Apoptose oder Nekrose in den Zellen stattgefunden hat.

Die HUH7 Zellen wurden auf einer 24 Well Zellkulturplatte ausplattiert, mit einer erhöhten Konzentration an DPO stimuliert (40 ng/ml) und für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche ohne den Zusatz von DPO inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend in ein FACS Röhrchen überführt und am FACS Gerät vermessen: Dot Plot-SSC vs FSC; Histogramm Plot FL-2H oder FLA2 für Zellzyklus Messungen. 10000 counts/Messung.

Die Verteilung der HUH7 Zellgröße nach der Stimulation mit DPO in Abb. 28 bewegt sich in einem Größenbereich von 10000 bis 60000. Gleiches gilt für die Größenverteilung der unbehandelten Kontrollzellen. Dies bedeutet, dass sich die Größe der Zellen in der Norm befindet. Während dem Vorgang der Apoptose in einer Zelle kommt es zu einer Verkleinerung des Zellvolumens, wohingegen bei einem nekrotischen Zelltod das Zellvolumen zunächst zunehmen würde, bevor es zur Fragmentierung und Auflösung des Zellkernes kommt. In Abb. 28 zeigt sich kein vergrößertes, bzw. verkleinertes Zellvolumen. Somit konnte kein Hinweis auf eine in den Zellen stattgefundenene Apoptose/Nekrose gefunden werden.

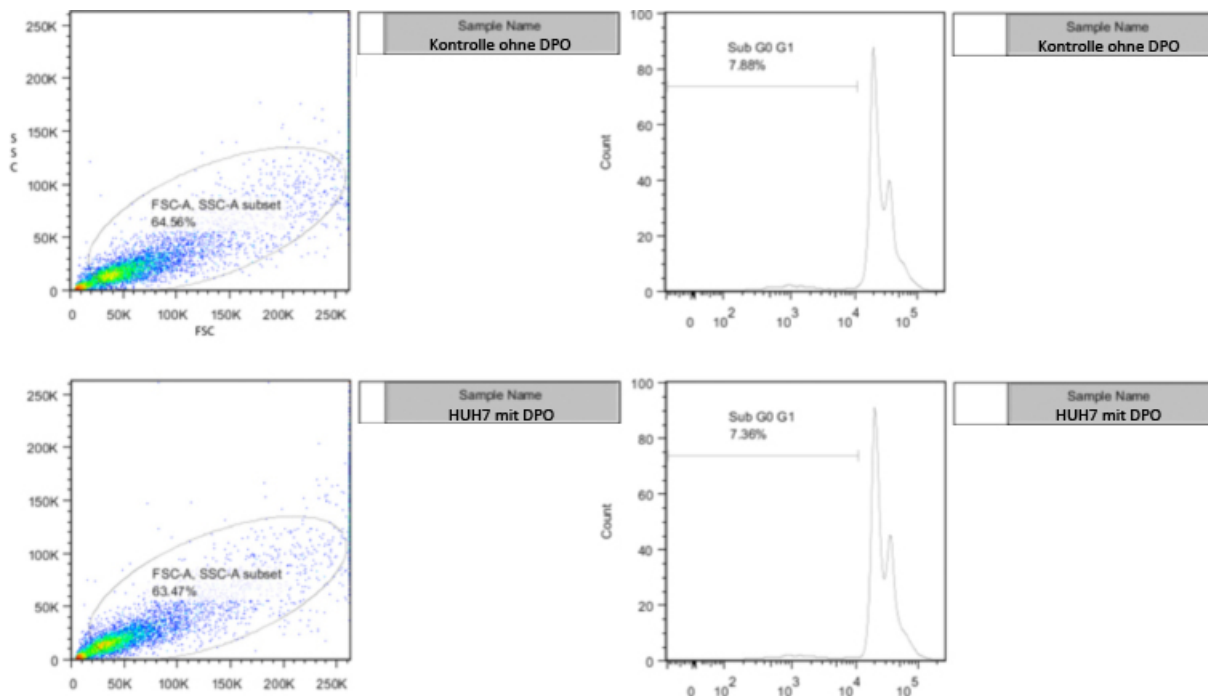


Abbildung 28 Durchflusszytometrie der HUH7 Zellen

Dargestellt sind jeweils 2 Proben der HUH7 Zellen, eine Probe wurde mit 40 ng/ml DPO stimuliert und die andere ohne DPO Zugabe dient als Kontrolle. Zu sehen ist jeweils links die Größe der Zellen, sowie im rechten Bild die Granularität der Zellen.

Mithilfe der Messung der Propidiumiodid Fluoreszenzintensität können die Phasen des Zellzyklus dargestellt werden. Dadurch, dass sich je nach Phase des Zellzyklus die DNA verändert, erlaubt die Färbung der DNA unter Verwendung von Propidiumiodid mit anschließender Fluoreszenzmessung eine graphische Darstellung der Zellzyklusphasen. Wie in Abb. 29 schematisch dargestellt, würde man bei einem nekrotischen Zelluntergang mehrerer Zellen zunehmend fraktionierter DNA vorfinden. Bei den HUH7 Zellen in Abb. 29 zeigt sich allerdings keine vermehrt fraktionierte DNA, wodurch auch hier kein Hinweis auf eine stattgefundenene Nekrose in der Zelle vorliegt.

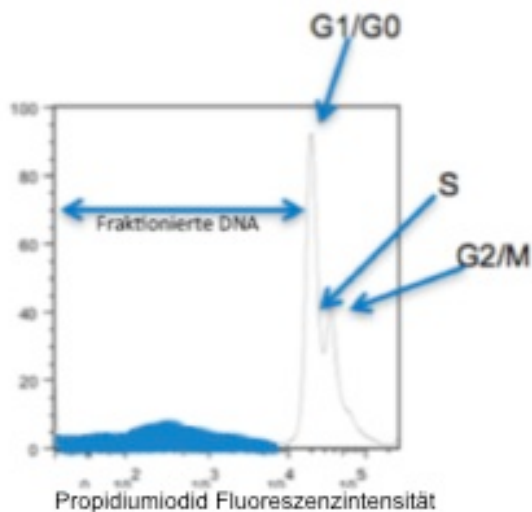


Abbildung 29 Schematische Darstellung der Fluorescence activated cell sorting Analyse

Dargestellt sind die Phasen des Zellzyklus, in welcher sich die Zellen momentan befinden, sowie der (**blaue**) Bereich im welchem man die fraktionierte DNA erwarten würde wenn ein nekrotischer Zelluntergang in der Zelle stattgefunden hätte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse des DNA Laddering sowie der FACS Analyse zwar keine Erklärung für die abnehmende Zellzahl der HUH7 Zellen nach der Stimulation mit DPO liefert, jedoch aber ausgeschlossen werden kann, dass die Abnahme der Zellzahl durch einen apoptotischen bzw. nekrotischen Prozess in der Zelle zu begründen ist.

4.4 Hemmende Wirkung von DPO auf die Proliferation von HUH7

Nachdem ein durch DPO induzierter Zelltod ausgeschlossen werden konnte, wurde das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Eine Möglichkeit ist, dass die Abnahme der Zellzahl dadurch zu begründen ist, dass unter der Stimulation von DPO die Proliferation der HUH7 Zellen gehemmt wird.

Für diesen Versuch wurde die Tumorzelllinie HUH7 auf einer 48 Well Platte ausplattiert und für insgesamt 4 Tage inkubiert. Die Zellen wurden während diesem Zeitraum mit einer Konzentration von 20, 30 und 40 ng/ml DPO stimuliert. Zur Kontrolle dienten unbehandelte HUH7 Tumorzellen, welche ohne die Zugabe von DPO inkubiert wurden. Jeweils nach einem Tag wurde mithilfe von Alamar Blue die Fluoreszenz der Zelllinien gemessen und die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen gegenübergestellt.

Dieser Schritt wurde jeden Tag wiederholt, so dass man am Ende das Wachstumsverhalten der Zellen über einem Zeitraum von 4 Tagen beobachten konnte.

Bei dem in Abb. 30 dargestellten Versuch wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von DPO behandelt. Zellen, welche mit DPO behandelt wurden, verfügen über ein geringeres Proliferationspotential als die unbehandelten Kontrollzellen. Die unterschiedlich verabreichte Konzentration von DPO steht in direkter Relation zum Proliferationsverhalten der Zellen. Die Zellen, welche mit der höchsten Dosis an DPO behandelt wurden (40 ng/ml) können nicht weiter proliferieren und zeigen zudem eine geringe Abnahme ihrer Zellpopulation. Wurden die Zellen mit einer geringeren Dosis DPO behandelt (20, 30 ng/ml) sind diese zwar weiterhin fähig zu proliferieren, allerdings nur mit einem wesentlich geringerem Potential als die unbehandelten Kontrollzellen.

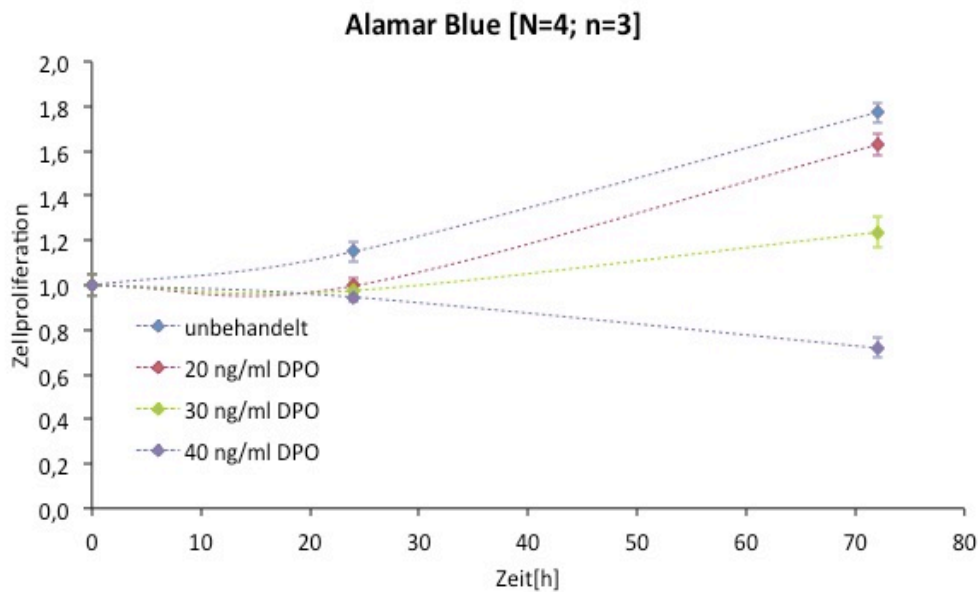


Abbildung 30 Wachstumskurve der HUH7 Zellen über 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentration

Dargestellt ist das Wachstumsverhalten der Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die Zellen wurden jeweils mit einer unterschiedlichen Konzentration von DPO behandelt (20, 30, 40 ng/ml) und den unbehandelten Zellen gegenübergestellt. (Lineare Regression der unbehandelten Zellen $p = 0.0953$, 20 ng/ml – $p = 0.2149$, 30 ng/ml – $p = 0.2655$, 40 ng/ml – $p = 0.0968$)

4.5 Western Blot

Die Western Blot Methode dient zum Nachweis von elektrophoretisch nach Größe getrennter Proteinfragmente mittels spezifischer Antikörper. Als „Wächter des Genoms“ spielt das Protein p53 bei der Tumorsuppression von entarteten Zellen eine zentrale Rolle und ist somit von Interesse um zu klären, warum einige Tumorzelllinien nach Applikation von DPO nicht weiter proliferieren.

Zur Messung der Aktivität von p53 in den Tumorzellen HUH7 und Hep3B wurde mittels Immunblot die Expression von p53 in den Zellen gemessen.

4.5.1 Vermehrte Expression von p53 in HUH7 Zellen

In Korrelation zum Proliferationstest wurden die Zellen erneut für insgesamt 96 Stunden mit DPO behandelt. Anschließend wurde mithilfe der Western-Blot Methode die Expression des p53 Protein gemessen. Zur Kontrolle wurde die Expression von GAPDH mitgeführt.

In Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation mit DPO zeigt sich bei den HUH7 Zellen eine zunehmende Expression von p53. Zum Zeitpunkt 0, ohne eine Stimulation der Zellen mit DPO, zeigt sich mit 26,64 % nur eine sehr geringe Expression von p53. Nach jeweils 24 Stunden lässt sich ein stetiger Anstieg der Expression von p53 nachweisen. Mit einer kurzen Regression der Expression nach 72 Stunden, zeigt sich mit 68,62 % die größte Aktivität von p53 nach 96 Stunden. Der direkt Vergleich von zeigt somit eine um den Faktor 3 gesteigerte Expression von p53 über einem Zeitraum von 96 Stunden nach DPO Applikation gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen.

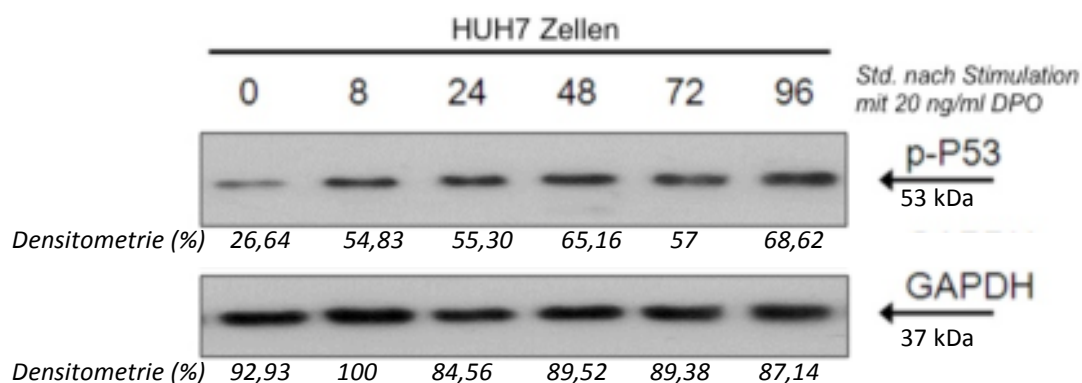


Abbildung 31 Expression der Proteine p53 und GAPDH in HUH7 Zellen

Dargestellt ist die Expression der Proteine p53 und GAPDH von den HUH7 Zellen. Die Expression der Proteine wurde jeweils nach der Stimulation mit DPO gemessen in einem Zeitraum von 0 Std., 8 Std., 24 Std., 48 Std., 72 Std. und 96 Std. Die Densitometrie der einzelnen Werte ergibt sich in Abhängigkeit zum Wert mit der größten Farbdichte.

4.5.2 Vermehrte Expression von p53 in Hep3B Zelle

In Korrelation zum Proliferationstest wurden die Zellen erneut für insgesamt 96 Stunden mit DPO behandelt. Anschließend wurde mithilfe der Western-Blot Methode die Expression des p53 Protein gemessen. Zur Kontrolle wurde die Expression von GAPDH mitgeführt.

Die Hep3B Zellen zeigen zu fast allen Messzeitpunkten eine vermehrte Expression von p53. Die Messung nach 8 Stunden stellt hierbei die Ausnahme, da hier nur eine schwache Aktivität von p53 gemessen werden konnte. Allerdings zeigt sich bei dem zur Kontrolle mitgeführten GAPDH Aktivität ebenfalls ein Rückgang der Aktivität zu den 8 Stundenwerten.

Gegenüber dem Ausgangswert der unbehandelten Kontrollzellen von 91,13 % zeigt sich 72 Stunden nach der DPO Applikation eine Zunahme der p53 Expression auf bis zu 100 %. Lediglich zu Ende der Messung nach 96 Stunden zeigt sich eine geringe Abnahme auf 91,57 % der Expression von p53.

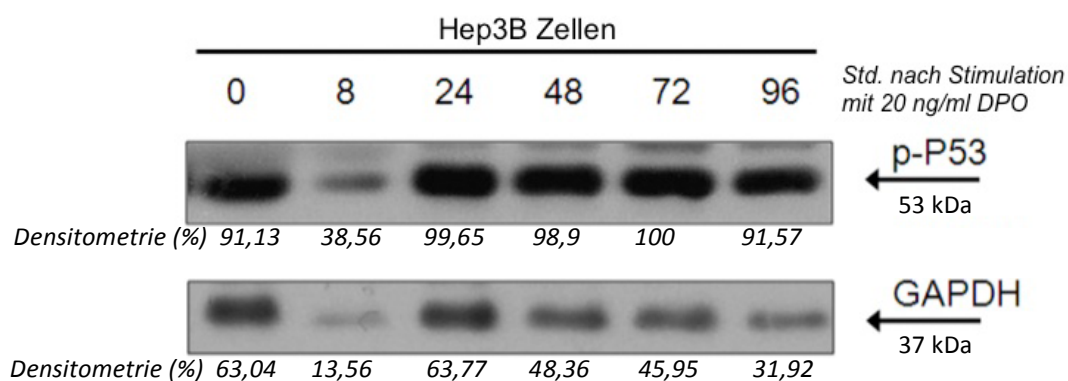


Abbildung 32 Expression der Proteine p53 und GAPDH in Hep3B Zellen

Dargestellt ist die Expression der Proteine p53 und GAPDH von den Hep3B Zellen. Die Expression der Proteine wurde jeweils nach der Stimulation mit DPO gemessen in einem Zeitraum von 0 Std., 8 Std., 24 Std., 48 Std., 72 Std. und 96 Std. Die Densitometrie der einzelnen Werte ergibt sich in Abhängigkeit zum Wert mit der größten Farbdichte.

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Wirkung von rhuEPO auf humane Hepatozyten und Lebertumorzellen zu untersuchen. Dabei waren besonders die proliferativen Eigenschaften der Zellen nach Stimulation mit rhuEPO von Interesse.

Das für den Menschen essentielle Glykoprotein-Hormon Erythropoetin wird primär in der Niere synthetisiert. Als Bestandteil der Hämatopoese führt Erythropoetin bei einem verminderten Sauerstoffgehalt im Blut zur gesteigerten Erythropoese (67). Nachdem mittels DNA Technologie Erythropoetin molekular geklont und sequenziert werden konnte, steht es nun auch in verschiedenen rekombinanten Formen der modernen Medizin zur Verfügung (48,105). Insbesondere in der therapeutischen Anwendung wird rhuEPO eingesetzt, um bei eigener ineffektiver Hämatopoese die Produktion zusätzlich zu steigern. Eine Anämie, charakterisiert durch ein vermindertes Blutvolumen, kann u.a. Folge von Niereninsuffizienz, akutem Blutverlust oder medikamentösen Nebenwirkungen sein. RhuEPO findet bereits effektiv Anwendung in den Bereichen der Onkologie (50), Chirurgie (6), sowie bei diversen anderen chronischen entzündlichen und infektiösen Erkrankungen mit anämischen Begleiterscheinungen (41). Während rhuEPO in der Öffentlichkeit vor allem als Dopingmittel für den Leistungssport bekannt wurde (120), eröffnen sich neben der fördernden Wirkung auf die Erythrozytenpopulation noch weitere Wege für den Gebrauch von rhuEPO. Angesichts der proangiogenetischen (21), sowie antioxidativen (5) und antiapoptotischen (63) Eigenschaften ergibt sich nach Applikation von rhuEPO ein möglicher protektiver Effekt auf Zellen, um diese vor äußeren schädlichen Einflüssen zu bewahren. Während Organtransplantationen, z.B. einer Lebertransplantation, sind die Zellen des Spenderorgans häufig einer längeren Ischämiezeit ausgesetzt, wodurch es nach anschließender Reperfusion in-vivo zu einer Schädigung der Leberzellen kommen kann. Aufgrund von Vasokonstriktion, Endothelschwellung und Thrombozytenaggregation werden vermehrt inflammatorische Zytokine und Tumornekrosefaktoren freigesetzt, welche das postoperative Ergebnis zusätzlich beeinträchtigen können (136). Erste Versuche am Tiermodell verdeutlichten die protektive Wirkung auf mit rhuEPO behandelten Leberzellen nach der Transplantation. Durch eine gesteigerte Reperfusion zeigten die Leberzellen eine erhöhte Regenerationsfähigkeit bei gleichzeitiger Abnahme der Apoptose- und Nekroseaktivität (108,141).

Um die protektive Wirkung von rhuEPO auch elektiv in der Leberchirurgie beim Menschen nutzen zu können, galt es herauszufinden welchen Einfluss rhuEPO auf humane Hepatozyten und vor allem auf Lebertumorzellen hat. Vorab wurde dazu der zytotoxische Einfluss von rhuEPO analysiert. Es zeigte sich, dass eine zunehmende Konzentrationen von rhuEPO keinen zytotoxischer Einfluss auf humane Hepatozyten hat. In Korrelation mit dem bereits erwähnten protektiven Effekt von rhuEPO auf Leberzellen (141) ist dieses Ergebnis nicht unerwartet. Vielmehr kann rhuEPO durch seine antiapoptischen (63) Eigenschaften auf Leberzellen resistenzfördernd gegenüber zytotoxischen Einflüssen wirken. Die Untersuchung der Lebertumorzellen zeigte für einen Großteil der Zelllinien ebenfalls keinen zytotoxischen Effekt. Bei zunehmender Konzentration von rhuEPO blieb die Zellzahl der Lebertumorzellen unverändert im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Dies deckt sich nicht mit anderen Studien, die nach der Behandlung von Tumorzellen mit rhuEPO eine verstärkte Zellproliferation beobachteten. Dies zeigt der Vergleich zweier an Brustkrebs erkrankter Patientengruppen mit dem Ergebnis einer geringeren Überlebenschance der mit rhuEPO behandelten Gruppe (77). In einer näheren Analyse konnte in malignen reproduzierenden weiblichen Tumoren eine für die Synthese von EPO und EPOR verantwortliche vermehrte Expression von mRNA nachgewiesen werden (1,138). Diese Beobachtung zeigte sich auch bei anderen malignen Erkrankungen, wie z.B. der Expressierung von EPOR auf Nierenzellkarzinomen (130), Rhabdomyosarkom, Hepatoblastom, Wilms Tumor (11) Malignes Melanom (113) oder auch dem Vestibularisschwannom/Akustikusneurinom (32). Ein im Jahr 2003 im Carciogenesis Journal veröffentlichter Artikel einer Forschungsgruppe gibt Aufschluss darüber, dass in insgesamt 24 malignen menschlichen Tumorzelllinien eine Expression von EPO und EPOR nachgewiesen werden konnte (139). Ursächlich kann für diesen Effekt der proangiogenetische Einfluss (21) von rhuEPO und die folglich verbesserte Vaskularisierung der Zellen eine entscheidende Rolle spielen.

Allerdings spaltet sich die Meinung der Fachliteratur in Bezug auf den beschriebenen Effekt der wachstumsfördernden Wirkung von rhuEPO auf Tumorzellen in zwei Gruppen. Die erste Gruppe elaboriert den zuvor erwähnten Forschungsansatz der Nachweisbarkeit des proliferativen Einflusses von rhuEPO auf entartete Tumorzellen. Die zweite negiert die wachstumsfördernde Wirkung von rhuEPO in Bezug auf Tumorzellen. Diese Ansicht basiert auf Studien, welche den proliferativen Effekt nicht bestätigen können. Zwar konnte für das

Wachstum der Tumorzellen beim Harnblasenkrebs ein Zusammenhang mit dem EPOR hergestellt werden, allerdings unabhängig von der rhuEPO Supplementation. Die mit rhuEPO behandelten Zellen zeigten kein zusätzliches Zellwachstum (13). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls keine Reaktion im Sinne einer Zellvermehrung in Anzahl oder Größe beim Mammakarzinom (48,68) und Ovarialkarzinom (97) nachgewiesen werden. Insgesamt konnte die Analyse unterschiedlicher Tumorzellen, u.a. auch die von Lebertumorzellen, eine Expression von EPOR mRNA innerhalb der Zellen nachweisen. Jedoch mit dem Unterschied, dass hier unter rhuEPO Substitution keine gesteigerte Expression der Rezeptoren zu finden war (73). Korrelierend konnte auch für die in dieser Arbeit publizierten Ergebnisse keine proliferative Wirkung von rhuEPO auf Lebertumorzellen nachgewiesen werden. Gegenüber dem beschriebenen Effekt der proliferativen, bzw. nicht-proliferativen Wirkung zeigte sich interessanterweise ein gegensätzlicher Effekt des rhuEPO auf die Zellpopulation einiger Lebertumorzellen. Für zwei der Tumorzelllinien (Hep3B / HUH7) konnte eine von der rhuEPO-Konzentration abhängige Abnahme der Zellzahl nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit rhuEPO zeigte sich eine um die zu 80 % verminderte Zellzahl gegenüber dem Ausgangswert. Der zytotoxische Effekt von rhuEPO auf Lebertumorzellen steht dabei im Kontrast zu den bisher oben genannten Ergebnissen in der Literatur, bietet aber zugleich Raum für neue Forschungsanalysen.

In welcher Relation die Abnahme der Zellzahl zur applizierten rhuEPO Konzentration steht sollten weitere Untersuchungen zeigen. Dazu war es zunächst wichtig herauszufinden, auf welchem Hintergrund die Zytotoxizität der Zellen zu begründen ist. In der Literatur ist bislang kein Beispiel für eine toxische Wirkung von rhuEPO auf humane Zellen beschrieben. Lediglich in Tierversuchen wurden die Folgen einer Überdosis von rhuEPO untersucht. Selbst bei einer 10-fachen Überdosierung konnte keine Schädigung der untersuchten Zellen gezeigt werden (142). Der Effekt einer zytotoxischen Wirkung auf Zellen ist im programmierten Zelltod zu suchen. Nach Ablauf einer Aktivierungskaskade kommt es durch Mechanismen der Apoptose, Nekrose und Autophagozytose zum Zelluntergang (98). Neben einer Vielzahl extra- und intrazellulärer Reize führen auch physikalisch-chemische Beanspruchungen, Veränderungen in Temperatur und Osmolarität, sowie Sauerstoff- und Wachstumsfaktoren zum programmierten Zelltod (98,134). Somit kommt rhuEPO ebenfalls als möglicher Induktor für Apoptose bzw. Nekrose als Erklärung für die verringerte Zellzahl in Frage. In

einem weiteren Experiment wurden die Zellen erneut mit rhuEPO stimuliert und anschließend auf typische Merkmale des induzierten Zelltods hin untersucht. Die Extraktion der DNA mit anschließender Untersuchung mittels der Gelelektrophorese zeigt bei apoptotischen Zellen das typische Bild einer sogenannten DNA-Leiter. Ebenso kann dieses Verfahren genutzt werden, um zwischen dem Prozess der Apoptose und Nekrose zu unterscheiden (133). In der DNA Gelelektrophorese zeigte sich kein Hinweis auf Apoptose bzw. Nekrose nach der Behandlung der Lebertumorzellen mit rhuEPO. Ergänzend wurde mithilfe der Durchflusszytometrie im FACS die Zellen auf ihre Größe und Granularität untersucht. Im Rahmen der Apoptose schrumpft der Zellkern und es kommt nach dem Zerfall der Plasmamembran zum Auflösen der Zelle. Die DNA wird bei diesem Prozess relativ schnell abgebaut. Physiologisch würde bei einem nekrotischen Zelluntergang das Zellvolumen zunächst anschwellen, bis die DNA schließlich, nach Verlust der Membranintegrität, abgebaut wird (91). Fluoreszierende Farbstoffe wie Propidiumiodid binden an die freiliegenden Guanin-Cytosin-Basenpaar der DNA und ermöglichen durch Detektion der Fluoreszenzmission eine Quantifizierung des DNA Gehalt der Zelle (44,131). Die untersuchten Zellen zeigten keine Variation ihres Zellvolumens gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Ebenso wurde keine vermehrt fraktionierte DNA gefunden, welche im Fall einer abgelaufenen Nekrose allgemein zu beobachten wäre. Somit konnte klar nachgewiesen werden, dass keine Aktivierung des programmierten Zelltodes (Apoptose/Nekrose) durch rhuEPO innerhalb der beobachteten Lebertumorzellen erfolgt ist. In der Aktivierungskaskade der Apoptose spielt das Enzym p53 eine zentrale Rolle. Zu beachten ist allerdings, dass einige Zellen über eine gehobene Resilienz gegenüber der p53 vermittelten Apoptose verfügen. Während Zellen von Mamma, Thymus und Niere wesentlich empfindlicher unter genotoxischem Stress auf p53 vermittelte Apoptose reagieren, findet sich bei Leberzellen eine höhere Resistenz (76). Somit korreliert das oben genannte Ergebnis mit den Angaben der Literatur, welche eine allgemeine Widerstandsfähigkeit von Leberzellen gegenüber der Apoptose beschreiben. In diesem Zusammenhang ergab die Untersuchung von DNA-Schäden am Gewebe von Thymus, Niere, Hoden und Gehirn im Mausmodel einen positiven Nachweis der Apoptose korrelierend mit einer Akkumulation von p53 an den Mitochondrien. Jedoch konnte keine dieser Reaktionen in der Leber nachgewiesen werden (37). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die

Aktivierung des p53 Enzyms in humanen Hepatozyten generell zu einem Arrest des Zellzyklus führt (104).

Implementiert man diese Erkenntnisse auf entartete, maligne Lebertumorzellen, bietet die verringerte Proliferation der Zellen nach Behandlung mit rhuEPO einen möglichen Erklärungsansatz. Zur weiteren Analyse der Zytotoxizität wurden die Lebertumorzellen mit der höchsten Signifikanz der vorherigen Versuche für mehrere Tage mit rhuEPO stimuliert und dabei das proliferative Verhalten der Zellen beobachtet. Zellen, welche mit rhuEPO behandelt wurden, verfügten über ein geringeres Proliferationspotential gegenüber dem, der unbehandelten Kontrollzellen. Die verabreichte rhuEPO Konzentration steht dabei in direkter Relation zum Proliferationsverhalten der Zellen. Während die unbehandelten Kontrollzellen ungehindert proliferieren konnten, zeigte sich bei zunehmender Konzentration mit rhuEPO eine kontinuierliche Abnahme der Proliferationsfähigkeit der Lebertumorzellen bis zum vollständigen Arrest des Zellzyklus. Somit führt eine dauerhafte rhuEPO-Stimulation zu einer verminderten Proliferation der untersuchten Tumorzelllinie und erklärt die zuvor beobachtete Zytotoxizität gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. In der Literatur finden sich bereits ähnliche Beispiele für die Tumorreduktion durch physiologische Substanzen auf der Grundlage einer Proliferationshemmung. In diesem Zusammenhang ließ sich bei Tumorzellen, welche zuvor mit dem Östrogenmetaboliten 2-Methoxyestradiol behandelt wurden ein ähnliches Ergebnis erzielen. Zu beachten ist allerdings, dass während des Östrogen-Metabolismus verschiedene Abbauprodukte mit gegensätzlicher Wirkung entstehen. Während die Oxidation am D-Ring des Steroidgerüsts eine die Proliferation stimulierende Wirkung auf Tumorzellen zeigt, bewirkt die Oxidation am A-Ring eine proliferationsinhibierende Wirkung (79). Die proliferationsinhibierende Wirkung, sowie ein antiangiogenetischer Effekt von 2-Methoxyestradiol wurde 1994 erstmalig beschrieben (42). Durch die Gabe von 2-Methoxyestradiol konnte die Proliferation von Tumorzellen eines Neuroblastom, Angiosarkom, Magen- und Mammakarzinom effektiv gehemmt werden (7,85,128). Des Weiteren konnte auch bei Lebertumorzellen des HCC eine Proliferationshemmung beobachtet werden. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte sich eine dosisabhängige Wachstumshemmung der Zellen von über 90 % nach der Behandlung mit 2-Methoxyestradiol. Als Ursache konnte eine durch 2-Methoxyestradiol induzierte

Stabilisierung von p53 in den Tumorzellen identifiziert werden. Folglich zeigte sich eine durch p53 vermittelte proliferationsinhibierende Wirkung auf die Zellen (111).

Somit lassen sich definitiv Parallelen zwischen der Wirkung von physiologischen Substanzen wie 2-Methoxyestradiol und Erythropoetin, bzw. rhuEPO, auf Lebertumorzellen ziehen. Der Vergleich mit der oben genannten Literatur zeigt, dass wie beim Beispiel von 2-Methoxyestradiol die proliferationsinhibierende Wirkung in der Aktivität von p53 zu finden ist. Für die Interpretation dieser Ergebnisse im Hinblick auf den Einfluss von rhuEPO, war es wichtig herauszufinden, welche Rolle die Aktivität von p53 in Bezug auf die geminderte Proliferation der Lebertumorzellen spielt. Die Analyse der Proteinfrafragmente von den Lebertumorzellen nach Stimulation mit rhuEPO zeigte eine mit steigender Konzentration zunehmende Expression von p53. Bei einigen Zellen konnten um bis zu 3fach höhere Werte gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen gemessen werden. Somit korreliert die zunehmende Expression von p53 mit der Proliferationshemmung der Zellen nach rhuEPO Stimulation. Generell spielt das Protein p53 in der Tumorsuppression eine zentrale Rolle. Es verfügt über die Fähigkeit bei Schäden der DNA den Zellzyklus anzuhalten und diese zu reparieren. Alternativ kann es bei irreparablen Schäden des Genoms mittels Apoptose den programmierten Zelltod induzieren. Somit wird es auch als „Wächter des Genoms“ beschrieben (70). In über 50 % der Fälle finden sich bei malignen Zellen eine mutierte Form des p53 Gens. Diese Mutation kann zu einer inaktiven Form von p53 bzw. dem kompletten Verlust desselben führen (123). Eine Mutation von p53 bewirkt, dass es seine eigentliche Funktion nicht mehr ausführen kann und entartete Zellen in ihrer Proliferation nicht gehemmt werden (82). Wie bei vielen anderen malignen Zellen konnte auch eine mutierte Form von p53 in Lebertumorzellen identifiziert werden (118). Während also bei intaktem p53 die Leberzellen nach einem Schaden nicht weiter proliferieren können (104) konnte gezeigt werden, dass es durch die mutierte Form in Lebertumorzellen zu einer ungehinderten Proliferation der Zellen kommt.

Anhand dieser Ergebnisse postulieren wir, dass die Stimulation mit rhuEPO zur gesteigerten Aktivität von intaktem p53 in ausgewählten Lebertumorzellen führt. Resultierend werden die malignen Zellen in ihrer weiteren Proliferation gehemmt. Eine Analyse der Literatur über Studien, die sich bislang mit einer ähnlichen Problematik auseinander gesetzt haben, zeigt, dass es bereits möglich ist, über eine Kontrolle von p53 das Tumorwachstum zu stoppen. Eine

Studiengruppe kontrollierte über RNA-Interferenzen die Expression von endogenen p53 in Tumorzellen des Leberkarzinoms am Mausmodell. Schon eine kurze Reaktivierung von endogenem p53 konnte eine komplette Tumorregression bewirken. Während am Modell in-vitro eine proliferative Hemmung der Zellen beobachtet werden konnte, erreichte man bereits in-vivo eine Differenzierung und Hochregulation von Zytokinen mit dem Ergebnis einer gezielten Immunantwort gegen die Tumorzellen nach vermehrter Expression von endogenem p53 (123). Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zeigt sich auch in neuen Studien, welche die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit einem HCC nach p53-Therapie beobachtet haben. Über einen Port-Katheter in der A. iliaca externa wurde den Patienten eine Infusion mit p53-Gen, Gendicine und Hydroxycamptothecin verabreicht. Nach einem Beobachtungszeitraum von insgesamt 12 Monaten zeigte sich eine signifikant höhere Überlebensrate der mit p53 behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe, welche nur mit Gendicine und Hydroxycamptothecin behandelt wurde. Vielmehr konnte auch in Korrelation zur höheren Überlebensrate eine deutliche gesteigerte Expression von p53 bei den Patienten beobachtet werden (24). Dies lässt darauf schließen, dass es durch die Infusionstherapie zu einer p53 vermittelten Regression des Tumorwachstums gekommen ist, was folglich den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen konnte.

Repetitiv besteht durch die mutierte Form von p53 in malignen Zellen eine Gefahr der ungestörten Tumorzellproliferation. Die Literatur bestätigt dabei die Möglichkeit über eine Kontrolle von p53, bzw. dessen künstliche Zufuhr, eine Tumorregression zu erreichen. Wie gezeigt werden konnte, führte auch die Behandlung von Lebertumorzellen mit rhuEPO zu einer gesteigerten Expression von p53 mit anschließend proliferativer Hemmung des Zellwachstums. Unklar ist zu diesem Zeitpunkt noch warum nur bestimmte Lebertumorzelllinien der Versuchsreihen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Ebenso ist noch nicht bekannt, über welchen Signalweg rhuEPO mit den Tumorzellen interagiert. In diesem Zusammenhang sollte man beachten, dass es noch weitere Faktoren gibt, welche das Protein p53 in seiner Funktion beeinflussen können. Das intrazelluläre Protein Mortalin gehört zu der Familie der Heatshockproteine 70 (hsp70) und interagiert mit dem Protein p53. Neben einer Vielfalt von Aufgaben, wie z.B. der Energieerzeugung und dem intrazellulären Transport (127), wurde es auch als Tumormarker für Zellen des HCC identifiziert (140). Während man Mortalin nur in geringer Konzentration bei normalen

Leberzellen nachweisen konnte, zeigte sich eine Verbindung von Mortalin mit dem mutierten p53-Protein der Lebertumorzellen. Mortalin bindet an p53, wodurch dieses in seiner Aufgabe inaktiviert wird. Die gezielte Inaktivierung von Mortalin führte zu einer Apoptose der jeweiligen Zellen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Mortalin wesentlich an dem Prozess der p53 vermittelten Apoptose beteiligt ist (84). Einige Lebertumorzellen weisen eine höhere Mortalin-Konzentration als andere Zellen auf. Interessanterweise konnte vor allem für die Zelllinien HUH7 und Hep3B eine erhöhte Konzentration von Mortalin (HSPA9) gemessen werden (140). Dieses Ergebnis korreliert mit den Zelllinien, welche nach Behandlung mit rhuEPO eine verminderte Proliferation zeigten. Aufgrund der aktuellen Datenlage ist es aber noch zu früh ausführlich über einen möglichen Zusammenhang zwischen rhuEPO und Mortalin zu diskutieren. Anhand dieser Beispiele soll aber gezeigt werden, dass es eine Vielzahl von möglichen Faktoren gibt, die den p53 vermittelten Prozess der Apoptose bzw. Proliferationshemmung beeinflussen können. Um den genauen Signalweg der rhuEPO vermittelten Proliferationshemmung von Lebertumorzellen zu entschlüsseln, werden noch weitere Studien und Experimente nötig sein.

Mit dieser Arbeit zeigt sich neben den konventionellen Chemotherapeutika zur Therapie von Leberzellkarzinomen eine neue Komponente, um die Überlebenschancen von Patienten zu verbessern. Während rhuEPO bereits präoperativ die Proliferation der Tumorzellen hemmt, führt die weitere Behandlung zu einer protektiven und fördernden Wirkung auf die gesunden Leberzellen. Speziell in Kombination mit den Ergebnissen der rhuEPO-Applikation zur Verbesserung der Regeneration von Leberzellen nach einer Lebertransplantation (49,108), ist die neoadjuvante Therapie mit rhuEPO beim Vorliegen eines malignen Leberkarzinoms von großem Interesse für die zukünftige Krebstherapie.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Neben der Anwendung von rhuEPO zur effektiven Korrektur einer Anämie finden sich bereits weitere Einsatzbereiche über seinen hämatopoetischen Effekt hinaus. In der Leberchirurgie konnte in einer präklinischen Versuchsphase rhuEPO bereits erfolgreich eingesetzt werden, um die Regenerationsfähigkeit der Leberzellen nach einer Lebertransplantation zu fördern. Neben einer verbesserten Reperfusionrate des Transplantats in-vivo bietet rhuEPO zudem einen Schutz gegen Apoptose bzw. Nekrose. Mit dem Hintergrund einer Lebertransplantation aufgrund einer malignen Genese des entarteten Lebergewebes finden sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen für den Einsatz von rhuEPO im Bereich der Onkologie. Bei einigen Zelllinien konnte nach Applikation von rhuEPO ein verstärkt proliferatives Wachstum der Tumorzellen beobachtet werden. Allerdings finden sich dazu im Kontrast weitere Studien, welche diesen Effekt nicht bestätigen konnten. Für einen erfolgreichen Einsatz von rhuEPO in der Leberchirurgie war es aufgrund dieser Ergebnisse zunächst wichtig herauszufinden, wie sich die Applikation von rhuEPO auf das proliferative Verhalten der Lebertumorzellen ausübt.

Untersucht wurden insgesamt 7 Lebertumorzelllinien sowie gesunde humane Hepatozyten. Zum Vergleich der Lebertumorzelllinien mit humanen Hepatozyten wurde die Fähigkeit der einzelnen Zellen Glukose und Harnstoff zu produzieren gemessen und miteinander verglichen. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Zellen mit verschiedenen Färbetechniken behandelt und fotografisch dokumentiert. Die Analyse der Zytotoxizität von rhuEPO wurde unter Beobachtung der Zellzahl mit einem rhuEPO-Toxizitätstest untersucht. Im weiteren Verlauf wurden mithilfe von DNA Analysen und Fluorescence activated cell sorting der DNA-Gehalt, sowie die Größe und Granularität der Zellen analysiert. Ein über mehrere Tage angesetzter Proliferationstest erlaubte die isolierte Betrachtung der Zellen in ihrem Wachstumsverhalten nach Stimulation mit rhuEPO. Komplementierend wurde anschließend zur Beurteilung der p53-Expression mit Western Blot Analysen die Proteinfragmente der Zellen isoliert und elektrophoretisch dargestellt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Stimulation von Lebertumorzellen mit rhuEPO zu einer Abnahme der Zellzahl bei einigen der Tumorzelllinien gekommen ist. Während die Zellzahl von humanen Hepatozyten bei zunehmender rhuEPO Konzentration

unverändert blieb, zeigte sich bei einigen Lebertumorzelllinien eine Abnahme der Zellzahl um bis zu 80 % gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Unter Annahme eines über rhuEPO vermittelten Zelltodes konnte kein Hinweis auf eine stattgefundenene Apoptose bzw. Nekrose in den Zellen gefunden werden. Vielmehr zeigte das mehrtägige Proliferationsverhalten der betroffenen Zellen eine Abnahme des Proliferationspotentials in Korrelation zur verabreichten rhuEPO Konzentration. Dabei wurde unter zunehmender rhuEPO Konzentration eine Abnahme der Proliferation bis hin zum vollständigen Arrest des Zellwachstums beobachtet. In Verbindung mit der verminderten Proliferation zeigte sich im Western Blot eine zunehmende Expression von p53 bei den auffälligen Lebertumorzelllinien. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es durch rhuEPO zur einer p53 vermittelten Inhibition des Zellwachstums einiger Lebertumorzelllinien kommt. Zusammen mit der chirurgischen Entfernung des Tumorgewebes wird die neoadjuvante Therapie mit rhuEPO zu einem wichtigen Aspekt für die zukünftige Therapie von malignen Lebererkrankungen.

Abschließend soll hier noch ein möglicher Ausblick zur weiteren Analyse der Ergebnisse gegeben werden. Dabei sollte vor allem beachtet werden, dass in unseren Versuchen nur bestimmte Lebertumorzelllinien durch rhuEPO in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, wie rhuEPO im Zusammenspiel mit p53 Einfluss auf das proliferative Verhalten der Zellen nimmt. Neben der Entschlüsselung eines verbindenden Signalweges wird es auch für einen gezielten Einsatz von rhuEPO wichtig sein, eine Zielstruktur zu identifizieren. Dies könnte später als Screening Methode genutzt werden, um die Zelllinien zu ermitteln, welche sensitiv auf rhuEPO reagieren. Dabei wird vor allem die Zytogenetik eine tragende Rolle spielen. Eine Chromosomenanalyse in Bezug auf das Chromosom 17p13.1, welches zuständig für das p53 Gen ist, könnte hinweisend für die Wirkung von rhuEPO auf das Proliferationsverhalten der Zellen sein. Eventuell würde sich damit auch eine Erklärung finden, warum nicht alle Zellen gleich auf rhuEPO reagieren. Während die hier gezeigten Ergebnisse an einem Versuchsmodell in-vitro durchgeführt wurden sind, ist es auch in Aussicht auf eine klinische Anwendung wichtig, die Ergebnisse zunächst am Mausmodell in-vivo zu replizieren. Der Vergleich der Ergebnisse mit Zellen eines Primärtumors ist wichtig, um die Effektivität für eine erfolgreiche in-vivo Therapie zu beweisen. Infolge der vielfältigen Effekte von rhuEPO im Organismus würde allerdings nicht nur das Wachstumsverhalten der Lebertumorzellen

beeinflusst werden. Wie beschrieben, kann die systemische Anwendung von rhuEPO u.a. auch zu einer Veränderung des Blutdrucks sowie verstärkter Angiogenese führen. Somit müssen auch die weiteren Wirkungen bzw. Nebenwirkung einer systemischen rhuEPO Therapie beobachtet werden. Um den Effekt einer neoadjuvanten Therapie mit rhuEPO im menschlichen Organismus im Gesamtüberblick zu beurteilen, werden umfassende klinische Studien nötig sein, um das volle Potential einer rhuEPO Therapie für die onkologische Chirurgie nutzen zu können.

7 Verzeichnisse

7.1 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 ZELLTYPEN UND BENÖTIGTES MEDIUM	41
TABELLE 2 FORMEL FÜR ZÄHLUNG DER ZELLEN IN NEUBAUERZÄHLKAMMER	45
TABELLE 3 HARNSTOFF STANDARDS 3FACH BESTIMMUNG	54
TABELLE 4 GLUKOSE STANDARDS 3FACH BESTIMMUNG.....	57
TABELLE 5 GLUKOSE-6-PHOSPHATASE LÖSUNG PRO WELL	60
TABELLE 6 PAS LÖSUNG PRO WELL.....	62
TABELLE 7 ÖLROT O LÖSUNG PRO WELL	63

7.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 VERTEILUNGSMUSTER DER HÄUFIGSTEN HEPATOBILIÄREN TUMORE	9
ABBILDUNG 2 KAVERNÖSES HÄMANGIOM	10
ABBILDUNG 3 FOKAL NODULÄRE HYPERPLASIE	11
ABBILDUNG 4 LEBERZELLADENOM IM MRT	12
ABBILDUNG 5 LEBERMETASTASEN	14
ABBILDUNG 6 HEPATOZELLULÄRES KARZINOM.....	16
ABBILDUNG 7 EUROTRANSPLANT WARTELISTE IN DEUTSCHLAND (41)	22
ABBILDUNG 8 REGULATION DER HIF-1EXPRESSION DURCH ZELLULÄRE SAUERSTOFFKONZENTRATION [4].....	26
ABBILDUNG 9 NEUBAUER ZÄHLKAMMER (ANSICHT UNTER MIKROSKOP)	44
ABBILDUNG 10 PERFUSIONSSCHEMA DES LEBERTEILRESEKTAT	48
ABBILDUNG 11 HARNSTOFFZYKLUS IN DER LEBER.....	50
ABBILDUNG 12 GLUKONEOGENESE DER LEBER	55
ABBILDUNG 13 GLUKOSE-6-PHOSPHATASE FÄRBUNG	58
ABBILDUNG 14 AUSPLATIEREN DER ZELLEN.....	65
ABBILDUNG 15 DPO TOX TEST KONZENTRATIONSREIHE	66
ABBILDUNG 16 PROLIFERATIONSTEST	73
ABBILDUNG 17 ENZYMATISCHE OXIDATION VON LUMINOL	78
ABBILDUNG 18 GLUKOSEMESSUNG DER LEBERTUMORZELLEN IM VERGLEICH MIT HUMANEN HEPATOZYTEN	81
ABBILDUNG 19 GLUKOSEMESSUNG DER LEBERTUMORZELLEN IM VERGLEICH MIT HUMANEN HEPATOZYTEN	81

ABBILDUNG 20 HARNSTOFFMESSUNG DER LEBERTUMORZELLEN IM VERGLEICH MIT HUMANEN HEPATOZYTEN.....	82
ABBILDUNG 21 HARNSTOFFMESSUNG DER LEBERTUMORZELLEN IM VERGLEICH MIT HUMANEN HEPATOZYTEN.....	83
ABBILDUNG 22 GLUKOSE-6-PHOSPHATASE FÄRBUNG TUMORZELLEN UND HUMANE HEPATOZYTEN	84
ABBILDUNG 23 ÖLROT-O FÄRBUNG TUMORZELLEN UND HUMANE HEPATOZYTEN.....	85
ABBILDUNG 24 PAS FÄRBUNG TUMORZELLEN UND HUMANE HEPATOZYTEN.....	86
ABBILDUNG 25 WACHSTUMSVERHALTEN HUMANER HEPATOZYTEN UND TUMORZELLEN UNTER BEHANDLUNG MIT DPO	88
ABBILDUNG 26 GELELEKTROPHORESE TUMORZELLINIE HUH7	90
ABBILDUNG 27 GELELEKTROPHORESE TUMORZELLINIEN <i>SkHep1 Hep3B HepG2 HCC-M AKN1 HCC-T</i>	91
ABBILDUNG 28 DURCHFLUSSZYTOMETRIE DER <i>HUH7 ZELLEN</i>	92
ABBILDUNG 29 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING ANALYSE	93
ABBILDUNG 30 WACHSTUMSKURVE DER <i>HUH7 ZELLEN ÜBER 4 TAGE MIT UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATION</i>	95
ABBILDUNG 31 EXPRESSION DER PROTEINE P53 UND GAPDH IN <i>HUH7 ZELLEN</i>	96
ABBILDUNG 32 EXPRESSION DER PROTEINE P53 UND GAPDH IN <i>HEP3B ZELLEN</i>	97

7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Ca	Kalzium
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
DMSO	Dimethylsulfoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
D-PBS	Dulbecco`s Phosphate Bufferd Saline
DPO	Darbepoetin
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
Em	Emission
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetin Rezeptor
Ex	Exikation
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FNH	Fokal noduläre Hyperplasie

GPC3	Glypican 3
Hb-Wert	Hämoglobin-Wert
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF	Hypoxia-inducibletranscriptionfactor
M	Molar
Mg	Magnesium
Min	Minuten
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
PAS	Periodic acid-Schiff
rhuEPO	Recombinant human Erythropoietin
Rpm	Rounds per minute
Sek	Sekunden
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vv.	Venae
μ l	Mikroliter

7.4 Literaturverzeichnis

1. Acs, G.; Xu, X.; Chu, C.; Acs, P.; Verma, A. Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma. *Cancer* 100(11):2376-2386; 2004.
2. Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282(5739):615-616; 1979.
3. Albertinen-Krankenhaus. Sonographie-Atlas II. Medizin, Albertinen-Krankenhaus, Hamburg.
<http://www.sonographiebilder.de/html/start.php?main=2&sub=10&ssub=379#>.
24.10.2011
4. Allegretta, M.; Filmus, J. Therapeutic potential of targeting glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 11(6):543-548; 2011.

5. Amer, J.; Dana, M.; Fibach, E. The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells. *Anemia* 2010:978710; 2010.
6. Andrade, J. R. D.; Baseline, J. M. hemoglobin as a predictor of risk of transfusion and response to epoetin- α in patients undergoing major orthopedic surgery. *Am J Orthoped*:25:533–546; 1996.
7. Arbiser, J. L.; Panigrathy, D.; Klauber, N.; Rupnick, M.; Flynn, E.; Udagawa, T.; D'Amato, R. J. The antiangiogenic agents TNP-470 and 2-methoxyestradiol inhibit the growth of angiosarcoma in mice. *J Am Acad Dermatol* 40(6 Pt 1):925-929; 1999.
8. Arcasoy, M. O.; Amin, K.; Karayal, A. F.; Chou, S. C.; Raleigh, J. A.; Varia, M. A.; Haroon, Z. A. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest* 82(7):911-918; 2002.
9. Balletshofer, B.; Claussen, C. D.; Lauer, U. M.; Häring, H.-U. In: *Leber und Gastrointestinaltrakt: Fallorientierte Einführung in die klinische Medizin*. Georg Thime Verlage KG Stuttgart, 2009, 216.
10. Baltes, W.; Matissek, R. *Lebensmittelchemie: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2011; 7. Auflage, 325
11. Batra, S.; Perelman, N.; Luck, L. R.; Shimada, H.; Malik, P. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest* 83(10):1477-1487; 2003.
12. Bauer, C.; Kurtz, A.; Eckardt, K. U.; Tannahill, L. Regulation of erythropoietin synthesis. *Nephron* 51 Suppl 1:3-10; 1989.
13. Belda-Iniesta, C.; Perona, R.; Carpeno Jde, C.; Cejas, P.; Casado, E.; Manguan-Garcia, C.; Ibanez de Caceres, I.; Sanchez-Perez, I.; Andreu, F. B.; Ferreira, J. A. and others. Human recombinant erythropoietin does not promote cancer growth in presence of functional receptors expressed in cancer cells. *Cancer biology & therapy* 6(10):1600-1605; 2007.
14. Bioresources, J. C. o. R. JCRB Cell Bank, Research Resources, Infrastructure, Cell Lines, Research Support System, Japan. <http://cellbank.nibio.go.jp/index.html>. 10.10.2011
15. Birth, M.; Ittel, T. H.; Pereira, P. L. *Hepatobiliäre und Pankreastumoren: Interdisziplinäres Vorgehen (Onkologie Aktuell): Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2010; 1. Auflage, 397-401; 350-362
16. Brady, H. J. M. In: *Apoptosis Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) Chapter 1: Measurement of Apoptosis by DNA Fragmentation*. Human Press, 2004, 320.
17. Buchta, M. *Das Hammerexamen: Repetitorium für den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH*, 2008; 2. Auflage, 297-298
18. Bundesvereinigung, B. u. K. *Deutsches Ärzteblatt* 47. *Deutsches Ärzteblatt* 47; 2001.
19. Burke, Z. D.; Shen, C. N.; Ralphs, K. L.; Tosh, D. Characterization of liver function in transdifferentiated hepatocytes. *J Cell Physiol* 206(1):147-159; 2006.
20. Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2):195-203; 1981.
21. Carlini, R. G.; Reyes, A. A.; Rothstein, M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 47(3):740-745; 1995.
22. Cases, A. Darbepoetin alfa: a novel erythropoiesis-stimulating protein. *Drugs Today (Barc)* 39(7):477-495; 2003.

23. Catlin, D. H.; Hatton, C. K.; Lasne, F. Abuse of recombinant erythropoietins by athletes. *Erythropoietins and Erythropoiesis* 205-227; 2003.
24. Chen, S.; Chen, J.; Ma, G.; Xi, W.; Xu, Q.; Xu, W.; Yin, G. Clinical Therapeutic Effect and Biological Monitoring of p53 Gene in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Am J Clin Oncol*; 2011.
25. Collections, H. P. A. C. Health Protection Agency. <http://www.hpacultures.org.uk/>. 10.10.2011
26. Collections, H. P. A. C. Health Protection Agency Culture Collections. <http://www.hpacultures.org.uk>. 25.04.2011
27. Colletti, L. M.; Kunkel, S. L.; Walz, A.; Burdick, M. D.; Kunkel, R. G.; Wilke, C. A.; Strieter, R. M. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 23(3):506-514; 1996.
28. Dancygier, H. *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002; 1. Auflage, 17-26
29. Dancygier, H. *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002; 1. Auflage, 147-149, 746-785
30. Denk, H.; Dillmann, J. *Pathologie der Leber und Gallenwege (Spezielle pathologische Anatomie)*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999; 2. Auflage, 841-842
31. Dettmer, U.; Folkerts, M.; Kächler, E.; Sönnichsen, A. *Intensivkurs Biochemie*: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2005; 1. Auflage, 548
32. Dillard, D. G.; Venkatraman, G.; Cohen, C.; Delgado, J.; Gal, A. A.; Mattox, D. E. Immunolocalization of erythropoietin and erythropoietin receptor in vestibular schwannoma. *Acta Otolaryngol* 121(2):149-152; 2001.
33. Docherty, J. R. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). *Br J Pharmacol* 154(3):606-622; 2008.
34. Dooley, P. D. r. n. S. *Molekulare Hepatologie*. Mannheim.
35. Dudeck, O.; Ricke, J. *Advances in regional chemotherapy of the liver*. *Expert Opin Drug Deliv*; 2011.
36. Eckardt, K. U.; Kurtz, A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest* 35 Suppl 3:13-19; 2005.
37. Erster, S.; Mihara, M.; Kim, R. H.; Petrenko, O.; Moll, U. M. In Vivo Mitochondrial p53 Translocation Triggers a Rapid First Wave of Cell Death in Response to DNA Damage That Can Precede p53 Target Gene Activation. *Molecular and Cellular Biology* 24(15):6728-6741; 2004.
38. Eschbach, J. W.; Egrie, J. C.; Downing, M. R.; Browne, J. K.; Adamson, J. W. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 316(2):73-78; 1987.
39. Fang, Y. W.; Chang, C. H. Subcutaneous administration of darbepoetin alfa effectively maintains hemoglobin concentrations at extended dose intervals in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 29(2):199-203; 2009.
40. FDA, U. S. F. a. D. A. Information for Healthcare Professionals: Erythropoiesis Stimulating Agents (ESA) [Aranesp (darbepoetin), Epogen (epoetin alfa), and Procrit (epoetin alfa)]. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm126481.htm>. 8.12.2011

41. Fisher, J. W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* (Maywood) 228(1):1-14; 2003.
42. Fotsis, T.; Zhang, Y.; Pepper, M. S.; Adlercreutz, H.; Montesano, R.; Nawroth, P. P.; Schweigerer, L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* 368(6468):237-239; 1994.
43. Foundation, E. I. Eurotransplant Deutschland. http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=pat_germany. 08.10.2011
44. Freshney, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques and Specialized Applications*: John Wiley & Sons, 2010; 6. Auflage, 234-236
45. Fridman, J. S.; Lowe, S. W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22(56):9030-9040; 2003.
46. Ganten, D.; Ruckpaul, K.; Ruiz-Torres, A. *Molekularmedizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen (Molekulare Medizin)*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004; 1. Auflage, 75
47. Gerok, W.; Huber, C.; Meinertz, T.; Zeidler, H. *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*: Schattauer, F.K. Verlag GmbH, 2007; 11. Auflage, 692-700
48. Gewirtz, D. A.; Di, X.; Walker, T. D.; Sawyer, S. T. Erythropoietin fails to interfere with the antiproliferative and cytotoxic effects of antitumor drugs. *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 1):2232-2238; 2006.
49. Greif, F.; Ben-Ari, Z.; Taya, R.; Pappo, O.; Kurtzwald, E.; Cheporko, Y.; Ravid, A.; Hochhauser, E. Dual effect of erythropoietin on liver protection and regeneration after subtotal hepatectomy in rats. *Liver Transpl* 16(5):631-638; 2010.
50. Gupta, S.; Singh, P. K.; Bisth, S. S.; Bhatt, M. L.; Pant, M.; Gupta, R.; Singh, S.; Negi, M. P. Role of recombinant human erythropoietin in patients of advanced cervical cancer treated "by chemoradiotherapy". *Cancer Biol Ther* 8(1):13-17; 2009.
51. Heilmann, J.; MD. Multiple Liver Metastases. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/MultipleLiverMets2008.jpg>.
52. Henne-Bruns, D.; Kremer, B.; Dürig, M. *Duale Reihe Chirurgie*: Georg Thime Verlage KG Stuttgart, 2007; 3. Auflage, 487-489
53. Henry, D. H.; Beall, G. N.; Benson, C. A.; Carey, J.; Cone, L. A.; Eron, L. J.; Fiala, M.; Fischl, M. A.; Gabin, S. J.; Gottlieb, M. S. and others. Recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection and zidovudine therapy. Overview of four clinical trials. *Ann Intern Med* 117(9):739-748; 1992.
54. Herold, G. *Innere Medizin: Herold und Mitarbeiter*, 2009 485-490, 530-532
55. Hinkel, J. M.; Li, E. C.; Sherman, S. L. Insights and perspectives in the clinical and operational management of cancer-related anemia. *J Natl Compr Canc Netw* 8 Suppl 7:S38-55; 2010.
56. Ho, M. Advances in liver cancer antibody therapies: a focus on glypican-3 and mesothelin. *BioDrugs* 25(5):275-284; 2011.
57. Hoogsteen, I. J.; Peeters, W. J.; Marres, H. A.; Rijken, P. F.; van den Hoogen, F. J.; van der Kogel, A. J.; Kaanders, J. H. Erythropoietin receptor is not a surrogate marker for tumor hypoxia and does not correlate with survival in head and neck squamous cell carcinomas. *Radiother Oncol* 76(2):213-218; 2005.
58. Huynh, H.; Ong, R. W.; Li, P. Y.; Lee, S. S.; Yang, S.; Chong, L. W.; Luu, D. A.; Jong, C. T.; Lam, I. W. Targeting receptor tyrosine kinase pathways in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 11(6):560-575; 2011.

59. JCRB. Japanese Collection of Research Bioresources. <http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0403.htm>. 25.04.11
60. Jelkmann, W. Erythropoiesis stimulating agents and techniques: a challenge for doping analysts. *Curr Med Chem* 16(10):1236-1247; 2009.
61. Kammula, U. S.; Buell, J. F.; Labow, D. M.; Rosen, S.; Millis, J. M.; Posner, M. C. Surgical management of benign tumors of the liver. *Int J Gastrointest Cancer* 30(3):141-146; 2001.
62. Karow, T.; Lang-Roth, R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Dr. med. Thomas Karow*, 2010; 16. Auflage, 828
63. Kim, M. S.; Seo, Y. K.; Park, H. J.; Lee, K. H.; Choi, E. J.; Kim, J. K.; Chung, H. L.; Kim, W. T. The neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin via an antiapoptotic mechanism on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Korean J Pediatr* 53(10):898-908; 2010.
64. Klintmalm, G. B. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report of the impact of tumor characteristics on outcome. *Ann Surg* 228(4):479-490; 1998.
65. Knobloch, D.; Ehnert, S.; Schyschka, L.; Buchler, P.; Schoenberg, M.; Kleeff, J.; Thasler, W. E.; Nussler, N. C.; Godoy, P.; Hengstler, J. and others. Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Methods Mol Biol* 806:99-120; 2012.
66. Knowles, B. B.; Howe, C. C.; Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209(4455):497-499; 1980.
67. Lacombe, C.; Mayeux, P.; Casadevall, N. Overview of erythropoietin. *Nephrologie* 12(5):221-226; 1991.
68. LaMontagne, K. R.; Butler, J.; Marshall, D. J.; Tullai, J.; Gechtman, Z.; Hall, C.; Meshaw, A.; Farrell, F. X. Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models. *Mol Cancer Ther* 5(2):347-355; 2006.
69. Lan, V. T.; Loan, P. T.; Duong, P. A.; Thanh le, T.; Ha, N. T.; Thuan, T. B. Straightforward procedure for laboratory production of DNA ladder. *J Nucleic Acids* 2012:254630; 2012.
70. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381):15-16; 1992.
71. Lang, G. In: *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik Chapter J: Kohlenhydratdarstellung - Perjud-Acid-Schiff'sche Reaktion nach McMannus*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016, 427.
72. Lang, H.; von Woellwarth, J.; Oldhafer, K. J.; Behrend, M.; Schlitt, H. J.; Nashan, B.; Pichlmayr, R. Liver transplantation in patients with polycystic liver disease. *Transplant Proc* 29(7):2832-2833; 1997.
73. Laugsch, M.; Metzen, E.; Svensson, T.; Depping, R.; Jelkmann, W. Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines. *Int J Cancer* 122(5):1005-1011; 2008.
74. Lawrence, T. S.; Robertson, J. M.; Anscher, M. S.; Jirtle, R. L.; Ensminger, W. D.; Fajardo, L. F. Hepatic toxicity resulting from cancer treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31(5):1237-1248; 1995.
75. Layer, G.; Kaick, G. v.; Delorme, S. *Radiologische Diagnostik in der Onkologie: Band 2: Gastrointestinalum, Urogenitaltrakt, Retroperitoneum*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007; 1. Auflage, 86-88, 99-116

76. Leu, J. I.; George, D. L. Hepatic IGFBP1 is a prosurvival factor that binds to BAK, protects the liver from apoptosis, and antagonizes the proapoptotic actions of p53 at mitochondria. *Genes Dev* 21(23):3095-3109; 2007.
77. Leyland-Jones, B.; Semiglazov, V.; Pawlicki, M.; Pienkowski, T.; Tjulandin, S.; Manikhas, G.; Makhson, A.; Roth, A.; Dodwell, D.; Baselga, J. and others. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol* 23(25):5960-5972; 2005.
78. Lindl, T.; Gstraunthaler, G. *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank: Spektrum Akademischer Verlag, 2008; 5. Auflage, 316*
79. Lippert, T. H.; Seeger, H.; Mueck, A. O. The significance of estrogen metabolism for hormone-dependent neoplasms from the clinical-pharmacological viewpoint. *Arzneimittelforschung* 49(8):649-662; 1999.
80. Llovet, J. M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J. F.; de Oliveira, A. C.; Santoro, A.; Raoul, J. L.; Forner, A. and others. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* 359(4):378-390; 2008.
81. Loka, T.; Tsuruoka, S.; Ito, C.; Iwaguro, H.; Asahara, T.; Fujimura, A.; Kusano, E. Hypertension induced by erythropoietin has a correlation with truncated erythropoietin receptor mRNA in endothelial progenitor cells of hemodialysis patients. *Clin Pharmacol Ther* 86(2):154-159; 2009.
82. Lowe, S. W.; Cepero, E.; Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432(7015):307-315; 2004.
83. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275; 1951.
84. Lu, W. J.; Lee, N. P.; Kaul, S. C.; Lan, F.; Poon, R. T.; Wadhwa, R.; Luk, J. M. Induction of mutant p53-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma by targeting stress protein mortalin. *International journal of cancer. Journal international du cancer*; 2010.
85. Lui, W. Y.; Lin, H. L.; Chau, G. Y.; Liu, T. Y.; Chi, C. W. Male predominance in hepatocellular carcinoma: new insight and a possible therapeutic alternative. *Med Hypotheses* 55(4):348-350; 2000.
86. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie: Georg Thime Verlage KG Stuttgart, 2009; 3. Auflage, 400-406*
87. Macdougall, I. C. Darbepoetin alfa: a new therapeutic agent for renal anemia. *Kidney Int Suppl* (80):55-61; 2002.
88. Mason-Garcia, M.; Beckman, B. S.; Brookins, J. W.; Powell, J. S.; Lanham, W.; Blaisdell, S.; Keay, L.; Li, S. C.; Fisher, J. W. Development of a new radioimmunoassay for erythropoietin using recombinant erythropoietin. *Kidney Int* 38(5):969-975; 1990.
89. May, P.; May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18(53):7621-7636; 1999.
90. McKeown, C. M.; Edwards, V.; Phillips, M. J.; Harvey, P. R.; Petrunka, C. N.; Strasberg, S. M. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 46(2):178-191; 1988.
91. Modrow, S.; Falke, D.; Schätzl, H.; Truyen, U. In: *Molekulare Virologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 37-38.*

92. Moll, K.-J.; Moll, M. In: Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2005, 519-521.
93. Nordlinger, B.; Van Cutsem, E.; Gruenberger, T.; Glimelius, B.; Poston, G.; Rougier, P.; Sobrero, A.; Ychou, M. Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendations from an expert panel. *Ann Oncol* 20(6):985-992; 2009.
94. Nussler, A. K.; Nussler, N. C.; Merk, V.; Brulport, M.; Schormann, W.; Yao, P.; Hengstler, J. G. In: Strategies in Regenerative Medicine Chapter 9: The Holy grail of hepatocyte culturing and therapeutic use. Ed. M. Santin University of Brighton Springer Internatinoal Germany, USA, ed.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009, 283-320.
95. Nussler, A. K.; Vergani, G.; Gollin, S. M.; Dorko, K.; Morris, S. M., Jr.; Demetris, A. J.; Nomoto, M.; Beger, H. G.; Strom, S. C. Isolation and characterization of a human hepatic epithelial-like cell line (AKN-1) from a normal liver. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35(4):190-197; 1999.
96. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17):5421-5426; 2000.
97. Paragh, G.; Kumar, S. M.; Rakosy, Z.; Choi, S.-C.; Xu, X.; Acs, G. RNA Interference-Mediated Inhibition of Erythropoietin Receptor Expression Suppresses Tumor Growth and Invasiveness in A2780 Human Ovarian Carcinoma Cells. *The American Journal of Pathology* 174(4):1504-1514; 2009.
98. Portt, L.; Norman, G.; Clapp, C.; Greenwood, M.; Greenwood, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta* 1813(1):238-259; 2011.
99. Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. *Duale Reihe Biochemie: Georg Thime Verlage KG Stuttgart*, 2008; 2. Auflage, 145-149, 212-220
100. Rassow, W.; K, H.; R, N.; R, D. *Duale Reihe Biochmie: Georg Thime Verlage KG Stuttgart*, 2008; 2. Auflage, 147
101. Remmele, W.; Bubendorf, L.; Feichter, G. E.; Obermann, E. C.; Dalquen, P. *Pathologie: Zytopathologie: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2010; 3. Auflage, 418-428
102. Richter, E.; Feyerabend, T. *Grundlagen der Strahlentherapie: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2002; 2. Auflage, 271-278
103. Riede, U. N.; Werner, M.; Freudenberg, N. *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2009; 1. Auflage, 403-405
104. Ringshausen, I.; O'Shea, C. C.; Finch, A. J.; Swigart, L. B.; Evan, G. I. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell* 10(6):501-514; 2006.
105. Robak, T. Clinical applications of erythropoietin. *Acta Haematol Pol* 25(2 Suppl 1):112-123; 1994.
106. Sahm, S.; Caspary, W. F. *Gastroenterologische Onkologie: klinischer Leitfaden für Diagnostik und Therapie: Schattauer, F.K. Verlag GmbH*, 2003; 2. Auflage, 82-82
107. Saito, H.; Morizane, T.; Watanabe, T.; Kagawa, T.; Iwabuchi, N.; Kumagai, N.; Inagaki, Y.; Tsuchimoto, K.; Tsuchiya, M. Establishment of a human cell line (HCC-T) from a patient with hepatoma bearing no evidence of hepatitis B or A virus infection. *Cancer* 64(5):1054-1060; 28.06.2006.

108. Schmeding, M.; Hunold, G.; Ariyakhagorn, V.; Rademacher, S.; Boas-Knoop, S.; Lippert, S.; Neuhaus, P.; Neumann, U. P. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transpl Int* 22(7):738-746; 2009.
109. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur: Spektrum Akademischer Verlag*, 2011; 3. Auflage, 206
110. Schölmerich, J. *Medizinische Therapie: 2007/2008: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2007; 3. Auflage, 837-845
111. Schumacher, G.; Scheunert, S.; Rueggeberg, A.; Bachem, M. G.; Nussler, A. K.; Spinelli, A.; Mukhopadhyay, T.; Pratschke, J.; Neuhaus, P. A very low toxic agent induces apoptosis and reduces growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Gastroenterol Hepatol* 21(7):1207-1212; 2006.
112. Schyschka, L.; Rudy, A.; Jeremias, I.; Barth, N.; Pettit, G. R.; Vollmar, A. M. Spongistatin 1: a new chemosensitizing marine compound that degrades XIAP. *Leukemia* 22(9):1737-1745; 2008.
113. Selzer, E.; Wacheck, V.; Kodym, R.; Schlagbauer-Wadl, H.; Schlegel, W.; Pehamberger, H.; Jansen, B. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanoma Res* 10(5):421-426; 2000.
114. Sengupta, S.; Harris, C. C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):44-55; 2005.
115. Serracino-Inglott, F.; Habib, N. A.; Mathie, R. T. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 181(2):160-166; 2001.
116. Sgouros, J.; Cast, J.; Garadi, K. K.; Belechri, M.; Breen, D. J.; Monson, J. R.; Maraveyas, A. Chemotherapy plus percutaneous radiofrequency ablation in patients with inoperable colorectal liver metastases. *World J Gastrointest Oncol* 3(4):60-66; 2011.
117. Siewert, J. R.; Rothmund, M.; Schumpelick, V. *Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2010; 2. Auflage, 595-638
118. Staib, F.; Hussain, S. P.; Hofseth, L. J.; Wang, X. W.; Harris, C. C. TP53 and liver carcinogenesis. *Human Mutation* 21(3):201-216; 2003.
119. Stange, B. J., Glanemann, M., Nuessler, N. C., Settmacher, U., Steinmuller, T., Neuhaus, P. Hepatic artery thrombosis after adult liver transplantation. *Liver Transpl* 9(6):612-620; 2003.
120. Thieme, D.; Hammersbach, P. *Handbook of Experimental Pharmacology - Doping in sports: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2009; 1. Auflage, 252-253
121. Thomas, C. *Spezielle Pathologie: Schattauer, F.K. Verlag GmbH*, 1996; 3. Auflage, 273-275
122. Tiller, F.-W.; Stein, B. *Das klinische Labor: Hüthig Jehle Rehm*, 2005; 2. Auflage, 59-59
123. Toledo, F.; Wahl, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6(12):909-923; 2006.
124. Universitätsspital-Zürich. Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie. http://www.vis.usz.ch/PATIENTENUNDBESUCHER/LEBERGALLENWEGE/GUTARTIGE_LEBERTUMOREN/Seiten/GutartigeLebertumorenFNH.aspx. 07.10.2011
125. Vaziri, N. D. Cardiovascular effects of erythropoietin and anemia correction. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10(5):633-637; 2001.
126. Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310; 2000.
127. Wadhwa, R.; Taira, K.; Kaul, S. C. Mortalin: a potential candidate for biotechnology and biomedicine. *Histol Histopathol* 17(4):1173-1177; 2002.

128. Wassberg, E. Angiostatic treatment of neuroblastoma. *Ups J Med Sci* 104(1):1-24; 1999.
129. Watanabe, T.; Morizane, T.; Tsuchimoto, K.; Inagaki, Y.; Munakata, Y.; Nakamura, T.; Kumagai, N.; Tsuchiya, M. Establishment of a cell line (HCC-M) from a human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 32(2):141-146; 17.07.2006.
130. Westenfelder, C.; Baranowski, R. L. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 58(2):647-657; 2000.
131. Wink, M. *Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011; 2. Auflage, 199
132. Wong, L. L.; Tanaka, K.; Lau, L.; Komura, S. Pre-transplant treatment of hepatocellular carcinoma: assessment of tumor necrosis in explanted livers. *Clin Transplant* 18(3):227-234; 2004.
133. Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756):555-556; 1980.
134. Wyllie, A. H. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol* 42(1):4-9; 2010.
135. Xue, W.; Zender, L.; Miething, C.; Dickins, R. A.; Hernando, E.; Krizhanovsky, V.; Cordon-Cardo, C.; Lowe, S. W. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445(7128):656-660; 2007.
136. Yamamoto, S.; Shimizu, K.; Oonishi, I.; Hasebe, K.; Takamura, H.; Inoue, T.; Muraoka, K.; Tani, T.; Hashimoto, T.; Yagi, M. Genistein suppresses cellular injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation proceedings* 28(2):1111-1115; 1996.
137. Yan, B.; Wei, J. J.; Qian, Y. M.; Zhao, X. L.; Zhang, W. W.; Xu, A. M.; Zhang, S. H. Expression and clinicopathologic significance of glypican 3 in hepatocellular carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 15(3):162-169; 2011.
138. Yasuda, Y.; Fujita, Y.; Masuda, S.; Musha, T.; Ueda, K.; Tanaka, H.; Fujita, H.; Matsuo, T.; Nagao, M.; Sasaki, R. and others. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis* 23(11):1797-1805; 2002.
139. Yasuda, Y.; Fujita, Y.; Matsuo, T.; Koinuma, S.; Hara, S.; Tazaki, A.; Onozaki, M.; Hashimoto, M.; Musha, T.; Ogawa, K. and others. Erythropoietin regulates tumor growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 24(6):1021-1029; 2003.
140. Yi, X.; Luk, J. M.; Lee, N. P.; Peng, J.; Leng, X.; Guan, X. Y.; Lau, G. K.; Beretta, L.; Fan, S. T. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics* 7(2):315-325; 2008.
141. Yilmaz, S.; Ates, E.; Tokyol, C.; Pehlivan, T.; Erkasap, S.; Koken, T. The protective effect of erythropoietin on ischaemia/reperfusion injury of liver. *HPB (Oxford)* 6(3):169-173; 2004.
142. Zhang, J. F.; Wu, Y. L.; Xu, J. Y.; Ye, W.; Zhang, Y.; Weng, H.; Shi, W. D.; Xu, G. X.; Lu, L.; Dai, W. and others. Pharmacokinetic and toxicity study of intravitreal erythropoietin in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 29(11):1383-1390; 2008.